

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE
TRANSPORTADORES DE FOSFATO EM CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp.)**

RAUL SANTIN ALMEIDA

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2002

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE
TRANSPORTADORES DE FOSFATO EM CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum* spp.)**

RAUL SANTIN ALMEIDA

Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. Dr. **ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências, Área de Concentração: Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo – Brasil
Dezembro – 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Almeida, Raul Santin

Identificação e caracterização de genes de transportadores de fósforo em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) / Raul Santin Almeida. - - Piracicaba, 2002.

76 p. : il.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.

Bibliografia.

1. Cana-de-açúcar 2. Genes 3. Genoma 4. Fósforo 5. Simbiose I. Título

CDD 633.61

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

À minha mãe Dulce Werneck Almeida e minha família, pelo amor e carinho dedicados e pelo exemplo de vida. Em especial à minha Dany que muito tem me dado força durante minha caminhada e a cada dia Amo mais.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr Antonio Figueira pela oportunidade, pela orientação, confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira pela amizade, força, e orientação durante a realização deste trabalho;

Ao Pesquisador Dr. Eugênio César Ulian, pela credibilidade, apoio e amizade.

Aos colegas de laboratório Angela, Anileda, Arthur, Carlos, Cristiane, Daniela, Deborah, Sr. & Sra. Kido, Gildemberg, Henrique, Jonny, Luis César, Lorena, Mariana, Matheus, Rafael, Rodrigo, Silvana, Tercílio, Thiago;

A TODOS os colegas de curso pela amizade apoio e solidariedade;

À todos meus amigos do Melhoramento de Plantas I e II do CENA.;

Aos amigos e profissionais do CENA e da ESALQ;

À COPERSUCAR pelo apoio e suporte técnico e hospitalidade.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade de realização do curso de mestrado;

À FAPESP, pelo suporte através de concessão de bolsa de estudo de mestrado e pelo auxílio financeiro à execução do projeto.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 O fósforo.....	4
2.2 Fósforo e outro nutrientes.....	5
2.3 Fósforo e o ambiente.....	6
2.4 Absorção de fosfato pelas plantas.....	7
2.4.1 Simbiose na absorção de fosfato.....	9
2.4.2 Transportadores de fosfato.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1 Análise comparativa e anotação de genes TP.....	15
3.2 Seqüenciamento.....	16
3.3 Análise de seqüências.....	16
3.4 Produção de sondas.....	17
3.4.1 Seleção de clones EST.....	17
3.4.2 Isolamento de sondas com e nzimas de restrição.....	17
3.4.3 Purificação das sondas de produtos de PCR.....	18
3.5 Extração de DNA genômico de cana-de-açúcar.....	18
3.6 Teste de sondas via <i>Dot Blot</i>	19
3.6.1 Marcação de sonda.....	20

3.6.2 Hibridização não radioativa.....	20
3.6.3 Geração e detecção de sinal.....	21
3.7 <i>Southern</i>	21
3.7.1 Método não radiativo.....	21
3.8 Material vegetal e propagação.....	22
3.9 Experimentos para indução de expressão de genes TP.....	22
3.9.1 Experimento I: indução da expressão temporal de TP.....	22
3.9.2 Experimento II: expressão de TP em função de 6 doses de fosfato..	23
3.9.3 Experimento III: expressão de TP em função de 3 doses de fosfato..	23
3.10 Extração de RNA.....	24
3.10.1 Preparo de material livre de RNase.....	24
3.10.2 Extração de RNA de folhas e raízes.....	25
3.10.3 Quantificação de RNA.....	25
3.11 <i>Northern</i> radioativo	26
3.11.1 Marcação de sonda [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP.....	26
3.11.2 Hibridização sem formamida.....	27
3.11.3 Hibridização com formamida.....	28
3.12 Análise estatística.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Identificação e anotação de genes TP.....	29
4.2 Sequenciamento.....	39
4.3 Produção de sondas dos clones EST.....	43
4.3.1 Purificação de clones via produtos de PCR.....	47
4.4 Extração de DNA genômico de cana-de-açúcar.....	48
4.4.1 <i>Dot Blot</i>	48
4.5 <i>Souther Blot</i>	52
4.6 Material vegetal e hidroponia.....	57
4.7 Indução da deficiência de fósforo.....	58
4.7.1 Experimento I: indução da expressão temporal de TP.....	58
4.7.2 Experimento II: e xpressão de TP em função de 6 doses de fosfato..	61

4.7.3 Experimento III: expressão de tp em função de 3 doses de fosfato.....	64
4.8 Extração de RNA.....	65
4.9 <i>Northern Blot</i>	65
5. CONCLUSÕES.....	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Marcador de peso molecular
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
$[\text{}^{32}\text{P}\alpha]\text{-dCTP}$	Citosina marcada com ^{32}P
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA complementar ao mRNA
CDP-Start	Dioxetano
<i>Cluster</i>	Agrupamento de seqüências de DNA
CTAB	Brometo de hexadiltrimetilamônio
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EST	Região de seqüência expressa (<i>expressed sequence tag</i>)
mg	Miligrama
MilliQ	Água destilada deionizada e estéril
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-[N-Morfolino] propaneusulfônico
NCBI	Centro Nacional de Informação Biotecnológica
ng	Nanograma
ORF	Seqüência de leitura aberta (<i>open reading frame</i>)
PCR	Reação em cadeia da Polimerase

<i>Primer</i>	Iniciador
RNA	Ácido ribonucléico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	Citrato de sódio

**IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE
TRANSPORTADORES DE FÓSFORO EM CANA-DE-AÇÚCAR
(*Saccharum spp.*)**

Autor: RAUL SANTIN ALMEIDA

Orientador: Prof. Dr. ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA

RESUMO

O Brasil é responsável por 25% da produção mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), e a importância econômica desta cultura está relacionada ao seu crescente consumo como fonte de energia e açúcar. Os programas de melhoramento genético tradicionais esbarram na complexidade do seu genoma, consequência de sua origem multi-espécie e poliploidia. A disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) nos agroecossistemas é uma das maiores limitações para o crescimento e produção vegetal, pois a absorção de Pi pelas raízes ocorre em função das oscilações de fósforo lábil no solo e contra um gradiente elétrico e de concentração. Para a produção agrícola intensiva, usam-se largamente fontes inorgânicas e orgânicas de fósforo, mas parte desse Pi não é recuperado do solo, pois cerca de 80% torna-se adsorvido ou complexado na fração orgânica, junto com resíduos de metais pesados (ex: Zn, Cd, Ni ou Cu). Os genes transportadores de baixa afinidade são expressos constitutivamente e operam sob maiores concentrações de Pi disponível. As seqüências de genes transportadores de Pi (TP) de alta afinidade já descritos (*PHO84* de *S. cerevisiae*; *PHO-5* de *N. crassa*; *GvPT* de *G. versiforme*; *AtPT1* e *AtPT2* de *A. thaliana*; *LePT1* e *LePT2* de *L. esculentum*; *StPT1* e *StPT2* de *S. tuberosum*) codificam uma proteína transportadora de Pi com 12 domínios transmembrana conservados. A expressão em plantas ocorre preferencialmente no sistema radicular, sob deficiência de fósforo. Utilizando as seqüências desses genes de TP descritos, identificou-se no banco de dados do genoma de cana-de-açúcar

seqüências ESTs destes transportadores, destacando-se o *cluster* SCEQRT1028B07.g, com o cDNA completo de transportadores de fosfato de alta afinidade, cuja seqüência deduzida produziu uma proteína de 541 aminoácidos, com 12 domínios trans-membrana, característicos destes transportadores de fosfato.

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PHOSPHATE TRANSPORTERS GENES IN SUGARCANE (*Saccharum* spp.)

Author: RAUL SANTIN ALMEIDA

Adviser: Prof. Dr. ANTONIO VARGAS DE OLIVEIRA FIGUEIRA

SUMMARY

Brazil is responsible for 25% of the world production of sugarcane (*Saccharum* spp.), and the economic importance of this crop is related to its increasing use as energy source and sugar. Traditional genetic breeding programs are hampered by the genomic complexity, derived from its multi-specific origin and polyploidy. The availability of inorganic phosphorus (Pi) in agri-ecosystems is one of the largest limitation for plant growth and yield, because Pi uptake by the roots depends on the variation of the concentration of labile phosphorus in the soil and against an electric and concentration gradient. For intensive agriculture, inorganic and organic sources of phosphorus are largely used, but part of this Pi is not recovered from the soil, because around 80% becomes adsorbed or complexed to the organic fraction, together with heavy metals residues (ex: Zn, Cd, Ni or Cu). Genes of low affinity phosphate transporters are constitutively expressed and work under higher concentrations of available Pi. Sequences of high affinity phosphate transporters already described (*PHO84* of *Saccharomyces cerevisiae*; *PHO-5* of *Neurospora crassa*; *GvPT* of *Glomus versiforme*; *AtPT1* and *AtPT2* of *Arabidopsis thaliana*; *LePT1* and *LePT2* of *Lycopersicon esculentum*; *StPT1* and *StPT2* of *Solanum tuberosum*) encoded a Pi transporter protein with 12 conserved transmembrane domains. Their expression in plants occur

preferentially ion roots under phosphorous deficiency. Using the sequences of these high affinity phosphate transporter genes, ESTs sequences with high identity were identified in the sugarcane genome project, especially the *cluster* SCEQRT1028B07.g, with a complete cDNA, which deduced sequence coded for a protein with 541 amino acids, and 12 transmembrane domains, typical of these transporters.

1 INTRODUÇÃO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) foi introduzida nas Américas na primeira metade do século XVI, tornando-se a monocultura mais antiga explorada no Brasil. As cultivares de cana-de-açúcar foram desenvolvidas pelo processo de nobilitação, caracterizado por hibridações interespecíficas, seguidas de retrocruzamentos com o genitor considerado nobre (*S. officinarum*), envolvendo dentre outras *S. barberi*, *S. sinense*, e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum*, que contribuem com 5 a 15% do número de cromossomos das cultivares modernas (Simmonds, 1976). Segundo Ingelbrecht et al. (1999), em virtude de sua origem múltipla, a cana-de-açúcar possui um dos genomas mais complexos do reino vegetal, apresentando um nível variável de ploidia (geralmente de $5x$ a $14x$, em que $x = 5, 6, 8, 10, 12$ ou 14). Essa complexidade dificulta a aplicação de técnicas de melhoramento genético convencional.

Hoje, a cana-de-açúcar ocupa um lugar de destaque na agricultura por sua importância econômica, sendo uma das espécies vegetais mais cultivadas no mundo, alcançando mais de 80 países. Estimou-se que a área total cultivada foi de 18 milhões de hectares em 1995. Esse número continua crescendo em função do aumento do seu consumo como fonte de energia (etanol e eletricidade) e açúcar. O Brasil produziu cerca de 350 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, com rendimento médio de 70 ton ha^{-1} na safra 2001/2002 (www.agricultura.gov.br/spa/spa_01.htm), o que corresponde a cerca de 25% do total mundial, consagrando-se assim como o maior produtor de cana-de-açúcar e maior exportador de açúcar do mundo (10,9 milhões de toneladas), quase o dobro da Rússia, o segundo maior exportador. O Estado de São Paulo é responsável por cerca de 60% da produção nacional de cana-de-açúcar, seguido pelo estado de Alagoas e Paraná (www.prossiga.br/basededados). No setor sucro-alcooleiro, as 308 indústrias em

atividade, sendo 81 destilarias autônomas e 227 usinas de açúcar e álcool, movimentam o equivalente a 12,7 bilhões de reais.ano⁻¹ de faturamento direto e indireto, contribuindo com 2,3% do Produto Interno Bruto, destacando o Brasil como único país a implantar um combustível alternativo ao petróleo, em larga escala (www.jornalcana.com.br).

Devido à sua grande importância no contexto social e econômico, existem investimentos em pesquisas para obtenção de novas variedades, mais produtivas e resistentes a estresses bióticos e abióticos. Uma tendência é buscar variedades produtivas que agreguem melhoria de resposta econômica, uma vez que a cultura da cana-de-açúcar é uma das maiores consumidoras de adubos, chegando a 20% do total de insumos comercializados no Brasil (www.prossiga.br/basededados). A necessidade de utilizar novas tecnologias para facilitar o melhoramento genético, levou a criação de vários projetos que têm por objetivo estudar e seqüenciar genes da cana-de-açúcar. Esses projetos estão sendo conduzidos na Austrália, África do Sul, França e Estados Unidos da América (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/>). No Brasil, o Projeto Genoma da Cana-de-açúcar (*Sugarcane EST Project - SUCEST*) sequenciou e analisou 238.000 etiquetas de seqüências expressas (*expressed sequence tag – EST*) de 26 bibliotecas de cDNA oriundas de diversos tecidos e órgãos, em vários estágios de desenvolvimento.

Um dos maiores entraves para a produção agrícola no mundo é a baixa disponibilidade de fósforo inorgânico (Pi) no solo, o qual se encontra, em concentrações da ordem de 2 µM, enquanto que nos tecidos vegetais é de 10 mM (Mimura et al., 1999). Pelo fato do Pi não se encontrar sempre prontamente lábil, tem sido observadas diferentes cinéticas de absorção de fosfato em condições naturais (Ozane, 1980). As plantas têm evoluído de forma adaptativa, utilizando os mais variados mecanismos morfológicos, fisiológicos, metabólicos, moleculares e simbióticos para conviver nessas condições (Raghothama, 1999). As atividades humanas, de forma análoga, lançam mão de fertilizantes como estratégia alternativa para aumentar a disponibilidade de fósforo para as plantas. Investigações fisiológicas revelaram a existência de dois mecanismos de absorção de Pi, um de baixa afinidade, expresso constitutivamente na disponibilidade de Pi (50 - 800 µM), e outro de alta afinidade, induzido sob baixas concentrações de Pi (1-10 µM), otimizando e aumentando a absorção de Pi nas raízes (Raghothama, 1999).

Neste trabalho estão descritos genes transportadores de fósforo (PT) de cana-

de-açúcar encontrados no banco de dados do SUCEST, identificados pela comparação de seqüências de cana-de-açúcar com outros transportadores de plantas já descritos. Neste estudo, foram identificados três tipos de transportadores: similares aos transportadores de fosfato dependentes de Na^+ ; os de mitocôndrias; e os de alta afinidade por fosfato, que são expressos preferencialmente em raízes de plantas sob deficiência de fósforo. O acesso as seqüências expressas de DNA de cana-de-açúcar permitiu a realização de um estudo específico do transportador de alta afinidade por fosfato, identificado com nome de SCEQRT1028B07.g, para o qual foi proposto um modelo estrutural da proteína, caracterizada quanto à sua topologia e domínios conservados. Em análise via *Southern Blot* observaram-se variações no número de cópias no genoma para diferentes sondas derivadas de diversos clones de cDNA, sendo esta uma evidência da presença de isoformas deste gene em cana-de-açúcar. Finalmente, foram realizadas análises de expressão em função da disponibilidade de Pi e do tempo de indução.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O fósforo

O fósforo (P) é um importante macronutriente, constituindo cerca de 0,2% do peso seco das plantas. É um componente estrutural de macromoléculas, como ácidos nucleicos e fosfolipídios, e também do adenosina trifosfato (ATP), sendo um elemento chave de várias vias metabólicas e reações bioquímicas, tais como inúmeras etapas das vias C₃ e C₄ do ciclo de Calvin e da glicólise. Depois do nitrogênio, P é o macronutriente que mais limita o crescimento dos vegetais. Embora a quantidade total de fósforo no solo possa ser relativamente alta, na maioria das vezes este não se encontra em sua forma lábil ou ao alcance da rizosfera. Nos diversos sistemas de produção agrícola, principalmente os tropicais, são necessárias aplicações de Pi no solo para garantir a produtividade. A recuperação do fósforo durante o ciclo de produção é drasticamente limitada. Cerca de 80% do total Pi aplicada no solo torna-se indisponível, sendo imobilizado, adsorvido e/ou acaba adquirindo uma forma orgânica. O restante se encontra na fração inorgânica, na qual já foram documentadas 170 formas minerais de Pi (Holford, 1997). Além disso, a mobilidade de Pi no solo é baixa, ocorrendo principalmente por difusão com taxas variando de 10⁻¹² a 10⁻¹⁵ m² s⁻¹ (Novais & Smyth, 1999).

Para valores de pH abaixo de 6, a maior parte do Pi está presente na forma de H₂PO₄⁻, enquanto H₃PO₄ e HPO₄²⁻ se apresentaram em menores proporções. Estudos da cinética de absorção de P por plantas superiores, revelaram maiores taxas em pH entre 5,0 e 6,0, nos quais a forma monovalente H₂PO₄⁻ é predominante (Ullrich-Eberius et al., 1984; Furihata et al., 1992).

2.2 Fósforo e outros nutrientes

A deficiência de P, reduzindo a absorção de N, também já foi registrada na literatura (Lee, 1982; Schjørring, 1996; Rufty et al., 1993). Novais (1999) cita que Magalhães (1996) demonstrou que a omissão de P em solução nutritiva por dois dias, reduziu a absorção de nitrato em 63%. A partir do sexto dia de omissão de P, a absorção de nitrato caiu para zero, mesmo na presença de doses satisfatórias na solução nutritiva. A aplicação de P juntamente com N proporcionou a absorção duas vezes maior de P_i pelas raízes, enquanto que a aplicação de P_i separadamente de N proporcionou uma taxa 1,5 vezes menor na absorção de fósforo em plantas de milho (Miller, 1974). Esse efeito positivo do N sobre a absorção de P está relacionado com o envolvimento do N nos processos de absorção e transporte interno de P_i . Além disso, o $N-NH_4^+$ contribuiu para a redução do pH na interface solo-raiz (Marschner, 1991), solubilizando outras formas de P, aumentando sua disponibilidade. A pronta disponibilidade de N é um estímulo à síntese metabólica de proteínas, tendo como consequência o crescimento e a maior absorção do sistema radicular.

Em estudos da absorção de fósforo em milho, depois de nove cultivos, Novais & Kamprath (1978) verificaram que a forma que mais liberou P foi P-Al, seguida à distância, por P-Fe e depois por P-Ca que contribuiu com 3,2% do P absorvido pelas plantas na Carolina do Norte. Na verdade, todo o P retirado pelas formas P-Al, P-Fe e P-Ca passou pela forma P- H_2O , portanto, a contribuição deste último não pode ser comparada com a dos demais. Outras interpretações têm mostrado que qualquer uma das quatro formas poderá ser uma importante fonte de P para plantas se considerados os diferentes tipos de solo (Bahia Filho & Braga, 1975), ou de plantas (Hedly et al., 1982; Gillespie & Pope, 1990).

2.3 Fósforo e o ambiente

Para garantir a produtividade, altas dosagens de fontes inorgânicas de P são aplicadas no solo e conjuntamente, os resíduos da fabricação de fertilizantes metais pesados como o Ni e Cd, são fortemente complexados no solo. Em solos australianos fertilizados com fosfato natural ou superfosfato simples durante muitos anos, observou-se aumento de 5 vezes no acúmulo de Cd no solo (Novais e Smyth, 1999). Para ervilha, a concentração final nos grãos foi inferior a $0,010-0,015 \text{ mg kg}^{-1}$, o que demonstrou ser negligível, mas por outro lado, o acúmulo de Cd em folhas e raízes atingiu concentrações consideradas de maior risco para o consumo destes por humanos e animais (Novais & Smyth, 1999). Em solos cultivados com cana-de-açúcar e fertilizados com Pi há pelo menos 20 anos no Estado do Rio de Janeiro, observou-se um aumento na concentração de Cd no solo em relação a áreas contíguas não fertilizadas (Amaral Sobrinho, 1996). Entretanto, a concentração de Cd em adubos fosfatados brasileiros é menor do que as encontradas nos similares australianos, sugerindo que, aparentemente, o uso prolongado destas fontes não teria maiores implicações ambientais, a curto prazo, no Brasil. As altas concentrações de Ni em fertilizantes podem representar maiores riscos para o uso na agricultura brasileira. Estes metais pesados permanecem praticamente imóveis no solo, podendo causar toxidez em plantas, contaminação de corpos de água e, mesmo em mínimas concentrações, são um risco para lençóis freáticos e ambientes aquáticos.

Por outro lado, o uso de fontes orgânicas de P têm um papel fundamental para a vida de microrganismos, aumentam a capacidade de troca catiônica (CTC) e a mobilidade de P no solo, mas também têm as suas implicações indesejáveis. A utilização de esterco, principalmente de aves e suínos, têm sido descrita como contribuinte para o acúmulo de Zn e Cu no solo. Embora em solos tropicais, a capacidade máxima de absorção de P (CMAP) seja alta, enquanto a mobilidade do fósforo e dos metais pesados sejam baixas, esse contexto pode, aparentemente, mascarar os efeitos do uso intensivo de fertilizantes de P a curto prazo. A aplicação destes adubos na olericultura, também foi retratada como desencadeadora do processo de eutroficação de certos ambientes aquáticos no país (Novais & Smyth, 1999).

2.4 Absorção de fósforo pelas plantas

A absorção de Pi no solo ocorre preferencialmente na forma de ânion ortofosfato, através de um processo de co-transporte com próton (H^+), via um gradiente eletroquímico de membrana gerado com consumo de ATP (Sakano, 1990). Essa teoria baseia-se nas seguintes observações: a despolarização da membrana plasmática e acidificação do citosol, que foram provocados pela reposição de Pi à plantas sob deficiência de fósforo (Ullrich & Novacky, 1990). Em seguida, a repolarização da membrana plasmática é realizada pela H^+ -ATPase, que bombeia prótons para o meio externo, mantendo o pH interno celular e gerando a força motriz para absorção de fósforo (Schachtman et al., 1998). Nos animais, o transporte de Pi através da membrana plasmática envolve o co-transporte com Na, porém não foram encontrados dados na literatura da ocorrência desse co-transporte em plantas superiores.

Essas observações levam a questionar se existem um ou diferentes sistemas transportadores de Pi com características peculiares, em plantas. Diferentes interpretações sobre a cinética de absorção de Pi, suportam a existência de apenas um sistema em raízes de cevada (Drew & Saker, 1984) e até sete em raízes de milho (Novais & Smyth, 1999). Hoje, o mais comumente aceito é a existência de dois sistemas de absorção de Pi, um de alta afinidade que é ativado em condições de baixa disponibilidade de Pi, e outro com baixa afinidade que é expresso constitutivamente. Estima-se que o K_m do sistema de alta afinidade varia de 3 a 7 μM , enquanto o sistema de baixa afinidade é mais abrangente, atua na faixa de 50 à 330 μM para diferentes tecidos e espécies de plantas (Ullrich-Eberius et al., 1984; McPharlin & Bieleski, 1987; Furihata et al., 1992). Há fortes evidências de que a concentração de fósforo no vacúolo, assim como a concentração de Pi no meio externo, contribuem para ativar mecanismos de regulação gênica dos transportadores de alta e baixa afinidade (Raghothama, 1999). A condição de homeostasia, ideal para o bom funcionamento celular, é resultado da

dinâmica de transporte através de membranas e trocas de fósforo entre os compartimentos da célula.

Em resposta à baixa disponibilidade de Pi na rizosfera, os mais variados mecanismos morfológicos e metabólicos, evoluíram de forma adaptativa para conviver nessas condições. Modificações no crescimento e arquitetura do sistema radicular, assim como maior proporção de emissão de brotações radiculares são bem documentados em função das limitações de Pi (Daram et al., 1998; Liu, C. et al., 1998; Raghothama, 1999). O estresse de Pi induz a maior emissão de pêlos radiculares e o alongamento destes, que absorvem até 90% do total de Pi adquirido pelas plantas. As micorrizas são também importantes para absorção de P, pois as hifas dos fungos aumentam sensivelmente o volume de solo explorado pelo sistema radicular das plantas (Rausch et al., 2001). Estudos da localização *in situ*, mostraram claramente a expressão preferencial de genes transportadores de Pi, na camada epidérmica de pêlos radiculares de tomate (Daram et al., 1998; Liu C. et al., 1998). Também foram observadas modificações em processos bioquímicos no sistema radicular, provocadas pela múltipla ativação de genes em resposta ao estresse por deficiência fósforo (Raghothama, 1999).

