

RESUMO

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

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

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

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

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

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

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

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

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