

Grayce Hellen Romim Silva

O papel da β -1,3 glucanase (GH17) na formação do aerênquima na raiz da cana-de-açúcar

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisa Tecnológica para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

São Paulo

2019

Grayce Hellen Romim Silva

**O papel da β -1,3 glucanase (GH17) na formação do aerênquima na raiz da
cana-de-açúcar**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia USP / Instituto Butantan / IPT,
para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Marcos Silveira Buckeridge

Versão original.

São Paulo

2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Romim Silva, Grayce Hellen

O papel da B-1,3 glucanase (GH17) na formação do
aerênquima na raiz da cana-de-açúcar / Grayce Hellen
Romim Silva; orientador Marcos Silveira
Buckeridge. -- São Paulo, 2019.

70 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. plasmodesmo. 2. glicosil hidrolase. 3. cana-
de-açúcar. 4. formação do aerênquima. 5. calose. I.
Silveira Buckeridge, Marcos , orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas
Tecnológicas

Candidato(a): Grayce Hellen Romim Silva

Título da Dissertação: O papel da β -1,3 glucanase (GH17) na formação do aerênquima na raiz da cana-de-açúcar

Orientador: Marcos Silveira Buckeridge

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **840/2016** referente ao projeto intitulado: "**O papel da hidrolase de calose (GH 17), na formação do aerênquima da cana-de-açúcar**" sob a responsabilidade de **Grayce Hellen Romim Silva** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Marcos Silveira Buckerigde**, do Departamento de Biotecnologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela **CEPSH** - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 14 de outubro de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora 3 CEPSH ICB/USP

Dedico esse trabalho a todos que me ajudaram nessa jornada e principalmente para minha mãe que ao me ver falava: - *E aí já acabou? Ainda não?! Termina logo isso pra te efetivarem. Ai meu Deus menina, toma juízo...*

Em sua memória te dedico, finalmente acabei...
Que Deus a tenha em paz.

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer a Universidade de São Paulo por existir, agradecer ao meu orientador Marcos Buckeridge por ter me aceitado como sua aluna e ter acreditado no meu potencial, principalmente por eu ser uma aluna de fora e que sabemos que nem todos abrem as portas para quem não é de dentro da Universidade, obrigada por ver algo em mim que nem eu mesma vejo.

Quero agradecer ao programa de Biotecnologia por toda ajuda e principalmente a Fábria e Elaine, parabéns pela paciência de vocês e obrigada por sempre ajudar da melhor forma que podem e por torcerem para que tudo dê certo, com certeza vocês são essenciais para a gente.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Gostaria muito de agradecer ao Departamento de botânica e o LAFIECO, vocês foram fundamentais para o meu crescimento profissional e principalmente pessoal. Todos sem exceção, contribuíram muito, seja de forma direta ou indireta. Obrigada a Amandis por ter sido a primeira a me receber e ter me aceito com todo o coração, obrigada a Eglee e a Vivi por todos os ensinamentos, obrigada a Bruna e Adriana por estarem presentes nos momentos iniciais da minha jornada e por acreditarem que daria certo, e a Dri ainda, por ter sido tão paciente comigo no final dessa jornada.

A Joyce por ter me indicado o LAFIECO dizendo “vai lá amiga você consegue”, obrigada por ter me dado uma direção. Ao Vinicius e o Giuliano por me ajudarem a quebrar a cabeça com a estatística que não ia e por toda a parceria; a Flaviane e o Bruno Flausino por me ajudarem com muitas coisas e por ficarem ao meu lado quando precisei. A Rusiska por arrumar o computador e por ter sempre palavras motivacionais. A Marina, Carmen, Débora e todos que me ajudaram nas coletas, vocês são incríveis. Aos novos integrantes Marcela e João que tornaram os momentos divertidos e alegres.

Gostaria de agradecer também o laboratório de Anatomia vegetal e ao professor Diego por toda ajuda e em especial a Gisele que me ajudou a cortar todos os blocos e inclusive pulou o carnaval comigo no “unidos do corte de bloco no micrótomo”. Agradecer a Tati do GATE que sempre me recebeu muito bem e me ajudou em tudo que precisei, você é incrível; e também agradecer ao Biocel e ao

GMP, a técnica Amanda e Silvia que sempre me receberam muito bem e me ajudaram sempre com muita gentileza, a Giovana, Dani e Paula que me ajudaram em etapas cruciais do meu projeto, ao Giovanni por ter compartilhado momentos únicos quando morávamos juntos, obrigada por ter sido um bom companheiro nesse período; a Marcella pelas tardes de almoço sempre muito divertidas.

E não podendo esquecer de vocês, meu agradecimento especial são para aqueles que além de amigos viraram família, as minhas Desmarkets e Giga Pudim. Obrigada a Eveline por simplesmente tudo, obrigada por ser minha amiga e parceira, obrigada por ser tão atenciosa, calma e inteligente, você é uma pessoa admirável, quando crescer quero ser tão boa quanto você, a Carla por sempre me receber tão bem e me aceitar como praticamente membro da família, assim como o Floriano e a Tulipa. Obrigada a Eglee por sempre me ouvir e dar ótimos conselhos e ser sempre justa em suas atitudes, obrigada Mariana por ser companheira e sempre animar a gente. Obrigada Arthur por passar por uma situação tensa na sua vida e mesmo assim ter tempo para ajudar os amigos, você é incrível, Janaina que também mesmo longe faz de tudo para ajudar e contribuir com o trabalho dos amigos. Obrigada Lauana e Bruno Navarro, vocês são admiráveis, obrigada por passarem a noite em claro me ajudando a corrigir meus erros de escrita, obrigada por toda a orientação e toda paciência e por não desistirem, vocês serão ótimos orientadores, obrigada a todos por tornarem tudo especial, independente das dificuldades que passei, sem vocês com certeza teria sido mais difícil.

E para finalizar, quero agradecer a minha família pela minha criação, obrigada Tia por ter me criado e não ter desistido, sei que não foi fácil para você, a minha mãe (não a biológica), que me amou muito e sempre me ligava querendo saber se eu ainda estava viva, se eu estava me alimentando e se a USP tinha me contratado, porque ela tinha que me efetivar logo (rsrs); ao meu pai e meu irmão por me apoiarem na minha decisão de largar tudo e virar bióloga; a Laura Brandi por ser minha amiga desde sempre e ouvir minhas reclamações e me apoiar em vários momentos da minha vida, a todos meus irmãos e principalmente a Samara por me acharem inteligente (coitados rsrs), ao Felipe von Atzingen que sofreu com minhas mudanças de humor e minhas desmotivações, e mesmo assim ficou do meu lado me motivando a sempre ir em frente, acho que foi o que mais sofreu ao longo dessa dissertação; e meu eterno amor Marvin que esteve ao meu lado em todos os momentos.

“Eu não sou o que aconteceu comigo, eu sou o que eu escolhi ser”

Carl Jung

Resumo

ROMIM, G.H. **O papel da calose hidrolase (GH17) na formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar.** 2019. 65 f. Dissertação de Mestrado (Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

O estudo da parede celular tem se mostrado promissor para auxiliar na compreensão de mecanismos de degradação de açúcares contidos na estrutura da parede vegetal. No entanto o procedimento se torna complexo devido a deposição organizada destes polissacarídeos e das interações estabelecidas entre eles. Alguns processos naturais da hidrólise da parede celular já são conhecidos como a degradação de reservas, amadurecimento de frutos e a formação do aerênquima. Em cana-de-açúcar, a formação do aerênquima inclui modificações nas paredes celulares e seu processo de formação lisígeno inclui morte celular programada, a indução do processo como um todo é considerado constitutivo, respondendo à sinalização endógena exercida pelos hormônios etileno e auxina. O processo tem início em algumas células que sofrem transdiferenciação e provavelmente espalham sinais ao redor. Não se sabe ainda quais são estes sinais, mas sabe-se que há formação de plasmodesmos que facilitam a comunicação entre as células transdiferenciadas e suas vizinhas. A sinalização via plasmodesmo possivelmente inclui um processo de abertura regulado por turnover entre a síntese e a degradação de calose por meio da ação de glicosil hidrolases denominadas β -1,3-glucanases, pertencentes à família GH17. De fato, a expressão de uma grande variedade de membros desta família foi detectada com padrão transcricional condizente com a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar. Com base nestas descobertas, realizamos uma seleção para escolher 1 sequência de β -1,3-glucanase de 10 mais significativas encontradas em cana-de-açúcar por trabalhos posteriores. No processo de imunolocalização foi utilizado anticorpo para calose (LAMP), para β -glucano (BG1) e um anticorpo desenhado especificamente para a proteína escolhida de cana-de-açúcar ScPDBG1. Verificamos que o padrão da proteína é inverso ao da calose, indicando possivelmente uma ação de regulação, e que a ambos podem ser um fator ainda não visto sobre os módulos de degradação da parede celular, possivelmente permitindo a comunicação entre apenas alguns

grupos de células que iniciam o processo, fato esse que explicaria porque determinado grupo de células efetuam a morte celular programada e outros não.

Palavras-chave: β -1,3-glucanase; calose; plasmodesmo; aerênquima; imunolocalização.

Abstract

ROMIM, G.H. **Role of callose hydrolase (GH17) in aerenchyma formation of sugarcane roots**. 2019. 65 f. Masters degree dissertation (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

The cell wall study has been promising to the understanding of sugar degradation mechanisms contained in the plant wall structure. However, the procedure becomes complex due to the organized deposition of these polysaccharides and the interactions established between them. Some natural processes of cell wall hydrolysis are already known as reserve degradation, fruit ripening, and aerenchyma formation. In sugarcane, aerenchyma formation includes modifications in cell walls and its lysigen formation process includes programmed cell death, the induction of the whole process is considered constitutive, responding to endogenous signaling exerted by the ethylene and auxin hormones. The process begins in some cells that undergo transdifferentiation and are likely to spread signals around. It is not yet known what these signals are, but it is known that plasmodesma is formed that facilitates communication between the transdifferentiated cells and their neighbors. Signaling via plasmodesmata possibly includes a turnover-regulated opening process between synthesis and degradation of callose through the action of glycosyl hydrolases called β -1,3-glucanases, belonging to the GH17 family. The expression of a wide variety of members of this family was detected with a transcriptional pattern consistent with aerenchyma formation in sugarcane roots. Based on these findings, we made a selection to choose 1 of the 10 most significant β -1,3-glucanase sequences found in sugarcane for further work. In the immunolocalization process, we used the antibody to callose (LAMP), to β -glucan (BG1) and an antibody designed specifically for the chosen sugarcane protein ScPDBG1. We have found that the protein pattern is inverse to that of callose, possibly indicating a regulatory action, and that both may be a factor not yet seen on cell wall degradation modules, possibly allowing communication between only a few groups of cells which begin the process, a fact that would explain why a certain group of cells realized programmed cell death and others doesn't.

Key words: β -1,3-glucanase; callose; plasmodesm; aerenchyma; immunolocalization.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Etanol e bioenergia	15
1.2. Polissacarídeos da parede celular como substrato para a utilização como açúcares fermentescíveis	16
1.3. Formação do aerênquima	19
1.4. Modificações da parede celular e morte celular programada na formação de aerênquima em cana-de-açúcar	21
1.5. Plasmodesmos e a comunicação celular durante a formação do aerênquima	23
1.6. Domínios proteicos das β -1,3 glucanases e sua relação com o Plasmodesmo	25
1.7. Identificação de transcritos de β -1,3 glucanases no aerênquima de cana-de-açúcar	26
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Delineamento experimental	27
3.2. Cultivo e coleta de raízes cana-de-açúcar	28
3.3. Fixação e emblocamento	29
3.4. Imunolocalização de polissacarídeos e da proteína GH17	30
3.5. Busca em banco de dados e análises fenéticas	31
3.6. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA	31
3.7. Desenho dos iniciadores	32
3.8. Análise por RT-qPCR	33
3.9. Análise estatística dos dados	33
4. RESULTADOS	34
4.1. Sequências alvos identificadas em cana-de-açúcar estão possivelmente envolvidas em processos ligados a parede celular	34

4.1.1.	Os domínios GH17 e X8 são essenciais para a ação de β -1,3 glucanases associadas à calose	36
4.1.2.	As sequências de cana-de-açúcar selecionadas possuem similaridade com as β -1,3 glucanases de <i>A. thaliana</i> envolvidas no controle do funcionamento do plasmodesmo	39
4.1.3.	A expressão dos transcritos de β -1,3 glucanases são similares entre os segmentos de raiz de cana-de-açúcar	43
4.2.	Imunolocalização	45
4.2.1.	Padrão encontrado do β -glucano (BG1) corrobora com a formação do aerênquima e evidencia uma degradação pontual	45
4.2.2.	Anticorpo anti-calose (LAMP) evidencia regiões do plasmodesmo na parede celular	48
4.2.3.	Proteína de β -1,3 glucanase apresenta padrão inverso a deposição de calose	50
5.	DISCUSSÃO	52
6.	CONCLUSÃO	59
7.	REFERÊNCIAS	60
8.	APÊNDICE	68

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etanol e bioenergia

A cana-de-açúcar é considerada uma das fontes de biomassa mais produtivas do planeta (De Souza *et al.*, 2014). Segundo dados da UNICA (2019), na primeira quinzena da safra 2018/2019, o Brasil produziu cerca de 620 milhões de toneladas de cana-de-açúcar, sendo esta matéria-prima utilizada para a produção de 29 milhões de toneladas de açúcar, 21,5 *Terawatt*-hora para a rede elétrica nacional e 33 bilhões de litros para a produção de biocombustível.

Em relação aos biocombustíveis, esse tem sido considerado foco das atenções nacionais e internacionais como uma alternativa de energia renovável devido ao aumento excessivo do preço do petróleo, e por questões ambientais sobre a diminuição das emissões de gases do efeito estufa (Kohlhepp, 2010). Nesse quesito, o Brasil mostra experiências de décadas em sua produção, a qual é proveniente da fermentação dos açúcares obtidos da cana-de-açúcar (Kohlhepp, 2010).

Em razão do advento do Programa Nacional do Álcool (Proálcool) na década de 70, o Brasil aprimorou as técnicas necessárias para produzir etanol de primeira geração (1G), tendo como matéria-prima a sacarose proveniente da cana-de-açúcar (Goldemberg *et al.*, 2008; Mitsutani, 2010). Esta produção tornou-se eficiente em meados do século XX (De Souza *et al.*, 2014), a qual utilizada apenas 1/3 da biomassa vegetal (caldo) para tal fim. Os outros 2/3 da biomassa remanescente representam as folhas, o bagaço e a palha, as quais não são utilizadas na produção do etanol 1G (Goldemberg, 2008; Buckeridge *et al.*, 2010).

A biomassa vegetal é a soma de todas as partes que compõem a massa de um organismo. Segundo Macedo (2005), se a palha fosse usada juntamente a 50% do bagaço para produção de etanol, seria possível diminuir em 33 a 38% o uso da terra e aumentar a produção de etanol para 3700 a 4000 L/hectare. Como resultado, a ocupação de um maior número de áreas agrícolas para o plantio de cana não seria necessária (Buckeridge *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2014), fato que torna o etanol de cana-de-açúcar no Brasil o mais sustentável, e provê a maior compensação nas emissões de carbono dos combustíveis fósseis (Jaiswal *et al.*, 2017).

Nesse contexto, uma ampla gama de estratégias que visam o aumento da produção de etanol tem sido empregada atualmente. O objetivo destas estratégias é incrementar a sustentabilidade e o balanço energético da produtividade do biocombustível, sendo uma delas a produção de etanol de segunda geração, também conhecido como lignocelulósico (Huang *et al.*, 2009; Zabed *et al.*, 2016; Manochio *et al.*, 2017). No entanto, para a utilização dos compostos da biomassa vegetal, faz-se necessário a liberação dos polissacarídeos contidos na parede celular, os quais serão convertidos em açúcares monoméricos, permitindo que esses açúcares fiquem acessíveis para o processo fermentescível (Buckeridge *et al.*, 2010). Neste caso, a tecnologia de produção de etanol lignocelulósico ou segunda geração (2G), seria usada em complemento à 1G (Buckeridge *et al.*, 2010; De Souza *et al.*, 2014).

1.2. Polissacarídeos da parede celular como substrato para a utilização como açúcares fermentescíveis

Quando se trata de tornar os polissacarídeos de parede celular disponíveis para a conversão em açúcares monoméricos, faz-se necessária a compreensão da estrutura fina e composição da parede celular. Para a bioenergia, o nível de organização mais pesquisado é a composição de cada polissacarídeo presente na parede celular que pode prover informações para interpretar possíveis padrões de ação de hidrolases, enzimas que promovem cisão de ligações químicas através do uso da água, e como é alterada a composição da parede celular, bem como estudar possíveis padrões que indiquem quais são os açúcares que podem ser liberados para o subsequente processo de fermentação (Buckeridge *et al.*, 2016).