As plantas também respondem a distribuição heterogênea de fósforo, aumentando a absorção localizada. Em folhas de milho, o P acumula se de maneira desuniforme em consequência da disponibilidade desigual de P em parte das raízes, semelhante ao ocorrido em solução nutritiva (Robertson et al., 1966). Esse tipo de compartimentalização de P na planta também foi observada por Stryker et al. (1974), que atribuíram o fato observado à anatomia dos sistemas vasculares entre folhas e raízes de milho.

A formação de regiões na raiz com alta densidade de radículas e grande emaranhado de pêlos radiculares (*proteoid roots*), especializadas na síntese e secreção de ácidos orgânicos, é uma resposta comum na família Proteaceae, às limitações de Pi no solo (Tadano & Sakai, 1991). A secreção de ácidos orgânicos pela raiz aumenta a atividade de enzimas relacionadas com a síntese desses ácidos, incluindo a fosfoenolpiruvato carboxilase (PEPC), a citrato sintetase (CS) e a malato desidrogenase (MDH), e a sinergia desses eventos incrementou em até 20 vezes a absorção de Pi em tremoço.

A produção de fosfatases intracelulares e extracelulares é considerada como parte integrante da resposta bioquímica das plantas à falta de Pi. Durante o estresse por Pi, há uma redução dos níveis de ATP e nucleotídeos, e as enzimas que não requerem nucleotídeos fosfatados ou Pi como substrato são ativadas. Essas enzimas participam de reações que não requerem Pi e adenosina durante a glicólise, possibilitando o metabolismo do carbono durante e, em virtude da falta de fósforo. Severas limitações de Pi podem desencadear rotas alternativas na respiração, redução nas taxas fotossintéticas e diminuição na condutância estomática (Natr, 1992).

2.4.1 Simbiose na absorção de fosfato

A sofisticada interação mutualística entre plantas e fungos micorrízicos, é um processo co-evolutivo de centenas de milhões de anos que vem afetando o funcionamento e a biodiversidade ambiental. Hoje, mais de 80% das plantas terrestres associam-se com micorrizas arbusculares em diversos ecossistemas no mundo. Micorrizas arbusculares (AM) são fungos biotróficos obrigatórios que colonizam as plantas para obter carbono. O processo de desenvolvimento da simbiose é variável, dependendo das espécies de plantas e fungos envolvidas. Na maioria das espécies agrícolas, a colonização inicia-se nos espaços intercelulares da raiz. Em seguida, a hifa avança para dentro das células corticais internas, onde produz ramificações dicotômicas, chamadas arbúsculos. Embora, o fungo esteja localizado fisiologicamente interno à célula do córtex, permanece separado do citoplasma da planta pela membrana peri-arbuscular vegetal. Cria-se aí um espaço apoplástico entre a membrana do arbúsculo. Esses fungos não-patogênicos colonizam células do córtex, desenvolvem extensos micélios externos às raízes, tornando-se prolongações funcionais do sistema radicular capazes de aumentar a disponibilidade de certos nutrientes, em particular do íon fosfato. A contribuição da AM para a nutrição de fósforo das plantas tem sido documentada como fator de impacto no desenvolvimento e saúde das plantas. Esse fenômeno é de grande valor para o desenvolvimento de agrossistemas sustentáveis, menos exigentes em adubações fosfatadas.

2.4.2 Transportadores de fosfato

As plantas possivelmente exploram dois sistemas de transportadores de P, sendo um de baixa afinidade e outro de alta afinidade. Até o presente, pouco se sabe sobre a natureza e a função dos transportadores de baixa afinidade (Raghothama, 1999). Um transportador de baixa afinidade, que possui similaridade de seqüência com transportadores de Pi dependente de sódio de *Saccharomyces cerevisiae* e *Neurospora crassa* foi identificado em *Arabidopsis* (Daram et al., 1999). Esse gene *Pht2;1* está presente em apenas uma cópia no genoma de *Arabidopsis*, e codifica uma proteína de 12 domínios conservados, separados por uma seqüência peptídica hidrofílica entre os domínios 8 e 9. Possui ainda duas seqüências consenso de 8 e 9 aminoácidos nas extremidades amino e carboxílicas, respectivamente, altamente conservada entre bactérias, fungos, plantas e animais. O gene *Pht2;1* é expresso nas folhas independente do *status* de Pi na parte aérea da planta e na raiz, provalmente envolvido no transporte de Pi estes órgãos (Daram et al., 1999).

Os primeiros genes de transportadores de fosfato (TP) de alta afinidade foram isolados de *Saccharomyces cerevisiae* (*PHO84*; Bun-ya et al., 1991), *Neurospora crassa* (*PHO-5*; Versaw, 1995) e do fungo *Glomus versiforme* (*GvPT*; Harrison & Van Buuren, 1995). Os transportadores de fosfato de alta afinidade de plantas possuem maior similaridade de seqüência com esses transportadores de levedura e *N. crassa*, associados ao co-transporte de prótons e foram identificados principalmente a partir de raízes de diversas dicotiledôneas (Harrison et al., 2002). A análise de ESTs com similaridade aos genes descritos, permitiu a identificação e clonagem de genes transportadores de fosfato, a partir de bibliotecas de cDNA de *Arabidopsis* (Muchhal et al., 1996). Em especial, os ESTs dos genes *AtPT1* e *AtPT2*, têm contribuído para a identificação de vários homólogos em outras espécies vegetais, tais como batata (*StPT1* e *StTP2*; Leggewie et al., 1997), *Mendicago truncatula* (*MtPT1* e *MtPT2*; Liu H. et al., 1998; Chiou et al., 2001), e tomate (*LePT1* e *LePT2*; Daram et al., 1998; Liu C. et al., 1998), além de outros eucariotos, destacando-se a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*.

A finalização do seqüenciamento do genoma da *Arabidopsis* permitiu a identificação de nove genes presumíveis de transportadores de fosfato de alta afinidade,

denominados de *Pht1-1* a *Pht1-9* (Mudge et al., 2002), da família *Pht-1* (Quadro 1). No genoma de arroz cv. ‘Nipponbare’, também recentemente seqüenciado, foram identificadas 13 seqüências associadas aos transportadores de alta afinidade, denominados de *ORYsa;PhT1* a *ORYsa;PhT13* ou *OsPT1* a *OsPT13* (Paszkowski et al., 2002).

Os transportadores de fosfato de alta afinidade já clonados e caracterizados consistem de proteínas integrais de membrana do tipo *multipass*, compostas por doze domínios transmembranares separados em dois grupos de seis, através de uma região peptídica hidrofílica. Essas são características específicas de proteínas transportadoras de açúcares, íons, antibióticos e aminoácidos (Henderson, 1993). A maioria dessas proteínas transportadoras de Pi de alta afinidade (HAPT) de plantas, são expressas predominantemente e induzidas sob condições de baixa disponibilidade de Pi (Raghothama et al., 1999), translocando Pi do meio externo para o simplasto.

Os vários genes HATP clonados foram usados para complementar o mutante *pho84* de leveduras, que é deficiente de transportador de alta afinidade de fósforo. O cDNA de *MtPT1* de *Medicago truncatula* foi capaz de complementar o mutante *pho84*, registrando um K_m de 192 μ M. Os transcritos de *MtPT1* e *MtPT2* estão presentes nas raízes e aumentam a concentração sob carência de Pi, porém, são suprimidos pelo desenvolvimento de micorrizas. Ambos os transcritos não foram detectados nas folhas (Liu, H. et al., 1998). Em *Lycopersicon esculentum*, o gene *LePT1* possui 2023 pares de bases (pb) que codifica um polipeptídeo de 538 aminoácidos (58,7 kD), enquanto o *LePT2* possui 1826 pb que são traduzidas em 528 aminoácidos (57,8 kD). As ORFs de *LePT1* e *LePT2* são flanqueadas por seqüências não traduzidas de 151 e 37 pb, na região 5’, respectivamente; na região 3’ encontram-se seqüências de 258 e 205 pb (incluindo a cauda poli-A), também não traduzidas respectivamente (Liu C. et al., 1998). Esses genes de tomate, possuem 80,5% de similaridade da seqüência deduzida de aminoácidos e alto grau de similaridade com outros transportadores. Os genes *StPT1* e *StPT2* foram isolados de *Solanum tuberosum*, cujo peso molecular das respectivas proteínas foi calculado com sendo 59 e 58 kD, expressos no mutante MB192 (levedura deficiente para *PHO84*) na dependência de pH. Os transcritos de ambos os genes se reduzem em

quantidade na presença de 2,4-dinitrofenol (Leggewie et al., 1997). O gene *StPT1* apresentou expressão em raízes, tubérculos, folhas fontes, e flores, enquanto *StPT2* foi principalmente expresso no sistema radicular de plantas sob deficiência de Pi.

A super-expressão de *AtPT1* levou ao aumento da taxa de absorção de fósforo e ao crescimento de células de *Nicotiana tabacum*, mesmo em meio de cultura deficiente em Pi (Mitsukawa et. al., 1997). Em tomate, os genes *LePT1* e *LePT2* são induzidos e expressos transientemente dependendo da concentração de Pi no solo (Lui C. et al., 1998). Em plântulas de tomate, sob condições adequadas de nutrição, foram detectados transcritos de *LePT1* em todos os órgãos vegetativos e alto acúmulo de transcritos nos pêlos radiculares (Daram et al., 1998).

Em *M. truncatula* e batata, foi claramente demonstrado que MtPT1/MtPT2 e StPT1/StPT2 não estão envolvidos no transporte de fosfato mediado por simbiose com micorrizas arbusculares (MA), uma vez que estes simportadores são desativados rapidamente com o desenvolvimento da relação simbiótica (Liu H. et al., 1998; Chiou et al., 2001). O gene *LePT1*, em contraste, apresentou uma expressão contínua ao longo da colonização do fungo micorrízico, sendo detectados transcritos do transportador em células com arbusculos. Esse fenômeno sugere que o *LePT1* também desempenha o transporte de fosfato em raízes colonizadas com micorrizas (Rosewarne et al., 1999). O gene *StPT3* foi recentemente identificado e possui 83% de similaridade com *StPT1* e *StPT2*, porém é expresso apenas em raízes com MA, especialmente em células colonizadas com arbusculos, possivelmente mediando o transporte de fosfato na interface arbuscular (Rausch et al., 2001). Da mesma forma, o gene *OsPT11* também possui indução específica, induzida por colonização com micorrizas em arroz, e independente do estado nutricional das plantas ou disponibilidade de P na rizosfera (Paszkowski et al., 2002).

Esses estudos evidenciam que boa parte dos transportadores de alta afinidade, membros da família *Pho1* são preferencialmente expressos na raiz, envolvidos na absorção de fosfato da solução do solo. De fato, esses genes foram originalmente isolados de bibliotecas de cDNA provenientes de raízes. Em trabalhos recentes com *Arabidopsis*, envolvendo outros genes de transportadores de fosfato de alta afinidade demonstraram maior diversidade no padrão de expressão, não restrito a raízes, mas com

expressão em diversos tecidos e estágios de desenvolvimento (cotilédones, hidatódios, flores, anteras). Para identificar a função destes genes na nutrição de fósforo, Mudge et al. (2002), isolaram regiões promotoras de cada um dos genes e fusionaram aos genes repórteres β -glucuronidase e/ou *green fluorescent protein (gfp)*. Estes genes quiméricos foram introduzidos em *Arabidopsis* e a expressão dos genes repórteres foram avaliadas em plantas cultivadas em mistura de solo e areia (1:9) com baixa (10 mg kg^{-1}) e alta concentração de Pi. Os promotores de *Pht1-1*, *Pht1-2*, *Pht1-3* e *Pht1-4* direcionaram a expressão para a epiderme das raízes, sendo induzidos quando as plantas cresceram em solos contendo baixa concentração de Pi, de modo semelhante aos transportadores de alta afinidade descritos para tomate LePT1 e LePT2 (Liu C. et al., 1998), e de *Mendicago* MtPT1 (Chiou et al., 2001). Os demais promotores de genes transportadores de fosfato de alta afinidade de *Arabidopsis* mostraram um variado padrão de expressão.

O entendimento dos mecanismos moleculares de absorção de fósforo, assim como as suas bases genéticas e sua regulação, são de extrema importância para o melhoramento de cultivares visando qualidade e produtividade (Mitsukawa et al., 1997), principalmente em se tratando de solos tropicais pobres em fósforo. Entretanto, o padrão de expressão desses genes é variável dentre os diversos membros da família multigênica e entre as espécies vegetais. Por isso, é necessário conduzir estudos relacionados com o padrão de expressão de genes transportadores em outras espécies vegetais, tais como a cana-de-açúcar.

Quadro 1. Genes de Arabidopsis, membros da família *Phl1* de transportadores de fosfato, descritos por Mudge et al. (2002) seguindo os critérios da Comissão de Nomeclatura de Genes de Plantas e nomes formais descritos: ^abanco de dados do genoma de Arabidopsis MATDB (www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/db/index.html); ^bOkumura et al., (1998); ^cSmith et al., (1997); ^dMuchhal et al., (1996); ^dLiu et al., (1997).

Nome dos genes (Mudge et al., 2002)	Nomes formais dos genes Por outros autores	Código da proteína (banco de dados MATDB*)
<i>ARAth; Phl1;1</i>	<i>PHT1^b, APTP2^c, AtPT1^d</i>	At5g43350
<i>ARAth; Phl1;2</i>	<i>PHT2^b, APTP1^c</i>	At5g43370
<i>ARAth; Phl1;3</i>	<i>PHT3^b, APTP4^c</i>	At5g43360
<i>ARAth; Phl1;4</i>	<i>PHT4^b, AtPT4^e</i>	At2g38940
<i>ARAth; Phl1;5</i>	<i>PHT5^b, AtPT2^d</i>	At2g32830
<i>ARAth; Phl1;6</i>	<i>PHT6^b,</i>	At5g43340
<i>ARAth; Phl1;7</i>	-	At3g54700
<i>ARAth; Phl1;8</i>	-	At1g20860
<i>ARAth; Phl1;9</i>	-	At1g76430

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise comparativa e anotação de genes TP

As buscas de ESTs foram realizadas no banco de dados do SUCEST da UNICAMP (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/>), usando-se as ferramentas *keyword search* e *BLAST - mode tblastx*. Os *clusters* identificados com um relevante baixo valor *E* (fator de homologia) foram individualmente reanalisados, usando BLAST disponível do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-newblast?Jform=0>) para confirmar suas similaridade.

A seqüência consensual dos nucleotídeos foram conceitualmente traduzidas no portal MBS (<http://www.mbshortcuts.com/biotools/index.htm>) ou no “ORF Finder” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). As seqüências de proteínas apresentando a tradução correta, foram alinhadas com proteínas similares de outros organismos usando ClustalW 1.8 (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>). As seqüências deduzidas das proteínas de transportadores de fosfato foram analisadas no programa MegAlign (DnaStar Inc., Madison, WI, EUA) para obtenção dos dados de identidade e divergência de aminoácidos. As seqüências deduzidas de aminoácidos dos transportadores de fósforo foram usadas para determinação do perfil de hidrofobicidade, topologia da proteína e predição dos 12 domínios transmembrana, no programa TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>).

3.2 Seqüenciamento

Os clones EST de cana-de-açúcar foram crescidos em meio LB contendo $100\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina a 37°C e 150 rpm, e tiveram seus plasmídeos purificados usando kit Concert Rapid Plasmids Purification Systems (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA). As reações de seqüenciamento foram preparadas com um quarto do volume recomendado pelo *kit* ABI Prism BigDye terminator Sequence (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), acrescentando-se: $2\mu\text{L}$ do tampão “*Save Money*” (200 mM Tris-HCl pH 9,0; 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), $1\mu\text{L}$ do *primer reverse* (SP6) ou *forward* (T7) [$0,1\mu\text{g}\mu\text{L}^{-1}$], 100 ng de DNA molde dos clones EST, completando o volume final para $8\mu\text{L}$ com água MilliQ, caso necessário. A reação de seqüenciamento foi estabelecida com o seguinte perfil: desnaturaçãoinicial a 96°C por 5 min; 35 ciclos de 96°C por 45 s, anelamento a 52°C por 30 s e extensão a 60°C por 2 min; concluindo a extensão por 4 min a 60°C e finalizando a 4°C . Os produtos de amplificação obtidos foram precipitados com etanol (95%) e acetato de sódio (3 M), seguido-se duas lavagens com etanol (75%). Os sedimento de DNA foram submetidos à secagem a 37°C durante 20 min, e ressuspensos em tampão de seqüenciamento [80% (v/v) formamida deionizada; 20% de *loading-buffer*], para o carregamento em gel de poli-acrilamida para análise em seqüenciador automático 377 ABI-Prism (Applied Biosystems).

3.3 Análise de seqüências

Os cromatogramas obtidos foram analisados no programa Contig Express (InforMax Inc., Bethesda, MD, EUA) que cria alinhamentos de seqüências com respectivas seqüências *consensus*, chamados de *contigs*. Após a montagem dos alinhamentos, foram realizadas as possíveis correções nas seqüências dos cromatogramas. As seqüências *consensus* dos *contigs* foram então submetidas a análise via *blastn* contra o banco de dados de *reads* e *cluster-CAP3* do SUCEST e contra o GeneBank do NCBI.

3.4 Produção de sondas

3.4.1 Seleção de clones EST

A análise do consenso do cluster SCEQRT1028B07.g possibilitou a identificação da distribuição dos clones ao longo do mesmo com relação ao ATG inicial do gene (Tabela 1). A seleção de clones para produção de sondas utilizou o critério de escolher clones que possuíssem variações na região 3' e com início da sequência na região da alça hidrofóbica da proteína.

Para a confecção de sondas duas estratégias básicas foram utilizadas: digestão de clones com enzimas de restrição e purificação dos insertos liberados e a purificação de produtos amplificads por PCR.

3.4.2 Isolamento de sondas com enzimas de restrição

As enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* foram usadas para digerir o DNA dos clones, a fim de liberar os insertos de EST de cana-de-açúcar do *cluster* SCEQRT1028B07.g. Cada clone liberou apenas um fragmento de DNA, cujo tamanho foi estimado pelo programa Kodak Digital Science 1D, após eletroforese em gel de agarose 1% em TAE (40 mM Tris acetato; 2 mM EDTA) corado com brometo de etídeo ($0,03 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) e visualizadas em transiluminador. Os fragmentos digeridos com as enzimas e mais uma amostra do vetor linearizado foram cortados do gel, com cerca de 300 mg utilizando uma lâmina de bisturi nova, e extraídos com o Kit de purificação de DNA GFX (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) conforme as instruções do fabricante. As amostras de DNA purificado produzidos foram eluídos em 30 μL de água MilliQ estéril e uma alíquota de 5 μL foi aplicada em gel de agarose 1% para eletroforese e diagnóstico da purificação.

3.4.3 Purificação das sonda de produtos de PCR

Para o teste inicial foi utilizado o clone SCSFSD2064C07.g. As reações foram preparadas com 25 μL de volume final cada, contendo 0,2 mM de cada dNTPs; 1x de tampão comercial de PCR (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl_2 ; 40 ng dos *primers reverse* (SP6) e *forward* (T7) cada; 1 U *Taq* DNA Polimerase (Life Technologies do Brasil) e a presença ou ausência de 0,5 μL de formamida. Neste conjunto foram incluídas reações de verificação, sem DNA molde e outra sem os *primers*. Na reação de PCR foi estabelecido seguinte perfil: desnaturação inicial a 96°C por 5 min; 35 ciclos de 96°C por 45 s, 52°C por 30 s, e 72°C por 2 min; finalizando com 4 min de extensão a 72°C. As reações de PCR foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1% em TAE, corados com brometo de etídeo e visualizadas em transiluminador.

Os produtos de PCR identificados como ampliações dos clones EST, semelhantes aos respectivos fragmentos liberados pela digestão com *EcoRI* e *HindIII*, foram purificados com Kit GFX, como descrito acima. Para o diagnóstico, 5 μL de cada fragmento purificado foram submetidos a eletroforese, visualizados e fotografados. A concentração de DNA de cada purificação foi determinada indiretamente pelo programa Kodak Digital Science 1D, sendo então preparadas diluições para a concentração de 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para utilização nas reações de marcação de sondas.

3.5 Extração de DNA genômico de cana-de-açúcar

Foram colhidas folhas tenras ("palmito") da variedade 'SP80-3280', no Centre de Tecnologia da Copersucar em Piracicaba, SP, para extração de DNA. Inicialmente, o material foi congelado em nitrogênio líquido e triturado com gelo seco no moedor doméstico de café, pulverizado no cadinho com nitrogênio líquido e em seguida incubado por 30 minutos com tampão extrator (2% CTAB; 0,2 % β -mercaptoetanol)

aquecido a 65°C, seguindo o método de extração de CTAB (Brasileiro et al., 1998). O DNA foi precipitado e ressuspenso em 150 µL de H₂O MilliQ. Em um gel de agarose 0,8% foram aplicadas amostras das extrações para diagnóstico. As amostras foram quantificadas em gel e posteriormente utilizadas em *Southern*.

3.6 Teste de sondas via *Dot Blot*

Dot Blot é uma técnica de imobilização de quantidades conhecidas de DNA não fragmentado em uma membrana, permitindo a realização de hibridizações para detecção da abundância de seqüências de interesse. Para o desenvolvimento *dot blot* foi utilizada uma membrana de náilon carregada positivamente, Biodyne B (Life Technologies, East Hill, NY, EUA), e o Bio Dot Filtration Aparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A membrana foi hidratada por 10 min em água MilliQ estéril e montada sobre papel cromatográfico pré-umidificado, dentro do aparato, sendo o sistema acoplado a uma bomba de vácuo, seguindo as especificações do fabricante. A cada poço foi adicionado 500 µL de água MilliQ estéril, e ao final, foi aplicado vácuo ao sistema. Após a total absorção da água o vácuo foi desligado e a membrana estava pronta para aplicação das amostras.

Os clones EST escolhidos para o teste, foram aplicados à membrana (2-10 ng), com pelo menos uma repetição cada, para serem testados como controle positivos (CP) das sondas. O vetor pSport1 linearizado foi usado como controle negativo (CN), aplicando-se 5 -10 ng por *blot*. O alvo de sondagem foi o DNA genômico da cana-de-açúcar ('SP80-3280') aplicado nos *blots* a 5 e 10 µg. Para cada conjunto de membrana, foi preparado pelo menos um *blot* aplicando-se apenas H₂O, como branco (B), para verificar o efeito de *background* da membrana e a qualidade da água.

O preparo das amostras, incluindo os brancos, realizou-se com a desnaturação de DNA a 100°C por 5 min seguido de incubação a 0°C por 5 min. Cada amostra teve seu volume completado para 150 µL com a adição de NaOH e EDTA nas concentrações finais de 0,4 N e 10 mM, respectivamente (Somebrook et al., 1989). Depois da aplicação

das amostras seguida de vácuo, foram aplicados mais 500 μL de 0,4 M NaOH, para fixação de DNA à membrana sob condição desnaturante ($\text{pH} \geq 9,0$). Uma vez finalizada a filtração a vácuo, desmontou-se o sistema, a membrana foi rinsada com 2X SSC (2X: 0,5 M NaCl; 0,05 M citrato de sódio dihidratado) e seca a 80°C por 30 minutos, para então ser encaminhada a hibridização.

3.6.1 Marcação de sonda

A reação de marcação das sondas utilizou o sistema não-radioativo AlkPhos Direct (Amersham Biosciences, Uppsala, Suécia). Na reação, amostras de 5 e 25 ng de DNA purificado e desnaturado de cada clone, foram incubados a 37°C por 30 min conforme instruções do fabricante e marcados via ligação covalente da enzima fosfatase alcalina ao DNA fita simples.

3.6.2 Hibridização não radioativa

A pré-hibridização dos mini-*blots* durou 30-45 min a 65°C , em tampão de hibridização do fabricante, na proporção de $0,12 \text{ mL cm}^{-2}$ de membrana, o qual foi ajustado para 0,5 M de NaCl e 4% (p/v) do agente bloqueador do kit. Os mini-*blots* foram hibridizados a 65°C por 15 horas no mesmo tampão com adição da sonda marcada (5 ng mL^{-1}). As lavagens dos mini-*blots* foram realizadas a 65°C por duas vezes durante 10 min, com uma solução contendo 2 M de uréia; 0,1% SDS; 50 mM de fosfato sódio pH 7,0; 150 mM de NaCl; e 0,2% do agente bloqueador; e por duas vezes de 5 min a temperatura ambiente, em uma solução contendo 50 mM Tris base; 100 mM NaCl; e 2 mM MgCl_2 .