Inicialmente a parede celular era mencionada como uma estrutura dinâmica com funções variadas, dentre elas delimitação celular (McCann & Robert, 1990). Porém, com o avanço do conhecimento, foi possível obter informações mais complexas de seu papel, como por exemplo, conter marcadores de superfície que podem predizer o desenvolvimento e marcar posições dentro da planta (Knox *et al.*, 1989; Knox, 1990; Pennell & Roberts, 1990); manter a continuidade molecular com a membrana plasmática e citoesqueleto (Roberts, 1990); e permitir conexões mais firmes com a membrana plasmática de forma adaptativa ao estresse osmótico (Zhu *et al.*, 1993). Além disso, sinais da parede celular emitidos como resposta à

predação por insetos ou ataque de patógenos induzem a produção de moléculas de defesa (Esquerre-Tugaye *et al.*, 1979; Vance *et al.*, 1980; Bowles, 1990; Ryan, 1990).

Para que as células sejam capazes de se desenvolver funcionalmente e ter a sua especificidade, elas precisam se alongar, se diferenciar, e alguns desses processos tornam-se possíveis a partir da alteração da estrutura da parede celular (Carpita & Gibeaut 1993), a qual pode ser classificada como primária e secundária. As paredes primárias são mais flexíveis, constituem-se de células em crescimento e expansão (McCann & Roberts, 1990). Já as secundárias são formadas após expansão celular, com mais depósito de celulose e lignina, proporcionando rigidez e impermeabilidade para a célula (Bacic *et al.*, 1988; McCann & Roberts, 1990).

A parede celular é composta por diversos polímeros, principalmente carboidratos, proteínas e metabólitos secundários (Carpita & Gibeaut, 1993). Estes polímeros interagem entre si através de ligações covalentes e não covalentes, formando um "complexo supramolecular" que se acredita ser uma estrutura multifuncional responsável por propriedades mecânicas da parede celular (Carpita & Gibeaut, 1993; Lima *et al.*, 2003; Grandis *et al.*, 2014). Devido a essa capacidade de interação entre os polímeros, a parede celular pode apresentar domínios específicos de proteínas, celulose, hemiceluloses e pectinas (McCann & Roberts 1991; Harris, 2005).

Os domínios podem conter uma fase fibrilar de microfibrilas de celulose e uma fase matricial que contém uma alta proporção de polissacarídeos não celulósicos, os quais variam em suas estruturas químicas (Harris, 2005). Já a celulose, é um polímero linear com monômeros de glicose apresentando ligações glicosídicas do tipo β -1,4, que pode formar longas cadeias alinhadas e ligadas entre si por pontes de hidrogênio formando microfibrilas. Estas conferem uma forma cristalina e rígida atribuindo resistência para a parede celular, e também tornando-a estável e resistente à degradação (Carpita, 1996).

As hemiceluloses podem interagir com a celulose atuando como um revestimento impedindo o contato direto entre as microfibrilas. Sua composição pode variar dependendo do tipo da parede celular (Carpita & Gibeaut 1993; Harris, 2005; Buckeridge *et al.*, 2015), das quais podem apresentar diferentes monossacarídeos, como exemplo, a xilose, glicose, arabinose, galactose, manose (Grandis *et al.*, 2014). As principais hemiceluloses encontradas na natureza são

xiloglucanos, galactomananos/galactoglucomananos, β -glucanos e glucoroarabinoxilanos em proporções que podem variar nas plantas (Grandis *et al.*, 2014).

O domínio das pectinas é formado por polímeros mais solúveis em água (Buckeridge *et al.*, 2014), o qual é associado à porosidade da parede celular e é quimicamente independente dos outros domínios. As pectinas na cana-de-açúcar ocorrem tanto na parede celular quanto na lamela média e são importantes para a separação das microfibrilas de celulose e para a adesão celular (Jarvis *et al.*, 2003; Caffall & Mohnen, 2009; Peaucelle *et al.*, 2012).

Por fim, a lignina é um polímero fenólico complexo que, aumenta a rigidez da parede celular da planta e suas propriedades hidrofóbicas, tornando-se uma importante barreira contra o ataque de patógenos (Ithal *et al.*, 2007, Schuetz *et al.*, 2014). Sua deposição ocorre nas paredes secundárias, mas há proporções menores nas paredes primárias de células parenquimáticas de cana-de-açúcar (Buckeridge *et al.*, 2017). Além disso, a lignina pode se associar ao arabinoxilano, glucuronoarabinoxilano e pectinas por ligações éster (Buckeridge *et al.*, 2019).

A variação na proporção destes domínios possibilita a classificação da parede celular como tipo I, II ou III, sendo que estas diferenças podem ser utilizadas para a definição de diferentes taxa das espécies vegetais (McCann *et al.*, 1991; Carpita & Gibeaut 1993; e Silva *et al.*, 2011).

Paredes do tipo I apresentam domínio celulose-hemicelulose compostos por xiloglucanos com diferentes tipos de ramificações, tendo um equilíbrio na proporção entre celulose, hemiceluloses e pectinas (Carpita & Gibeaut 1993). Os xiloglucanos são característicos de paredes do tipo I de angiospermas, eudicotiledôneas e monocotiledôneas não comelinóides (Carpita & Gibeaut 1993). Possuem uma cadeia principal de glicose com ligações β -1,4 com ramificações laterais de xilose com ligação α -1,6 (Grandis *et al.*, 2014). Os xiloglucanos podem conectar e espaçar as microfibrilas de celulose, apresentando assim uma função estrutural e arquitetônica (Hayashi 1989), este tipo de parede possui também polissacarídeos pécticos de cadeia principal de galacturonano com homogalacturonano e ramnogalacturonanos I substituídos por diversas cadeias laterais (Carpita & Gibeaut 1993). As pectinas contribuem com carga e propriedades hidrofílicas.

As paredes do tipo II são encontradas em monocotiledôneas comelinóides, e apresentam a hemicelulose glucuronoarabinoxilano (Carpita & Gibeaut 1993; Carpita,

1996; Smith & Harris, 1999). No entanto, dentro da ordem Poales, há a presença também de glucanos de ligação mista β -1,3-1,4 (β -glucano). Estes possuem uma longa cadeia de glucanos, não ramificados e em espiral, com ligações β -1,4 e uma menor parte sendo β -1,3 (Xue & Fry, 2012). Essa hemicelulose está presente em alguns estágios do desenvolvimento da planta (Carpita 1996; Smith & Harris 1999, Buckeridge *et al.*, 2004, Trethewey *et al.*, 2005), e pode atuar como um revestimento que impede que as superfícies das microfibrilas de celulose tenham contato direto entre elas (Buckeridge *et al.*, 2008).

Em cana-de-açúcar, a parede é do tipo II, composta por 30% de celulose, 40% de arabinosilano, 10% de β -glucano, 8% de xiloglucano 8% de pectinas (homoglacturonano, arabinogalacturonano, ramnogalacturonano I) e 6% de lignina (De Souza *et al.*, 2013). A utilização dessas estruturas monoméricas em processos fermentescíveis é diretamente dependente da complexidade da parede celular. Logo, o sucesso desta estratégia está atrelado à recalcitrância da parede, bem como às ações das hidrolases que clivam as ligações e interações entre os polissacarídeos constituintes (Gueretta, 2011; Santos *et al.*, 2012, Buckeridge, 2010; Buckeridge *et al.*, 2017).

Desta forma, o conhecimento acerca dos mecanismos de degradação da parede celular efetuado pela própria planta em alguns processos fisiológicos específicos, tem sido apontado em trabalhos científicos como importantes guias para a pesquisa em bioenergia (Grandis *et al.*, 2014, Tavares *et al.*, 2015; Buckeridge *et al.*, 2017). Alguns exemplos destes processos incluem a degradação da parede celular de reserva em endosperma de sementes (Buckeridge, 2010), o amadurecimento de frutos (Yashoda *et al.*, 2007) e a formação de aerênquima (Bouranis *et al.*, 2007), tendo sido este último identificado e descrito em raízes de cana-de-açúcar (Grandis, 2014; Leite *et al.*, 2017; Tavares *et al.*, 2018; Grandis *et al.*, 2019).

1.3. Formação do aerênquima

O aerênquima é formado por espaços intercelulares interconectados longitudinalmente, os quais podem ser preenchidos por gás, facilitando a sua difusão para os tecidos (Armstrong, 1979). Seu desenvolvimento pode ocorrer por morte celular programada, ou por crescimento e expansão diferencial (Sachs 1882;

Evans, 2003). A formação do aerênquima é em muitos casos um método alternativo de oxigenação dos tecidos internos da planta, consistindo em uma resposta adaptativa a circunstâncias de hipóxia, geralmente por alagamento (Evans, 2003).

Descrita pela primeira vez em 1882 (Sachs, 1882), a formação do aerênquima pode se dar de modo esquizógeno, o que consiste na separação de células gerando lacunas de gás; ou expansígeno, que também se desenvolve pela expansão dos espaços intercelulares em lacunas por meio de divisão celular e expansão celular, porém, sem que ocorram separações celulares adicionais e sem colapso ou morte celular programada (Seago *et al.*, 2005; Bailey-Serres & Voeselek 2008; Jung *et al.*, 2008).

Em contrapartida, o aerênquima que se desenvolve por meio de processo lisígeno é resultado da morte celular programada de grupos específicos de células, sendo o espaço posteriormente preenchido por gás (Jackson & Armstrong, 1999; Evans, 2003). Essa formação de aerênquima lisígeno já foi vista em raízes, caule, bainha foliar, nós, entrenós e também em nervuras das plantas de *Oryza sativa* (Matsukura *et al.*, 2000; Colmer & Pedersen, 2008; Parlanti *et al.*, 2011; Steffens *et al.*, 2011).

A formação do aerênquima pode ocorrer como uma resposta adaptativa, por exemplo, a que ocorre em raízes de milho como consequência do cultivo em hipóxia, estresse nutricional e osmótico, além de impedância mecânica (Drew *et al.*, 2000; Yamauchi *et al.*, 2013). Por outro lado, a formação constitutiva do aerênquima foi reportada em plantas como *Sorghum bicolor* (Promkhambut *et al.*, 2011), *Musa* spp (Aguilar *et al.*, 1998), *Hordeum vulgare* (Garthwaite *et al.*, 2003) e em raízes e colmo de cana-de-açúcar (Begum *et al.*, 2013; Leite *et al.*, 2017, Tavares *et al.*, 2018; Grandis *et al.*, 2019).

Em variedades de cana-de-açúcar, a tolerância ao alagamento deve-se à ocorrência de aerênquima na raiz (Begum *et al.*, 2013). A mais recente caracterização da formação de aerênquima formado por lisigenia foi executada por Leite e colaboradores (2017) na variedade SP80-3280, seccionando as raízes de cana-de-açúcar a partir do ápice, em 5 fragmentos de 1 cm. Neste trabalho, foram analisadas as modificações que ocorrem na composição da parede celular, na qual a formação do aerênquima se deu sem o requerimento de um indutor ambiental, com os primeiros sinais de formação de espaços de gases no segmento 2 das raízes seccionadas e considerando-o completo no segmento 5 (Leite *et al.*, 2017).

O desenvolvimento do aerênquima constitutivo por lisigenia sugere questões importantes. A mais fundamental foca na razão pela qual as células no interior da matriz do tecido do córtex são alvo da morte celular programada, enquanto que outras células adjacentes e aparentemente idênticas não o fazem de imediato (Leite *et al.*, 2017). Além disso, a formação do aerênquima na ausência de um indutor externo é vista como uma etapa normal do desenvolvimento da raiz (Evans, 2003). Diante do contexto, o estudo da formação do aerênquima é uma oportunidade de compreender o processo biológico desde a deflagração e amplificação do sinal que desencadeia a morte celular programada, culminando nas modificações que ocorrem na parede celular por meio de hidrólises.

Do ponto de vista da bioenergia, faz-se necessária a compreensão da composição e arquitetura da parede celular dentro do contexto dos mecanismos endógenos de desconstrução desta estrutura. Tavares e colaboradores (2018) apresentaram a hipótese de que o aerênquima constitutivo de cana-de-açúcar é induzido por uma combinação de concentrações equilibradas de etileno e auxina que, por sua vez leva à indução da transcrição de genes que codificam para fatores de transcrição, morte celular programada e a ação de proteínas/enzimas de parede celular, entre elas membros das famílias das expansinas, celulases (GH1) e glicosil hidrolases (GH17), que culminam nas modificações da parede celular (Grandis *et al.*, 2019; Tavares *et al.*, 2019).

1.4. Modificações da parede celular e morte celular programada na formação de aerênquima em cana-de-açúcar

Durante o processo de formação de aerênquima em raízes de cana-de-açúcar foram observadas modificações na parede celular das células do córtex (Leite *et al.*, 2017). Dentre as principais modificações, destacam-se a degradação do β -glucano e de pectinas principalmente relacionadas à lamela média. Quanto aos demais polímeros, micrografias eletrônicas revelaram pontos de empilhamento de fragmentos de parede celular nas bordas dos espaços de ar, sugerindo que sua degradação não seja completa, formando compósitos (Leite *et al.*, 2017; Grandis *et al.*, 2019). Acredita-se que isso seja resultado do ataque de hidrolases aos polissacarídeos em pontos específicos mais suscetíveis à degradação (Buckeridge & De Souza, 2014).

Corroborando o trabalho de Leite e colaboradores (2017), Grandis e colaboradores (2019) identificaram padrões de expressão gênica, biossíntese de proteínas e ação das enzimas glicosil hidrolases sobre a parede celular durante a formação do aerênquima, constatando que suas modificações ocorriam de forma modular. Concomitantemente, Piovezanni (2017) efetuou a montagem e análise de um banco de transcritos de diferentes segmentos de raízes de cana-de-açúcar, identificando os genes de parede celular que participam do processo de formação do aerênquima. Dentre estes genes, o mais expressivo foi uma glicosil hidrolase da família 17 (GH17), em que 130 genes foram identificados ao longo dos segmentos da raiz.

As glicosil hidrolases são enzimas chave para o metabolismo, catalisando a hidrólise de ligações glicosídicas entre carboidratos ou ligações O-glicosídicas (Henrissat, 1991). Grandis e colaboradores (2019) também identificaram a atividade de outras enzimas responsáveis pela degradação dos polissacarídeos de parede celular, como os arabinanos e galactanos, corroborando o ataque às pectinas e ao β -glucano.

Além das modificações na parede celular, a morte celular programada é outro mecanismo biológico identificado como sendo central na formação do aerênquima de cana-de-açúcar (Leite, 2013). Neste aspecto, a caracterização da formação lisígena do aerênquima se deu por meio da marcação de núcleos com DNA degradado (Leite 2013). Algumas investigações sugerem que para que a morte celular programada seja deflagrada há a necessidade de um aumento das concentrações endógenas de etileno e conseqüentemente aumento dos níveis citosólicos de Ca^{2+} (Gunawardena *et al.*, 2001). O somatório da morte celular programada resulta em um processo em que as células em degradação perdem o contato com a parede celular das células vizinhas e a degradação ocorre radialmente. Em raízes de cana-de-açúcar foi verificado o aumento de transcritos relacionados às proteínas possivelmente envolvidas com o processo de morte celular programada, como exemplo proteínas de ligação ao cálcio (Grandis, 2015).

Algumas linhas de evidência sugerem que a propagação do sinal responsável por provocar a morte celular programada se dá por intermédio da comunicação celular entre células vizinhas, processo este mediado por estruturas chamadas plasmodesmos (Morgan & Drew, 2004; Visser & Bogemann, 2006; Joshi & Kumar, 2012).

1.5. Plasmodesmos e a comunicação celular durante a formação do aerênquima

Plasmodesmos são interligações entre membranas de células vizinhas que criam pontes citoplasmáticas, sendo estruturalmente complexos e com capacidade de abertura e fechamento (Figura 1), (Epel, 1994; Lucas 1995; Ehlers, 2001; Kim, 2005; Lucas *et al.*, 2009; Lee, 2014;). Este fato possibilita o transporte célula a célula de micro e macromoléculas como RNAs e proteínas, além de patógenos virais (Roberts & Oparka, 2003; Lee & Lu, 2011; Han *et al.*, 2014; Regan *et al.*, 2018). A abertura dos plasmodesmos pode sofrer um aumento no tamanho do limite de exclusão (abertura do poro) de 1 a 61 kDa, dependendo do desenvolvimento do tecido e por infecções virais (Meshi *et al.*, 1987; Wolf *et al.*, 1989; Lucas & Gilbertson, 1994; Heinlein, 2000; Jackson, 2000; Radford & White, 2001). Esta abertura é mediada pelo componente regulador da abertura do plasmodesmo, que consiste na deposição de um homopolímero de glicose (β -glucano) com ligações β -1,3 conhecido como calose (Kauss, 1996; Zavaliev *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2018).