3.6.3 Geração e detecção de sinal

A geração do sinal para detecção utilizou a fosfatase alcalina ligada a sonda, para catalisar a decomposição, durante 5 min, do substrato estável dioxetano, o CDP-Star (Amersham Biosciences). A energia luminosa gerada possui uma fase *lag* curta o que possibilitou a rápida detecção do sinal via sensibilização do Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences), com apenas uma hora de exposição. A revelação em câmara escura foi realizada com processadora automática (MacrotecMX-2), com solução reveladora e fixadora RP X-Omat (Kodak, S. J. Campos, Brasil).

3.7 Southern

3.7.1 Método não radioativo

Dez μg de DNA genômico de cana-de-açúcar foram digeridos a 37°C por onze horas com as seguintes enzimas: *AluI*, *HaeIII*, *MboI*, *RsaI*, *DraI*, *EcoRI*, *HindIII* e *SalI*. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em TAE por 15 horas a $1,5 \text{ volts cm}^{-1}$. Em seguida, o gel foi tratado com solução de depuração (0,25 M HCl) por dez min, desnaturado com duas lavagens em solução com 1,5 M NaCl e 0,5 M NaOH, e neutralizado com 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris-HCl pH 7,0. A transferência por capilaridade do DNA para a membrana de nylon foi favorecida pelo tampão salino 10X SSC (10X: 1,5 M NaCl; 0,15 M citrato de sódio dihidratado), durante 16 horas. Após a transferência, a membrana foi seca e o DNA fixado com tratamento de UV calibrado a $70.000 \mu\text{J cm}^{-2}$ de membrana, usando-se o programa padrão do transiluminador de ultravioleta Hoffer UVC 500 (Amersham Biosciences). A pré-hibridização transcorreu a 65°C por 30 min, utilizando o kit AlkPhos Direct conforme descrito anteriormente. A hibridização a 65°C , correu durante a noite utilizando-se 5 ng mL^{-1} de sonda marcada com a fosfatase alcalina. A geração e detecção do sinal seguiram os mesmos procedimentos do *Dot Blot*. A sonda foi então removida tratando a membrana com 0,5%

SDS (p/v) a 60°C por 1 hora, seguido de lavagem com 100 mM Tris, pH 8,0. A membrana úmida foi guardada a 4°C em saco plástico até a próxima hibridização.

3.8 Material vegetal e propagação

Foram obtidas plântulas derivadas de culturas de meristemas de cana-de-açúcar da variedade 'SP 80-3280', produzidas na biofábrica da COPERSUCAR, Piracicaba, SP. Essa variedade foi utilizada para a preparação da maioria das bibliotecas de cDNA do projeto SUCEST. Inicialmente, foram fornecidos 10 frascos de plantas *in vitro* na fase III (caracterizada pela regeneração da parte aérea e indução de enraizamento). O material foi inicialmente mantido *in vitro*, replicado e multiplicado no meio Murashige & Skoog (MS), suplementado com 0,12 mg L⁻¹ de 2,4-D e 0,01 mg L⁻¹ BAP. As plântulas na fase III foram aclimatadas em bandejas com 1/20 da concentração solução nutritiva de Hoagland & Arnon (1953). A cada 7 dias a solução foi trocada para concentrações crescentes de força iônica para adaptação à hidroponia, até atingirem a concentração usada nos experimentos, ¼ da solução nutritiva completa [solução 1X: 5 mM Ca(NO₃)₂·4 H₂O; 5 mM KNO₃; 1 mM KH₂PO₄; 2 mM MgSO₄·7 H₂O; 7,15 mg L⁻¹ H₃BO₃; 4,52 mg L⁻¹ MnCl₂·4H₂O; 0,55 mg L⁻¹ Zn SO₄·5H₂O; 0,2 mg L⁻¹ CuSO₄·5 H₂O; 0,225 mg L⁻¹ Na₂MoO₄; Fe-EDTA]. O sistema de hidroponia foi conectado por mangueiras a um compressor isento de óleo que forneceu 44 L ar dia⁻¹ a cada bandeja, trabalhando 15 min.h⁻¹.

3.9 Experimentos para indicação de expressão de genes TP

3.9.1 Experimento I: indução da expressão temporal de TP

Foram utilizadas 30 plantas de cana-de-açúcar regeneradas *in vitro* e aclimatadas para sistema de hidroponia. O experimento foi conduzido com aplicação das doses 0 e 250 µM de Pi para cada 15 plantas. Durante o experimento, foi medido o valor

de pH da solução nutritiva, com Pi e sem Pi, de cada vaso, como forma de monitoramento. A coleta de amostras foi realizada com três repetições para os seguintes tratamentos: 0, 6, 12, 24 e 48 horas, separado-se em dois grupos, de plantas cultivadas na presença de Pi e ausência de Pi, respectivamente. As plantas foram coletadas nos tempos acima descritos e separadas em parte aérea e raízes, identificadas e congeladas em nitrogênio líquido para armazenamento a -80°C . O RNA total das amostras foi isolado para realização de análise de expressão gênica por *Northern Blot*.

3.9.2 Experimento II: expressão de TP em função de 6 doses de fosfato

As plantas aclimatizadas em hidroponia, foram cultivadas sob influência de concentrações crescentes de Pi (tratamentos: 0, 5, 10, 50, 100 e $250\mu\text{M}$) durante 14 dias, com dois vasos por tratamento e duas plantas por vaso, totalizando quatro repetições por dose de Pi aplicada. Para monitorar as condições experimentais foram realizados:

- a) Determinação do pH da solução nutritiva de cada vaso (5°, 7°, 10° e 14° dia);
- b) Determinação da média de 5 leituras de SPAD da folha +2 de cada planta por tratamento;
- c) Determinação do teor de fósforo de folhas e raízes da cada planta;
- d) Determinação do peso fresco inicial e final das plantas.

Ao final de 14 dias, um total de 24 plantas foi coletado e, amostras de folhas e raízes de todas as plantas armazenadas como descrito anteriormente. O RNA total das amostras foi isolado para realização de *Northern Blot*.

3.9.3 Experimento III: expressão de TP em função de 3 doses de fosfato

Este experimento segue uma estrutura semelhante ao anterior, diferindo em poucos aspectos. Possui um total de 12 plantas, sendo uma por vaso, com quatro

repetições por tratamento, nas doses de fosfato 0, 50 e 250 μM de Pi. Em cada tratamento, foram distribuídas plantas com dois tamanhos distintos, cuja média de peso fresco inicial era 9,4 g para as plantas maiores e 2,6 g para as menores. O período experimental foi de 14 dias, com determinações do peso fresco inicial e final das plantas, e das respectivas taxas de crescimento médio do período. A título de monitorar o experimento foram feitas as seguintes medidas:

- a) Determinação do pH da solução nutritiva de cada vaso (0, 2^o, 5^o, 7^o, 10^o e 14^o dia);
- b) Determinação da média de 5 leituras de SPAD da folha +2 de cada planta por tratamento;
- c) Determinação do teor de fósforo de folhas e raízes da cada planta.

No final de 14 dias, o material vegetal foi coletado e armazenado a -80°C seguindo os mesmos procedimentos já descritos. O RNA total das amostras foi isolado para realização de *Northern Blot*.

3.10 Extração de RNA

3.10.1 Preparo de material livre de RNase

Os cadinhos e pistilos foram lavados com uma solução de 0,01 % SDS (p/v), e enxaguados com água, água destilada e MilliQ. A seguir, foram incubados com água com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) ativo por duas horas na capela, antes de serem embalados com papel alumínio, autoclavados (120°C) por 20 min e secos na estufas (80°C). Todas as soluções usadas para trabalhos com RNA foram preparadas com água 0,01% DEPC autoclavada. As cubas de eletroforese e pentes para RNA foram lavados com 0,01% SDS e enxaguados com água livre de RNase. A vidraria também foi lavada da mesma forma e depois autoclavada.

3.10.2 Extração de RNA de folhas e raízes

As primeiras extrações de RNA total utilizaram as recomendações básica do método Trizol (Invitrogen), partindo de 100 mg de tecido fresco pulverizado em cadinhos com nitrogênio líquido. Antes de descongelar, o macerado recebeu 1 mL de reagente Trizol sendo então transferido para microtubo (1,7 mL), e vortexado. Após ser incubado a temperatura ambiente por 5 min, foi centrifugado (10.000 g por 15 min a 4°C). A fase aquosa foi cuidadosamente transferida para um tubo novo para realizar uma lavagem com clorofórmio (200 µL) sob agitação e posterior incubação a temperatura ambiente por 5 min, seguido de nova centrifugação (10.000 g, 15 min a 4°C). A fase aquosa foi transferida novamente para um microtubo novo e o RNA foi precipitado com isopropanol (250 µL) e 0,8 M de citrato de sódio e 1,2 M da NaCl (250 µL). O RNA precipitado foi centrifugado (10.000 g, 10 min a 4°C) e o pellet lavado com etanol 75%. Depois de seco (37°C por 10 min), o RNA foi ressuspense em 30 µL de água livre de RNase. Os estoques de RNA foram mantidos a -80°C. O diagnóstico das amostras foi feito em gel de 1% agarose em TAE livre de RNase.

3.10.3 Quantificação de RNA

A quantificação das amostras de RNA foi realizado com espectrofotômetro SmartSpec 3000 (Bio Rad, Hercules, Califórnia, EUA), sendo a concentração calculada em µg µL⁻¹ através da fórmula:

$$[\text{RNA}] = \frac{A_{260} \times Fc \times fd}{1000}$$

Onde: **A₂₆₀** é valor de leitura da amostra a 260 nm; **Fc** corresponde ao fator de conversão, no qual a **A₂₆₀** máxima é 1,0 e corresponde a 40 µg mL⁻¹ de RNA; **fd**

corresponde ao fator de diluição da amostra de leitura; o resultado da multiplicação é dividido por mil para obtermos a concentração em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$. A qualidade do RNA foi analisada com base na relação da absorbância $A_{260:280}$ nm e da leitura a A_{320} nm, assim como na visualização do RNA após eletroforese em gel de 1% agarose em TAE livre de RNase.

3.11 Northern radioativo

Para o *Northern*, foram realizadas hibridizações com 2 e 4 μg de RNA total, sendo as amostras preparadas em 40% de formamida, 1x MOPS e 2 M formaldeído. Para cada *Northern*, dois conjuntos de amostras de RNA e dois géis foram montados. Um gel para transferência para membrana de náilon, e outro, com coloração com brometo de etídeo ($0,03 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) aplicado nas amostras para visualização e registro fotográfico. O RNA foi separado eletroforeticamente em um gel desnaturante de 1,2% agarose com 3% formaldeído e 1x MOPS, durante 3½ horas a 3,5 volts cm^{-1} . Após a corrida, o gel foi lavado em água MilliQ DEPC estéril por 10 min e incubado em 10x SSC por 30 min. A transferência por capilaridade para a membrana de náilon XL Hybond (Amersham Biosciences) transcorreu com 10x SSC por 15 h. Em seguida, a membrana foi seca a 80°C por 30 min e o RNA fixado com tratamento de UV ($70.000 \mu\text{J } \text{cm}^{-2}$), usando o programa padrão do forno de ultravioleta Hoffer UVC 500.

3.11.1 Marcação de sonda com [α - ^{32}P]-dCTP

Para preparação da sonda radiomarcada, foram utilizados 25 ng do fragmento amplificado e purificado (clone EST) por hibridização. As sondas foram desnaturadas a 100°C por 5 min, e marcadas com [α - ^{32}P]-dCTP, utilizando-se os kits *Random Primer* ou *Ready-to-Go DNA labelling Beads-dCTP* (Amersham Biosciences) segundo as instruções do fabricante. Em seguida, a sonda marcada foi purificada em uma

microcoluna *Probe Quant 650* (Amersham Biosciences) para eliminação dos nucleotídeos não incorporados.

3.13.2 Hibridização sem formamida

A pré-hibridização durou 2 h a 68°C, em solução contendo 6x SSC, 10x Denhardt's, 1% SDS, 0,2% sódio pirofosfato e DNA de esperma de salmão (SSDNA) desnaturado (40 µg mL⁻¹). A sonda marcada foi desnaturada e adicionada a um novo tampão pré-aquecido (68°C), contendo 3x SSC, 1,25x Denhardt's, 1% SDS, 0,2% pirofosfato de sódio (Na PPI), 2mM EDTA, 20 mM Tris-HCl pH 7,5 e ssDNA desnaturado (40 µg mL⁻¹). A hibridização a 68°C transcorreu por toda a noite, conforme Somebrook et al. (1989). O protocolo recomenda de 2 a 3 lavagens de até 30 minutos, com os tampões, primário (2x SSC; 0,1% SDS e 0,2% NaPPI) e secundário (0,2x SSC; 0,1% SDS e 0,2% NaPPI). O número de lavagens depende da intensidade do sinal em cpm, monitorado entre as lavagens.

Retirado o excesso de solução de lavagem, a membrana foi embalada em film plástico, monitorada com o contador Geiger e colocada para expor em cassete com intensificador de sinal a -80°C. O tempo de exposição varia em função do sinal detectado (cpm) e pode ser de 24 hs até dias.

A revelação de filmes de autoradiografia foi realizada manualmente em câmara escura, colocando o filme por 2 min em solução reveladora RP X-Omat (Kodak, S. J. Campos, SP, Brasil), seguido de lavagem com água, e colocando por 2 min em solução fixadora RP X-Omat, seguida de nova lavagem.

Para a remoção de sonda radiomarcada foi realizada uma lavagem com 1% SDS fervente até seu resfriamento natural à temperatura ambiente (15-30 min). Em seguida a membrana foi monitorada com o contador Geiger, sendo a lavagem repetida até remover a sonda, quando o sinal detectado foi <100 cpm. Em seguida a membrana foi rehibridizada a 65°C.

3.13.3 Hibridização com formamida

A pré-hibridização durou 4 h a 42°C, em solução contendo 50% de formamida deionizada, 5x SSC, 50 mM de fosfato de sódio pH 6,8, 5x Denhardt's, 1% SDS e DNA de esperma de salmão (SSDNA) desnaturado (100 µg mL⁻¹). A sonda marcada foi desnaturada e adicionada ao tampão de hibridização pré-aquecido (42°C), contendo 50% de formamida deionizada, 5x SSC, 20 mM 50 mM de fosfato de sódio pH 6,8, 1% SDS e 5% sulfato de dextran. A hibridização a 42°C transcorreu por toda a noite, conforme Somebrook et al. (1989). Foram realizadas duas lavagens com o tampão (0,2x SSC; 0,1% SDS), sendo uma a temperatura ambiente durante 15 min., e a segunda a 65°C por mais 15 min.. O número de lavagens dependeu da intensidade do sinal em cpm, monitorado entre as lavagens.

Retirado o excesso de solução de lavagem, a membrana foi embalada em saco plástico, e monitorada com o contador Geiger e colocada para expor em cassete com um filme permanente (Image Plate, Fujifilm, Japão), em função do sinal detectado (cpm) a exposição pode ser de 24 horas até dias. As imagens de *Northern*s geradas foram obtidas com sistema BAS 2500 (Fujifilm, Japão).

3.12 Análise estatística

A análise dos dados de teor de fósforo, crescimento e leitura de SPAD dos experimentos de indicação de expressão de genes TP foi conduzida utilizando o programa SAS.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação e anotação de genes transportadores de fosfato (PT)

O projeto genoma da cana-de-açúcar (Sugarcane EST Project - SUCEST) analisou 237.954 seqüências EST provenientes de 26 bibliotecas de cDNA produzidas de diverso tecidos de cana (Grivet & Arruda, 2001; Vettore et al., 2001). A identificação de cada seqüência EST do projeto foi feita com um código, que representa o laboratório que a submeteu; biblioteca de cDNA de origem; a placa de clones; a posição na placa e sentido de seqüenciamento ('.g' para 5' ou '.b' para 3'). O código ainda inclui as iniciais "SC" que correspondem a *sugarcane*. Como exemplo, o código da seqüência SCEQRT1028B07.g inclui "EQ" correspondendo ao laboratório de origem; "RT1" à biblioteca de onde foi obtido o cDNA, neste caso de raízes de cana; "028" corresponde ao número da placa desta biblioteca; "B07" indicada a posição na placa e ".g" o sentido do seqüenciamento (5'). As seqüências EST foram analisadas, sendo agrupadas em função da identidade, gerando um consenso para cada agrupamento de seqüências, chamado de *cluster*, correspondendo a um gene presumível. O SUCEST gerou cerca de 43.150 *cluster* onde realizaram-se as buscas por genes transportadores de fosfato (Grivet & Arruda, 2001).

Os transportadores de fosfato (PT) de alta afinidade são extremamente conservados em plantas e a disponibilidade de vários genes isolados codificando esses PT permitiu a busca no banco de dados do SUCEST por similares em cana-de-açúcar. No primeiro momento, foi realizada uma busca por palavra chave "*phosphate AND transporter*" no banco de dados de cana. Inicialmente, foram encontrados cinco agrupamentos ou *clusters* de transportadores de Pi em cana, identificados pelos seguintes códigos: SCEQRT1028B07.g; SCEPAM2011H02.g; SCVPHR1092B07.g; SCSBST3095B06.g; e SCEZLR1052H04.g (Figueira et al., 2001). As seqüências de nucleotídeos destes cinco *clusters* foram conceitualmente traduzidas em aminoácidos com auxílio do programa *ORF finder*. As proteínas traduzidas corretamente foram identificadas via análise comparativa de seqüências, utilizando o programa BLASTp para proteínas no GenBank e via BLASTp no banco de dados do SUCEST. Estas ferramentas

possibilitaram a identificação de proteínas de plantas com maior grau de similaridade (%) e menor valor E para cada *cluster* de cana. O valor E representa o número de alinhamentos diferentes necessários, puramente ao acaso, para se obter um alinhamento melhor em pontuação, em uma pesquisa realizada em um banco de dados. Os cinco *clusters*, derivados de 49 clones EST, foram identificados com valores de $E < 10^{-34}$ (Tabela 1).

Tabela 1. *Clusters* de EST de cana-de-açúcar com similaridade a transportadores de fosfato de alta afinidade isolados de *Nicotiana tabacum* (NtPT1), seqüência parcial de trigo (*TaPT1*); *Catharanthus roseus* (CrPT1), *Lycopersicum esculentum* (LePT1) e *Arabidopsis thaliana* (AtPT2) expresso por valores E .

<i>Clusters</i>	Nº. de READS	NtPT1 (536 aa)	<i>TaPT1</i> (396 aa)	CrPT1 (542 aa)	LePT1 (538 aa)	AtPT2 (534 aa)
SCEQRT1028B07.g	27	0.0	10^{-179}	0.0	0.0	0.0
SCEPAM2011H02.g	14	e^{-80}	10^{-65}	e^{-80}	e^{-80}	e^{-83}
SCEZRT2019B05.g	9	e^{-86}	10^{-50}	10^{-84}	10^{-84}	10^{-88}
SCSBST3095B06.g	1	10^{-68}	10^{-53}	10^{-67}	10^{-68}	10^{-67}
SCEZLR1052H04.g	3	10^{-49}	10^{-34}	10^{-47}	10^{-49}	10^{-50}

Um *cluster* em particular, SCEQRT1028B07.g apresentou a melhor similaridade com todos os transportadores de Pi de alta afinidade, especialmente com o transportador de tabaco NtPT1, e a seqüência parcial do TaPT1 de trigo (Figueira et al., 2001). Em análise separada, as s (aa) dos 5 *clusters* foram alinhadas, constatando-se que o SCVPHR1092B07.g, SCSBST3095B06.g, SCEZLR1052H04.g possuíam alta similaridade (maior que 79%) com o SCEQRT1028B07.g, enquanto o SCEPAM2011H02.g era o mais divergente do grupo. A identidade de aminoácidos entre os transportadores de Pi isolados de *Arabidopsis*, batata, tomate, tabaco, *Catharanthus*, *Mendicago* e trigo é maior que 75%, exceto para *AtPT6* (Raghothama, 2000). O transportador de alta afinidade de Pi de cana-de-açúcar aqui destacado (SCEQRT1028B07.g ou ScPT1) apresentou uma alta identidade de aminoácidos com outros transportadores de Pi, variando de 73%, com *Mendicago MtPI* a 81% com *NtPT1* de tabaco (Tabela 2).

Tabela 2. Identidade de aminoácidos em percentual entre o *cluster* SCERRT1028B07.g (ScPT1) identificado no banco de dados do SUCEST e outros transportadores de fosfato de alta afinidade de plantas encontrados no GenBank NCBI, onde NtPT1 - *Nicotiana tabacum* (GenBank AB20061); TaPT1 - *Triticum aestivum* (AAD26146); CrPT1 *Catharanthus roseus* - CrPT1 (BAA20522); LePT1 - *Lycopersicon esculentum* (AAB82146); StPT1 - *Solanum tuberosum* (CAA67395); AtPT2 - *Arabidopsis thaliana* (AAB17265), Os seqüência parcial de *Oryza sativa* (AAF40188); AtPT4 - *A. thaliana* (AAB88291) AtPT1 - *A. thaliana* (AAB69122); LePT2 - *L. esculentum* (AAB82147); MtPT1 - *Medicago truncatula*, (AAB81346).

	ScPT1	NtPT1	TaPT1 ^z	CrPT1	LePT1	StPT1	AtPT2	Os ^z	AtPT4	AtPT1	LePT2	MtPT1
ScPT1	100											
NtPT1	81	100										
TaPT1	81	80.3	100									
CrPT1	80	88	78	100								
LePT1	80	89	78	84	100							
StPT1	80	94	80	86	77	100						
AtPT2	77	83	75	82	80	83	100					
Os	76	71	68	72	70	70	67	100				
AtPT1	75	80	74	79	77	80	78	70	100			
AtPT4	75	80	73	79	79	82	79	68	100	94		
LePT2	74	81	71	78	79	81	77	70	79	78	100	
MtPT1	73	77	72	77	76	78	77	69	80	79	81	100

Em relação a monocotiledôneas, o *cluster* SCEQRT1028B07.g foi identificado como principal transportador de alta afinidade de fosfato de cana-de-açúcar, devido ao seu grau de identidade com os transportadores de Pi, apresentando uma identidade de 83% com os genes de arroz *Phl1;2* de *O. sativa* (acesso Genbank AF493788) e 77% com transportador *Phl1;2* *O. sativa* cv. Indica (AF416722) usando BLASTp contra as proteínas do banco de dados NCBI (dados não mostrados). Em análise mais recente, o *cluster* SCEQRT1028B07.g de cana revelou maior identidade de aminoácidos com os transportadores de Pi de alta afinidade de arroz OsPT8 (85%) e OsPT12 (74%), descritos por Paszkowski et al, 2002.

Numa busca mais abrangente por palavras-chave realizada no banco de dados SUCEST, foram identificados 18 *clusters* com similaridade a diversos tipos de transportadores de fosfato. Entre esses, foram encontrados transportadores de fosfato de alta afinidade;

transportadores de fosfato mitocondriais; e genes não descritos similares a transportadores de fosfato dependentes de sódio. Foram então selecionados representantes de cada grupo, considerando um valor $E < 10^{-50}$.

Para classificar esses grupos de proteínas de cana, foram buscadas seqüências depositadas no GenBank via BLAST, e aquelas que apresentavam a maior similaridade com cana foram selecionadas e utilizadas para uma análise filogenética com o programa MegAlign com padrão ClustalW. Um total de 36 proteínas foram selecionadas para essa análise, incluindo os *clusters* de cana mais representativos de transportadores de fosfato, mitocondrial e similares aos transportadores de fosfato dependentes de sódio (Figura 1).

A análise foi baseada na região compreendida entre os aminoácidos 310 e 515, de todas as 36 proteínas, inclusive as seqüências parciais dos *clusters* SCSBST3095B06.g e SCEZRT2019B05.g, possibilitando uma melhor na construção da árvore filogenética destes transportadores. Os transportadores Pht1;2 de arroz (AF493788) e o IPT1 de tabaco apresentam-se com valor de identidade com o *cluster* SCEQRT1028B07.g de 77% e 77,5%, respectivamente, que difere dos valores encontrados no NCBI devido a limitação à região de 206 aminoácidos. O transportador NtPT1 de tabaco (BAA86070) apresentou a melhor identidade (78,2%) com *cluster* SCEQRT1028B07.g (Tabela 3).

O resultado da análise de filogenia mostra claramente os três grupos de transportadores de fosfato: alta afinidade por Pi; mitocondriais; e similares aos dependentes de Na, marcados por retângulos em verde, azul e amarelo respectivamente (Figura 1). Em cada um dos grupos, encontram-se representantes de cana-de-açúcar: SCEQRT1028B07.g, SCSBST3095B06.g e SCEZRT2019B05.g (HAPT); SCEZRT2019D07.g, SCCCLB1024B10.g, SCMCRT2105F08.g e SCCCL2001B10.b (PT mitocondriais); SCCCAM2001A07.g e SCEZAM2059E07.g (similares aos dependentes de Na⁺).

Entre os transportadores de alta afinidade de fosfato, membros da família *Pht1* (Figura 1), os transportadores de solanáceas foram agrupados, enquanto que os 5 PTs derivados de monocotiledôneas permaneceram separados dos de dicotiledôneas. Apesar da elevada identidade (acima de 70%) entre os PT de cana-de-açúcar com todos os outros, os PT de cana agruparam-se mais próximos aos de arroz.

O gene de um transportador de Pi de baixa afinidade (*Pht2;1*) foi clonado e caracterizado em *Arabidopsis* (Daram et al., 1999). *Pht2;1* codifica um *symporter* de P_i:H⁺ com 12 regiões transmembrana, expresso preferencialmente em folhas de *Arabidopsis*. Seqüências similares (ESTs) a *Pht2;1* foram identificados em arroz e em outras plantas, mas

nenhum foi identificado em cana-de-açúcar com um valor E razoavelmente baixo. Entretanto, os *clusters* SCCCAM2001A07.g e SCEZAM2059E07.g, apresentam duas características do transportador de baixa afinidade *Pht2;1* de *Arabidopsis*: são expressos na parte aérea, provenientes de bibliotecas de meristema apical, e são similares aos transportadores dependentes de Na^+ .

Tabela 3. Identidade e divergência de aminoácidos em percentual, entre o *cluster* identificado no SUCEST SCERRT1028B07.g (**ScPT1**) e os transportadores de fosfato IPT1-*Nt* (AF156696 PID AAF74025) e NiPT2 (BAB21545) de tabaco; Pht1-2-*Os* (AF493788) e Pht1-2-*Os* I (AF416722) ambos de *Oryza sativa*, sendo o último grupo Indica; PT2 *At* (NP_181428) de *Arabidopsis*; Prob IPT *Le* (T05714) de tomate; StPT1 (T07604) de batata. Resultantes da análise feita no programa MegAlign.

		Idetidade (%)																
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15		
Divergência (%)	1		74.4	74.3	98.7	72.3	76.0	75.5	75.5	75.8	73.0	73.8	77.0	75.6	72.1	74.7	1	Pht1-2 Os (AF493788)
	2	28.9		99.6	74.1	82.6	90.3	90.7	90.3	90.1	79.7	86.6	77.5	96.1	83.0	87.9	2	IPT Nt (AAF74025)
	3	29.5	0.4		73.7	82.6	89.9	90.3	89.9	89.8	79.3	86.2	77.1	95.7	82.6	87.5	3	NiPT2 (BAB21545)
	4	1.3	29.8	30.3		72.1	75.7	74.9	74.9	75.5	72.3	73.4	76.8	75.0	72.0	74.3	4	Pht1-2 Os i (AF416722)
	5	32.3	18.3	18.3	32.5		81.5	82.0	82.2	81.3	79.2	83.1	77.2	82.0	88.2	79.2	5	AtPT2 (NP_181428)
	6	28.3	9.6	10.0	28.9	19.7		95.5	96.3	99.3	79.6	84.9	77.3	91.6	80.9	97.6	6	ProbIPT1 Le (T05714)
	7	29.6	7.9	8.3	30.4	19.2	4.6		99.1	95.0	80.0	84.8	77.4	92.4	81.5	93.1	7	StPT1 (T07604)
	8	29.6	8.5	8.9	30.4	19.2	3.8	0.9		95.5	80.0	84.8	77.0	92.0	81.5	93.9	8	IPT1 Nt (AAD38859)
	9	28.6	9.8	10.2	29.1	20.2	0.7	5.2	4.6		79.2	84.9	77.0	91.5	80.7	96.8	9	ProbIPT1 Le (T07164)
	10	30.9	23.5	24.0	32.0	22.7	22.0	21.0	21.3	22.3		79.1	76.5	80.6	79.6	77.9	10	Trans. PT3 St (CAC28219)
	11	30.2	13.2	13.7	30.7	19.6	15.0	15.5	15.5	15.0	22.0		76.7	86.6	82.4	82.9	11	Put.HAPT Os i (T07808)
	12	26.9	26.6	27.1	27.2	27.0	26.6	26.3	26.8	26.9	28.1	27.5		78.2	75.5	75.8	12	SCEQRT1028B07.g
	13	28.4	3.2	3.6	29.2	18.3	8.9	6.8	7.5	9.1	21.8	12.6	25.3		82.2	89.2	13	NiPT1 (BAA86070)
	14	33.3	18.9	19.4	33.6	11.9	20.9	20.4	20.4	21.1	22.9	20.1	29.7	18.7		78.9	14	PT At (NP_191030)
	15	30.2	12.4	12.8	30.8	22.7	2.5	7.2	6.4	3.2	24.3	17.6	28.7	11.7	23.7		15	Prob.IPT Le (T07740)

Dos genes presumíveis de cana até então analisados, o SCEQRT028B07.g destacou-se por ser o único de seqüência de nucleotídeos que permitiu a predição da proteína completa contendo 541 amino ácidos, dentro do tamanho médio observado para transportadores fosfato de fungos e plantas (518 a 587 aminoácidos) (Raghothama, 1999). Os demais *clusters* identificados como transportadores de alta afinidade por Pi, apesar da alta similaridade (>79%) com o SCEQRT1028B07.g, possuem seqüências parciais e não foram usados na análise de hidropatia e predição da topologia da proteína trans-membrana.

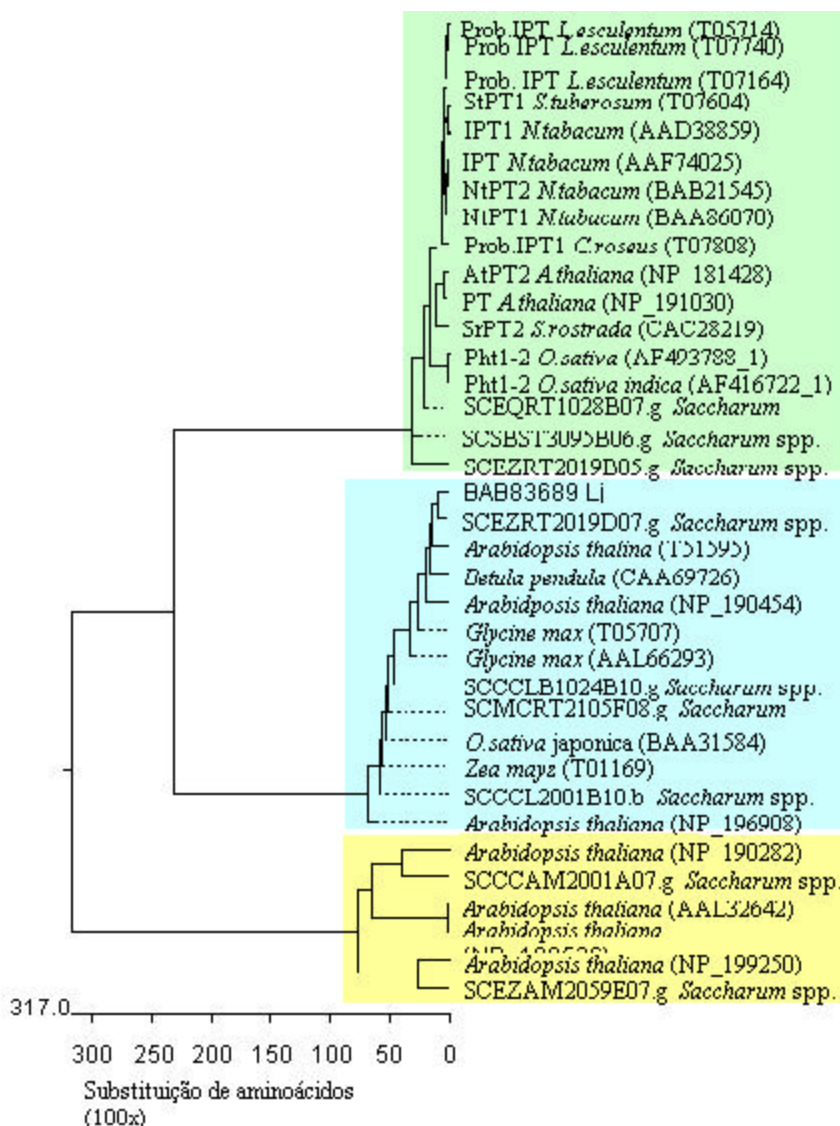


Figura 1. Análise filogenética mostrando a substituição de aminoácidos de transportadores de fosfato de alta afinidade por Pi em verde; os PTmitocondriais em azul; e os dependentes de Na^+ em amarelo. Para cada grupo são apresentados os *clusters* de cana-de-açúcar, respectivamente: SCEQRT1028B07.g, SCSBST3095B06.g e SCEZRT2019B05.g (*Pht1*); SCEZRT2019D07.g, SCCCLB1024B10.g, SCMCRT205F08.g e SCCCL2001B10.b (mitocondriais); SCCCAM2001A07.g e SCEZAM2059E07.g (Na-dependentes)

A estrutura secundária destes co-transportadores de fosfato é caracterizada por 12 domínios trans-membrana, divididos em dois grupos de seis, separados por uma longa alça hidrofílica carregada. Para predição desta estrutura secundária são empregados programas que geram índices de hidropatia, e assim denotam as regiões hidrofóbicas e hidrofílicas do polipeptídeo. Dois programas bastante difundidos e disponíveis na internet, são TmPred

(http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) e o TopPred (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/toppred.html>), os quais foram usado para determinação da estrutura secundária potencial do *cluster* SCEQRT1028B07.g. Os programas baseam-se no princípio *positive-inside rule*, inicialmente descrito para os aminoácidos arginina e lisina, de cargas positivas, voltados, em maior abundância, para parte interna da célula em proteínas trans-membrana. Essa tendência tem sido largamente confirmada experimentalmente, assim como em estudos estatísticos (von-Heijne, 1992; Claros e von-Heijne, 1994). As seqüências de arroz *Pht1-2* (AF493788) e *Pht1;2* cultivar indica (AF16722); tabaco NtPT2 (BAB21541), prob.IPT1 (T05714), PT2 At (NP_181428), e batata StPT1 (T07604) também foram incluídas nesta análise devido a alta identidade com *cluster* SCEQRT1028B07.g. Os resultados obtidos com o TopPred foram melhores, formando as 12 regiões hidrofóbicas, que caracterizam os domínios trans-membrana, com alta similaridade com os descritos no LePT1 e LePT2 de tomate (Liu C. et al., 1998) e AtPT1 e AtPT2 de Arabidopsis (Muchhal et al., 1996). A proteína conceitualmente traduzida do *cluster* de cana possui todas as características de um transportador de alta afinidade de Pi típicos de fungos e plantas, sendo estas proteínas associadas a membranas pertencentes a grande família (*Major Facilitator Super Family*), consistindo de 12 domínios trans-membrana divididas em dois grupos de seis por uma grande alça hidrofílica com carga, uma das característica comum em co-transportadores de açúcares, íons, antibióticos e aminoácidos (Chrispeels et al., 1999). O transportador de Pi de cana-de-açúcar contém sítios potenciais de fosforilação e de N-glicosilação (Figuras 2 e 3), como observados para transportadores de fungos e plantas (Raghothama, 1999). A seqüência “TAL” indicada é consenso para fosforilação por caseína quinase II, enquanto a “TAR” é o consenso para N-glicosilação, ambas situadas na alça hidrofílica entre os domínios seis e sete. A seqüência “SLEE”, corresponde ao sítio consensual para fosforilação por proteína quinase C, situado na extremidade carboxila, no aminoácido 511 após o décimo segundo domínio.

Os resultados apresentados até aqui indicam a existência de genes presumíveis de transportadores de fosfato de alta afinidade, mitocondriais e similares a PT dependentes de sódio. Destes 3 grupos, apenas um único *cluster*, o SCEQRT1028B07.g, composto de 28 clones EST, deduziu uma proteína completa de 541 aminoácidos caracterizada com transportador de alta afinidade por fosfato. Dos vinte oito clones que compõem este *cluster*, 50% são de tecidos de zona de raízes e da intercessão de parte aérea e raízes de planta maduras. Os restantes são provenientes diferentes tecidos como meristema apical, gema lateral, sementes, e plantas infectadas com *Herbaspirillum diazotrophicans* (Vettore et al., 2001). Essa

variabilidade de expressão sugere que cana possui uma família multigênica de PT. No projeto SUCEST, cerca de 90% das seqüências foi gerada no sentido 5', portanto é possível que nas extremidades 3', não seqüenciadas, possam ser encontradas variações que identifiquem isoformas de um gene. Para confirmar a identidade dos ESTs, a serem usados como sondas na caracterização funcional do(s) gene(s) de transportador de alta afinidade de fosfato, diversos clones foram requisitados e seqüenciados, inclusive pela extremidade 3' de forma a buscar possíveis variações de seqüências.

		I	II																					
IPT1 Nt	1	MAK--DQLQVINALDVAKTLQVHYHTAIIVLAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGRIYY	HHDGAPKPGTLPPNVSAAVNGVAF 78																					
Ph1-20sI	1	MAG---ELKVINALD SAKTQWYHFTAIVLAGMGFFTDAYDLF	SISLVTKLLGRIYY FNPASKS PGSLLPPNVSAAVNGVAF 77																					
Ph1-20s	1	MAG---ELKVINALD SAKTQWYHFTAIVLAGMGFFTDAYDLF	SISLVTKLLGRIYY FNPASKS PGSLLPPNVSAAVNGVAF 77																					
NtPT2	1	MAK--DQLQVINALDVAKTLQVHYHTAIIVLAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGRIYY	HHDGAPKPGTLPPNVSAAVNGVAF 78																					
PT2 At	1	MAR--EQLQVINALDVAKTLQWYHFTAIIVLAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGRIYY	HVEGAQKPGTLPPNVAAAVNGVAF 78																					
IPT1 Le	1	MAN--D-LQVINALDVAKTLQVHYHTAIIVLAGMGFFTDAYDLFCISMVTKLLGRLYY	HHDGALKPGSLPPNVSAAVNGVAF 77																					
StPT1	1	MAN--D-LQVINALDVAKTLQVHYHTAIIVLAGMGFFTDAYDLFCISMVTKLLGRIYY	HHDNALKPGSLPPNVSAAVNGVAF 77																					
ScPT1	1	MARGGDLQVLSALDAAKTQWYHFTAIVLAGMGFFTDAYDLFCISLVTKLLGRIYY	TDTSKENPGSLPPNVGAAVNGVAF 80																					
consensus	1	Mar d LqVL ALD AKTQwYHTAIivAGMGFFTDAYDLFcISlVTKLLGRiYY	PGsLPPNV AAVNGVAF 67																					
		II	III	IV																				
IPT1 Nt	79	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMMVICSIASGLSFGHTPKSVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 158																			
Ph1-20sI	78	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMLMVICCLASGLSFGS	SAKGVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 157																		
Ph1-20s	78	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMLMVICCLASGLSFGS	SAKGVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 157																		
NtPT2	79	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMMVICSIASGLSFGHTPKSVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 158																			
PT2 At	79	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMMVICSIASGLSFGHEP	KAVMATL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 158																		
IPT1 Le	78	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMMVICSIASGLSFGHTPKSVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 157																			
StPT1	78	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMMVICSIASGLSFGHTPKSVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 157																			
ScPT1	81	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMMVICSIASGLSFGHTPKSVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 160																			
consensus	68	CGTLAQQLFFGWLGDKMKRKR	VYGMTLMLMVICsiASGLSFGhtp	gVMTL	CLCFRFFWLGF	GIGGDYPLSATIMSEYANK 145																		
		V	VI	VII																				
IPT1 Nt	159	KTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAQTYQTDPLG	STVSQADFWWRIILMFGAIPAA	MTYYWRMKMPE 238																			
Ph1-20sI	158	RTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKAR	FDAPAYRDRAGSTVPQADYAWRI	VLMFGAIPAL	LTYYWRMKMPE 237																			
Ph1-20s	158	RTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKAR	FDAPAYRDRAGSTVPQADYAWRI	VLMFGAIPAL	LTYYWRMKMPE 237																			
NtPT2	159	KTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAQTYQTDPLG	STISQADFWWRIILMFGAIPAA	MTYYWRMKMPE 238																			
PT2 At	159	KTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAPAYEVDL	AGSTVPQADFWWRIILMFGAIPAA	MTYYWRMKMPE 238																			
IPT1 Le	158	KTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAPAYEVDL	AGSTVPQADFWWRIILMFGAIPAG	LTYYWRMKMPE 237																			
StPT1	158	KTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAPAYEVDL	AGSTVPQADFWWRIILMFGAIPAG	LTYYWRMKMPE 237																			
ScPT1	161	KTRGAFIAAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAPAYEVDL	AGSTVPQADFWWRIILMFGAIPAA	LTYYWRMKMPE 240																			
consensus	146	kTRGAFiaAVFAMQGFGLAGMVAIVSAAFKGA	FPAPAYEVDL	AGSTVPQADfwWRIiLM GA PA	LTYYWRmkMPE 217																			
		VIII	IX	X	XI	XII																		
IPT1 Nt	239	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMSKVLQV	IEE	EQEKVEN	VSQNT	-RNE	PGLFSR	QFLRRHGR	GLHL	L	GTA	STWFL	LDIAFYS	QNL	317						
Ph1-20sI	238	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMTQVLN	VE	EQEKAD	VARRE	---	QGLFSR	QFLRRHGR	HLLG	T	VC	NFV	LDIAFYS	SNL	314						
Ph1-20s	238	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMTQVLN	VE	EQEKAD	VARRE	---	QGLFSR	QFLRRHGR	HLLG	T	VC	NFV	LDIAFYS	SNL	314						
NtPT2	239	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMSKVLQV	IEE	EQEKVEN	VSQNT	-RNE	PGLFSR	QFLRRHGR	GLHL	L	GTA	STWFL	LDIAFYS	QNL	317						
PT2 At	239	TAR	Y	TAL	VAKDAKQAASDMSKVLQ	VE	IEPEQ	KL	EE	ISKEK	-SKA	PGLFSR	QFLRRHGR	GLHL	L	GTA	STWFL	LDIAFYS	QNL	317				
IPT1 Le	238	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMSKVLQ	VE	IEA	PEK	V	A	ISEAK	G	N	PGLF	T	KE	FLRRHGR	GLHL	L	GTA	STWFL	LDIAFYS	QNL	317
StPT1	238	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMSKVLQ	VE	IEA	PEK	V	A	ISEAK	G	N	PGLF	T	KE	FLRRHGR	GLHL	L	GTA	STWFL	LDIAFYS	QNL	317
ScPT1	241	TAR	Y	TAL	VAKNLKQAANDMSKVLQ	VE	IEA	PEK	V	A	ISEAK	G	N	PGLF	T	KE	FLRRHGR	GLHL	L	GTA	STWFL	LDIAFYS	QNL	319
consensus	218	TARY	T	AL	VAKnaKQAAdMskVLq	eI	dE	q	K	Idem	-sn	FGLFSr	E	r	RHGLHLvG	TattWFL	LDIAFYS	qNL	289					

Figura 2 - Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos do *cluster* SCEQRT1028B07.g (ScPT1) de cana-de-açúcar com o IPT1-Nt (AF156696 PID AAF74025) e NtPT2 (BAB21545) de tabaco; Ph1;2-Os (AF493788) e Ph1;2-Os I (AF416722) ambos de *Oryza sativa*, sendo o último grupo Indica; PT2 At (NP_181428) de Arabidopsis; Prob IPT Le (T05714) de tomate; StPT1 (T07604) de batata. Aminoácidos idênticos estão indicados em vermelho e as substituições conservadas em azul. Os 12 domínios trans-membranas são indicados em cinza e por números em algarismos romanos (I - XII). As seqüências sombreadas azul são sítios consensuais para fosforilação por proteína quinase C ("SLEE"), e a caixa aberta são o consenso para N-glicosilação ("TAR").

		VIII	IX	
IPT1 Nt	318	FQKDIFSAIGWIPPAQTMNALEEVYKIARAQTLIALCSTVPGYWFTVFF	IdKI GRFAIQIMGFFMTVFMFALAI	397
Pht1-20sI	315	FQKDIYTAQVQLPKADTMSALEEMFKISRQTLVALC	GIIPGYWFTVFFIdII GRFVIQLGGFFMTAFMLGLAVPYHHW	394
Pht1-20s	315	FQKDIYTAQVQLPKADTMSALEEMFKISRQTLVALC	GIIPGYWFTVFFIdII GRFVIQLGGFFMTAFMLGLAVPYHHW	394
NtPT2	318	FQKDIFSAIGWIPPAQTMNALEEVYKIARAQTLIALCSTVPGYWFTVFF	IdKI GRFAIQIMGFFMTVFMFALAI	397
PT2 At	318	FQKDIFSAIGWIPPAQSMNAIQEVFKIARAQTLIALCSTVPGYWFTVA	FIDVI GRFAIQMMGFFMTVFMFALAI	397
IPT1 Le	318	FQKDIFSAIGWIPPAQTMNALEEVYKIARAQTLIALCSTVPGYWFTVA	FIDKI GRFAIQIMGFFMTVFMFALAI	397
StPT1	318	FQKDIFSAIGWIPPAQTMNALEEVYKIARAQTLIALCSTVPGYWFTVA	FIDRI GRFAIQIMGFFMTVFMFALAI	397
ScPT1	320	FQKDIFTAINWIPKANTMSALEEVFRISRQTLIALCSTVPGYWFTVAL	IDVVGRFAIQLLGGFFMTVFMGLAIPYHHW	400
consensus	290	FQKDIFTAi WiP AntM AleEvfrIsRAQTLiALC TvPGYWFTVa	IDvvGRFaiQllGGFF MtVFM gLAIpYhHW	362
		X	XI	
IPT1 Nt	398	TLKDNRIIGFVIMYSLTFFFNFGPNAITTFVVP	AEIIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAMIGAFGLYAAQ	PTDRKKADAGYP 477
Pht1-20sI	395	TTFGTTSGFVVMYAFTEFFFNFGP	NSTTFIVPAEIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAI	VGSFGFLYAAQSTDA SKTDAGYP 374
Pht1-20s	395	TTFGNHIGFVVMYAFTEFFFNFGP	NSTTFIVPAEIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAI	VGSFGFLYAAQSTDA SKTDAGYP 374
NtPT2	398	TLKDNRIIGFVIMYSLTFFFNFGPNAITTFVVP	AEIIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAMIGAFGLYAAQ	PTDRKKADAGYP 477
PT2 At	398	TKHENRIIGFVIMYSLTFFFNFGPNAITTFVVP	AEIIPPARFRSTCHGISAAAGKAGAMIGAFGLYAAQ	PTDRKKADAGYP 477
IPT1 Le	398	TLKDNRIIGFVIMYSLTFFFNFGPNAITTFVVP	AEIIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAMIGAFGLYAAQ	PTDPKTDAGYP 477
StPT1	398	TLKDNRIIGFVIMYSLTFFFNFGPNAITTFVVP	AEIIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAMIGAFGLYAAQ	PTDPKTDAGYP 477
ScPT1	401	TKGNHIGFVVMYAFTEFFFNFGP	NSTTFIVPAEIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAI	IGAFGLYAAQNQDKSKADAGYP 480
consensus	363	T k nhiGFVVMYafTEFFFNFGPNsTTFIVPAEIPPARLRSTCHGISAAAGKAGAI	igAFGLYAAQ DksK DAGYP	437
		XII		
IPT1 Nt	478	AGIGVRNSLIILVLCVNLGMVFTFLVPE	SKGKSLEEMSRNEGEEESGTEMN--SGRIVPV--	538
Pht1-20sI	475	PGIGVRNSLFFLAGCNVIGFFF	TFLVPE SKGKSLEELSGENE	DDVDP-EAPSTADHRTAPAPPA 538
Pht1-20s	475	PGIGVRNSLFFLAGCNVIGFFF	TFLVPE SKGKSLEELSGENE	DDVDP-EAPSTADHRTAPAPPA 538
NtPT2	478	AGIGVRNSLIILVLCVNLGMVFTFLVPE	SKGKSLEEMSRNEGEEESGTEMN--SGRIVPV--	537
PT2 At	478	PGIGVRNSLIILVLCVNLGLLFTFLVPE	SKGKSLEEMSGENE	DNENS---NN-DSRIVPV-- 534
IPT1 Le	478	P GIGVRN SLIILVLCVNLGMVFTFLVPE	SKGKSLEELSRNEGEEETVAEIRAT-SGRIVPV--	538
StPT1	478	AGIGVRNSLIILVLCVNLGMVFTFLVPE	SKGKSLEEMSRNEGEEETVAEMRAT-SGRIVLKF-	540
ScPT1	480	AGIGVRNSLFLVLAACNMLGVFLTFLVPE	SKGKSLEEMSGEADDAEEAVGSRVRPSEIQMV--	541
consensus	438	aGIGVRNSL vLa N LG v TFLVPE SKGSLEEmSgE dd ee ra T v		479

Figura 3 - Continuação do alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos do *cluster* SCEQRT1028B07.g (ScPT1) de cana-de-açúcar com o IPT1-Nt (AF156696 PID AAF74025) e NtPT2 (BAB21545) de tabaco; Pht1-2-Os (AF493788) e Pht1-2-Os I (AF416722) ambos de *Oryza sativa*, sendo o último grupo Indica; PT2 At (NP_181428) de Arabidopsis; Prob IPT Le (T05714) de tomate; StPT1 (T07604) de batata. Aminoácidos idênticos estão indicados em vermelho e as substituições conservadas em azul. Os 12 domínios trans-membranas são indicados em cinza e por números em algarismos romanos (I - XII). As seqüências sombreadas em amarelo indicam consenso para fosforilação por caseína quinase II (“TAL”); em sombreado azul são sítios consensuais para fosforilação por proteína quinase C (“SLEE”), e a caixa aberta são o consenso para N-glicosilação (“TAR”).