A deposição de calose nos poros do plasmodesmo pode contrair fisicamente a dimensão de abertura e reduzir, bloquear ou até mesmo selar o tráfego de moléculas (Radfor *et al.*, 1998; Zavaliev *et al.*, 2011). O nível de calose é um resultado do equilíbrio (*turnover*) entre a deposição (operada pela calose sintase) e a degradação (operada pela β -1,3 glucanase) deste polímero (Zavaliev *et al.*, 2011). Esta última é responsável pela hidrólise das ligações β -1,3 presentes na estrutura da calose (Ruan *et al.*, 2004).

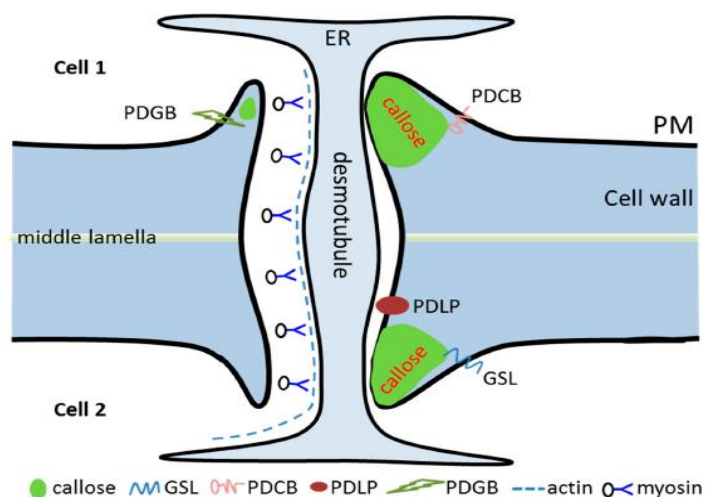


Figura 1: Esquema simplificado da representação do plasmodesmo. Deposição de calose nos poros do plasmodesmo pode contrair fisicamente a dimensão de abertura (representada em verde). O lado esquerdo do desenho representa a degradação da calose e a abertura do plasmodesmo pela ação da β -1,3 glucanase. ER: retículo endoplasmático; GSL: glucano sintase; PM: membrana plasmática; PDCB: proteína de ligação a calose relacionada ao plasmodesmo; PDBG: β -1,3 glucanase associada ao plasmodesmo; PDLP: proteína associada ao plasmodesmo. Fonte: Han *et al.*, 2019.

A β -1,3 glucanase (EC 3.2.1.39) é uma glicosil hidrolase da família GH17, com expressão detectada inicialmente em tecidos florais e raízes, com possível papel regulador no desenvolvimento e crescimento vegetal (Lotan *et al.*, 1989; Memelink *et al.*, 1990; Neale *et al.*, 1990). Uma função mais específica foi identificada por Wan e colaboradores (2011), sugerindo que a expressão deste gene é essencial para o desenvolvimento do pólen devido a seu papel na degradação da calose. Por outro lado, plantas mutantes com deficiência na produção da β -1,3 glucanase apresentam maior resistência a alguns vírus, decorrente da elevada deposição de calose (Beffa *et al.*, 1996; Iglesias & Meins 2000). Já Bucher e colaboradores (2001) analisaram a hidrólise da calose em células das folhas de tabaco infectadas pelo vírus do mosaico com superexpressão de β -1,3 glucanase, a qual propiciou um acentuado deslocamento dos vírus célula a célula.

Alguns trabalhos sugerem a participação de plasmodesmos no tráfego intercelular durante a formação do aerênquima (Kawai *et al.*, 1998; Gunawardena *et al.*, 2011). Segundo Gunawardena e colaboradores (2001), ao induzir morte celular programada em raízes de milho para a formação de aerênquima, foi possível observar um aumento proeminente na quantidade de plasmodesmos. Esta proeminência foi constatada em tratamentos de hipóxia e etileno sendo indistinto no controle.

Em raízes de arroz (*Oryza sativa*), para determinar a direção em que a formação do aerênquima se dá, foram feitas microinjeções de sondas fluorescentes de 4 a 450 Da (Kawai *et al.*, 1998). Concluiu-se que os processos de alongamento e expansão celular são seguidos por acidificação do citoplasma e rompimento do tonoplasto, e isso coincide com o movimento observado das sondas injetadas através dos plasmodesmos, com um padrão radial (Kawai *et al.*, 1998).

1.6. Domínios proteicos das β -1,3 glucanases e sua relação com o Plasmodesmo

Como mencionado anteriormente, o plasmodesmo é sugerido como participante de diversos processos de desenvolvimento da planta, destacando a necessidade de uma regulação rápida e reversível (Iglesias & Meins, 2000; Barral *et al.*, 2005; Levy *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2009). Processos como a deposição de calose na parede celular ao redor da zona de exclusão do plasmodesmo são propostos como fatores de regulação do fluxo da informação celular (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2018).

Entretanto, para que essa interação seja precisa e eficaz, as células vegetais desenvolveram alguns sistemas de interação, como por exemplo, os domínios de ligação ao carboidrato e a formação de pontes de dissulfeto (Forslund *et al.*, 2008). Alguns autores (Barral *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2009) identificaram a presença de um domínio proteico conhecido como X8 ou módulo de ligação ao carboidrato família 43 (CBM 43), que interage com a calose e conseqüentemente regula o tráfego de moléculas da célula devido à deposição ou degradação deste polissacarídeo, bem como, modula a atividade da β -1,3 glucanase, afetando também o tráfego celular (Iglesias & Meins, 2000; Levy *et al.*, 2007; Simpson *et al.*, 2009).

Devido à associação da atividade enzimática da β -1,3 glucanase ao domínio X8 junto à calose, é possível prever que a enzima relacionada com esse domínio possa ser direcionada e retida na região do plasmodesmo (Barra *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2009). Análises filogenéticas dos domínios proteicos de sequências de espécies de eucariotos, evidenciaram que o domínio X8 surgiu em dois momentos, de forma independente nas plantas (Viridiplantae), uma vez em eudicotiledôneas (*Arabidopsis thaliana*) e outra vez em monocotiledôneas (*O. sativa*), sendo esse domínio terminal pertencente à glicosil hidrolase (Forslund *et al.*, 2008).

As glicosil hidrolases poderiam apresentar nenhum, um ou dois domínios X8 C-terminais. No entanto, genes que codificam para proteínas com um único domínio X8 estariam presentes no genoma de ambas as espécies (*A. thaliana* e *O. sativa*), sugerindo assim que a interação da glicosil hidrolase através do domínio X8 poderia ajudar a estabilizar a hidrolase com um determinado substrato (Forslund *et al.*,

2008), permitindo assim uma regulação mais específica. Além disso, seria possível sugerir que a necessidade de uma especificidade de substrato levou a uma duplicação independente do domínio X8 em algumas proteínas (Forslund *et al.*, 2008).

1.7. Identificação de transcritos de β -1,3 glucanases no aerênquima de cana-de-açúcar

Dados do transcriptoma dos segmentos de raízes de cana-de-açúcar com aerênquima em desenvolvimento evidenciaram a ocorrência de 10 transcritos referentes à β -1,3 glucanases, sugerindo que essas enzimas poderiam ter um importante papel neste processo (Piovezani, 2017). Concomitantemente, em uma análise proteômica, seis destas 10 sequências foram identificadas como β -1,3 glucanases (Grandis, 2019), das quais algumas com um padrão que coincide com a degradação do β -glucano, que é degradado ao longo da formação do aerênquima (Leite *et al.*, 2017). A remoção do β -glucano requer uma enzima responsável pela hidrólise da ligação β -1,4 adjacente a uma β -1,3 e não há relatos de atividade de β -1,3 glucanases sobre o β -glucano. Por outro lado, a grande quantidade observada de transcritos e proteínas relacionados à atividade de degradação de calose reforça a suspeita de que o tráfego de moléculas via plasmodesmo possa ter um papel durante a formação do aerênquima em cana-de-açúcar.

Sendo a degradação da calose um fator chave para aberturas de poros de comunicação entre células, informações a respeito do papel da β -1,3 glucanase podem ser obtidas por meio da co-localização da proteína no tecido. Nesse sentido, o uso de anticorpos contra ambos os polissacarídeos juntamente à localização da enzima de degradação de calose auxiliaria na identificação mais precisa da localização dos plasmodesmos, gerando dados relevantes para elucidar seu papel na formação do aerênquima. Esta comunicação possivelmente é necessária para amplificar o sinal da morte celular programada (Visser & Bogemann, 2006; Joshi & Kumar, 2012) e especula-se que a β -1,3 glucanase possa estar relacionada à abertura dos poros do plasmodesmo durante a formação do aerênquima ao mesmo tempo em que a morte celular programada ocorre.

Desta forma, mediante a possível relevância da comunicação do plasmodesmo para a formação do aerênquima, a caracterização das sequências de

genes que codificam para proteínas que controlam a abertura e fechamento dos plasmodesmos, representa importante ferramenta para a compreensão do desenvolvimento do aerênquima. Especula-se que a formação do aerênquima seja resultado de algum sinal ainda desconhecido, mas que pode envolver elementos do processo de morte celular programada trafegando célula a célula de modo radial por células vizinhas.

Logo, a identificação de genes candidatos referentes às GH17 potencialmente responsáveis pela abertura do plasmodesmo consiste no meio pelo qual será realizada a caracterização funcional em termos de localização tecidual da proteína correspondente, juntamente à localização do polissacarídeo alvo (calose). A compreensão dos mecanismos biológicos por trás da formação do aerênquima em raiz de cana-de-açúcar tem o potencial de complementar o conhecimento acerca de processos nos quais a parede celular é degradada. Os dados produzidos podem contribuir na compreensão de aspectos fisiológicos deste processo, e espera-se que também para questões voltadas à bioenergia.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar o padrão de ocorrência *in situ* da proteína β -1,3 glucanase, da calose e do β -glucano e relacionar com a formação do aerênquima em cana-de-açúcar.

2.2. Objetivos específicos

- Inferir relações fenéticas das sequências de β -1,3 glucanases previamente identificadas na proteômica e transcriptômica de raiz de cana-de-açúcar;
 - Identificar o padrão local de ação da β -1,3-glucanase no tecido com aerênquima em formação;
- Localizar a calose e o β -glucano no tecido com aerênquima em formação.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental

O projeto foi executado visando à obtenção de uma sequência alvo de β -1,3-glucanase para a realização de ensaio de imunolocalização desta proteína, associada à localização dos polissacarídeos β -glucano e calose. Desta forma, foram executadas duas etapas: a primeira foi baseada em uma busca nos bancos de dados, anotação funcional e análise fenética, enquanto a segunda consistiu no cultivo do material e preparo para RT-qPCR (Figura 2). Os resultados obtidos nos processos consistiram em meios de avaliação para a seleção da sequência alvo desejada.

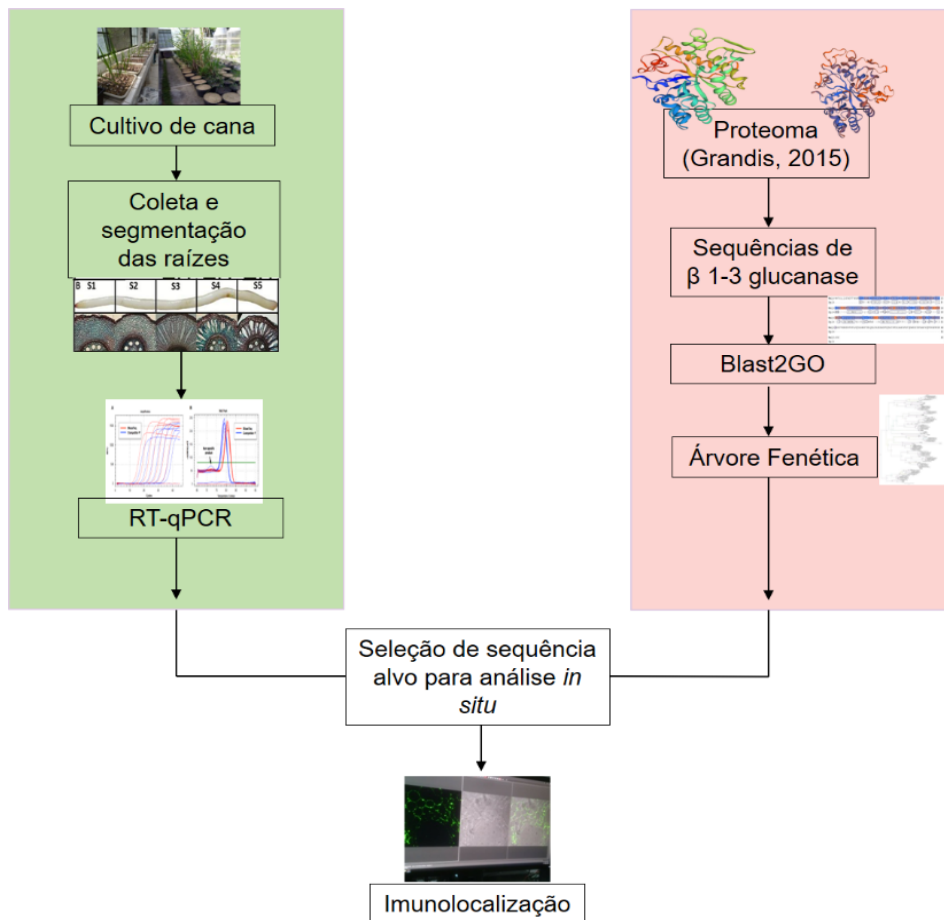


Figura 2: Fluxograma simplificado esquematizando as etapas realizadas nesse trabalho, sendo a etapa 1 evidenciada em verde e a 2 em vermelho. Todas as etapas contribuíram para a seleção de uma sequência alvo de β -1,3-glucanase utilizada para a imunolocalização *in situ*.

3.2. Cultivo e coleta de raízes cana-de-açúcar

Os experimentos foram realizados no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo no Laboratório de Fisiologia Ecológica de Plantas entre os meses de outubro de 2017 e março de 2018. Para o desenvolvimento das plantas foram utilizados colmos da variedade de cana-de-açúcar SP80-3280 que foram

cortados em toletes contendo uma gema lateral, plantados em bandejas contendo vermiculita e regados três vezes por semana. Após seis semanas, quando as plantas apresentavam aproximadamente 15 cm de altura, foram transplantadas para vasos com capacidade de 10 litros contendo vermiculita e substrato de argila expandida, e foi adicionado NPK (30:20:30) à superfície do substrato em cada vaso de planta uma única vez.

Para a coleta das raízes foram separadas três plantas em cinco grupos (A-E), totalizando 15 plantas. De cada planta foram cortadas três raízes do perfilho, cada raiz foi segmentada em cinco partes contendo 1 cm cada, no qual esse foi separado para a fase de fixação e emblocamento (Figura 3).

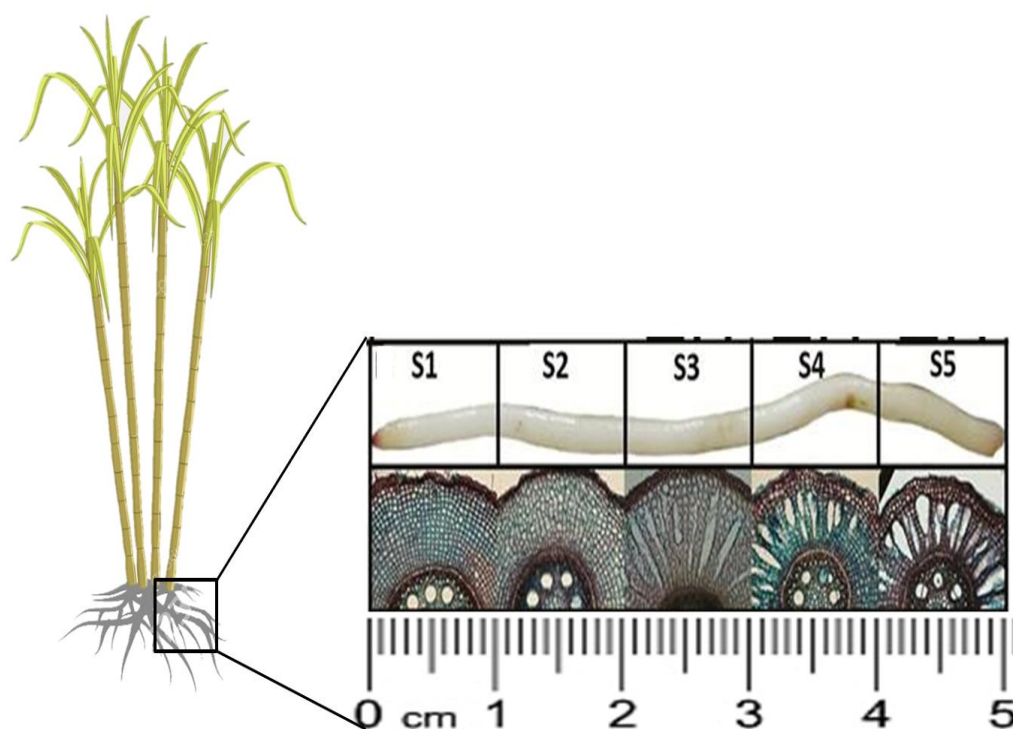


Figura 3: Ilustração representativa da cana-de-açúcar mostrando a divisão das raízes que emergem do perfilho, cortadas em 5 segmentos de um centímetro cada. Fonte: Adaptado de Tavares (2015).