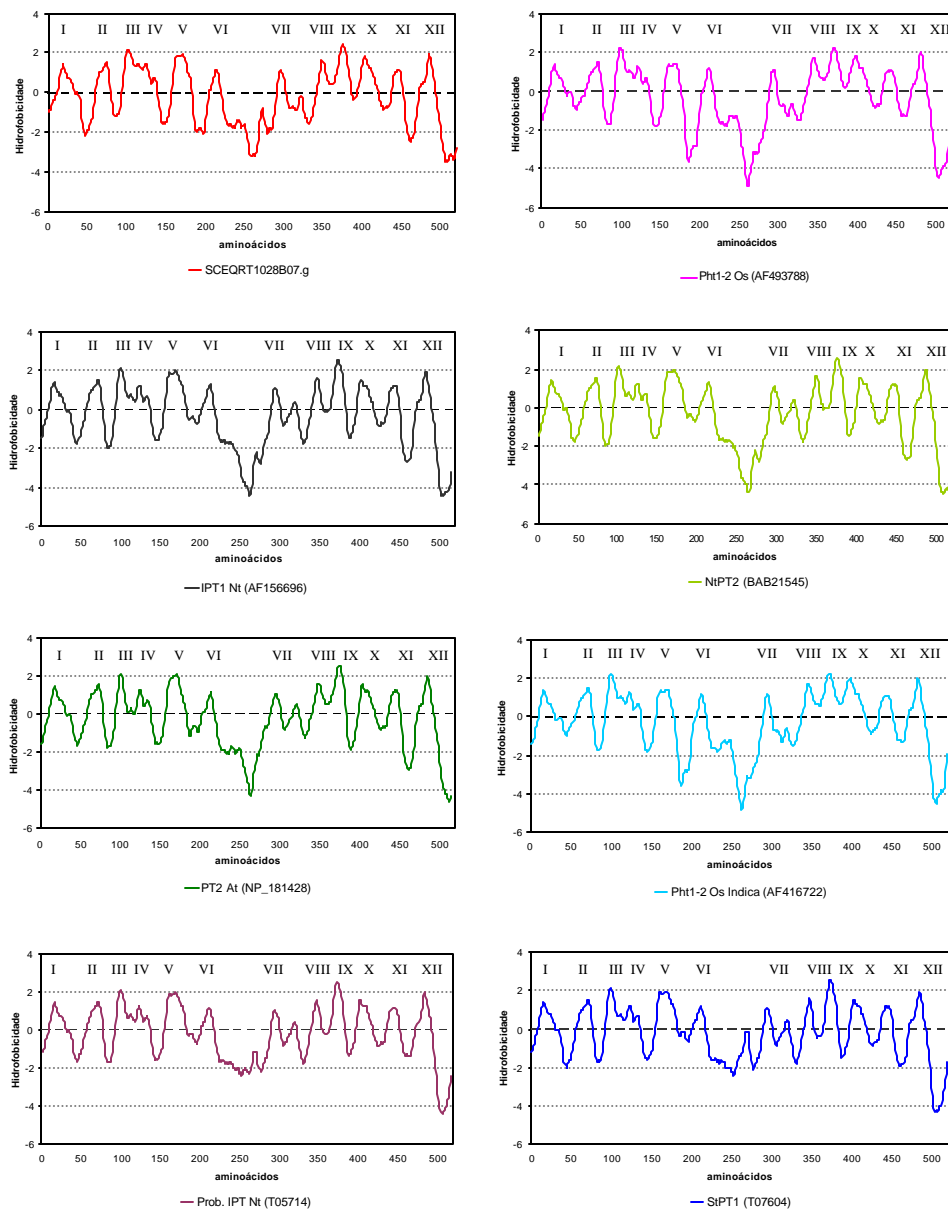


Figura 4 - Gráficos mostrando os valores de hidropatia (hidrofobia e hidrofília) das seqüências deduzida de aminoácidos do *cluster* **SCEQRT1028B07.g** de cana-de-açúcar; **Pht1-2-Os** e **Pht1-2-Os I** de arroz; **NiPT2**, **IPT1-Nt** e **prob.IPT1 Nt** de tabaco; **PT2 At** de Arabidopsis e **StPT1** de batata Os 12 domínios trans-membranas estão indicados por números em algarismos romanos (I - XII).

4.2 Seqüenciamento

O *cluster* SCEQRT1028B07.g é composto por 28 clones, dos quais foram seqüenciados os 20 clones recebidos. Também foram seqüenciados 4 clones de outros PT identificados em cana (Tabela 4).

Tabela 4. Listas dos clones EST seqüenciados não pertencentes ao *cluster* SCEQRT1028B07.g

<i>Cluster</i>	clone EST	<i>E-value</i>	Anotação
SCCCCL2001B10.b	SCCCLB1025H06.g SCCCSD2001D07.g	10^{-127}	T01169 phosphate transport protein, mitochondrial - maize >gi 3318613 dbj BAA31583.1 (AB016064)
SCSBST3095B06.g	SCSBST3095B06.g	10^{-77}	CAC28219.1 (AJ286744) phosphate transporter Sesbania rostrata
SCCCLR1001G10.g	SCEZLR1052H05.g SCEZLR1052H04.g	10^{-76}	CAC28219.1 (AJ286744) phosphate transporter Sesbania rostrata

Os clones do *cluster* SCEQRT1028B07.g foram seqüenciados no sentido 5' e 3' com os *primers* "T7" e "SP6", respectivamente, totalizando 48 reações de seqüenciamento. As seqüências de DNA obtidas, foram editadas para eliminar regiões do vetor de clonagem (pSPORT1) que tenham sido eventualmente seqüenciadas. Essa limpeza das seqüências foi realizada com auxílio de programa VecScreen. Uma vez eliminada a contaminação por seqüência do vetor, foi realizada a análise das seqüências através do programa BLAST/NCBI para verificar a homologia do DNA seqüenciado com o de outras espécies de plantas. No GeneBank, as seqüências de cana obtidas foram identificadas com os transportadores de fosfato apresentando valores $E < 10^{-76}$, exceto para 8 seqüências. Foi portanto, confirmada a identidade destes clones como transportadores de fosfato de plantas. No seqüenciamento são gerados cromatogramas, que são representações gráficas da intensidade de fluorescência emitida por cada nucleotídeo de DNA seqüenciado, e indicam a confiabilidade dos dados obtidos. As 8 seqüências com baixa identidade com transportadores de fosfato derivam de reações com baixa intensidade de sinal, baseada na análise dos cromatogramas. As 36 seqüências restantes apresentaram cromatogramas de maior confiabilidade que prosseguiram na análise de alinhamento e montagem.

A análise de alinhamento e montagem foi realizada no programa *Contig Express*. O programa usa o algoritmo *PAC3* e executa a leitura dos picos de fluorescência, associando a respectiva base nitrogenada a cada pico e atribuindo valores de qualidade para cada base. Após essa análise, o programa reescreve os dados, considerando o algoritmo *PAC3*, aumentando a precisão de montagem do alinhamento. Assim, foi realizado o alinhamento e montagem virtual das seqüências de DNA, que são reunidas para construir os *contigs*. Os *contigs* são agrupamentos de seqüências que apresentam regiões sobrepostas e adjacentes formando uma seqüência maior contínua.

Foram gerados 8 *contigs*, compostos por no mínimo 2 e no máximo 13 seqüências (Tabelas 5 e 6). Os *contigs* foram analisados individualmente, realizando-se possíveis correções nos próprios cromatogramas, os quais são visualizados no alinhamento montado. A estratégia adotada para as correções considerou a intensidade do sinal em termos gráficos, o valor *PAC3* atribuído aos picos das seqüências, e a predominância do nucleotídeo em questão, nas outras seqüências, na mesma posição no alinhamento. Os clones re-sequenciados são apresentados nas Tabelas 5 e 6, resumindo os resultados do BLAST dos *contigs* contra as seqüências originais de cana (*reads* do SUCEST). Esta estratégia possibilitou avaliar, de forma ampla, o conteúdo específico de cada *contig* contra as seqüências originais do SUCEST.

Os resultados mostram que os alinhamentos encontrados possuem valores *E* médios em torno de 10^{-131} . Os alinhamentos gerados para os *contigs* 5, 7 e 8 registraram os valores *E* mais elevados ($E < 10^{-92}$). Os *contigs* 7 e 8 possuem seqüências de menor qualidade (Tabela 6), o que interferiu na análise. O *contig* 5, coincidentemente, possui 5 seqüências “SP6”, o que pode ter contribuído para elevar o valor *E* observado, uma vez que muitas destas são inéditas. O *contig* 4 é o mais longo montado com 2335 pares de bases, no qual a maioria das seqüências é “T7”, ou seja, seqüenciadas partindo da extremidade 5', sendo estas destacados em azul na Tabela 5, quando encontram sua seqüência original no SUCEST. Dez destas seqüências, todas “T7” (5'), pertencem ao *cluster* SCEQRT1028B07.g, com o qual o *contig* 4 confirmou identidade ($E=0,0$) via BLAST/SUCEST na modalidade *cluster* (Tabela 7). Neste alinhamento, o *contig* 4 posiciona-se a região inicial (5'ATG=1954 nt) do *cluster* SCEQRT1028B07.g, extendendo-se até porção mediana (1630 nt). Simultaneamente, o *contig* 4 alinha-se em outra região com o *cluster* SCCCLRI001G10.g, o qual é incompleto e possui similaridade acima de 90% com a região inicial do SCEQRT1028B07.g.

Tabela 5. Resumo do identidade encontrada via BLAST entre *reads* dos *contigs* e o banco de dados do SUCEST. Os clones em azul foram identificados com os respectivos *reads* no SUCEST, e em vermelho estão marcados os clones com baixa qualidade de seqüenciamento, enquanto que os demais (em preto) não identificaram os mesmos no banco do SUCEST

<i>Contig</i>	Seqüenciamento		BLAST READ		
	<i>Primer</i>	CLONE	Seqüências	<i>E-value</i>	Identidade
1 785 pb	SP6	SCJFRZ3C08G02.g	SCJFRZ3C08G02.b	0,0	384/408 (94%)
	SP6	SCEPRZ3087C01.g	SCEQRT1028B07.g	10^{-149}	---
2 939 pb	SP6	SCQGRZ3012G09.g	SCRLSD1011F01.g	0,0	379/392 (96%)
	SP6	SCCCLB1025H06.g	SCCCLB1025H06.g	10^{-168}	---
	SP6	SCCCSD2001D07.g			
3 976 pb	SP6	SCSGRT2061H10.g	SCSGRT2061H10.b	0,0	494/512 (96%)
	SP6	SCBFLB2092E05.g	SCJFRZ3C08G02.b	10^{-127}	---
	SP6	SCAGHR1017H06.g	SCEQRT1028B07.g	10^{-125}	---
	SP6	SCRUAD1135D02.g	SCRFS2023E10.g	10^{-119}	---
4 2335 pb	---	---	SCPRLB2030E06.g	0,0	337/346 (97%)
	T7	SCEZLR1052H04.g	SCEZLR1052H04.g	0,0	337/346 (97%)
	T7	SCBFLB2092E05.g	SCBFLB2092E05.g	10^{-170}	328/346 (94%)
	T7	SCRUAD1135D02.g	SCRUAD1135D02.g	10^{-170}	328/346 (94%)
	T7	SCSGRT2061H10.g	SCSGRT2061H10.g	10^{-170}	328/346 (94%)
	T7	SCCCHR1003H08.g	SCCCHR1003H08.g	10^{-170}	328/346 (94%)
	T7	SCAGHR1017H06.g	SCAGHR1017H06.g	10^{-170}	328/346 (94%)
	T7	SCAGHR1015G01.g	SCAGHR1015G01.g	10^{-170}	328/346 (94%)
	T7	SCRFLB2056E04.g	SCRFLB2056E04.g	10^{-160}	324/346 (93%)
	SP6 T7	SCSBST3095B06.g	SCSBST3095B06.g	10^{-157}	278/281 (98%)
	---	---	SCCCLR1001G10.g	10^{-147}	310/333 (93%)
	---	---	SCJFRZ3C08G02.g	10^{-140}	243/245 (99%)
	T7	SCEPRZ3087D05.g	SCEPRZ3087D05.g	10^{-140}	243/245 (99%)
	---	---	SCEPRZ3087C01.g	10^{-140}	243/245 (99%)
	T7	SCEPRZ3086G08.g	SCEPRZ3086G08.g	10^{-140}	243/245 (99%)
T7	SCEZAM2059E01.g	SCEZAM2059E01.g	10^{-138}	242/245 (98%)	
5 1787 pb	T7	SCJFRZ3C08G02.g	SCJFRZ3C08G02.b	10^{-98}	364/408 (89%)
	SP6 T7	SCEQRT1028B07.g	SCEQRT1028B07.g	10^{-98}	364/408 (89%)
	T7	SCCCLB1025H06.g	SCRFS2023E10.g	10^{-93}	362/408 (88%)
	SP6 T7	SCRFRZ3055C02.g	SCQGRZ1038F09.g	10^{-81}	328/369 (88%)
	SP6	SCQGRZ3012G09.g	SCQGRZ3012G09.g	10^{-78}	343/390 (87%)
	SP6	SCEPRZ3086G08.g			

Tabela 6. Continuação Resumo do identidade encontrada via BLAST entre *reads* dos *contigs* e o banco de dados do SUCEST. Os clones em azul foram identificados com os respectivos *reads* no SUCEST, e em vermelho estão marcados os clones com baixa qualidade de seqüenciamento, enquanto que os demais (em preto) não identificaram os mesmos no banco do SUCEST

<i>Contig</i>	Seqüenciamento		BLAST READ		
	<i>Primer</i>	CLONE	Seqüências	<i>E-value</i>	identidade
6 783 pb	T7	SCJFHR1C01G05.g SCQGRZ3012G09.g	SCJFRZ3C08G02.b SCEQRT1028B07.g SCRFS2023E10.g SCQGR1038F09.g	10 ⁻¹⁴⁶ 10 ⁻¹⁴⁶ 10 ⁻¹³⁵ 10 ⁻¹²⁴	449/495 (90%) --- --- ---
7 801 pb	SP6 SP6	SCAGHR1015G01.g SCCCHR1003H08.g	SCJFHR1C01H03.b SCJFHR1C01H03.g SCAGAM2122F02.g SCJFRZ3C08G02.b	10 ⁻¹²⁶ 10 ⁻¹²⁶ 10 ⁻⁹⁵ 10 ⁻⁵⁰	267/279 (95%) --- --- ---
8 789 pb	T7 SP6	SCEZLR1052H05.g SCEZLR1052H04.g	SCSFLV1047G10.g	10 ⁻⁹²	186/191 (97%)

Dos 28 clones que compõem o *cluster* SCEQRT1028B07.g, apenas dois foram seqüenciados originalmente pela extremidade 3'. Avaliando os resultados, curiosamente os *contigs* 1, 2, 5 e 7, onde predominam seqüências "SP6" (3'), alinham com a porção terminal do *cluster* SCEQRT1028B07.g (Tabela 7). O *contig* 3 alinha com *cluster* SCEZRT2019B05.g, um transportador de fosfato incompleto, similar a porção final do SCEQRT1028B07.g.

É necessário ressaltar que a formação de oito *contigs* foi influenciada, aos seguintes fatores:

- possuir apenas 20 dos 28 clones EST que compõe o *cluster* SCEQRT1028B07.g;
- seqüenciar 18 clones partindo da extremidade 3' com o *primer* "SP6";
- ter incluído seis clones que pertencem a outros *cluster* de transportadores de fósforo do SUCEST.

No seqüenciamento partindo da extremidade 3', de um total de 18 seqüências "SP6", 16 não foram encontradas no banco de dados de cana-de-açúcar por serem inéditas. As seqüências "SP6" geraram, pelo menos, 5 novos genes potenciais, a partir do seqüenciamento das extremidades 3', aqui denominados de *contigs* 1, 2, 3, 5 e 7 (Tabela 7). Enquanto as seqüências "T7", predominantes no *contig* 4 e 6, e 40% de participação no *contigs* 5. O *contig* 8 foi desconsiderado devido a inferioridade da qualidade de suas seqüências.

Recomenda-se finalizar o seqüenciamento dos maiores clones (Figura 5) usando a tática de *shot-gun*, para identificar seqüências completas e caracterizar possíveis polimorfismos e isoformas.

Tabela 7. Resumo do homologia encontrada via BLAST entre os *contigs* e o banco de dados *cluster* CAP3

(*posição do alinhamento do *contig* no referente *cluster* de cana).

<i>Contig</i>	Tamanho (pb)	Valor <i>E</i>	Identidade (%)	<i>Cluster</i>	Posição nucleotídeos * (pb)
1	785	0,0	384/408 (94%)	SCEQRT1028B07.g	165-565
2	939	0,0	379/392 (96%)	SCEQRT1028B07.g	90-696
3	976	0,0	463/494 (93%)	SCEZRT2019B05.g	510-1002
		10 ⁻¹²⁸	--	SCEQRT1028B07.g	--
4	2335	0,0	418/432 (96%)	SCCCLR1001G10.g	431-1
		0,0	388/416 (93%)	SCEQRT1028B07.g	1630-2031
5	1787	10 ⁻¹⁴⁷	449/495 (90%)	SCEQRT1028B07.g	267-734
6	783	10 ⁻¹⁴⁷	449/495 (90%)	SCEQRT1028B07.g	267-734
7	801	10 ⁻¹²⁷	263/274 (95%)	SCEQRT1028B07.g	1-271
8	789	10 ⁻⁷⁹	148/148 (100%)	SCEZRZ1017F11.g	567-714

4.3 Produção de sondas dos clones EST

O *cluster* SCEQRT1028B07.g foi montado a partir de 28 *reads*, sendo a maioria deles (15) derivados de bibliotecas de raízes e de zona de transição entre raiz-parte aérea. Os genes codificando transportadores de P_i de alta afinidade são preferencialmente expressos em raízes, com indução rápida em baixas concentrações de P em alguns sistemas (Raghothama, 2000). Os transportadores de P_i de alta afinidade são também expressos em outras partes das plantas, tais como folhas, ramos, tubérculos e flores, provavelmente associados com transporte interno na planta (Raghothama, 1999). Essa expressão variável em diferentes tecidos sugere a ocorrência de diversos genes no genoma, conforme já foi descrito para a *Arabidopsis* (9 genes presumíveis) e arroz (13 genes) (Paszowski et al., 2002). Buscando identificar os genes de P_{Tem} cana-de-açúcar, foram testados diversos clones do *cluster* SCERT1028B07.g como sondas no genoma de cana para avaliar variações no padrão de fragmentos de restrição, estimar o número de cópias no genoma, assim como avaliar variações na indução e expressão desse(s) gene(s).

Alíquotas do DNA plasmidial purificado por lise alcalina dos clones EST do *cluster*, com cerca de 200 ng de cada, foram digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII*

simultaneamente, durante duas horas a 37°C. Foram aplicados em gel de agarose 1% em TAE para eletroforese por duas horas a 1,5 volts cm^{-1} , e a digestão dos clones e liberação dos insertos de cana-de-açúcar foi visualizada, possibilitando a análise do padrão de restrição (Figura 5). A estimativa do tamanho dos insertos em pares de bases, pode ser encontrada na Tabela 8.

Procurou-se escolher aqueles clones EST cujo inserto iniciava-se na região da alça hidrofóbica do gene estendendo-se até TAG-3'. A região da alça apresenta uma sequência única, característica do transportador de fosfato de cana-de-açúcar, evitando assim parte dos domínios hidrofóbicos da proteína que são bastante conservadas nas proteínas transportadoras de membrana (Alberts et al., 1994). Na extremidade 3' dos genes transportadores de fosfato já descritos, podem ser encontradas algumas variações na sequência de nucleotídeos que caracterizam certas isoformas (Chrispeels et al., 1999). A utilização de diferentes sondas com variações nesta região, possibilitara a identificação de isoformas no genoma da cana-de-açúcar.

Os clones escolhidos para purificação de insertos e confecção de sondas foram o 7, 8, 9, 10, 16, 20, 24, 25, os quais são representantes das bibliotecas RZ3, RT1, AD1 e RT3 (Tabela 8). Sendo estes de bibliotecas diferentes, maiores são as chances de encontrar isoformas e genes tecido-específico dos transportadores fosfato de cana.

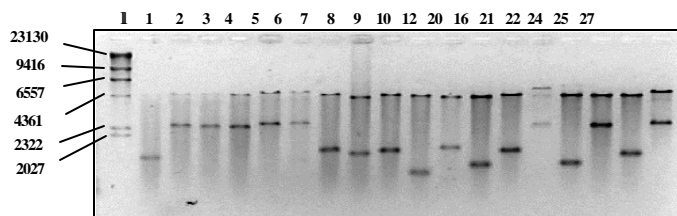


Figura 5 - Clones do cluster SCEQRT1028B07.g exibindo o padrão de restrição e liberação de insertos, quando digeridos com as enzimas *Eco* RI e *Hind* III. Na primeira coluna está o marcador de peso molecular λ -Hind (1) com 536,7 ng, em seguida os clones EST: SCAGAM2122F02.g (1), SCAGHR1015G01.g (2), SCAGHR1017H06.g (3), SCBFLB2092E05.g (4), SCCCHR1003H07.g (5), SCCCHR1003H08.g (6), SCEPRZ3086G08.g (7), SCEPRZ3087C01.g (8), SCEPRZ3087D05.g (9), SCEQRT1028B07.g (10), SCEZAM2059E01.g (12), SCQGRZ3012G09.g (20), SCJFRZ3C08G02.g (16), SCRFLB2056E04.g (21), SCRFRZ3055C02.g (22), SCRUIAD1135D02.g (24), SCSBRT3037F05.g (25) e SCSGRT2061H10.g (27).

Tabela 8. Clones do *cluster* SCEQRT1028B07.g e sua posição relativa no consenso.

N°	<i>Cluster</i> <i>READS</i>	Posição no consenso		Sequência SUCEST peso molecular (pb)	Tamanho do inserto
		Início (Início)	Final (Final)		
1	SCAGAM2122F02.g	410	-40	450	1262
2	SCAGHR1015G01.g	2040	1380	660	2482
3	SCAGHR1017H06.g	2040	1390	650	2421
4	SCBFLB2092E05.g	2040	1260	780	2392
5	SCCCHR1003H07.g	2040	1460	580	2543
6	SCCCHR1003H08.g	2040	1440	600	2639
7	SCEPRZ3086G08.g	1430	800	630	1481
8	SCEPRZ3087C01.g	1430	750	680	1376
9	SCEPRZ3087D05.g	1440	690	750	1445
10	SCEQRT1028B07.g	810	110	700	917
11	SCEQRT2025H10.g	2050	1580	500	
12	SCEZAM2059E01.g	1580	800	780	1556
13	SCJFHR1C01H03.b	660	0	660	
14	SCJFHR1C01H03.g	660	0	660	
15	SCJFRZ3C08G02.b	810	130	680	
16	SCJFRZ3C08G02.g	1490	690	800	1463
17	SCMCRT2106B11.g	2070	1410	670	
18	SCQGRT1038F09.g	700	130	570	
19	SCQGRT3042E05.g	930	30	900	
20	SCQGRZ3012G09.g	1100	390	710	1076
21	SCRFLB2056E04.g	2040	1320	720	2512
22	SCRFRZ3055C02.g	1600	970	630	1116
23	SCRFS2023E10.g	950	270	680	
24	SCRUAD1135D02.g	2030	1550	480	2451
25	SCSBRT3037F05.g	950	380	570	1376
26	SCSGHR1071F04.g	1400	705	695	
27	SCSGRT2061H10.g	2050	1370	680	2575
28	SCVPLB1016D08.g	910	210	700	

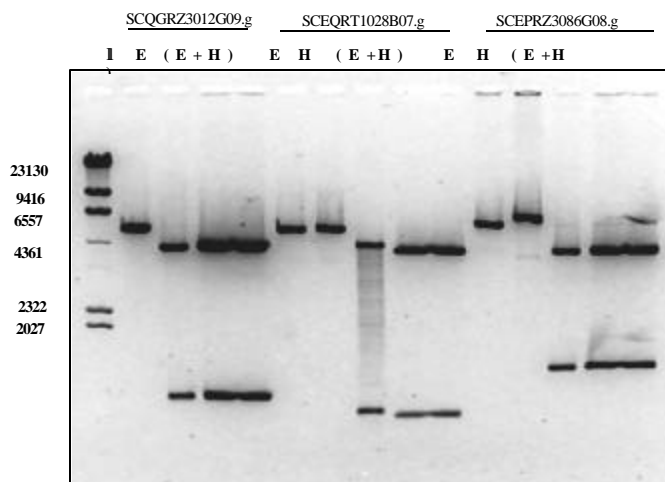


Figura 6 - Digestão dos clones SCQGRZ3012G09.g, SCEQRTI028B07.g, SCEPRZ3086G08.g para purificação de insertos liberados e do vetor pSPORT1 linearizado. As enzimas *EcoRI* e *HindIII* foram usadas individualmente como controles **E** e **H**; e simultaneamente (E+H) para liberação do insertos; marcador molecular λ -*HindIII* (**I**) com 536,7ng.

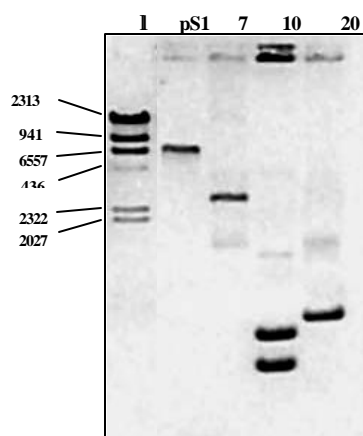


Figura 7 -Gel para diagnóstico de insertos purificados dos clones: SCEPRZ3086G08.g (7), SCEQRTI028B07.g (10) e SCQGRZ3012G09.g (20), e do vetor pSPORT1 (pS1) linearizado. Foram aplicadas 536,7 ng do marcador λ -*HindIII* (**I**).

A estratégia de produzir sondas via digestão e purificação de fragmentos EST (Figura 6-7) não gerou fragmentos puros, havendo contaminação das sondas testadas com restos de DNA do vetor e interferiram em alguns testes de hibridação. Portanto, foi conduzida uma nova estratégia através da purificação de produtos de PCR.

4.3.1 Purificação de clones via produtos de PCR

Para o teste inicial foi utilizado o clone SCSFSD2064C07.g. O resultado da amplificação (Figura 8A) mostrou bandas de DNA correspondentes ao tamanho dos clones estimados na Tabela 8. As bandas correspondendo ao tamanho dos clones EST foram removidas do gel com cerca de 300 mg e purificadas. Os pellets de DNA produzidos foram ressuspendidos em 30 μL cada, dos quais foram aplicados 5 μL em gel de agarose 1 %, e as amostras visualizada após eletroforese (Figura 8B). A concentração média atingida para essas amostras purificadas foi de 93,5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$, demonstrando que o rendimento dos produtos de PCR foi maior do que das purificações dos insertos feitas através das digestões *EcoRI-HindIII*. Dos clones purificados, foram feitas diluições de trabalho com 10 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ para utilização nas marcação de sondas.

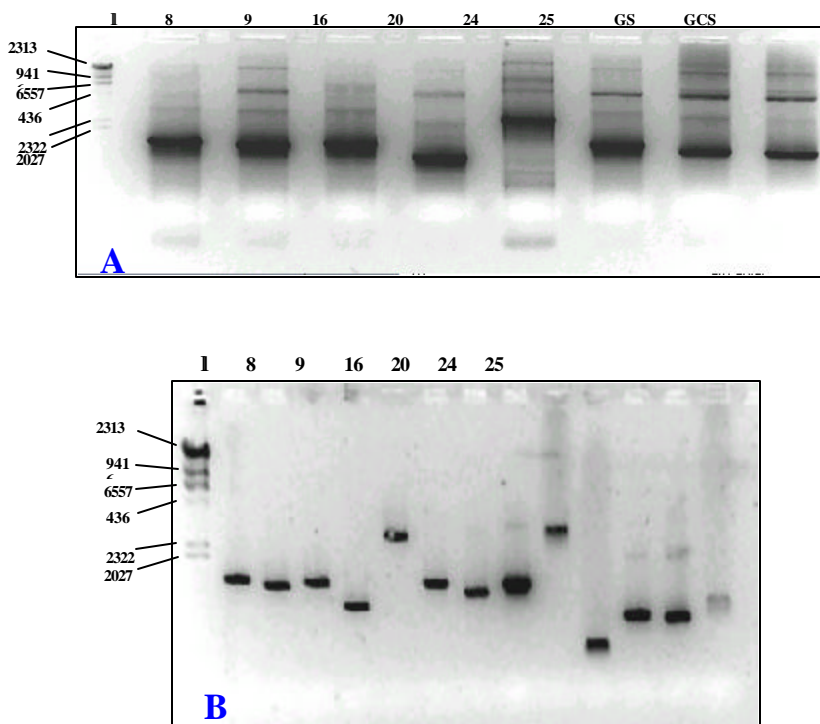


Figura 8 - **A** - Reações de amplificação para produção de sondas. **B** - Produtos do PCR purificados com o kit GFX. Os clones do *cluster* SCEQRT1028B07.g de cana são: SCEPRZ3087C01.g (8), SCEPRZ3087D05.g (9), SCJFRZ3C08G02.g (16), SCQGRZ3012G09.g (20), SCRUAD1135D02.g (24), SCSBRT3037F05.g (25). O marcador λ -HindIII foi usado com 805 ng em A e B.

4.4 Extração de DNA genômico de cana-de-açúcar

A extração de DNA genômico seguiu o método CTAB como citado, apenas escalonado para extração de maiores quantidades de DNA para realização dos experimentos de *Dot Blot* e *Southern* testando diferentes sondas.

4.4.1 *Dot blot*

Para testar os clones de cana como sondas usou-se a técnica do *Dot Blot*, através da qual foi possível testar várias sondas simultaneamente e escolher a melhor para as análises de *Southern* e *Northern*. O kit para marcação não radioativa e detecção de ácidos nucleicos Alkaphos Direct/CPD-Star foi utilizado com sucesso. A marcação de sondas é feita via ligação covalente termoestável da enzima fosfatase alcalina com ácidos nucleicos, possibilitando a utilização para análises de *Southern* e *Northern*. O sistema trabalha com a detecção da quimioluminescência produzida pela reação enzimática catalizada pela enzima na degradação do substrato dioxetano.

Das sondas testadas, os clones SCEPRZ3087D05.g, SCJFRZ3C08G02.g, SCRUAD1135D02.g, SCSBRT3037F05.g foram os que apresentaram melhores resultados (Figura 9). O sinal detectado no *blot* do DNA de cana não foi tão intenso quanto o gerado pelas sondas hibridizadas contra os respectivos clones purificados (CP). A quantidade de 10 µg de DNA genômico, parece ter sido demasiada para o pequeno *blot*, dificultando assim a hibridização da sonda com sua sequência homóloga do genoma. A hibridização com a sonda SCEPRZ3087C01.g não funcionou por que o microtubo de hibridização se soltou e ficou parado sem agitação. O plasmídeo pBG35 (contendo genes ribossomiais 25S-5.8S-18S de linho), foi usado como controle, porém não funcionou contra o seu respectivo CP, sugerindo baixa homologia entre as sequências ou problemas relativos a eficiência na marcação desta sonda (Figura 9).

Um segundo ensaio *Dot Blot* foi realizado e os resultados obtidos para as sondas SCEPRZ3087D05.g, SCJFRZ3C08G02.g, SCQGRZ3012GO9.g, SCRUAD1135D02.g e SCSBRT3037F05.g confirmaram-se para as sondas de transportadores de fosfato. As sonda SCEPRZ3087D05.g, SCRUAD1135D02.g e SCSBRT3037FO5.g apresentaram um sinal mais intenso contra o DNA genômico (dados não mostrados).

Num terceiro ensaio, os clones EST purificados SCEPRZ3087D05.g, SCEQRTI028B07.g, SCEZAM2059E01.g e SCSBRT3037F05.g foram fixados as suas respectivas membranas, como controle positivos (CP), em três quantidades (10, 5 e 2 ng) com uma repetição cada, afim de serem testados como sondas. O vetor pSport1 linearizado foi usado como controle negativo (CN), aplicando-se 5 ng por *blot*. Foram testados três purificados do pSport1 com uma repetição cada, totalizando seis *blots* do CN. O alvo de sondagem foi o DNA genômico da cana-de-açúcar ('SP80-3280'), aplicado-o em dois *blots* com 5 e 10 µg cada. Dois *blots* foram preparados com H₂O como branco (B), para verificar o efeito de *background* na membrana e a qualidade da água (Figura 10).

Cada conjunto com controle positivo, controle negativo, DNA genômico de cana e o branco, foi individualizado em uma membrana com 16 *blots* para serem hibridizados com as respectivas sondas, em tubos de 15 mL. A hibridização transcorreu por 15 h a 65°C em 5 mL do tampão apropriado, com adição de 5 ng mL⁻¹ de sonda marcada. As lavagens primárias foram realizadas a 65°C por duas vezes durante 10 min, e as secundárias por duas vezes de 5 min à temperatura ambiente, como anteriormente descrito. A geração do sinal durou 5 min, na presença do substrato estável dioxetano, o CDP-Star. Todas as 4 sondas testadas deram sinais positivos, tanto para os controles positivos quanto para o DNA genômico, coerentes com as quantidades de DNA aplicados às membranas. As sondas SCEQRT1028B07.g e SCSBRT3037F05.g tiveram maior intensidade de sinal com os respectivos CP do que as sondas SCEPRZ3087D05.g e SCEZAM2059E01.g. Para uma mesma quantidade de DNA usada na marcação de sondas, o número e cópias de um dado fragmento será maior, quanto menor for seu tamanho em termos de número de pares de bases. Isso explica em parte a variação na intensidade sinal entre as sondas contra seus CPs. O clone SCEQRT1028B07.g possui cerca de 900 pb, portanto as 25 ng usadas para preparação da sonda possuem maior número de cópias marcadas do que os demais clones que são maiores (SCSBRT3037F05.g ≅ 1,3 kb; SCEPRZ3087D05.g ≅ 1,4 kb e SCEZAM2059E01.g ≅ 1,5 kb). A Figura 10 mostra exatamente um sinal mais intenso para as sondas com maior número de cópias marcadas e um decaimento gradual do sinal em função das quantidades do CP aplicadas (10, 5 e 2 ng). A exceção é a membrana onde a aplicação de 10 ng da sonda SCSBRT3037F05.g (CP), que apresentou um sinal ligeiramente menos intenso ou igual ao sinal onde aplicaram-se 5 ng, provavelmente devido a uma variação na pipetagem. Os controles negativos não apresentaram sinal, exceto a membrana sondada com o clone SCSBRT3037F05.g (1,3 kb), pois parte da sua sequência está além dos limites do cDNA consenso do *cluster* SCEQRT1028B07.g. A intensidade de sinal apresentado nas hibridizações com DNA genômico, correspondem às quantidades aplicadas (10 e 5 ng), menos para a membrana sondada com SCEZAM2059E01.g onde o sinal apresenta igual intensidade para os *blots* com 5 e 10 ng, devido a provável variação na aplicação do DNA genômico.

Os clones escolhidos como sondas originaram de bibliotecas distintas [raízes de plantas adultas (RT1 e RT3), da zona de transição entre parte aérea e raiz (RZ3), e do ápice meristemático e parte aérea de plantas novas (AM2)], demonstrando a tecido especificidade em diferentes etapas de desenvolvimento e expressão temporal de genes transportadores de fosfato de alta afinidade em cana-de-açúcar.

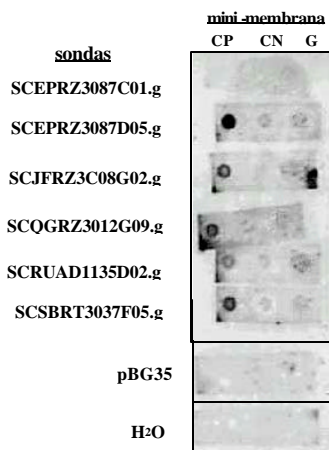
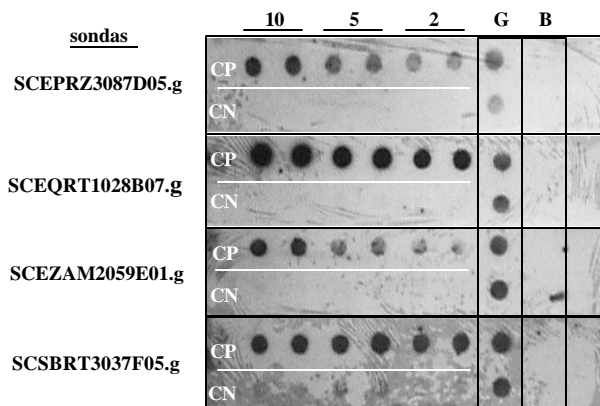


Figura 9 - *Dot Blot* 1 não radioativo das mini-membranas hibridizadas a 65°C individualmente em microtubos. Revelação feita após 1 hora de exposição do filme. Os *blots* da esquerda são os controles positivos (CP) com 10 ng cada: SCEPRZ3087C01.g, SCEPRZ3087D05.g, SCJFRZ3C08G02.g, SCQGRZ3012GO9.g, SCRUAD1135D02.g e SCSBRT3037F05.g. No centro, encontram-se os *blots*



dos controle negativos (CN) do vetor pSport1 linearizado (10ng). A direita estão os *blots* de DNA genômico (G) de cana-de-açúcar (10g). As duas últimas mini -membranas foram sondadas com o clone pBG35 (genes 25S e 18S rRNAs) e com água respectivamente.

Figura 10 - *Dot Blot* ensaio 3 das membranas hibridizadas individualmente em tubos de 15 mL, à 65°C. Revelação feita após 1 hora de exposição do filme. Os seis *blots* à direita do “CP”, correspondem aos controles positivos (CP) com 10, 5 e 2 ng das sondas: SCEPRZ3087D05.g, SCEQRT1028B07.g, SCEZAM2059E01.g e SCSBRT3037F05.g. À direita de “CN”, seis *blots* do controle negativo (CN) pSport1 linearizado, com 5 ng cada.

Na coluna **G** apresenta dois *blots* por membrana do DNA genômico de cana-de-açúcar com 10 e 5 µg, superior e inferior respectivamente. A coluna **B**, contendo dois blots por membrana, nos quais aplicou-se água.

4.5 Southern blot

As amostras individuais com 10 µg de DNA, de três variedades de cana ('SP80-3280'; 'SP80-180'; 'SP80-4966'), foram digeridas com as enzimas de restrição *EcoRI*, *DraI* e *XbaI* durante 12 hs. O conjunto completo das amostras, incluindo o controle positivo da sonda SCSBRT3037F05.g e o controle negativo, 10 ng do vetor pSport1 linearizado, foram analisadas em gel de eletroforese, sendo o DNA transferido para uma membrana de nylon para então ser hibridizada contra sonda radiomarcada [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP. Nesse experimento, ocorreu uma digestão parcial da enzima *EcoRI*, principalmente nos DNAs das variedades 'SP80-180' e 'SP80-4966'. Após a hibridização, o controle negativo apresentou um sinal, inúmeras vezes mais fraco do que CP, possivelmente por uma contaminação do plasmídeo purificado juntamente com uma pequena porção do DNA do clone SCSBRT3037F05.g parcialmente digerido. Essa sonda foi preparada através da estratégia de digestões com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, e pequenos fragmentos de DNA plasmidial permaneciam na sonda com essas digestões simultâneas.

Mesmo com esse problemas, a digestão de DNA genômico de cana com a enzima *DraI* revela pelo menos 6 bandas da variedade 'SP80-3280' e 4 bandas nas outras variedades, enquanto que nas digestões com *EcoRI* e *XbaI*, pelo meros 5 fragmentos foram identificados (Figura 11). Esses resultados indicam que o gene presumível do transportador de fosfato de alta afinidade de cana-de-açúcar possui várias cópias no genoma para cada uma das três variedades, o que é esperado, considerando que a cana é um organismo poliplóide.

Em análises subseqüentes foi empregada a marcação não radioativa Alkphos com duas temperaturas de hibridização, 55°C e 60°C. No primeiro teste, a sonda usada foi o clone SCSBRT3037F05.g, sendo 7 µg de DNA genômico das variedades de cana 'SP80 3280' e 'SP80 180' digeridos com as enzimas de restrição *EcoRI* e *HindIII* de corte raro e *HaeIII* e *RsaI* de corte freqüente. O padrão de bandas obtidos com a hibridização foi semelhante ao encontrado na hibridização prévia com [$\alpha^{32}\text{P}$]-dCTP, porém ainda com um rastro de sinal de *background* acompanhando o sentido da corrida de eletroforese. Nos experimentos seguintes, foi realizada a hibridização a 60°C, e foram obtidos bandas mais nítidas e menor sinal de *background* (dado não mostrado).

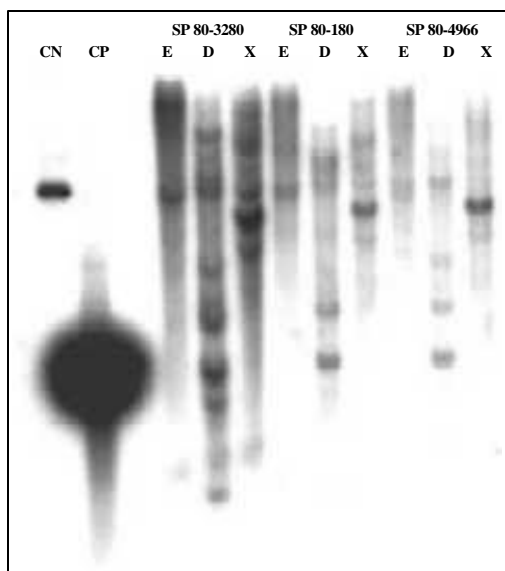


Figura 11. *Southern* genômico das variedades ‘SP80 3280’, ‘SP80-180’ e ‘SP 80-4966’ de cana-de-açúcar usando o clone SCSBRT3037F05.g como sonda marcada com $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP. O DNA genômico (10 μg) foi digerido com as enzimas *Eco*RI (E), *Dra*I (D) e com *Xba*I (X). O controle positivo (CP) da sonda e controle negativo (CN), vetor pSPORT 1 linearizado foram carregados com 10 ng cada.

A próxima análise de *Southern* foi realizada com as enzimas *Hae* III *Mbo* I, *Rsa* I e as de corte freqüente *Dra* I, *Eco* RI, *Hind* III e *Sal* I para testar qual dessas opções seria a melhor para o diagnóstico do *Southern Blot*. Apenas a digestão com a enzima *Sal* I não foi satisfatória (Figura 12). Os padrões de digestão gerados pelas enzimas de corte freqüente identificam rastros (*smear*) de DNA com fragmentos de peso molecular menor que 2500 pb (Figura 12), enquanto as enzimas de corte raro *Dra* I, *Eco*RI e *Hin*III produziram rastros de fragmentos maiores.

A sonda SCSBRT3037F05.g produzida via PCR, foi a primeira a ser testada com sistema de marcação A1kPhos Direct. A hibridização foi conduzida a 65°C durante a noite. Em seguida a sonda foi removida com 1% SDS e um novo *Southern* foi realizado com a sonda SCEPRZ3087D05.g, conduzido a 68°C (Figura 14).

Em ambos casos, os três controles positivos (três sondas testadas) acenderam, uma vez que todos ocupam a mesma região no consenso do *cluster* SCEQRT1028B07.g. Porém o sinal mais intenso foi gerado quando as sondas hibridizaram com seus respectivos controles

(Figuras 13 e 14). As bandas que aparecem acima do controles positivos, são similares as encontradas na reação de PCR (Figura 8A), reforçando a idéia de que a reação de PCR pode ser melhorada, embora as bandas não apareçam nos fragmentos purificados (Figura 8B). Na hibridização realizada a 65°C (Figura 13), o controle negativo acendeu, indicando a possibilidade aumentar a temperatura de hibridização ou o número e/ou tempo de lavagens. No segundo *Southern*, com a sonda SCEPRZ3087D05.g a temperatura de hibridização foi elevada para 68°C, o que melhorou o resultado.

As hibridizações com enzimas de corte raro permitem a melhor visualização dos fragmentos, que variam de pelo menos 5 com *EcoRI* a mais de 16 com *DraI* usando a sonda SCSBRT3037F05.g (Figura 13) e de pelo menos 7 com *EcoRI* a 12 com *HindIII* utilizando a sonda SCEPRZ3087D05.g. O número alto de fragmentos (> 5) é constante entre as enzimas, indicando um número equivalente de cópias no genoma. É importante ressaltar também, que o padrão de fragmentos obtidos para as combinações sonda x enzima de restrição diferem entre sondas (Figura 13 e 14, setas azuis e vermelhas). Essa diferença está mais evidente para as digestões com *DraI*, *EcoRI* e *HindIII*. Esse fato indica que as sondas, apesar de originarem de um mesmo *cluster*, e presumivelmente do mesmo gene, possuem um padrão de restrição distinto, sugerindo serem genes distintos e com localização diferente no genoma. Em cana-de-açúcar foi estimado que um gene num único loco no genoma está presente com aproximadamente 10 cópias, cada uma representando potencialmente um haplótipo, sendo 8 ou 9 correspondente a *S. officinarum* e 1 ou 2 a *S. spontaneum* (Grivet et al., 2001). Esses números esperados de cópias (cerca de 10) por genoma é consistente com os números de fragmentos estimados nas análises de *Southern* aqui apresentadas (média de fragmentos próximo a 10). Também, o padrão distinto de hibridização mostrados pelas duas sondas indicam tratarem-se de locos distintos. O genoma da *Arabidopsis* contém 9 genes presumíveis de transportadores de fosfato de alta afinidade, enquanto que o genoma de arroz possui pelo menos 13 cópias (Paszowski et al., 2002). Portanto, é razoável assumir que existam pelo menos 13 genes distintos de transportadores de fosfato de alta afinidade no genoma de cana-de-açúcar, dada a sintenia entre as gramíneas (Grivet & Arruda, 2001).