3.3. Fixação e emblocamento

Para fixação do material foram adicionados aos segmentos de raízes 600 μ L de formaldeído 4% e glutaraldeído 2,5%, os quais foram mantidos a vácuo por 3 h a 6 horas. Após a lavagem do fixador, o material passou por processo de desidratação seriada por uma hora em etanol (10, 30, 50, 70, 90 e 100%).

Vinte e cinco amostras foram infiltradas, sendo estas escolhidas dos grupos (A-E) 5 segmentos pertencentes à mesma raiz, porém de plantas aleatórias, utilizando-se a resina LR *White* (*Sigma-Aldrich*) sem adição do catalisador, inicialmente acrescida de etanol 100% na proporção 1:1, e posteriormente resina 100%, ambas permanecendo por 24 horas na solução a 4° C. A polimerização do material se deu através da adição do catalisador à resina (conforme descrição do fabricante). As amostras foram transferidas para cápsulas gelatinosas (*TED PELLA*), com capacidade para 210 µL e foram mantidas em uma estufa a 58° C para a polimerização por 48 horas. Após a checagem da qualidade das amostras polimerizadas os blocos foram desbastados utilizando uma lâmina de barbear. Destes blocos foram obtidas as secções semi-finas (500 nm) utilizando o Ultramicrótomo Leica (*Ultracut UCT*). Obtiveram-se 7 cortes por lâmina, em um total de 25 lâminas sendo de cada segmento e grupo conforme mencionado no item acima.

3.4. Imunolocalização de polissacarídeos e da proteína GH17

Os processos de imunolocalização foram realizados de acordo com a metodologia previamente estabelecida (Leite *et al.*, 2017). O anticorpo para marcação *in situ* da proteína β -1,3 glucanase de cana (ScPDBG1) foi sintetizado correspondendo à sequência [NH₂] -SGAASIVYQQPAGTCDATAN- [OH] 0,5µg/ml (1:2.000) (Rheabiotech Ltda). Para a detecção dos polissacarídeos β -glucano e calose foram utilizados os anticorpos BG1 e LAMP (*BioSupplies Australia*), respectivamente. Para o anticorpo da ScPDBG1, foram realizados testes de titulação (1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000). Já para o BG1 e LAMP a titulação utilizada de 1:100 havia sido previamente estabelecida (Leite *et al.*, 2017). Os cortes foram incubados em 12-15 µL de solução de bloqueio [tampão fosfato salino 10 mM pH 7,0 (KPBS) e 1% albumina sérica bovina (BSA)] e mantidos em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos. Após o período de incubação, a solução foi retirada dos cortes e foi adicionado o anticorpo primário correspondente para cada detecção (BG1, LAMP ou ScPDBG1) e incubado por 1 hora. Os anticorpos primários foram retirados e os cortes foram lavados seis vezes, 5 vezes em água ultrapura por 5 minutos e 1 vez em KBPS por 15 minutos. Posteriormente, foram adicionados os respectivos anticorpos secundários (*AlexaFluor® 488 GoatAnti-Rabbit ou Anti-*

Mouse IgG) e incubados em câmara úmida por 50 minutos no escuro. Em seguida, estes foram lavados cinco vezes, sendo duas vezes com KBPS e três vezes com água ultrapura, por 5 minutos cada lavagem. As lâminas foram visualizadas por microscopia confocal de fluorescência com super-resolução TCS SP8 X – *STED* (Leica) com velocidade de digitalização 600 Hz e comprimento de emissão de onda 580 nm e *zoom* 0,77 – 1.

3.5. Busca em banco de dados e análises fenéticas

A partir do proteoma e transcriptoma dos segmentos de raízes de cana-de-açúcar (Piovezani, 2017; Grandis, 2019), 10 sequências previamente anotadas como β -1,3 glucanase foram selecionadas e funcionalmente anotadas em categorias de ontologia (GOs) via Blast2GO, utilizando-se *A. thaliana* como banco de referência. Acessando-se um *draft* de genoma de cana-de-açúcar (Riaño-Pachón e Matiello, 2017), estas mesmas sequências foram recuperadas via tBLASTn (*e-value* > e^{-10}) (Altschul *et al.*, 1990), com a finalidade de aumentar a sua qualidade.

Análises fenéticas foram realizadas com outras sequências homólogas de espécies de Viridiplantae (*A. thaliana*, *Brachypodium dystachion*, *O. sativa*, *Panicum virgatum*, *Setaria viridis*, *S. bicolor* e *Zea mays*). As sequências de *A. thaliana* relacionadas ao plasmodesmo (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso, 2014), foram utilizadas como iscas no banco de dados *Phytozome* v12.1 (phytozome.jgi.doe.gov) para a recuperação de sequências homólogas. As sequências foram alinhadas usando *MUSCLE/CLUSTAL W* com parâmetros padrão do programa *MAFFT* (Katoh & Standeley, 2013) e a árvore fenética foi criada pelo programa *IQtree* (Nguyen *et al.*, 2015). As sequências de *A. thaliana* foram consideradas o grupo externo da análise fenética. Concomitantemente, a identificação dos domínios funcionais das sequências alvo de cana-de-açúcar e *Sorghum bicolor* foi realizada utilizando-se a plataforma PFAM (*protein family* - <https://pfam.xfam.org/>).

3.6. Extração de RNA, tratamento com DNase e síntese de cDNA

Para a extração de RNA foram utilizadas amostras de raízes de cana-de-açúcar (variedade SP80-3280). Cada amostra biológica foi composta por 9 plantas,

divididas em três réplicas (A, B e C). As raízes foram segmentadas do ápice à base em 5 partes (S1 a S5) com 1 cm cada, totalizando-se 15 amostras (Tavares, 2015). As amostras foram armazenadas e maceradas em nitrogênio líquido e usadas para extração de RNA total com *Trizol Reagent (Ambion / Life Technologies™)*, conforme protocolo estipulado por De Souza e colaboradores (2007). A quantidade e pureza do RNA nas amostras foi determinado por espectrofotometria (*NanoDrop ND-100 UV-VIS Spectrophotometer, ThermoScientific*) e a integridade do produto extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com Sybr™ Gold (*Invitrogen™*).

Para o tratamento com DNase e síntese de cDNA foram utilizados os *kits ThermoFisher® DNase I amplification Grade* e *SuperScript™ III First-Strand Synthesis System* respectivamente, seguindo orientações do fabricante. Para confirmar a ausência de contaminação genômica e o funcionamento da transcrição reversa, as amostras foram submetidas à análise de PCR com um par de primers de flanqueamento por íntron para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase - GAPDH (Iskandar *et al.*, 2004) (Apêndice - Tabela 1).

3.7. Desenho dos iniciadores

Um total de 10 sequências candidatas foram selecionadas com base na identificação prévia realizada por Piovezani (2017) e Grandis (2019). Para cada sequência foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores (Anexo - Tabela 1), utilizando-se as ferramentas Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) e *Integrated DNA Technologies – IDTDNA* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>). O tamanho do *amplicon* desejado foi determinado como sendo 75-150 pares de bases, com uma temperatura ótima de anelamento entre 58 e 65° C, e com o tamanho dos iniciadores entre 19 e 20 pares de bases contendo quantidades de bases G e C entre 20 a 60%. Os iniciadores sintetizados (DNA Express Biotecnologia) foram ressuspensos (100 µM) em Tris 10 mM e EDTA 1 mM pH 8,0, dos quais foram diluídos (1:10) para posterior uso.

As condições de amplificação por PCR foram: 95°C por 5 minutos para a desnaturação inicial; 35 ciclos de 95°C por 1 minuto para a desnaturação da fita de DNA, 59°C por 1 minuto para anelamento, e 72°C por 1 minuto para que ocorresse a extensão. Após o término da PCR, com o produto da amplificação foi feito um gel

de agarose em tampão TAE 1x (TAE 50 X com Tris base 2M, EDTA 50 mM pH 8,0 e ácido acético 5,7%), corado com *SybrTM Gold (InvitrogenTM)* conforme orientações do fabricante.

3.8. Análise por RT-qPCR

A abundância de transcritos foi avaliada por análise de RT-qPCR usando um sistema de PCR em tempo real *QuantStudioTM 6 Flex Real-Time PCR System (Applied BiosystemsTM Thermo Fisher)*. As reações de PCR foram realizadas com cDNA em concentração estoque, oligonucleotídeos na concentração final de 600 nM e *Power SYBRTM Green PCR Master Mix 1x (Applied Biosystems)* e as seguintes condições de ciclagem: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 30 segundos. Todas as reações foram realizadas em triplicata técnica para cada uma das três réplicas biológicas. A amplificação dos produtos únicos foi confirmada por análise de *Melt curve*. Os iniciadores constitutivos foram usados para normalização dos dados, sendo eles: 60S (Subunidade 60s do ribossomo), ACT 11 (Actina), GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), PUB (Poliubiquitina), UB (Ubiquitina), UBE-2 (Enzima E2 de ubiquitinação) e UBQ-10 (Poliubiquitina 10). Os dados obtidos foram normalizados na ferramenta *qBasePlus*, com seleção automática de genes constitutivos através da opção *GeNormPLUS* (Biogazelle; Hellemans *et al.*, 2007). Os resultados das análises foram expressos em valores relativos CNRQ (*Calibrated Normalized Relative Quantity*).

3.9. Análise estatística dos dados

Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido pelo teste *Tukey* considerando significativo o valor de $P \leq 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o software JMP 5.0.1 (Copyright[©] 1989-2002 SAS Institute Inc.).

4. RESULTADOS

4.1. Sequências alvos identificadas em cana-de-açúcar estão possivelmente envolvidas em processos ligados a parede celular

Foram identificadas no proteoma e transcriptoma de raízes de cana-de-açúcar dez sequências de β -1,3 glucanases, com anotação obtida via SUCEST (Piovezani, 2017; Grandis, 2019). Com o intuito de selecionar uma sequência alvo a ser utilizada no experimento de imunolocalização, realizou-se uma avaliação de critérios pontuando as sequências alvos. Para isso, foi feito um alinhamento local destas 10 sequências provindas do proteoma com Viridiplantae, em que foram obtidos altos valores de similaridades (68-100%) com sequências de enzimas β -1,3 glucanases (Tabela 1).

Adicionalmente, uma anotação funcional com base em ontologia foi realizada via BLAST2GO com o intuito de identificar sequências que possuíssem termos associados à categoria 'componente celular' envolvidos em processos ligados à parede celular. Como resultado, todas as sequências apresentaram atuação em uma região de interesse como parede celular, membrana plasmática e plasmodesmo. Desta forma, todos os alvos foram positivamente pontuados (Apêndice Figura 1).

A análise do perfil transcricional dos genes identificados por Piovezani (2017) e Grandis (2019), mostraram um acúmulo de RNA mensageiro nos primeiros segmentos. Já na proteômica, Grandis (2019) obteve um acúmulo de proteína ao longo dos segmentos da raiz, estas proteínas foram identificadas nos alvos 1-SCVPAM1059E12.g, 3-SCEQRT1025C10.g, 7-SCRFAM2071E02.g, 8-SCEZHR1088G11.g e 10-SCRURT2006B10.g. Já o alvo 9-SCRFLR1055B07.g acumulou proteína durante a transição dos segmentos 2 e 3. Os alvos que não apresentaram proteína significativa de acordo com os parâmetros estabelecidos por Grandis (2019) como a 2-SCJRFLR1074D02.g, 4-SCCCRT2004C04.g, 5-SCEZLB1025C10.g e 6-SCJLRT1023E06.g, foram pontuados como neutros. Os demais foram pontuados positivamente por já apresentarem a proteína.

Tabela 1: Sequências de β -1,3 glucanases localizadas em raízes de cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima. Perfil de transcritos e de proteínas identificadas por Piovezani (2017) e Grandis, (2019) utilizando como banco de dados SUCEST (Vetore et al., 2001), S1-S5 representam a qual segmento da raiz de cana-de-açúcar foi identificado o perfil da glicosil hidrolase. O alinhamento representa o melhor *hit* encontrado no alinhamento local da sequência alvo por meio de *Blastp*, a qual apresenta valores de cobertura, identidade e *E-value*. Na coluna de componente celular são apresentadas a anotação funcional das sequências. As siglas representam MP=membrana plasmática; PC=parede celular; RE=retículo endoplasmático.

Alvo	Identificação das sequências (SUCEST)	Perfil da β -1,3 glucanases (Piovezani, 2017; Grandis, 2019)	Alinhamento (Viridiplantae)	Cobertura (%)	Identidade (%)	<i>E-value</i>	Componente celular (Blast2GO)
1	SCVPAM1059E12.g	proteína; crescente em direção a S5; mRNA; acúmulo em S3	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 3-like Sorghum bicolor XP_002468258.1	100	98.37	0.0	ancorado à MP, PC; região extracelular; citoplasma
2	SCJFLR1074D02.g	mRNA; acúmulo em S3	β-1,3-glucanase D <i>Saccharum hybrid</i> AG 89282.1 41%, 100%, 0	80	100	0.0	ancorado à MP; PC; cloroplasto; região extracelular; plasmodesmo; RE
3	SCEQRT1025C10.g	proteína; crescente em direção a S5; acúmulo em S2 e S3 (mRNA)	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13-like Panicum hallii XP_025800224.1	97	76.05	0.0	ancorado à MP; PC
4	SCCCRT2004C04.g	mRNA; aumento a partir de S2	beta-1,3-glucanase A <i>Saccharum hybrid</i> cultivar AGQ89281.1	99	98.06	4e ⁻¹⁷⁶	ancorado à MP; PC; plasmodesmo; vacúolo; apoplasto
5	SCEZLB1013D07.g	mRNA; acúmulo em S3	putative O-glycosyl hydrolase super family protein precursor <i>Zea mays</i> NP_001130376.1	93	95.59	6e ⁻⁹⁰	ancorado à MP; PC; plasmodesmo; região extracelular
6	SCJLRT1023E06.g	mRNA; aumento a partir de S2	beta-1,3-glucanase A <i>Saccharum hybrid</i> cultivar AGQ89281.1	100	97.59	0.0	ancorado à MP; PC; plasmodesmo; vacúolo; apoplasto
7	SCRFAM2071E02.g	proteína; crescente em direção a S5; mRNA; acúmulo em S3	glucan endo-1,3-beta-glucosidase Sorghum bicolor XP_002451320.1	99	94.12	1e ⁻¹⁴⁴	ancorado à MP; PC; plasmodesmo
8	SCEZHR1088G11.g	proteína; crescente em direção a S5; mRNA; acúmulo em S3	glucan endo-1,3-beta-glucosidase 13 Sorghum bicolor XP_002462968.1	85	96.15	3e ⁻⁷⁷	ancorado à MP; PC; RE; plasmodesmo
9	SCRFLR1055B07.g	proteína; maior acúmulo na transição S2/S3	glucan endo-1,3-beta-D-glucosidase Sorghum bicolor XP_002446660.1	99	97.50	2e ⁻⁸⁰	MP
10	SCRURT2006B10.g	proteína; crescente em direção a S5; mRNA; acúmulo em S3	glycosyl hydrolase superfamily protein <i>Zea mays</i> ONM19541.1	91	86.01	2e ⁻¹¹³	ancorado à MP; PC; plasmodesmo

4.1.1. Os domínios GH17 e X8 são essenciais para a ação de β -1,3 glucanases associadas à calose

Outro critério de avaliação para a seleção da sequência alvo foi à predição dos domínios proteicos das 10 sequências alvo analisadas. Adicionalmente foi realizado um *Blast* com o *draft* do genoma de cana-de-açúcar (Riaño-Pachón e Matiello, 2017) com a finalidade de obter a sequência genômica correspondente às β -1,3 glucanases recuperadas do SUCEST (Piovezani, 2017; Grandis, 2019). As sequências do SUCEST, obtiveram similaridades de 65 a 100% com as sequências do genoma de cana-de-açúcar (Riaño-Pachón e Matiello, 2017). Os alvos 1-SCVPAM1059E12.g, 2-SCJFLR1074D02.g, 3-SCEQRT1025C10.g e 6-SCJLRT1023E06.g apresentaram o melhor valor de *E-value* e similaridade com a sequência correspondente do genoma de cana-de-açúcar (Riaño-Pachón e Matiello, 2017) (Tabela 2).