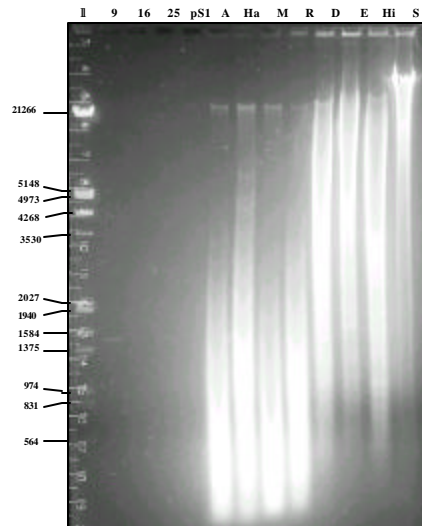


Figura 12 - Gel de agarose para *Southern* não radioativo, exibindo o DNA genômico digerido, da variedade ‘SP80-3280’, sendo 10 μ g por cada enzima: *AluI* (**A**), *HaeIII* (**Ha**), *MboI* (**M**), *RsaI* (**R**), *DraI* (**D**), *EcoRI* (**E**), *HindIII* (**Hi**), *SalI* (**S**). O marcador λ -*EcoRI/HindIII* (**I**) contendo 1 μ g, está à esquerda dos controles positivos (10ng): SCEPRZ3087D05.g (**9**), SCJFRZ3C08G02.g (**16**) e SCSBRT3037F05.g (**25**). O pSport1 (**pS1**) linearizado (6ng) foi usado como controle negativo.

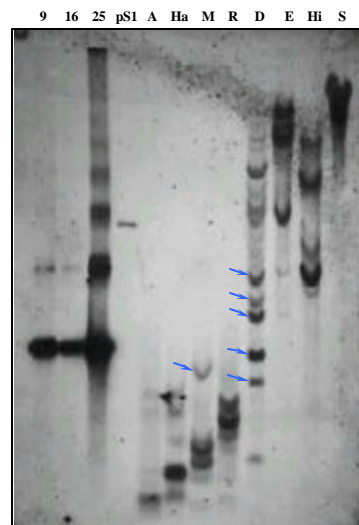


Figura 13 - *Southern* genômico da variedade ‘SP80-3280’ hibridizado a 65°C, usando a sonda SCSBRT3037F05.g (**25**). O DNA genômico (10 μ g) foi digerido com as enzimas: *AluI* (**A**), *HaeIII* (**Ha**), *MboI* (**M**), *RsaI* (**R**), *DraI* (**D**), *EcoRI* (**E**), *HindIII* (**Hi**) e *SalI* (**S**). Os controles positivos são (10ng): SCEPRZ3087D05.g (**9**), SCMCRT2106B11.g (**16**) e SCSGHR1071F04.g (**25**). Controle negativo é o pSport1 (**sP1**) linearizado. Setas azuis indicam fragmentos específicos para essa sonda (comparar com Figura 14).

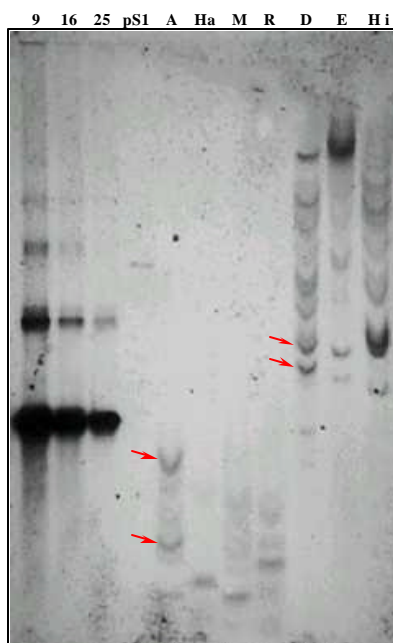


Figura 14 - *Southern* não radioativo hibridizado a 68°C, sondado com o clone SCEPRZ3087D05.g (9). DNA genômico foi digerido com as enzimas: *AluI* (A), *HaeIII* (Ha), *MboI* (M), *RsaI* (R), *DraI* (D), *EcoRI* (E), e *HindIII* (Hi). Os controles positivos são (10ng): SCEPRZ3087D05.g (9), SCJFRZ3C08G02.g (16) e SCSBRT3037F05.g (25). O controle negativo é pSport1 (sP1). Linenrizaio. Setas vermelhas indicam fragmentos específicos para essa sonda (comparar com Figura 13).

Buscando otimizar as condições de análise, foram realizados outros *Southern*s radioativo, empregando a sonda SCSBRT3037F05.g de 1300 pb (Figura 15), marcada com [α^{32} P]-dCTP, hibridizada por 15 h a 65°C, e revelado após uma semana de exposição. O controle positivo (CP) corresponde aplicação no gel de 0,54 ng do fragmento purificado do clone. As diversas digestões formaram um padrão complexo de múltiplas bandas, com baixa resolução, mas coerente com a hipótese de haver pelo menos 10 cópias do gene específico para essa sonda no genoma da cana-de-açúcar.

Devido a complexidade do genoma da cana, existe a necessidade de investigar maiores detalhes sobre os vários clones disponíveis pelo sequenciamento completo, seguido da hibridização, para permitir a conclusão de forma mais definitiva sobre o número de cópias dos diversos genes de transportadores de fosfato alta afinidade no genoma da cana-de-açúcar.

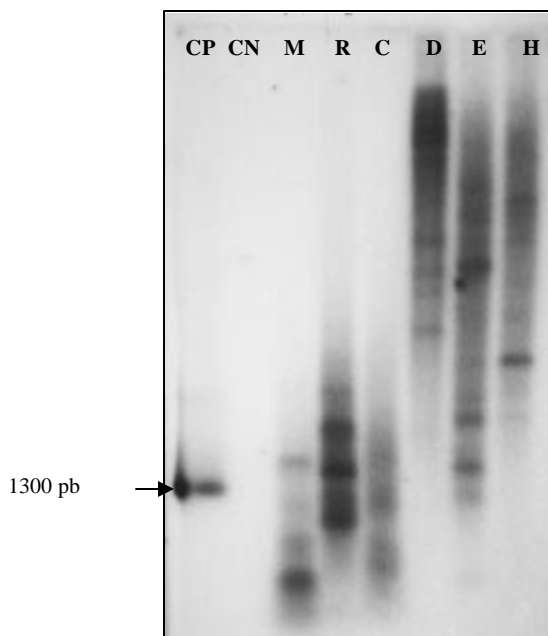


Figura 15 - *Southern Blot* sondado com o fragmento de 1300 pb do clone SCSBRT3037F05.g, marcado com ^{32}P . Hibridização realizada a 65°C durante 15 horas e exposição do filme por uma semana. O controle positivo (CP) corresponde a aplicação no gel de 0,54 ng do DNA purificado do clone SCSBRT3037F05.g. As enzimas de corte frequente são *MboI* (M), *RsaI* (R) e *HaeIII* (C); e as de corte raro são *DraI* (D), *EcoRI* (E) e *HindIII* (H).

4.6 Material vegetal e hidroponia

Para evitar a influência de reservas pré-existentes nos toletes usado na propagação da cana, optou-se por utilizar plântulas derivadas de cultivo *in vitro*. Para esse fim, plântulas derivadas de culturas de meristemas da variedade 'SP80-3280', foram fornecidas gentilmente pela COPERSUCAR (Figura 16). Para o desenvolvimento dos ensaios de expressão gênica, foi estabelecido um sistema de hidroponia para impor os tratamentos de deficiência de P. As plântulas *in vitro*, metade mantidas na fase II e a outra na fase III, eram a cada 20 dias repicadas para meio MS fresco, selecionando-se para aclimatização aquelas com sistema radicular bem desenvolvido, característica do final da fase III. As plântulas selecionadas passavam para bandejas coletivas de aclimatização e posteriormente transferidas para vasos no sistema de hidroponia, montado no Laboratório de Plantas Cultivadas Sob Estresse na USP-Esalq (Fig. 17A e 17B).

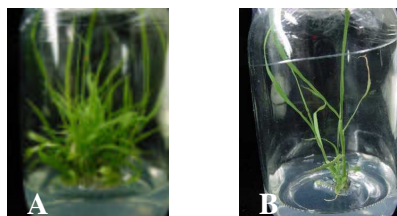


Figura 16. Plantas *in vitro* de cana-de-açúcar variedade 'SP80-3280'. A. material vegetal na fase II caracterizado pelo perfilhamento e brotamento em forma de tufo. B. planta na fase III com regeneração completa da parte aérea e início do desenvolvimento do sistema radicular.

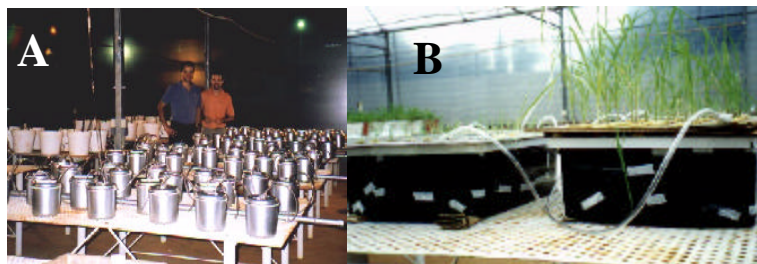


Fig. 17. Visualização do sistema de hidroponia na Esalq (A e B), Aspecto geral da montagem dos experimentos; B. Sistema rotacional de aclimatização de plantas, as plantas maiores em solução de Hoaglad 1/6 diluída, as menores na concentração 1/10.

4.7 Indução da deficiência de fósforo

4.7.1 Experimento I: indução da expressão temporal de PT

O período experimental de apenas 3 dias não possibilitou observar diferenças significativas para as médias de pH das soluções nutritivas nas dosagens de Pi (Figura 18). Os valores médios de pH encontrados mostram a sua evolução no decorrer do período experimental, possivelmente representando o consumo de nutrientes da solução pela planta, de

forma aparentemente similar entre as soluções com e sem Pi. O pH pode afetar a absorção de Pi pelas plantas.

Não foram observadas diferenças significativas para crescimento nas plantas (dados não mostrados). Neste experimento, foi observado que num período de 48 hs, houve um decréscimo significativo no teor de fósforo das raízes entre os tratamentos (0 e 250 μM), mas não para a parte aérea (Figura 19; Tabela 9). É possível que em 48 hs, as plantas cultivadas sem Pi tenham iniciado uma translocação de fosfato para partes jovens a fim de manter a homeostasia na planta, sem estar em condição de estresse agudo por Pi. Em tabaco, plantas cultivadas em hidroponia na ausência de Pi, tiveram quedas no teor de Pi das raízes em apenas 3 dias (Kai et al., 2002).

Esse experimento foi conduzido por tempo limitado não suficiente para detectar diferenças na concentração de P na parte aérea, nem um efeito no crescimento das plantas. Entretanto, foi observada uma possível re-mobilização de P das raízes. Nos tempos pré-determinados (0, 6, 12, 24 e 48 hs) foram coletadas raízes e folhas das plantas cultivadas com e sem fosfato, identificadas e armazenadas a -80°C para realizar a análise de expressão gênica por *Northern blot*.

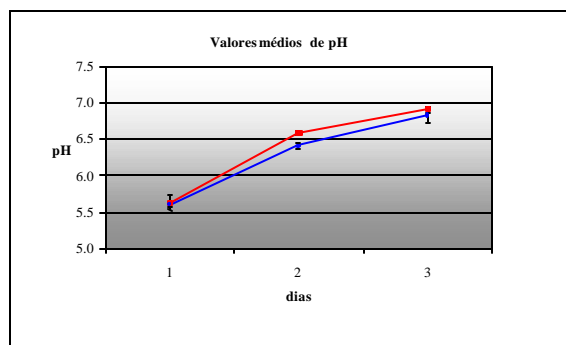


Figura 18 - Experimento I, valores médios de pH para as doses 0 e 250 μM de fosfato.

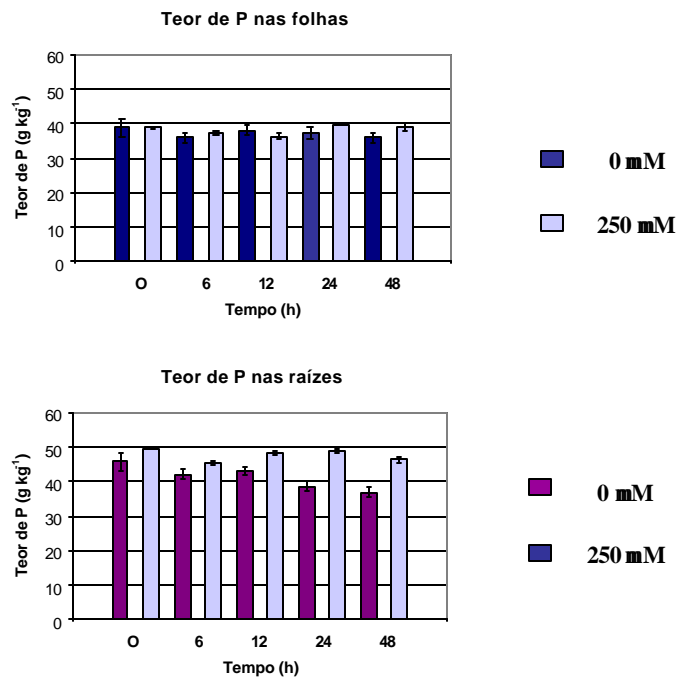


Figura 19 – Teor de Pi de folhas e raízes do experimento de indução temporal (A). Quadro de análise de médias do teor de Pi das raízes, do experimento de indução temporal, pelo teste Tukey (5%).

Tabela 9 - Comparação de médias de teor de P nas raízes de plantas de cana cultivadas na presença (250 mM) e ausência de P por 48 h.

Raízes		
Dose (μM)	Média (g .kg ⁻¹)	Tukey
250	47,7	A
0	41,3	B

4.7.2 E Experimento II: expressão de PT em função de seis doses de fosfato

De forma similar ao descrito para o ensaio anterior, o pH da solução nutritiva de todos os tratamentos aumentou desde o início, chegando por volta de 7 e 7,5 ao final de 14 dias (Figura 20A). Nas maiores doses de Pi (50, 100 e 250 μM), foram atingidos valores mais elevados de pH, sugerindo maior consumo de nutrientes (Fig. 20A). O comportamento do pH é uma evidência que as condições experimentais da solução nutritiva foram as mesmas para todas as plantas, variando apenas quanto a dose de Pi aplicada nos tratamentos. Neste experimento, foram realizadas leituras de SPAD de cada planta no 5, 7, 10^o e 14^o dias, como um parâmetro de observação do estado fisiológico das plantas, capaz de diferenciar o efeito dos tratamentos pela determinação indireta do teor de clorofila (Figura 20B). As leituras de SPAD revelaram que, apesar das plantas do mesmo tratamento possuírem valores diferentes entre si, as leituras apresentam a mesma tendência no tempo. As plantas nas doses de 0, 5 e 10 μM de fósforo apresentaram uma tendência comum de ascensão dos valores SPAD, seguida de declínio (Figura 20B). O declínio nos valores de SPAD nas menores concentrações parecem derivar de sintomas associados pela deficiência de P, demonstrados pelas valores altamente significativamente menores para os teores de P na raiz e parte aérea (Tabela 10) e pelo reduzido crescimento (Figura 20C). Em contrapartida, as plantas das doses 50, 100 e 250 μM apresentaram uma tendência de crescimento dos valores SPAD até o 14^o dia (Figura 20B). O peso fresco médio inicial das plantas por tratamento foi 2,10 g e do experimento em geral de 2,08 g, o que caracterizou a uniformidade do material vegetal selecionado (Figura 20C). Não houve diferenças significativas para peso médio final entre os tratamentos. Entretanto, as plantas que mais cresceram (cerca de 4,72X) com relação ao peso fresco inicial foram cultivadas com a dose 50 μM de Pi, com uma diferença sutil para as cultivadas na dose 100 μM (4,69X) e seguidas pelas da dose de 250 μM (4,47X). O tratamento sem Pi teve o menor taxa de crescimento das plantas (3,91x) (Fig. 20C).

Os resultados desse ensaio indicam ter ocorrido uma deficiência de fósforo, demonstrado pelas diferenças significativas nos teores de P nas raízes e parte aérea (Tabela 10) e pela aparente redução no crescimento das plantas nas menores concentrações de P e pelos valores de SPAD. No final de 14 dias as plantas foram identificadas, pesadas, coletadas separando raízes e parte aérea, e armazenadas a -80°C C para realizar a análise de expressão gênica por *Northern blot*.

Tabela 10 - Comparação de médias de teor de P nas raízes e parte aérea de plantas de cana cultivadas na presença de diversas doses de P por 14 dias.

Dose de P (μM)	Teor de P na raiz mg g^{-1}	Tukey	Teor de P na parte aérea mg g^{-1}	Tukey
250	28,4	A	30,4	A
100	22,0	AB	26,4	B
50	16,6	BC	17,0	C
10	12,6	C	11,2	D
5	13,6	C	10,5	D
0	9,7	C	10,2	D

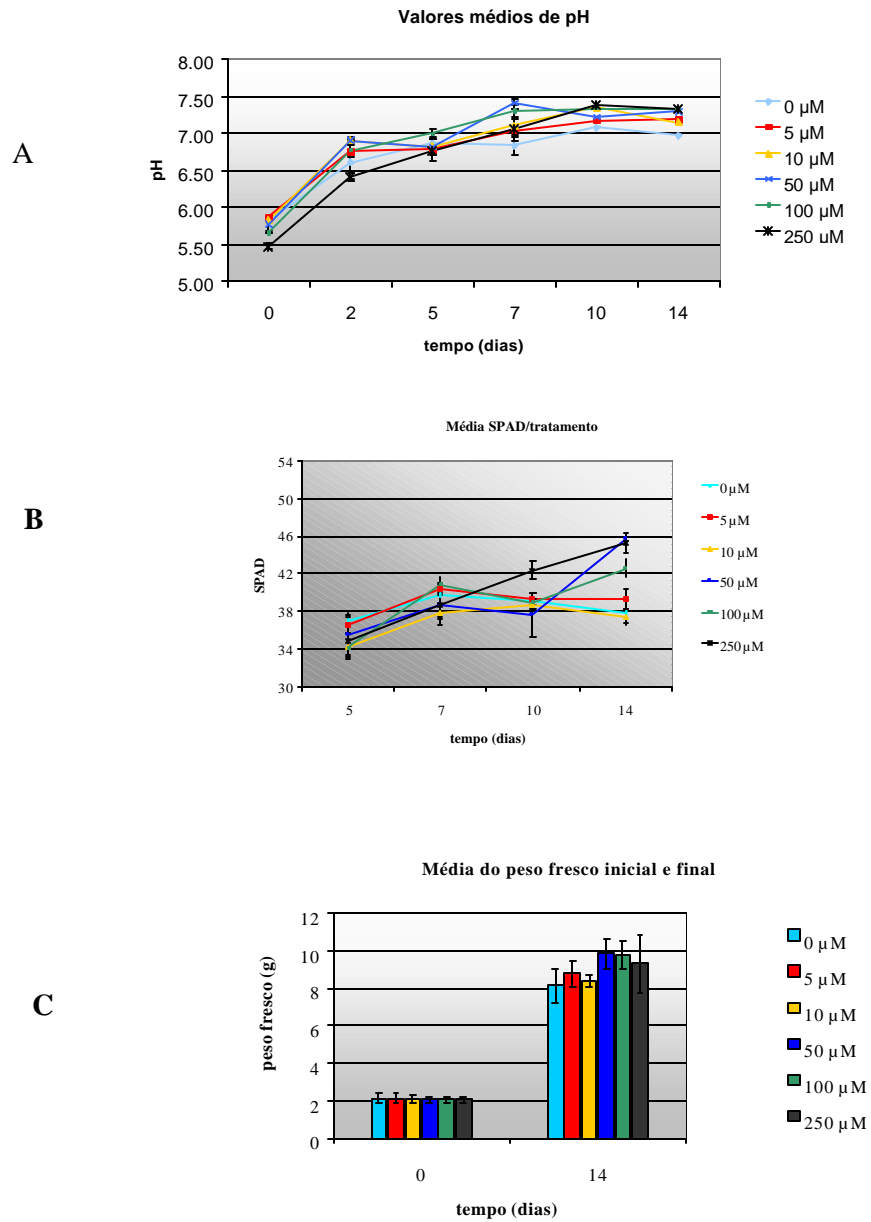


Figura 20 - (A) Média dos valores de pH do experimento de seis doses de Pi.

(B) Média das leituras de SPAD.

(C) Média do peso fresco inicial e final das plantas.

4.7.3 Experimento III: expressão de ptem função de 3 doses de fosfato:

Esse experimento foi conduzido de forma similar ao anterior, utilizando apenas 3 doses de fósforo (0, 50 e 250 μM). O pH e as leituras de SPAD tiveram comportamento similar ao observado no experimento II, exceto que os valores SPAD do Experimento III foram maiores (dados não mostrados), pois algumas das plantas utilizadas eram um pouco mais desenvolvidas. Houve diferenças significativas para leitura de SPAD aos 14 dias, com os valores significativamente menores para as plantas cultivadas na ausência de P. Também, foram observadas diferença significativas entre os tratamentos para teores de P nas raízes e parte aérea (Tabela 11). Embora o valor médio de peso fresco inicial tenha tido uma pequena variação entre os tratamentos (5,8 a 6,2 g), a dose de 50 μM Pi registrou a maior taxa de crescimento das plantas (4,58X com relação ao peso inicial), coerente com o resultado do Experimento II. A menor taxa de crescimento foi observada para o tratamento sem fosfato.

Os resultados desse ensaio confirmam as conclusões do experimento II, com indicações de ter ocorrido deficiência de fósforo, evidenciado pelas diferenças significativas nos teores de P nas raízes e parte aérea (Tabela 11), nos valores de SPAD aos 14 dias, e pela redução no crescimento das plantas na ausência de P. No final do experimento, as plantas foram identificadas, pesadas, coletadas separando raízes e parte aérea, e armazenadas a -80°C até a realização da análise de expressão gênica por *Northern blot*.

Tabela 11 - Comparação de médias de teor de P nas raízes e partes aéreas de plantas de cana cultivadas na presença de diversas doses de P por 14 dias.

Dose (μM)	Folha (mg g^{-1})		Dose (μM)	Raiz (mg g^{-1})	
	Média	Tukey		Média	Tukey
250	35,67	A	250	32,25	A
50	11,75	B	50	20,50	B
0	16,67	B	0	110,50	C

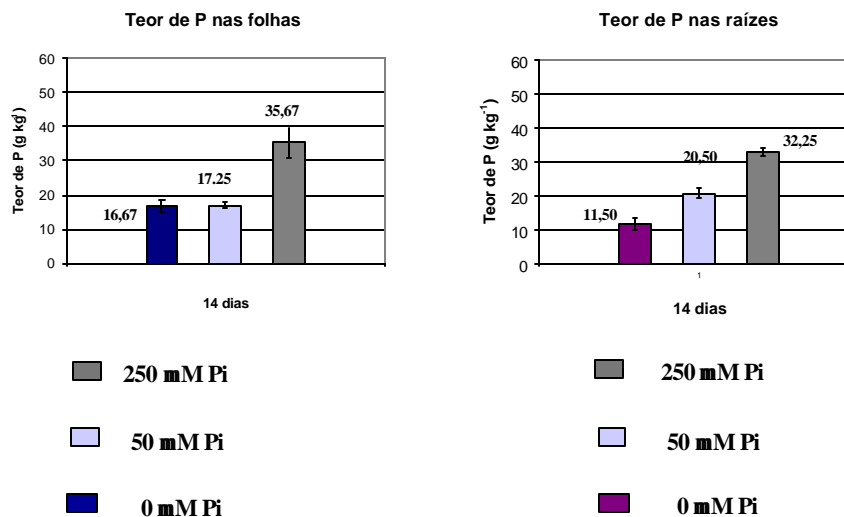


Figura 21 - Teores de P na parte aérea (A) e raízes (B) de cana-de-açúcar cultivadas em doses crescentes de P (0, 50 e 250 μ M)

4.8 Extração de RNA

Inicialmente, foram realizados testes de extração de RNA e *Northern Blot* com amostras de raiz e folha de plantas cultivadas na ausência e presença de fósforo (250 μ M). As primeiras extrações de RNA foram conduzidas partindo de 100 mg de tecido fresco e sem utilização de citrato de sódio e cloreto de sódio na etapa de precipitação do RNA. Após os testes iniciais, foram obtidos melhores resultados partindo de 200 mg de folha e 400 mg de raiz de tecido fresco para extração de RNA com 1200 μ L de Trizol, acrescentando citrato de sódio e cloreto de sódio para a precipitação do RNA total.