Tabela 2: Similaridades entre as sequências do SUCEST (Piovezani, 2017; Grandis, 2019) com a melhor sequência correspondente do *draft* do genoma da cana-de-açúcar SCP803280 (Riaño-Pachón e Matiello 2017). As sequências do SUCEST foram usadas como alvo para a busca da sequência genômica correspondente através do alinhamento de sequências pela ferramenta BLAST2GO.

Alvo	Genoma alvo SUCEST	Genoma SCP803280	<i>E-value</i>	Similaridade %
1	SCVPAM1059E12.g	0000903071.1	0	100
2	SCJFLR1074D02.g	000066371.3	0	100
3	SCEQRT1025C10.g	000047524.1	0	99
4	SCCCRT2004C04.g	000030147.2	7.47E ⁻¹⁵⁷	95
5	SCEZLB1013D07.g	000015718.1	1.05E ⁻¹⁰²	100
6	SCJLRT1023E06.g	000030147.2	0	95
7	SCRFAM2071E02.g	000025970.2	2.32E ⁻⁴⁹	65
8	SCEZHR1088G11.g	0000151005.1	4.24E ⁻⁵⁹	76

9	SCRFLR1055B07.g	000080499.3	4.53E ⁻⁸¹	100
10	SCRURT2006B10.g	000096910.1	4.89E ⁻⁷³	99

Tanto as sequências genômicas (Riaño-Pachón e Matiello 2017) quanto os transcritos (SUCEST) traduzidos de β -1,3 glucanases, tiveram seus domínios proteicos preditos pelo Pfam. Algumas sequências continham mais de um domínio proteico X8 junto com o domínio catalítico GH17, sendo consideradas possíveis candidatas de proteínas ligadas mais fortemente ao substrato (calose). No entanto, as sequências que apresentaram domínio proteico incompleto foram consideradas menos favoráveis para o desenho do anticorpo. Adicionalmente foram preditos os domínios das proteínas de β -1,3 glucanases de *S. bicolor*, em caráter comparativo, para corroborar com as informações obtidas (Tabela 3).

Como resultado, às sequências pontuadas como desfavoráveis foram 8-SCEZHR1088G11.g, 9-SCRFLR1055B07.g e 10-SCRURT2006B10.g por não apresentarem os domínios supostamente necessários para o papel funcional da proteína.

Tabela 3: Domínios proteicos preditos pela plataforma Pfam, evidenciando domínios característicos da família GH17, algumas proteínas apresentam apenas o domínio X8, não evidenciando o domínio característico da família. Foram checados os domínios das 10 sequências encontradas no transcriptoma e proteoma (Piovezani, 2017; Grandis, 2019), bem como, das sequências recuperadas pelo draft do genoma da cana-de-açúcar (Riaño-Pachón e Matiello 2017). *Sorghum bicolor* por ser evolutivamente mais próximo de cana-de-açúcar, foi utilizado para corroborar com as predições dos domínios proteicos.

Alvo	Genoma alvo SUCEST	Domínios PFAM	Envelope início -término (E-value)	Genoma SCP803280	Domínios PFAM	Envelope início -término (E-value)	Identificação <i>Sorghum bicolor</i>	Domínios PFAM	Envelope início -término (E-value)
1	SCVPAM1059E12.g		26-307 (6.5e-66)	0000903071.1		26-348 (4.3e-81) // 363-435 (2.2e-17)	001G452900.1		26-348 (1.1e-80) // 363-435 (2.7e-17)
2	SCJFLR1074D02.g		125-444 (1.9e-83)	000066371.3		32-351 (1.1e-83)	010G186700.1		32-351 (2.6e-84)
3	SCEQRT1025C10.g		45-398 (6.9e-67) // 416-487 (1.2e-22) / 501-572 (1.3e-22) / 587-658 (5.7e-23)	000047524.1		30-259 (6.4e-49) / 257-380 (1.5e-21) // 398-469 (1.1e-22) / 483-554 (1.2e-22) / 569-640 (6.8e-23)	002G327900.2		33-370 (3e-74) // 383-454 (9.7e-23) / 469-540 (2.2e-23)
4	SCCART2004C04.g*		29-259 (5.7e-70)	000030147.2**		43-345 (2.2e-106)	*003G421700.1 / 003G421500.1**	 	29-331 (9.5e-107)* // 32-335 (1.2e-104)
5	SCEZLB1013D07.g		8-80 (2.6e-18)	000015718.1		3-325 (5.5e-81) // 340-412 (2.5e-17)	001G452900.1		26-348 (1.1e-80) // 363-435 (2.7e-17)
6	SCJLRT1023E06.g*		29-331 (6.8e-107)	000030147.2**		43-345 (2.2e-106)	*003G421700.1 / 003G421500.1**	 	29-331 (9.5e-107)* // 32-335 (1.2e-104)
7	SCRFBAM2071E02.g		2-223 (7.8e-27)	000025970.2		29-347 (1e-71) // 376-448 (3.4e-20)	006G271100.1		31-349 (4.4e-72) // 378-450 (5e-20)
8	SCEZHR1088G11.g		29-152 (2.2e-23)	0000151005.1		27-292 (2.1e-60)	002G328300.1		29-286 (5.4e-52) // 286-379 (9.9e-15) / 392-463 (3.1e-23) / 478-549 (2.4e-20)
9	SCRFLR1055B07.g		37-107 (6.3e-19)	000080499.3		37-107 (1.7e-18)	006G119000.2		38-108 (1e-18)
10	SCRURT2006B10.g		1-81 (1.8e-16) // 111-181 (3.2e-23)	000096910.1		29-99 (7.5e-24)	005G228900.1		31-356 (6.4e-63) // 382-452 (2.2e-22)

4.1.2. As sequências de cana-de-açúcar selecionadas possuem similaridade com as β -1,3 glucanases de *A. thaliana* envolvidas no controle do funcionamento do plasmodesmo

Já é conhecido que algumas β -1,3 glucanases de *A. thaliana* possuem ação direta sobre o plasmodesmos (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso 2014). Deste modo, com a finalidade de inferir relações de similaridades das β -1,3 glucanases, uma árvore fenética foi gerada (figura 2). Para a construção da árvore foram utilizadas as sequências alvo de cana-de-açúcar obtidas via transcriptoma e proteoma (Piovezani, 2017; Grandis, 2019) e genoma (Riaño-Pachón e Matiello 2017), sequências *A. thaliana* diretamente envolvidas no controle de abertura e fechamento do plasmodesmo (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso 2014) e sequências de seis espécies de Poaceae.

Quatro grandes clados foram evidenciados nesta análise (Figura 4). As sequências de cana-de-açúcar (Grandis, 2015; Riaño-Pachón e Matiello 2017), estão presentes em todos os clados identificados, bem como as sequências de *A. thaliana* (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso 2014). Além disso, observou-se que alguns alvos de cana-de-açúcar (proteoma), compartilharam o mesmo clado com suas respectivas sequências genômicas, apresentando um alto valor de *bootstrap*. No entanto, os alvos 7-SCRFAM2071E02.g e 8-SCEZHR1088G11.g apresentaram suas sequências genômicas correspondente em outro ramo. Já os alvos 1-SCVPAM1059E12.g e 5-SCEZLB1013D07.g, assim como 4-SCCCRT2004C04.g e 6-SCJRLT1023E06.g, apresentaram alta similaridade entre eles e suas sequências genômicas.

Desta forma, como todas as sequências apresentarem similaridades com as β -1,3 glucanases de *A. thaliana*, todas foram pontuadas positivamente. Contudo, as sequências provindas do proteoma que não agruparam com suas sequências correspondentes do genoma, assim como as sequências que compartilharam o mesmo clado, foram pontuadas como neutras, sendo essas 1-SCVPAM1059E12.g, 4-SCCCRT2004C04.g, 5-SCEZLB1013D07.g, 6-SCJRLT1023E06.g, 7-SCRFAM2071E02.g e 8-SCEZHR1088G11.g.

árvore representam um gradiente de cores, quanto mais alto o valor de *bootstrap* mais próximo da cor rosa o ramo será. As cores dos clados colapsados são aleatórias do programa, não representando o gradiente de cores mencionado acima.

Para avaliar se as sequências pontuadas como neutras na análise fenética eram pertencentes a uma única sequência ou se a sequência genômica era mais conservada, um alinhamento múltiplo foi realizado entre as sequências obtidas no proteoma e suas respectivas sequências providas do genoma (Figura 5). Nesta análise, as sequências 1-SCVPAM1059E12.g e 5-SCEZLB1013D07.g foram negativamente pontuadas uma vez que ficou evidente que ambas formam uma única sequência (Figura 5A), mesmo havendo uma sequência genômica correspondente para cada uma. Da mesma forma, para 4-SCCART2004C04.g e 6-SCJRLT1023E06.g observou-se que as mesmas corresponderam a uma única sequência genômica, sendo a 6-SCJRLT1023E06.g mais completa (Figura 5B). No caso das sequências 7-SCRFAM2071E02.g e 8-SCEZHR1088G11.g (Figura 5C e D), estas também foram negativamente pontuadas por apresentarem baixa similaridades com suas sequências genômicas correspondentes.

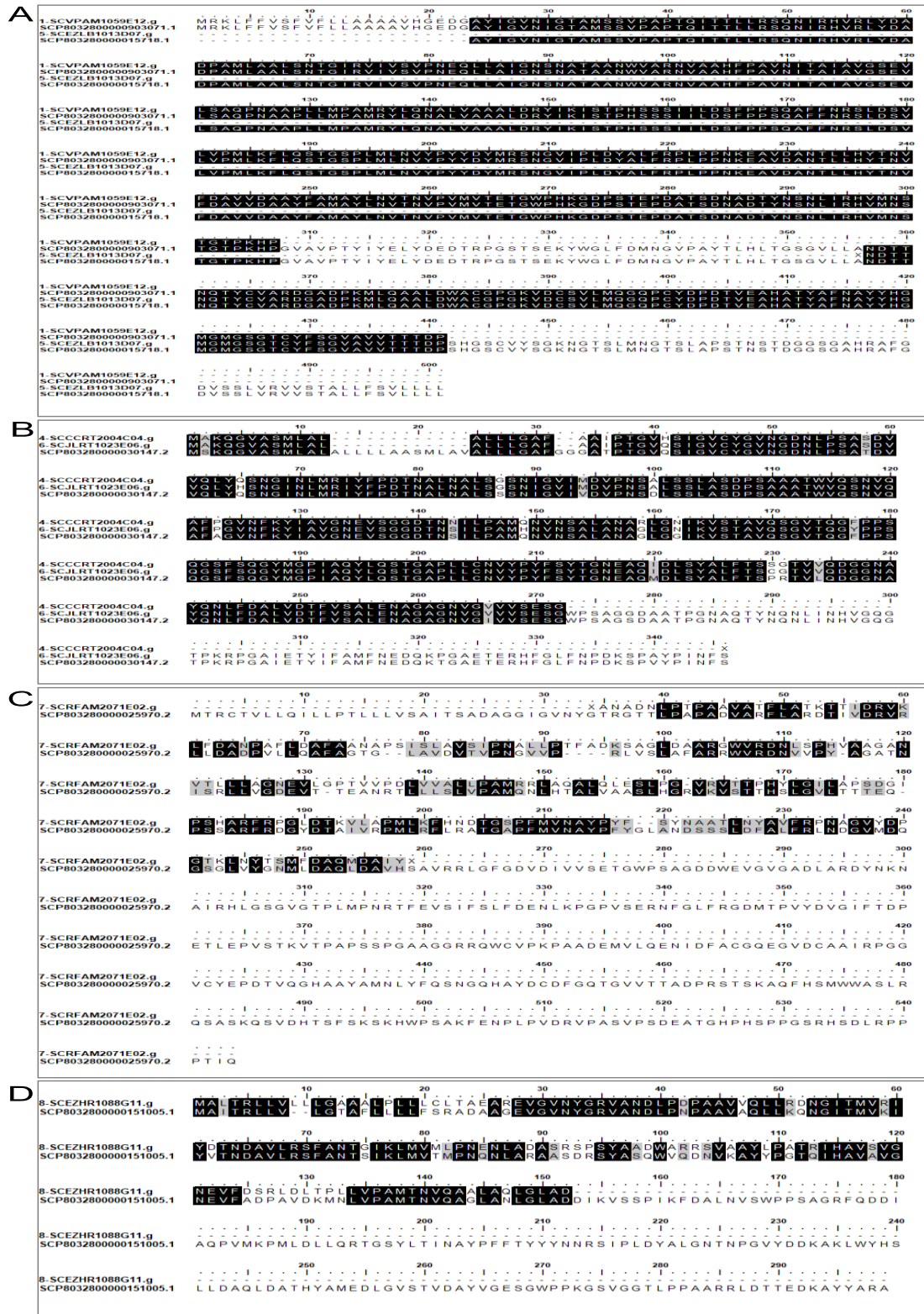


Figura 5: Alinhamentos realizados com as sequências obtidas no transcriptoma e proteoma (Piovezani 2017; Grandis, 2019), que foram pontuadas como neutras após o padrão encontrado na árvore fenética. A- alinhamento realizado entre as sequências 1-SCVPAM1059E12.g e 5-SCEZLB1013D07.g, nota-se que são sequências conservadas e suas sequências identificadas pelo SUCEST parecem ser complementares. B- alinhamento realizado entre as sequências 4-SCCCRT2004C04.g e 6-SCJRLT1023E06.g que obtiveram a mesma sequência genômica correspondente, ficando evidente que geram a mesma proteína, sendo o alvo 6-SCJRLT1023E06.g o mais completo. C- alinhamento 7-SCRFAM2071E02.g com baixa similaridade com a sequência genômica recuperada, mesmo caso do alvo 8-SCEZHR1088G11.g (D).

4.1.3. A expressão dos transcritos de β -1,3 glucanases são similares entre os segmentos de raiz de cana-de-açúcar

Tavares e colaboradores (2018) mostraram que há uma maior expressão de transcritos de glicosil hidrolases nos primeiros segmentos da raiz de cana-de-açúcar, antecedentes à formação do aerênquima. Desta forma, para avaliar se o padrão das sequências alvo de β -1,3 glucanase seguiam esse padrão de transcrição, uma análise de RT-qPCR foi realizada para verificar qual o padrão apresentado (Figura 6).

Não foi possível realizar a análise para alvo 5-SCEZLB1013D07.g, devido a não funcionalidade dos iniciadores na amplificação. Para os demais alvos, observou-se que a maioria dos transcritos das sequências de β -1,3 glucanase não apresentaram diferença de expressão entre os segmentos (Figura 6A-G e I). Apenas o alvo 9-SCRFLR1055B07.g apresentou diferença entre os segmentos, em que houve baixo nível de expressão nos segmentos S2, S3 e S4 comparados com os segmentos S1 e S5 (Figura 6H).

Desta forma, os alvos que não tiveram diferença significativa foram pontuados como neutros, bem como o alvo 5-SCEZLB1013D07.g. No entanto, o alvo 9-SCRFLR1055B07.g, foi pontuado negativamente, por apresentar um aumento de transcrito no S5, diferindo do padrão encontrado durante a formação do aerênquima.