4.9 Northern blot

Inicialmente, foram empregadas hibridizações não radioativas com o sistema AlkPhos Direct realizadas a 65°C, empregando de 2 e 4 μ g de RNA total, mas não foram obtidos resultados satisfatórios, sendo detectado sinal apenas nos controles positivos na autoradiografia (dados não mostrados). Passou-se então, a empregar apenas sondas marcadas com [α ³²P]-

dCTP, o que demandou inúmeras otimizações nas temperaturas de hibridização, presença de formamida; tempo, temperatura e número de lavagens.

A análise de expressão do gene de transportador de fosfato de alta afinidade foi conduzida para as amostras de folhas e raízes das plantas do experimento I. As amostras (5 µg de RNA total de raízes e folhas) derivam de plantas de cana-de-açúcar cultivadas na ausência (- P = 0 µM) ou presença de Pi (+P = 250µM) em solução nutritiva, coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas (Fig. 24 e 25). A hibridização transcorreu a 42°C durante a noite, em tampão com formamida, tendo com sonda o clone SCEPRZ3087DO5.g. O mesmo procedimento foi seguido com as mesmas amostras do experimento I, que foram hibridizadas com a sonda SCEQRT1028B07.g.

As análises de *Northern* com a sonda SCEPRZ3087DO5.g (Figura 24 e 25) indicam um baixo nível de expressão desse transcrito para todos os tratamentos. Também não foi detectada a indução de transcritos de transportadores de fósforo de alta afinidade de Pi em folhas e raízes durante o período do experimento (48 h) pela ausência de fósforo. Pelo contrário, o gene parece apresentar uma expressão com padrão constitutivo, tendo sido detectado tanto em raízes como em folhas.

Já as análises de *Northern* com a sonda SCEQRT1028B07.g (Figura 26) demonstram o mesmo baixo nível de expressão em todos os tratamentos, mas existe alguns indícios de indução dos transcritos em folhas 12 hs após imposição da ausência de fósforo.

Os transportadores de fosfato de alta afinidade de cana-de-açúcar provavelmente possuem uma cinética de expressão mais tardia, quando comparada a outros sistemas, uma vez que essa espécie é uma cultura semi-perene, com maior capacidade de acúmulo de reservas e maior rusticidade. A expressão dos transcritos de *LePT1* e *LePT2* em tomate foi demonstrada iniciar com 12 horas após a imposição de ausência de P, atingindo o máximo de indução aos 5 dias (Liu C. et al., 1998). O mesmo foi observado para *Arabidopsis* com indução de *AtPT1* em 5 dias (Muchhal et al., 1996), enquanto foram necessários 14 dias para detectar transcritos dos genes de tabaco *NtPT1* a *NtPT4* (Kai et al., 2002). Já em arroz, foram necessários 35 dias para detectar a expressão do gene *OsPT11* associado a colonização por *G. intraradices* (Paszkowski et al., 2002). A indução do transportador de fosfato de alta afinidade induzido por presença de micorrizas em *M. truncatula* (*MtPT4*) foi detectada apenas duas semanas após a inoculação (Harrison et al., 2002), enquanto que em batata o gene *StPT3* foi detectado após 6 a 8 semanas de inoculação com micorrizas (Rausch et al., 2001). A expressão do transportador de fosfato de alta afinidade de cana-de-açúcar necessita ser avaliada por um período mais longo.

As amostras derivadas do experimento II também foram analisadas quanto a expressão do gene HAPT. As amostras derivaram de raízes e folhas (5 µg de RNA total de cada) das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em doses crescentes de P (0, 5, 10, 50, 100 e 250 µM) em solução nutritiva, coletadas 14 dias da imposição dos tratamentos (Fig. 27). A hibridização transcorreu a 42°C com formamida durante a noite, usando como sondas os clones SCEPRZ3089D05.g e SCEQRT1028B07.g.

Para essas duas sondas, o nível de expressão em folhas detectado aos 14 dias foi um pouco superior que as anteriores (Figura 27). Mesmo assim, o acúmulo de transcritos para as duas sondas foi baixo. Não foi detectada a expressão das duas sondas em raízes. Não foi demonstrada nessas condições uma indução desses genes pela ausência de P.

A hipótese inicial era que a ausência de P seria o fator preponderante na indução de todos os genes de transportadores de fosfato de alta afinidade, inclusive os de cana-de-açúcar, baseado nos resultados existentes na literatura (Muchhal et al., 1996; Liu C. et al., 1998; Raghothama, 1999; 2000). Resultados mais recentes indicam que os diversos membros da família de genes de HAPT diferem para sua regulação em relação presença ou ausência de P, sendo também afetados pela simbiose de plantas com micorrizas.

Em batata, os níveis de mRNA de *StPT1* mantêm-se altos, independente da concentração de P no solo, enquanto que os de *StPT2* são reprimido pela maior abundância de P, enquanto um outro gene (*StPT3*) é induzido pela colonização por micorrizas (Rausch et al., 2001). Em tabaco, plantas cultivadas em hidroponia na ausência de Pi, apresentaram quedas no teor de Pi das raízes em apenas 3 dias, quando os genes *NtPT1* e *NtPT2* foram fortemente induzidos em tecidos verdes, enquanto *NtPT3* e *NtPT4* foram levemente expressos apenas em raízes (Kai et al., 2002).

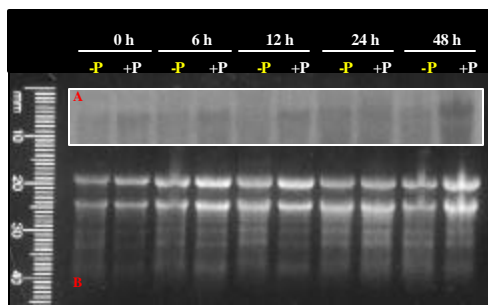


Figura 24 - *Northern Blot* (A) realizado com RNA de raízes de plantas de cana cultivadas na ausência de e presença Pi (-P= 0mM; +P = 250 μ M). As amostras coletadas nos tanpos 0, 6, 12 24 e 48 horas. A normalização das amostras de RNA total (B), extraídas das raízes e aplicadas cerca de 5 μ g, em gel desnaturante. A sonda utilizada é proveniente do clone SCEPRZ3087D05.g.

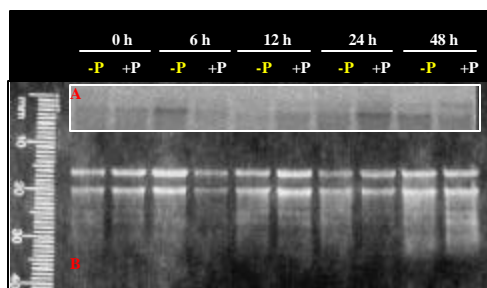


Figura 25 - Expressão do acúmulo de transcritos (*Northern* figura A) em folhas de plantas de cana cultivadas na ausência de e presença Pi (-P = 0 μ M; +P = 250 μ M) em solução nutritiva e coletadas nos tempos 0, 6, 12 24 e 48 horas. Amostras de RNA total de folhas e aplicadas cerca de 5 μ g cada, em gel desnaturante (B). A sonda utilizada é proveniente do clone SCEPRZ3087D05.g.

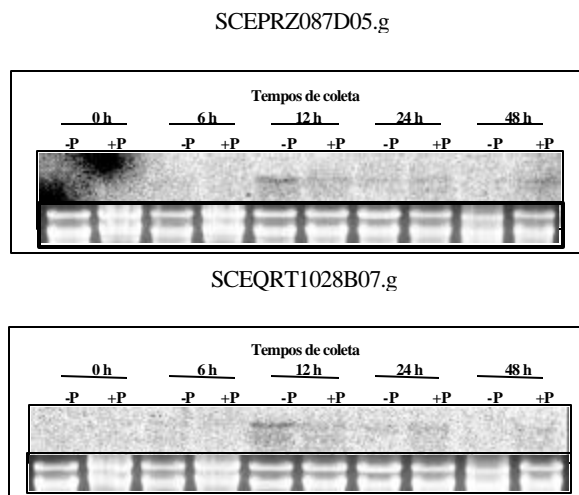


Figura 26 - Expressão dos transportadores de fosfato de cana. Expressão do acúmulo de transcritos (*Northern* figuras superiores) em folhas de plantas de cana cultivadas na ausência e presença de Pi (-P = 0 μ M; +P = 250 μ M) em solução nutritiva e coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas. Amostras de RNA total de folhas, com cerca de 5 μ g cada, foram aplicadas em gel desnaturante (figuras inferiores). As sondas dos transportadores de fosfato utilizadas estão acima de cada *Northern*.

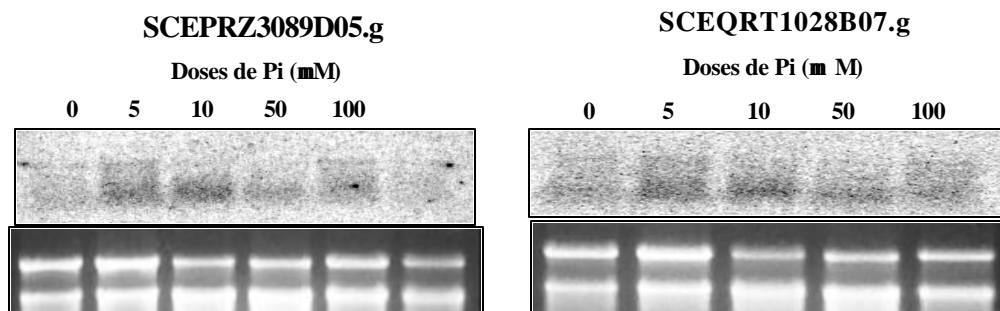


Figura 27 - Expressão dos transportadores de fosfato de cana. Expressão do acúmulo de transcritos (*Northern* figuras superiores) em folhas de plantas de cana cultivadas com diversas doses de Pi (0, 5, 10, 50, 100 e 250 μ M) em solução nutritiva. Amostras de RNA total de folhas com cerca de 5 μ g cada, foram aplicadas em gel desnaturante (figuras inferiores). As sondas dos transportadores de fosfato utilizadas estão acima de cada *Northern*.

Em arroz, os 13 genes identificados no genoma sequenciado (Paszkowski et al. 2002), possuem nível variável de expressão. Dez genes foram preferencialmente expressos nas raízes, enquanto *OsPT7* foi timidamente expresso, e *OsPT12* e *OsPT13* não foram detectados utilizando PCR em tempo real. O *cluster* SCEQRT1028B07.g de cana, aqui descrito, apresenta maior nível de similaridade com o *OsPT8*, e *OsPT12*. Diversos genes de HAPT de várias espécies foram recentemente caracterizados, sendo induzidos apenas pela colonização com micorrizas (*StPT3* de batata, Rausch et al., 2001; *MtPT4* de *Mendicago truncatula*, Hamilton et al., 2002; *OsPT11* de arroz, Paszkowski et al., 2002).

O transportador de fosfato de cana, objeto deste trabalho, não responde de forma direta à deficiência de fósforo. As plantas que deram origem as seqüências do genoma de cana-de-açúcar são provenientes de órgãos e tecidos de plantas de campos de cultivo e/ou estações experimentais, presumivelmente bem nutridas e sujeitas a interações com a microbiota do solo.

5 CONCLUSÕES

- O *cluster* de cana-de-açúcar, SCEQRT1028B07.g foi identificado como um transportador fosfato, cuja proteína deduzida com 541 aminoácidos, apresentando a hidropatia, topologia e os 12 domínios transmembrana previstos em transportadores de fosfato de alta afinidade;
- O seqüenciamento 3' da maioria dos clones do *cluster* sugere que existam isoformas do gene dentro do próprio *cluster* identificado;
- Foi estimado que devam existir pelo menos 10 cópias de cada gene do transportador de fosfato de alta afinidade no genoma de cana-de-açúcar;
- O padrão de restrição distinto, utilizando mais de uma sonda derivada do *cluster*, corrobora a existência de mais de um gene de transportador de fosfato de alta afinidade;
- A expressão dos genes de transportadores de fosfato de alta afinidade por análise de *Northern* demonstrou que aqueles analisados não eram indutíveis pela deficiência de Pi, mesmo quando as plantas já exibiam decréscimo de P nos tecidos e no crescimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL SOBRINHO, N.M.B. Metais pesados em solos brasileiros. In. ALVARES, V.V.H.; FONTES, L.E.F.; FONTES M.P.F. (Ed.). **O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e do desenvolvimento sustentado**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo; Universidade Federal de Viçosa, 1996. p.837-835.
- BAHIA FILHO, A.F.C.; BRAGA, J.M. Fósforo em Latossolos do Estado de Minas Gerais. III. Índices de disponibilidade de fósforo e crescimento vegetal. **Experientiae**, v.20, p.217-234, 1975.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. www.agricultura.gov.br/spa/spa_01.htm (20 nov. 2002).
- BRASILEIRO, A.C.M.; CARNEIRO, V.T.C. **Manual de transformação de plantas**. Brasília: Embrapa SPI/Embrapa-Cenargem, 1998. p.309.
- BUN-YA, M.; NISHIMURA, M.; HARASHIMA, S.; OSHIMA, Y. The PHO84 gene of *Saccharomices cerevisiae* encodes an inorganic phosphate transporter. **Molecular Cell Biology**, v.11, p.3229-3238, 1991.
- CANAWEB/dados e estatísticas. www.jornalcana.com.br (20 nov. 2002).
- CHIOU, .T.J.; LIU,H.; HARRISON, M.J. The spatial expression patterns of a phosphate transporter (MtPT1) from *Medicago truncatula* indicate a role of phosphate transporter in the root/soil interface. **Plant Journal**. v.25, p.1-15, 2001.
- CLAROS, M.G.; Von-HEIJNE, G. Prediction of transmembrane segment in integral membrane proteins, and the putative topologies using several algorithms. **Computer Applicatons in Biological Science**, v.10, p.685-686, 1994.
- DARAM, P.; BRUNNER, S.; PERSON, B.L.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. Functional analysis and cell-specific expression of a phosphate transporter from tomato. **Planta**, v.206, p.225-233, 1998.
- DARAM, P.; BRUNNER, S.; RAUSCH, C.; STEINER, C.; AMRHEIN, N.; BUCHER, M. PHT2;1 encodes a low-affinity phosphate transporter from Arabidopsis. **Plant Cell**, v.11, p.2153-2166, 1999.

- DREW, M.C.; SAKER, L.R. Uptake a long distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of non-allosteric regulation. **Planta**, v.60, p.500-507, 1984.
- FIGUEIRA, A; KIDO, E.A.; ALMEIDA, R.S. Identifying sugarcane expressed sequence associated with nutrient transporters and peptide metal chelators. **Genetics and Molecular Biology**. v.24, p.207-220, 2001.
- FURIHATA, T.; SUZUKI, M.; SAKURAI, H. Kinetic characterization of two phosphate uptake systems with different affinities in suspension-cultured *Catharanthus roseus* protoplasts. **Plant Cell Physiology**, v..33, p.1151-1157, 1992.
- GILLESPIE, A.R.; POPE, P.E. Rhizosphere acidification increase phosphorus recovery of Black Locust: I. Induced acidification and soil response. **Soil Science Society of America Journal**, v.54, p.533-537, 1990.
- GRIVET, L.; GLASZMAN, J.C.; ARRUDA, P. Sequence polymorphism from EST data in sugarcane: a fine analysis of 6phosphogluconate dehydrogenase genes. **Genetics and Molecular Biology**. v.24, p.161-167, 2001.
- GRIVET, L.; ARRUDA, P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Current Opinion in Plant Biology**. v. 5, p.122-127, 2001.
- HARRISON, M.J.; Van-BUUREN, M.L. A phosphate transporter from the micorrryzal fungus *Glomus versiforme*. **Nature**, v.378, p.626-629, 1995.
- HARRISON,M.J.; DEWBRE,G.R.; LIU, J. A phosphate transpoorter from *Meidago truncatula* involved in the aquisition of phosphate released by arbuscular mycorrhizal fungi. **The Plant Cell**. v.14, 2414-2429, 2002.
- HEDLY, M.J.; WHITE, R.E.; NYE, P.H. Plant-induced changes in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* var. Emerald) seedlings. III. Changes in L value, soil phosphate fraction and phosphatase activity. **The New Phytologist**, v.91, p.45-46, 1982.
- HENDERSON, P.J.F. The 12-transmembrane helix transporters. **Current Opinion of Cell Biology**, v.5, p.708-721, 1993.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D.I. **The water culture method for growing plants without soil**. Berkeley: University of California, California Agriculture Experimental Station, 1953. (Circular 347).
- HOLFORD, I.C.R. Soil phosphorus: its measurement and, its uptake by plants. **Australian Journal of Soil Research**, v.35, p.227-239, 1997.

- INGELBRECHT, I.L.; IRVINE, J.E.; MIRKOV. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. **Plant Physiology**, v.119, p.1187-1197, 1999.
- LEE R.B. Selectivity and kinetics of ion uptake by barley plants following nutrient deficiency. **Annals of Botany**, v.50, p.429-449, 1982.
- LEGGEWIE, G.; WILLMITZER, L.; RIESMEIER J.W. Two cDNAs from potato are able to complement a phosphate uptake-deficient yeast mutant: identification of phosphate transporters from higher plants. **Plant Cell**, v.9, p.381-392, 1997.
- LIU, C.; MUCHHAL, U.S.; UTHAPPA, M.; KONOWICZ, A.K.; RAGHOTHAMA, K.G. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissue by phosphorus. **Plant Physiology**, v.116, p.91-99, 1998.
- LIU, H.; TRIEU, A.T.; BLAYLOCK, L.A.; HARRISON, M.J. Cloning and characterization of two phosphate transporters from *Medicago truncatula* roots: regulation in response to phosphate and to colonization by arbuscular mycorrhizal (AM) fungi. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v.11, p.14-22, 1998.
- MARSCHNER, H. Root-induced changes in the availability of micronutrients in the rhizosphere, In: WAYSEL, Y., ESHEL, A.; KAFKAFI, U. (Ed.). **Plant root: the hidden half**. New York: Marcel Decker, 1991. p.503-528.
- McPHARLIN, J.; BIELESKI, R. Phosphate uptake by *Spirodela* and *Lemna* during early phosphate deficiency. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.14, p.561-572, 1987.
- MILLER, M.H. Effects of nitrogen on phosphorus absorption by plants. In: CARSON, E.W. (Ed.). **The plant root and its environment**. Charlottesville: University Press of Virginia, 1974. p.643-668.
- MIMURA, T. Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. **International Review of Cytology**, v.190, p.149-200, 1999.
- MITSUOKAWA, N.; OKUMURA, S.; SHIRANO, Y.; SATO, S.; KATO, T.; HARASHIMA, S.; SHIBATA, D. Overexpression of an *Arabidopsis thaliana* high-affinity phosphate transporter gene in tobacco cultured cells enhances cell growth under phosphate-limited conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.94, p.7098-7102, 1997.
- MUCHHAL, U.S.; PARDO, J.M.; RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.93, p.10519-10523, 1996.

- MUDGE, S.M.; RAE, A.L.; DIATLOFF, E.; SMITH, F.W. Expression analysis suggests novel roles for members of the Pht1 family of the phosphate transporters in *Arabidopsis*. **The plant Journal**. v.31, p.341-353, 2002.
- NANDY, S.K.; PANT, R.C.; NISSEN, O. Multiphasic uptake of phosphate by corn roots. **Plant Cell Environment**, v.10, p.463-474, 1987.
- NATR, L. Mineral nutrients: a ubiquitous stress factor for photosynthesis. **Photosynthetica**, v.27, p.271-294., 1992.
- NOVAIS, R.F.; KAMPRATH, F.E. Phosphorus supplying capacities of previously heavily fertilized soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.42, p.931-935, 1978.
- NOVAIS, R.F.; SMYTH, T.T. **Fósforo em solo e planta em condições tropicais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. 399 p.
- OZANE, P. G. **The roles of phosphorus in agriculture**. Madison: Crop Science Society of America; Soil Science Society of America, 1980. 910 p.
- OKUMURA, S.; MITSUKAWA, N.; SHIRANO, Y.; SHIBATA, D. Phosphate transporter gene family of *Arabidopsis thaliana*. **DNA Research**. v.5, p.261-269, 1998.
- PASZKOWSKI, U.; KROKEN, S.; ROUX, C.; BRIGGS, S.P. Rice phosphate transporters include a evolutionarily divergent gene specifically activated in arbuscular mycorrhizal symbiosis. **Proc. National Academy of Science USA**, v.99, p.13324-13329, 2002.
- PROSSIGA. www.prossiga.br/basededados. (20 nov. 2002)
- RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate acquisition. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v.50, p.665-686, 1999.
- RAGHOTHAMA, K.G. Phosphate transport and signaling. **Current Opinion in Plant Biology**, v.3, p.182-187, 2000.
- RAUSCH, C.; DARAM, P.; BRUNNER, P.; JANSKA, J.; LALOI, M.; LEGGWIE, G.; AMRHEI, N.; BUCHER, M.; A phosphate transporter expressed in arbuscule-containing cells in potato. **Nature**. v.414, p.462-466, 2001.
- ROBERTSON, J.A.; KANG, B.T.; RAMIREZ-PAZ, F.; WERHOVEN, C.H.E.; OHLROGGE, A.J. Principles of nutrient uptake from fertilizer bands. VII. P32 uptake by brace roots of maize and its distribution within the leaves. **Agronomy Journal**, v.58, p.293-296, 1966.
- ROSEWARNE, G.; BARKER, S.; SMITH, S.; SIMTH, F.; SCHACHTMAN, D. A *Licopersicon esculentum* phosphate transporter (LePT1) involved in a phosphorus uptake from a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus. **New Phytologist**. v.144, p.507-516, 1999.
- RUFTY, T.W.; ISRAEL, D.W.; VOLK R.J.; QUI, J.; SA, T. Phosphate regulation of nitrate assimilation in soybean. **Journal of Experimental Botany**, v.44, p.879-891, 1993.

- SAKANO, K. Proton/phosphate stoichiometry in uptake of inorganic phosphate by cultured cells of *Catharanthus roseus* (L.) G. **Plant Physiology**, v.67, p.797-801, 1990.
- SAMBROOK, J.; FRITSH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3v.
- SCHACHTMAN, D.P.; REID, R.J.; ALING S.M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell. **Plant Physiology**, v.116, p.447-453, 1998.
- SCHJØRRING, J.K. Nitrate and ammonium absorption by plants growing at a sufficient or insufficient level of phosphorus in nutrient solution. In: LAMERS, H. (Ed.). **Fundamental ecological and agricultural aspects of nitrogen metabolism in higher plants**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1996. p.53-58.
- SHAGHAI-MAROOF, M.A.; SOLIMAN, K.M.; JORGENSEN, R.A.; ALLARD, R.W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.81, n.24, p.8014-8018, 1984.
- SIMMONDS, N. W. **Evolution of crop plants**. London: Longmans, 1976. p.104-108: Sugarcanes.
- STRYKER, R. B.; GILLIAN, J. W.; JACKSON, W. A. Nonuniform transport of phosphorus from single roots to the leaves of *Zea mays*. **Plant Physiol.**, n.30, p.231-239, 1974.
- SUGAR CANE EST PROJECT - SUCEST. <http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/> (20 out. 2002).
- TADANO, T.; SAKAI, H. Secretion of acid phosphatase by the roots of several crop species under phosphorus-deficient conditions. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.37, p.129-140.1991.
- TRYKER, R.B.; GILLIAN, J.W.; JACKSON, W.A. Nonuniform transport of phosphorus from single roots to the leaves of *Zea mays*. **Plant Physiology**, v.30, p.231-239, 1974.
- ULLRICH, C.; NOVACKY, A. Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$, and NO_3^- uptake and fusicoccin in root hairs of *Limnium stoloniferum*. **Plant Physiology**, v.94, p.1561-1567, 1990.
- ULLRICH-EBERIUS C.; NOVACKY, A.; Van BELLA. Phosphorus uptake in *Lenna gibba* G1: energetics and kinetics. **Planta**, v.161, p.46-52, 1984.
- VERSAW, W.K. A phosphate repressible, high-affinity phosphate permease is encoded by the *PHO-5⁺* gene of *Neurospora crassa*. **Gene**, v.153, p.135-139, 1995.
- VON HEIJNE, G. Membrane Protein Structure Prediction: Hydrophobicity Analysis and the 'Positive Inside' Rule. **Journal of Molecular Biology**. v.225, p.487-494, 1992.