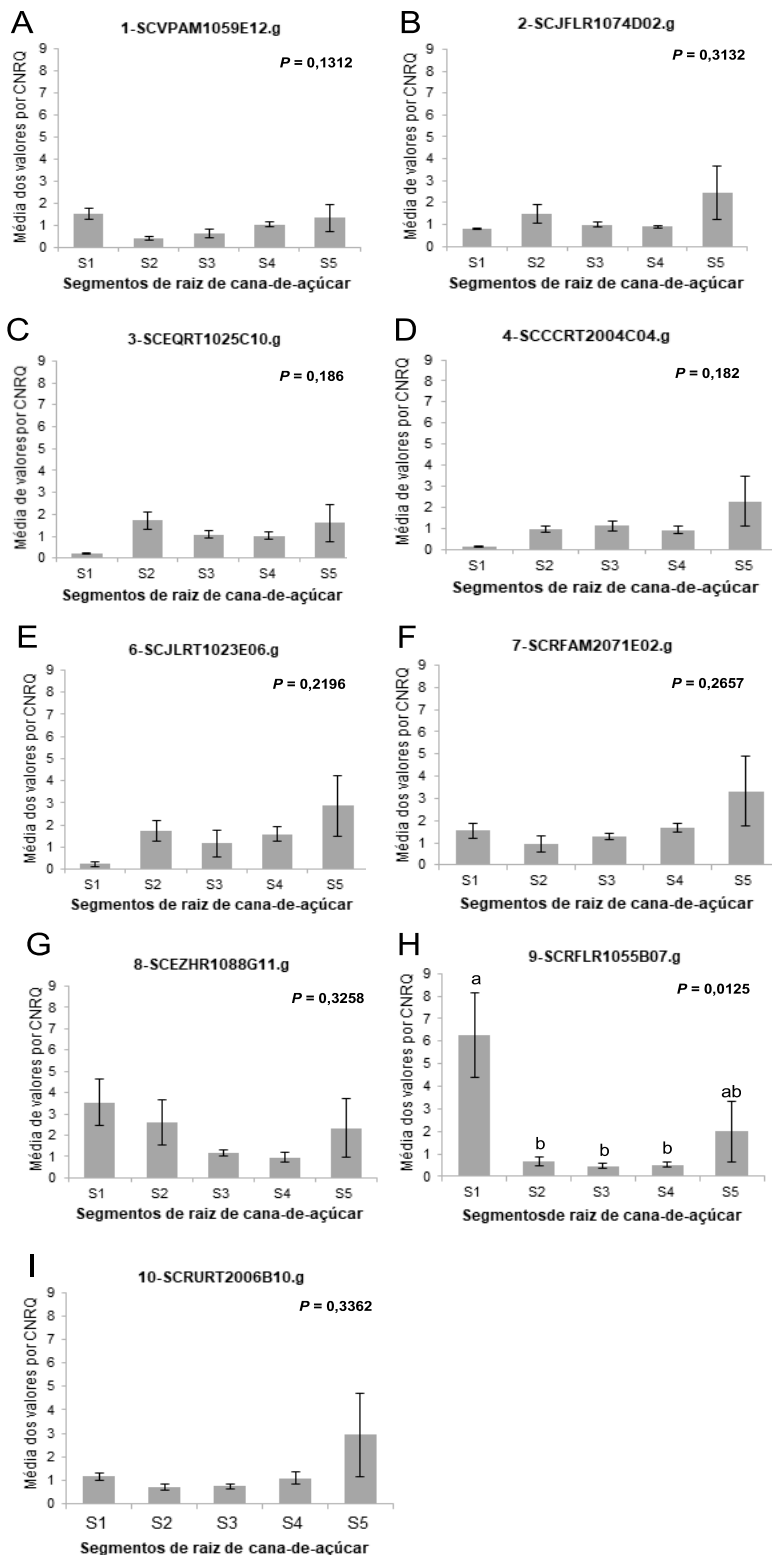


Figura 6: Perfil da transcrição das β -1,3 glucanase (Grandis, 2015) ao longo dos segmentos da raiz de cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima (A-I). Os valores representam a média de *Calibrated and Normalized Relative Quantification* (CNRQ), barras representam o erro padrão (n=3), Anova oneway. Letras diferentes corresponde a diferenças significativas $P \leq 0,05$.

Após todas essas análises, foi possível compilar os dados em uma tabela final mostrando qual o melhor alvo para o desenho do anticorpo para a

imunolocalização (Tabela 5). Como resultado, aquele que teve maior pontuação na maioria dos critérios da análise foi escolhido, sendo este o 3-SCEQRT1025C10.g.

Tabela 5: Tabela contendo todos os resultados das análises efetuadas em busca do gene candidato. Esfera em verde representa um resultado positivo, esfera em amarelo nulo e em vermelho representa um resultado não favorável.

	1- SCVPAM1059E12.g	2- SCJFLR1074D02.g	3- SCEQRT1025C10.g	4- SCCORT2004C04.g	5- SCEZLB1013D07.g	6- SCJLRT1023E06.g	7- SCRFAM2071E02.g	8- SCEZHR1088G11.g	9- SCRFRLR1055B07.g	10- SCRURT2006B10.g
Similaridades com β -1,3 glucanase	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Anotação funcional	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Proteômica (Grandis, 2015)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Melhor E-value na recuperação da sequência genômica (Riaño-Pachón e Mattiello, 2017)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Domínio proteico	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Similaridades com A. thaliana (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso 2014)	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Agrupamento das sequências alvo com as sequências genômicas na árvore fenética	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Alinhamento sequências alvo e genômica	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
Padrão transcripcional por RT-qPCR	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

4.2. Imunolocalização

A partir da seleção da proteína alvo, foi possível confeccionar o anticorpo específico e efetuar o ensaio *in situ* ao longo dos segmentos da raiz de cana-de-açúcar (S1-S5), durante a formação do aerênquima. Além disso, também foram realizados os ensaios de imunolocalização para os polissacarídeos β -glucano (BG1) e calose (LAMP). Para o β -glucano era esperado a sua presença ao longo da parede celular devido ao seu papel estrutural em sua arquitetura e que estes dados corroborassem com as observações de Leite e colaboradores (2017). Já em relação à calose não se sabe ao certo o seu papel durante a formação do aerênquima, bem como a ação das hidrolases.

4.2.1. Padrão encontrado do β -glucano (BG1) corrobora com a formação do aerênquima e evidencia uma degradação pontual

Durante a formação do aerênquima foi constatada a degradação do β -glucano nas paredes celulares de células do córtex a partir do segmento 2 (Leite *et*

al., 2017). O mesmo padrão foi observado neste trabalho. No primeiro segmento, o sinal de fluorescência do anticorpo BG1 encontrava-se homogêneo disperso ao longo da parede celular (Figura 7A, F, K, P e U). Neste mesmo segmento também foram evidenciados possíveis plasmodesmos na parede celular (Figura 7U), pelas micrografias obtidas por imagem de super-resolução.

A partir do segmento 2 e 3 foi possível notar que na região do córtex houve a presença de células mais arredondadas (Figura 7G, L, M, Q e R) que indicam células em expansão; assim como algumas lacunas entre elas (Figura 7B-C, G-H, L-M, Q-R). Particularmente, a partir do segmento 3 observou-se a presença de pontuações do sinal de fluorescência nas células em expansão (Figura 7M-W).

Já no segmento 4 a intensidade da fluorescência do anticorpo foi reduzida, e apenas as células da epiderme e endoderme apresentaram uma ligação mais contínua e em torno de toda a parede celular (Figura 7I, N, S e X). No segmento 5 houve a presença de lacunas maiores entre as células, o que identifica a formação do aerênquima. O sinal de fluorescência foi encontrado em torno de um composto formado por essas lacunas (fragmentos de parede celular), no qual foi possível visualizar um sinal de ligação com menor intensidade em regiões pontuais da parede celular (Figura 7O-T). Desta forma, evidenciou-se que a degradação do polissacarídeo β -glucano ao longo da formação do aerênquima ocorre de maneira pontual e em regiões específicas da cadeia do polissacarídeo, iniciando-se a partir do segmento 2.

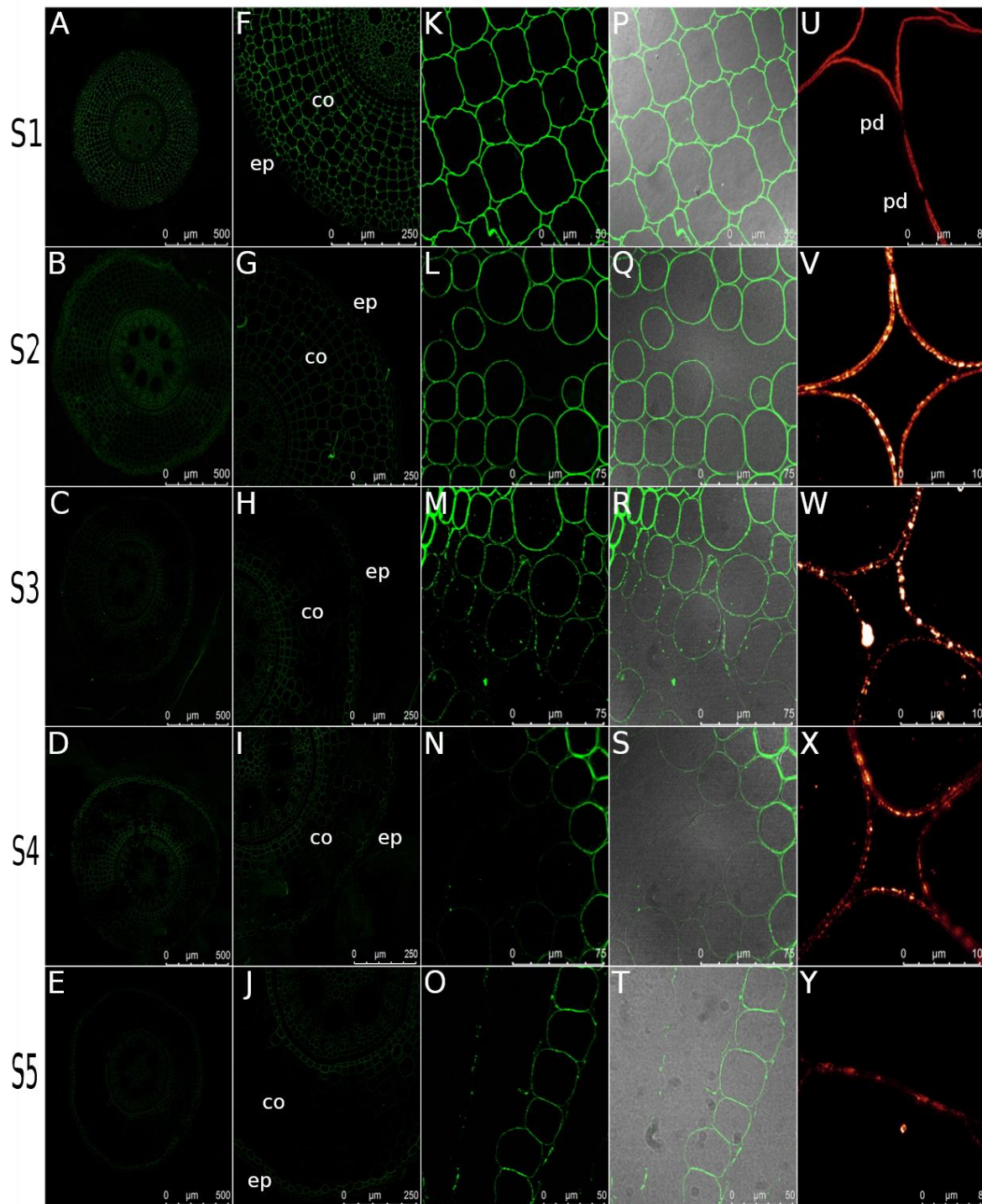


Figura 7: Imunolocalização de raízes de cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima utilizando o anticorpo BG1 contra o polissacarídeo β -glucano. A-E mostra o córtex inteiro da raiz de cana-de-açúcar por segmentos (S1 a S5) com escala de 500 μm ; F-J mostra um quadrante do córtex (co) com escala de 250 μm ; com a epiderme (ep) evidenciada em todos os quadrantes. K-O imagem com um aumento de 100x região do córtex evidenciando a presença do anticorpo (K e O com escala de 50 μm , L a N com escala de 75 μm). P-T imagem sobreposta do sinal do anticorpo e das células do córtex (P e T com escala de 50 μm , Q a R com escala de 75 μm). U- Y imagem em Super-resolução (U e Y com escala de 8 μm , V a X escala de 10 μm); Imagem U evidencia a junção quadrangular entre as células, bem como possíveis plasmodesmos (pd).V-X região quadrangular entre as células e Y evidencia a parede celular de uma célula em expansão.

4.2.2. Anticorpo anti-calose (LAMP) evidência regiões do plasmodesmo na parede celular

Para identificar um possível papel da calose durante a formação do aerênquima, foi realizada uma imunolocalização utilizando o anticorpo anti-calose (LAMP). Mediante a isto, observou-se que a calose apresentava um padrão similar, porém de menor intensidade em relação ao do β -glucano, havendo mais sinal de fluorescência do anticorpo nos primeiros segmentos (Figura 8).

No primeiro segmento foi possível notar um padrão de ligação descontínuo do anticorpo em torno da parede celular (Figura 8F, K, P). Este padrão deve-se ao fato da calose não ser um polissacarídeo estrutural presente constitutivamente ao longo da parede celular. Em uma amplitude maior, utilizando STED (imagem de super-resolução), foi notória uma concentração de sinal localmente, podendo indicar regiões relacionadas aos plasmodesmos (Figura 8P).

Nos segmentos 2 e 3, em algumas células menores do córtex a deposição de calose foi mais evidente. No entanto, em células em expansão, maiores e mais arredondadas, não foi observado o mesmo padrão (Figura 8G, H, L e M). Já no segmento 4, observou-se a ligação do anticorpo apenas em células presentes entre duas formações de compósitos (Figura 8I-N). Ampliando as regiões em que o sinal era mais evidente foi possível notar uma deposição local e concentrada (Figura 8S). Finalmente, no segmento 5 houve uma redução do sinal de fluorescência observado (Figura 8E, J, O e T). Este padrão de deposição de calose ao longo da formação do aerênquima pode indicar um importante papel de regulação na formação do mesmo.

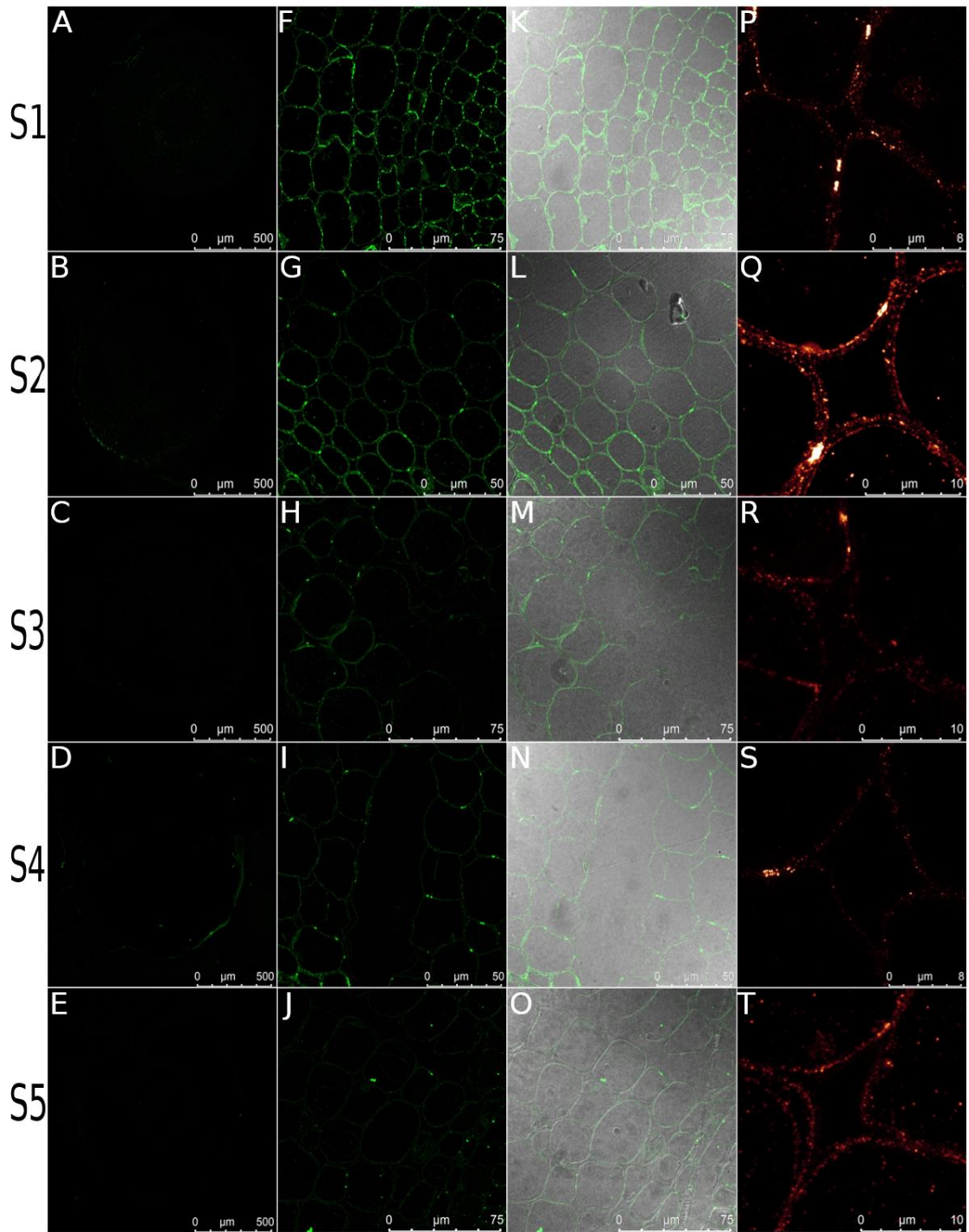


Figura 8: Imunolocalização de raízes de cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima utilizando o anticorpo LAMP anti-calose. A-E evidencia o córtex inteiro da raiz de cana-de-açúcar por segmentos (S1 a S5) com escala de 500 μm . F-J mostra células do córtex aumentadas 100x com escala 75 μm em F, H e J e escala de 50 μm em G, I; assim como K-O, mostrando a sobreposição do anticorpo e células do córtex com escala 75 μm em K, M e O e escala de 50 μm em L e N. P-T apresentam imagem de super-resolução com escala 8 μm (P e S) e 10 μm (Q, R e T). P, Q e R evidenciam a deposição de calose possivelmente na região do plasmodesmo.

4.2.3. Proteína de β -1,3 glucanase apresenta padrão inverso a deposição de calose

A escolha da proteína alvo de β -1,3 glucanase de cana-de-açúcar (ScPDBG1) culminou na realização da sua localização *in situ*. A proteína apresentou um padrão oposto ao dos polissacarídeos (β -glucano e calose), ou seja, quantidade de sinal de fluorescência reduzido no início do segmento (S1) de formação do aerênquima (Figura 9).

A partir do segmento 2 observou-se uma ligação pontual em algumas células menores do córtex (Figura 9G, L e Q). A partir do segmento 3 este sinal se amplificou e coincide com as regiões de presença do sinal do anticorpo anti-calose (Figura 9H, M e R), ou seja, um sinal pontual em torno de toda a parede celular. Já no segmento 4, observou-se esse mesmo tipo de padrão pontual do anticorpo, mas em sua maioria em células em expansão (Figura 9I, N e S). Porém, no segmento 5 houve uma redução da ligação do anticorpo na região do córtex (Figura 9J, O e T). Neste último caso (segmento 5), a ScPDBG1 apresentou um padrão inverso ao da calose, o que pode sugerir uma possível ação dessa proteína sobre este polissacarídeo.

De forma geral, foi possível observar um pico de calose no segmento 2, que coincidiu com a faixa de mais alta detecção do antígeno ScPDBG1 (Comparar figuras 8 e 9). A presença da enzima (com pico no S2) parece ter levado a degradação da calose que, no segmento 5 volta a aparecer (Figura 8T), possivelmente devido a à síntese do polissacarídeo na ausência da hidrolase (ScPDBG1).

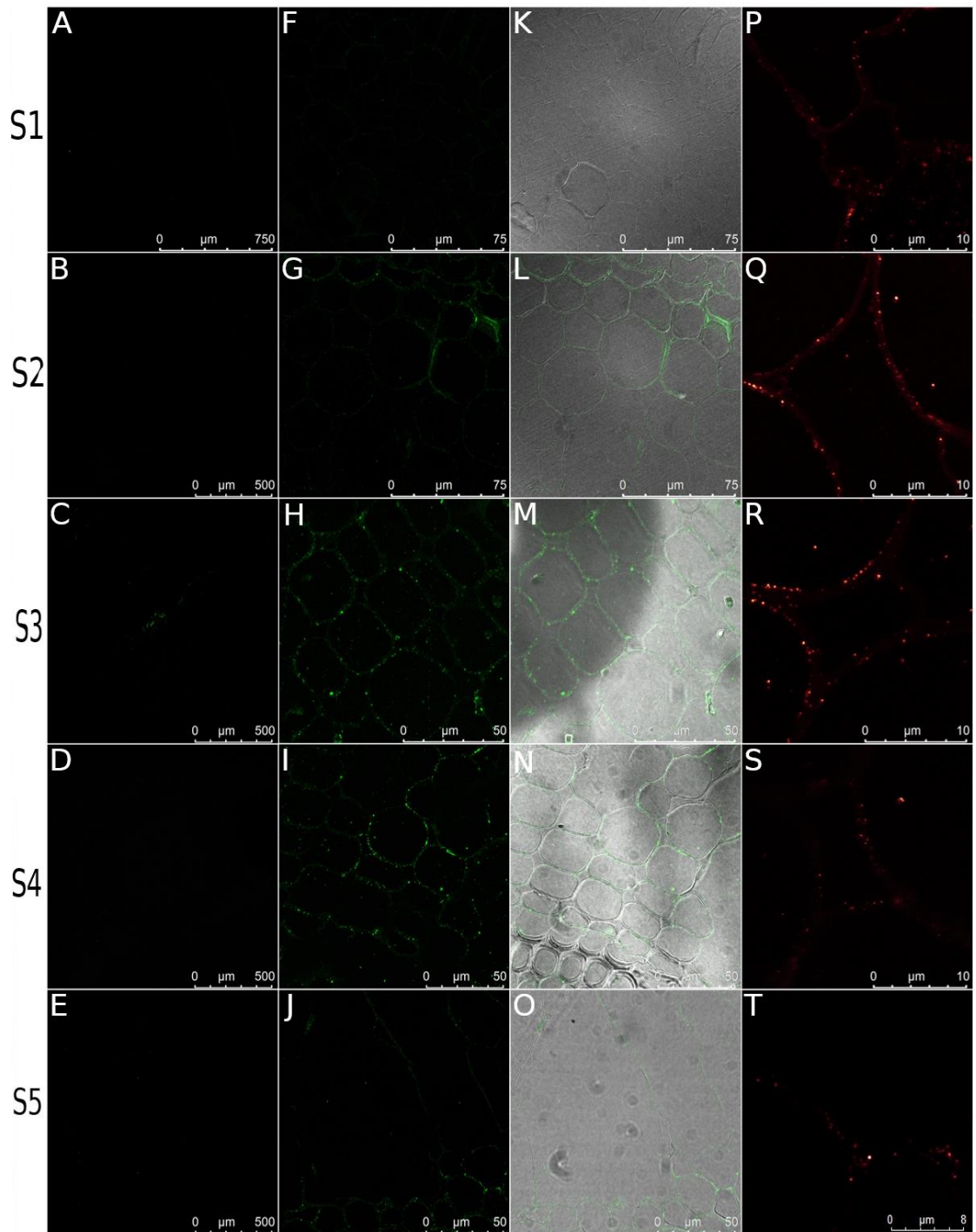


Figura 9: Imunolocalização de raízes de cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima utilizando o anticorpo PDSbG1 contra a proteína escolhida (3-SCEQRT1025C10.g), A-E evidencia o córtex inteiro da raiz de cana-de-açúcar por segmentos (S1 a S5) com escala de 500 µm. F-J mostra células do córtex aumentadas 100x mostra células do córtex aumentadas 100x com escala de 75 µm em F e G e escala de 50 µm em H-J; assim como K-O, mostrando a sobreposição do anticorpo e células do córtex com escala de 75 µm em K-L e escala de 50 µm de M-O. P-T apresentam imagem de super-resolução evidenciando um padrão pontilhado. Com escala de 10 µm (P-S) e 8 µm em T.

5. DISCUSSÃO

No contexto atual, entender mecanismos de degradação e modificação da parede celular tem importância para questões biotecnológicas. O estudo dessa estrutura se apresenta promissor para que seja possível acessar de maneira mais eficiente os açúcares fermentescíveis, e desta forma, utilizá-los no incremento da produção de bioetanol. Mediante a isso, a formação do aerênquima tem se mostrado um modelo biológico propício para investigar essas modificações que naturalmente ocorrem na parede celular, como pode ser observados em raízes, caule, bainha foliar, nós, entrenós e também em nervuras das plantas (Matsukura *et al.*, 2000; Colmer & Pedersen, 2008; Parlanti *et al.*, 2011; Steffens *et al.*, 2011).

Já é sabido que em cana-de-açúcar esse processo é constitutivo e lisígeno e suas modificações ocorrem por módulos, ou seja, primeiro há uma percepção do sinal para o início do processo, seguido da separação celular, expansão celular e morte celular programada, o que culmina na ação de hidrólise ou afrouxamento da matriz hemiceluloses-celulose e por fim, alguma hidrólise de celulose (Grandis *et al.*, 2014; Tavares, 2015; Leite *et al.*, 2017; Grandis *et al.*, 2019). No entanto, o mecanismo que controla a morte celular programada de um grupo de células específicas do córtex, permanece como um questionamento a ser respondido.

Estudos sobre o transcriptoma da formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar mostraram que 102 genes de β -1,3 glucano sintase foram identificados (Rusiska, 2019). Contudo, a maior modificação que ocorre nesse processo é a degradação de β -glucano de ligação mista (Leite *et al.*, 2017). Por outro lado, há também β -1,3 glucano (calose) nas raízes de cana-de-açúcar e os genes encontrados poderiam atacar este polissacarídeo, já que não são capazes de hidrolisar o β -glucano de ligação mista.

Desta forma, o presente trabalho contribuiu para a elucidação da relação das β -1,3 glucanase, enzimas da classe glicosil hidrolase, e a degradação da calose durante a formação do aerênquima. As glicosil hidrolases estão divididas em famílias e têm seu mecanismo catalítico conservado (Davies & Henrissat 1995). Piovezani (2017) e Grandis (2019) identificaram a expressão de 10 genes alvo de glicosil hidrolases da família 17, sendo seis delas presentes no proteoma da raiz de cana-de-açúcar. Estas sequências alvo foram anotadas como possíveis β -1,3 glucanases que possuem ação no tráfego intercelular. Diante disto, a primeira etapa

deste trabalho foi avaliar o envolvimento dessas sequências alvo de β -1,3 glucanases, contextualizando o seu papel de atuação.

Nossos resultados mostraram alta similaridade dessas sequências com as β -1,3 glucanases de outras espécies de plantas e que poderiam atuar na região da parede celular (Tabela 1). Dessas 10 sequências alvo, oito apresentavam o domínio catalítico atribuído à família 17 das glicosil hidrolases (GH17) (Tabela 3). As glicosil hidrolases possuem uma estrutura plurimodular ativa sobre carboidratos. Porém, devido a essa pluralidade modular, muitas enzimas são anotadas erroneamente (Henrissat & Davies, 2010). Um exemplo são proteínas com apenas um domínio X8 (aproximadamente 100 aminoácidos), que está diretamente associado com função de ligação da enzima a calose. No entanto, o domínio X8 deve estar fusionado ao domínio catalítico GH17 para que haja a função (Henrissat & Davies, 2010). Desta forma, sugere-se que das 10 sequências identificadas em raiz de cana-de-açúcar, possivelmente 8 delas realmente teriam a sua função de β -1,3 glucanases.

A presença do domínio X8 fusionado ao domínio catalítico poderia indicar uma regulação rápida, direcionada e precisa para a região do plasmodesmo, sugerindo assim que esta interação pudesse ajudar a estabilizar a hidrolase no substrato e regular o tráfego de moléculas (Barra *et al.*, 2005; Forslund *et al.*, 2008; Simpson *et al.*, 2009). No presente trabalho, as sequências de cana-de-açúcar preditas com os dois domínios foram 1-SCVPAM1059E12.g, 3-SCEQRT1025C10.g, 5-SCEZLB1013D07.g (Tabela 3), mas apenas a sequência 3-SCEQRT1025C10.g apresentava 3 domínios X8 completamente estruturados. Para Forslund e colaboradores (2008) a necessidade de uma especificidade de substrato levou a uma duplicação independente do domínio X8 em algumas proteínas. Desta forma, possivelmente a sequência com mais domínios X8 encontrada em cana-de-açúcar, poderia ser uma proteína de regulação do controle do tráfego celular com maior estabilização junto ao substrato.

Neste sentido, as β -1,3 glucanases poderiam ter um papel relevante na comunicação celular durante a formação do aerênquima, degradando a calose depositada no plasmodesmo. Desta forma, para entender melhor essa relação, uma árvore fenética foi gerada (Figura 4) utilizando 25 sequências de *A. thaliana* relacionadas com papel na regulação do plasmodesmo (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso 2014). Em *A. thaliana*, já são conhecidos alguns genes relacionados a este processo, tais como PdBG1 (*plasmodesmal-localized β -1,3*

glucanase 1 – AT3G13560), PdBG2 (AT2G01630), PdBG3 (AT1G66250), e *AtBG_ppap* (*A.thaliana* β -1,3 *glucanase putative plasmodesmal associated protein* – AT5G42100) (Levy *et al.*, 2007; Benitez-Alfonso *et al.*, 2013; Zavaliev *et al.*, 2013, Uniprot - <https://www.uniprot.org/uniprot>).

As proteínas PdBG1 (AT3G13560) e PdBG2 (AT2G01630), são conhecidas por sua suposta relação com a calose na organogênese de folhas e raízes laterais através da regulação do transporte simplástico. Elas são expressas preferencialmente na iniciação da raiz lateral, sugerindo que ambas as proteínas tenham genes funcionalmente redundante (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013). A *AtBG_ppap* é citada como responsável pela degradação de calose ao redor do plasmodesmo e também como um fator de infecção do genoma viral (Mps) que melhora a dispersão do vírus pela remoção da calose (Zavaliev *et al.*, 2013). Já a PdBG3 (AT1G66250) é sugerida também no controle da deposição de calose no plasmodesmo (Benitez-Alfonso *et al.*, 2013). Estes genes podem ser usados como alvos para a localização da proteína junto ao plasmodesmo e sua ação na degradação da calose na fase de organogênese da raiz lateral e em folhas. Podem ainda ser usados em análises da dispersão de genoma viral, utilizando mutantes superexpressos. De modo geral, estas proteínas são conhecidas por sua resposta contra patógenos, além de processos de desenvolvimento floral, incluindo anteras, estigma, ovário, estame e grão de pólen (Oriet *et al.*, 1990; Hird *et al.*, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1995; Kauss, 1996; Delp & Palva, 1999; Morohashi & Matsushima, 2000; Buchener *et al.*, 2002; Akiyama *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2007; Xing *et al.*, 2017).

No presente trabalho, as sequências de β -1,3 glucanases de *A. thaliana* relacionados ao plasmodesmo foram utilizadas como iscas em busca de sequências homólogas em Poaceae e também em *A. thaliana* para gerar uma árvore mais robusta. Nossos resultados mostraram quatro grandes clados (Figura 4). Todas as 10 sequências de cana-de-açúcar identificadas bem como, as sequências de *A. thaliana* estavam dispersas ao longo desta árvore, indicando similaridades entre elas. Além disso, as sequências em cana-de-açúcar possuem indicação de relação com a regulação do plasmodesmo. Também foi evidenciado que algumas sequências de cana-de-açúcar estavam agrupadas no mesmo ramo, podendo indicar variação de *splicing* ou duplicação gênica. No entanto, através do alinhamento dessas sequências, foram identificadas duas sequências em cana-de-açúcar, que constituíam o mesmo gene (4-SCCCRT2004C04.g e 6-

SCJLRT1023E06.g) (Figura 5). No alinhamento, também foi possível verificar que algumas sequências não estavam completas, restringindo a um menor número de β -1,3 glucanases que poderiam ser utilizadas nesse trabalho.

Grandis (2019) ao realizar a RT-qPCR de duas β -1,3 glucanases (4-SCCCRT2004C04.g e 6-SCJLRT1023E06.g), também notou que estas poderiam fazer parte da mesma proteína, pois não havia diferença entre elas. Ambas apresentaram um aumento de transcritos nos primeiros segmentos, especificamente nos segmentos 2 e 3, mas seu padrão de expressão era idêntico. As demais sequências encontradas também apresentaram acúmulo de mRNA nos segmentos iniciais (S2 e S3), contudo com um padrão de expressão diferente entre as sequências. Em relação ao padrão de transcrição, os dados apresentados no presente trabalho não evidenciaram diferença significativa na maioria das β -1,3 glucanases, exceto pela sequência 9-SCRFLR1055B07.g, que apresentou um aumento de expressão no segmento 5 (Figura 6).

De acordo com Leite e colaboradores (2017), nos primeiros segmentos ocorrem as primeiras modificações para a formação do aerênquima o que poderia indicar que a partir do segmento 2 já seria possível a ação de certas enzimas atuando para as modificações na parede celular na formação do aerênquima, o que levaria a um aumento de transcritos nos primeiros segmentos e não no segmento final. Correlacionando às proteínas, Grandis (2019) identificou uma diferença significativa no acúmulo de proteínas sendo crescente ao longo dos segmentos da raiz de cana-de-açúcar durante a formação do aerênquima. Acredita-se que os polissacarídeos seriam degradados nos estágios iniciais, assim a presença das β -1,3 glucanases poderia sugerir ataque à calose, além disso, ser um indício de que a comunicação entre as células formadoras do aerênquima pudesse aumentar (Grandis, 2019).

Com base nestes dados prévios, um dos objetivos do presente trabalho foi realizar imunolocalização *in situ* em raízes de cana-de-açúcar de uma β -1,3 glucanase escolhida com base nas características estruturais mais próximas de uma enzima relacionada ao plasmodesmo. A hipótese inicial era que durante a formação do aerênquima, a calose pudesse ser depositada em algumas células do córtex mais periféricas, que não entrariam em processo de morte celular programada, enquanto que nas células onde ocorre a ação da β -1,3 glucanase, o sinal relacionada à morte celular programada teria sido difundido célula a célula

via plasmodesmos, uma vez que estes estariam menos propícios à seletividade da comunicação celular, iniciando o processo de formação do aerênquima (Figura 10). Esta figura apresenta um modelo hipotético de como o sistema poderia funcionar. Um certo grupo de células (com suas paredes celulares em verde, no centro da figura) apresentaria plasmodesmo abertos devido à degradação prévia da calose a eles associada. Este grupo ficaria "circunscrito" por células que ainda teriam plasmodesmos, mas que estão sob ação da β -1,3 glucanase e irão oportunamente perder a calose e, portanto, abrir seus sistemas de comunicação célula a célula. No centro, as enzimas e sinais (hormônios, metabólitos) teriam livre circulação, fazendo com que este grupo de células entrasse em morte celular programada e tivesse suas paredes celulares modificadas segundo o padrão definido por Leite e colaboradores (2017).

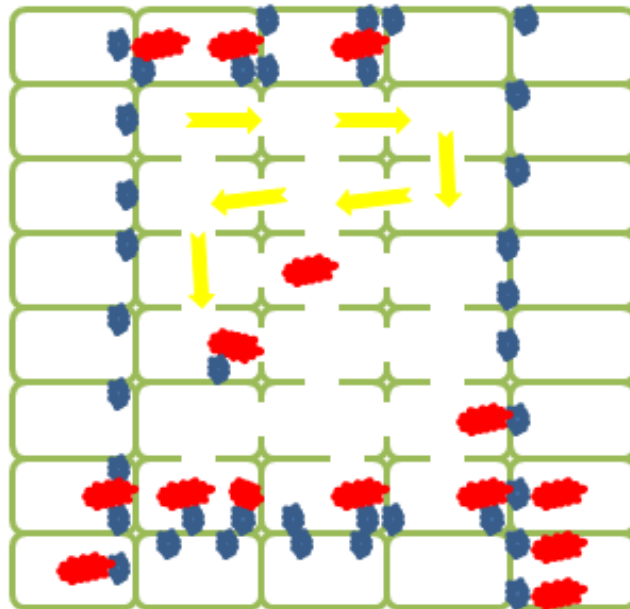


Figura 10: Imagem representando pontos de deposição de calose (azul). Em algumas posições estão ocorrendo ataques à calose por uma β -1,3 glucanase (vermelho). Na medida em que a enzima degrada a calose, os poros dos plasmodesmos se abrem e possibilitam o fluxo de informação intercelular (setas amarelas) com livre trânsito entre as células com o plasmodesmo aberto devido a degradação da calose.

Durante a formação do aerênquima, Leite e colaboradores (2017), marcaram o núcleo de células que entraram em morte celular programada e evidenciaram que o processo se iniciava no segmento 2, tinha um pico em S3 e diminuía no S4 e S5. Também foi relatado que a marcação do núcleo era mais evidente em células onde o aerênquima estava menos desenvolvido. Como a formação do aerênquima ocorre radial e centripetamente, foi sugerido que possa ocorrer alguma ação intensa e rápida das enzimas nas paredes de células periféricas e ter sua atividade

gradativamente reduzida no centro da raiz. Além disso, houve degradação principalmente de β -glucano e pectinas alterando assim as características físicas da parede tornando-a suscetível a dobras e colapsos, o que facilitaria a formação de compósitos que geram os espaços do aerênquima (Leite *et al.* 2017).

Através da imunolocalização, foi verificada a presença do β -glucano nos primeiros segmentos, corroborando os dados previamente obtidos para este polissacarídeo (Leite *et al.*, 2017). O β -glucano é constante nas paredes celulares do córtex e a sua remoção das paredes das células corticais foi gradual, espalhando-se no tecido de forma centrípeta (da epiderme em direção ao cilindro vascular) (Figura 7), seguindo o mesmo padrão de abertura dos espaços da formação do aerênquima (Leite *et al.*, 2017). Curiosamente, foi observado na interconexão longitudinal entre os espaços celulares o aparecimento de alguns compósitos de paredes colapsadas, com sinal bem enfraquecido e pontual de restos de β -glucano. Possivelmente devido ao colapso das paredes celulares durante o processo de desenvolvimento da raiz, esse β -glucano tornou-se inacessível à ação das enzimas. Verificou-se também que sua remoção não é total, e possivelmente houve ação das hidrolases em partes pontuais do polissacarídeo.

Em relação ao polissacarídeo de calose, Leite e colaboradores (2017), não identificaram diferenças relevantes na análise glicômica da parede. No entanto, vale ressaltar que a calose não é um polissacarídeo estrutural constitutivo da parede celular. Por isto, espera-se que a sua quantidade seja menor quando comparada a um polissacarídeo abundante na parede. Porém, isso não significa que a calose não possa ter um papel relevante durante a formação do aerênquima.

Em relação ao anticorpo anti-calose, já se sabe que sua ligação ao alvo é bem específica (Meikle *et al.*, 1991; 1994). Além disso, a calose é mencionada como um regulador do tráfego celular, sendo depositada na região do plasmodesmo, podendo bloquear parcial ou completamente o fluxo celular (Bucher *et al.*, 2001; Rinne *et al.*, 2005; Simpson *et al.*, 2009). Alguns estudos sobre a calose mencionam-na como importante para o desenvolvimento em determinada fase de desenvolvimento da planta. Segundo Benitez-Alfonso e colaboradores (2013), a regulação da comunicação célula a célula pela calose é fundamental para determinar o padrão de formação radicular lateral, além de influenciar na arquitetura radicular e no desempenho ideal da planta. Já Navarro (2018), evidenciou que o isolamento de determinadas células embriogênicas de *Araucaria angustifolia*

mantinham a seletividade da informação célula a célula por meio da deposição de calose, permitindo um controle importante para o desenvolvimento e diferenciação de outros tipos de célula.

No presente trabalho, verificou-se a presença da calose em células corticais da raiz durante a formação do aerênquima (Figura 8) nos primeiros segmentos (S1-S2), sendo esse sinal enfraquecido a partir do S3. Com a imunolocalização notou-se uma deposição pontual na parede celular de algumas células corticais, possivelmente demarcando a região do plasmodesmo. Mais ao interior desse grupo “selado” há células em expansão com o sinal enfraquecido de calose, possivelmente estas células já apresentam recepção da sinalização para a morte celular programada e iniciaram o processo de formação do aerênquima. Essas células em expansão que apresentam a sinalização enfraquecida, podem ter sido alvo da ação das β -1,3 glucanases, pois é sabido que a calose é degradada por estas. A sua remoção poderia permitir a propagação da informação entre aquelas células que estavam em expansão, iniciando a formação do aerênquima, mostrando assim que a hidrolase poderia ter um papel importante dentro desse processo do desenvolvimento.

Alguns trabalhos sobre a β -1,3 glucanase, mencionam a importância desta enzima na fase reprodutiva das plantas. Em anteras, as β -1,3 glucanases são expressas no momento de liberação do micrósporo. A β -1,3 glucanase é responsável por degradar a calose em torno da tétrade dos micrósporos, o que auxilia na liberação dos grãos de pólen (Hird *et al.*, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1995). Em *Rosa rugosa* o excesso de calose impede o crescimento do tubo polínico, sendo necessária a ação das β -1,3 glucanases para que ocorra esse crescimento (Xing *et al.*, 2017). Nossos resultados evidenciaram que a β -1,3 glucanase de cana-de-açúcar apresenta um padrão compatível com ação sobre a calose. Esta última é mais evidente no segmento 2 (Figura 9). O anticorpo contra a β -1,3 glucanase também tem maior intensidade nos segmentos 2 e 3, compatível com a ação da enzima sobre a calose na parede celular. Infelizmente, apesar de termos usado a microscopia de super-resolução, não foi possível visualizar claramente os plasmodesmos, de forma que assume-se aqui que estes estejam sendo marcados tanto pelo anticorpo anti-calose como pelo anti- β -1,3 glucanase (ScPDBG1).

Desta forma, os resultados apresentados neste trabalho contribuem para o entendimento dos mecanismos de regulação durante a formação do aerênquima,

sobretudo aqueles relacionados à comunicação celular e permeabilidade da sinalização de morte celular programada. Pode-se propor que os módulos de degradação da parede celular incluiriam a sinalização por meio da abertura dos plasmodesmos, possivelmente entre o módulo de sinalização e expansão celular, ou mesmo antes do módulo de sinalização, sendo o plasmodesmo um ponto de regulação importante a comunicação intercelular durante a formação do aerênquima.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho verificou-se que a β -1,3 glucanase pode ter um papel importante durante a formação do aerênquima. A degradação da calose e a abertura do plasmodesmo pode ser um fator chave para compreender o porquê certas células entram em morte celular programada e outras não, e porque inicialmente há um padrão centrípeto na iniciação do processo. Provavelmente a calose é fundamental para definir os grupos de células que ainda não serão sinalizadas para o início do desenvolvimento do aerênquima. A β -1,3 glucanase possivelmente abre os poros dos plasmodesmos de certos grupos de células que estão programadas para desencadear uma cascata de processos até chegar à completa formação do aerênquima.

Dados relacionados à comunicação celular podem ser importantes no quesito de bioenergia, pois a partir do momento que entende-se o mecanismo de abertura, é possível facilitar o acesso de enzimas a parede celular na planta inteira. Isto pode ajudar a melhorar as condições da biomassa de cana-de-açúcar para um pré-tratamento difundido as enzimas e aumentando a eficiência de hidrólise. Compreender o processo de desenvolvimento e formação do aerênquima em cana-de-açúcar, tem se apresentado de forma cada vez mais apropriado para identificar formas de degradação da parede celular usando sistemas endógenos.

Uma próxima etapa poderia ser entender como a formação do aerênquima se daria se houvesse uma superexpressão da β -1,3 glucanase, e como isso afetaria a ação das enzimas relacionadas a parede celular e a sacarificação da biomassa da cana-de-açúcar.

7. REFERÊNCIAS

- Aguilar EA, Turner DW, Gibbs DJ, Sivasithamparam K, Armstrong W (1998). **Response of banana (*Musa sp.*) roots to oxygen deficiency and its implication for Fusarium wilt.** Acta Hort 490:223-228.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). **Basic local alignment search tool.** J. Mol. Biol. 215: 403-410.
- Bacic A, Harris PJ, Stone BA (1988): **Structure and function of plant cell walls.** Pp. 297–371 in Preiss, J. (Ed.) “The Biochemistry of Plants”, Academic Press, San Diego.
- Bailey-Serres J, Voeselek LACJ (2008) **Flooding stress: acclimations and genetic diversity.** Annu Rev Plant Biol 59:313–339.
- Barral P, Suarez C, Batanero E, Alfonso C, Alche JD, Rodriguez-Garcia MI, Villalba M, Rivas G, Rodriguez R, (2005). **An olive pollen protein with allergenic activity, Ole-e10, defines a novel family of carbohydrate-binding modules and is potentially implicated in pollen germination.** Biochem. J. 390: 77–84.
- Begum MK, Alam MR, Islam MS (2013). **Adaptive mechanisms of sugarcane genotypes under flood stress condition.** World Journal of Agricultural Sciences, vol. 1(2), pp.056-064.
- Beffa RS, Hofer RM, Thomas M, Jr MF (1996). **Decreased susceptibility to viral disease of β -1,3-glucanase deficient plants generated by antisense transformation.** The Plant Cell, Vol. 8, 1001-1011, Jun. 1996. Journal of Agricultural Sciences, vol. 1(2), pp. 056-064.
- Bouranis DL, Chorianopoulou SN, Siyiannis VF, Protonotarios VE, Hawkesford MJ (2007). **Lysigenous Aerenchyma Development in Roots – Triggers and Cross-talks for a Cell Elimination Program.** International Journal of Plant Developmental Biology 1(1), 127-140.
- Bucher GL, Tarina C, Heinlein M, Di Serio F, Jr FM, Iglesias VA (2001). **Local expression of enzymatically active class I β -1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco.** The Plant Journal (2001) 28(3), 361-369.
- Buckeridge MS (2010). **Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: Models to Understand Cell Wall Biosynthesis and Degradation.** Plant Physiology, nov. 2010, Vol. 154, pp. 1017–1023.
- Buckeridge MS, Cavalari AA, Silva GB (2008). Parede celular. In: **Kerbaui GB, Fisiologia Vegetal**, 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Buckeridge MS & De Souza AP (2014). **Breaking the “glycomic code” of cell wall polysaccharides may improve second-generation bioenergy production from biomass.** Bioenergy Research On-line published DOI 101007/s12155-014-9460-6.
- Buckeridge MS, De Souza AP, Tavares EQP, Cambler, AB (2017). Sugarcane cell wall structure and degradation: from monosaccharide analyses to the Glycomic Code. In **Advances of Basic Science for Second Generation Bioethanol from Sugarcane** (M.S. Buckeridge & Amanda P. De Souza Eds.) Springer, New York, 7-19.

- Buckeridge, MS, Rayon C, Urbanowicz B, Tiné MAS, Carpita NC (2004) **Mixed-linkage (1-3),(1-4)-b-D-glucans of grasses**. *Cereal Chem.* 81, 115–127.
- Buckeridge MS, Santos WD; Souza AP (2010) As rotas para o etanol celulósico no Brasil. In: **Luís Augusto Barbosa Cortez. (Org.). Bioetanol da cana-de-açúcar: P&D para produtividade e sustentabilidade**. São Paulo: Editora Edgard Blucher, v., p. 365-380.
- Buckeridge MS, Santos WD, Tiné MS, De Souza AP (2015) The cell wall architecture of sugarcane and its implications to cell wall recalcitrance. In **Compendium of Bioenergy Plants: Sugarcane** (E.Lam, H.Carrer, J.A. Silva Eds). CRC Press 125p.
- Caffall KH, Mohnen D (2009) **The structure, function, and biosynthesis of plant cell wall pectic polysaccharides**. *Carbohydrate Research* 344 (14), 1879–1900.
- Camacho, C, Coulouris G, Avagyan V, Ma N, Papadopoulos J, Bealer K, Madden, TL (2009) **BLAST+: architecture and applications**. *BMC Bioinformatics* 10, 421-430.
- Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B (2009) **The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics**. *Nucleic Acids Res.* 37, D233–D238. doi:10.1093/nar/gkn663
- Carpita NC (1996) **Structure and biogenesis of the cell walls of grasses**. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1996.47:445-476. Downloaded from www.annualreviews.org Access provided by CAPES on 03/08/18. For personal use only
- Carpita NC, Gibeaut DM (1993) **Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth**. *Plant J* 3:1–30.
- Colmer TD, Pedersen O (2008) **Oxygen dynamics in submerged rice (*Oryza sativa*)**. *The New Phytologist* 178 (2), 326–334.
- Drew MC, He CJ, Morgan PW (2000) **Programmed Cell death and aerenchyma formation in roots**. *Trends in Plant Science* 5:123-7.
- De Souza AP (2007) **A cana-de-açúcar e as mudanças climáticas: efeitos de uma atmosfera enriquecida em CO₂ sobre o crescimento, desenvolvimento e metabolismo de carboidratos de *Saccharum Ssp.*** Tese Mestrado, Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.
- De Souza AP, Grandis A, Leite DCC, Buckeridge MS (2014) **Sugarcane as a Bioenergy Source: History, Performance, and Perspectives for Second-Generation Bioethanol**. *Bioenergy Research*, 7:24-35.
- Ehlers K, Kollmann R (2001) **Primary and secondary plasmodesmata: Structure, origin, and functioning**. *Protoplasma*, 216, 1–30.
- EISA - Energy Independence and Security Act. (2007). Disponível em: <http://www.epa.gov/oms/fuels/renewablefuels/> acessado em 21 de jan, de 2015.
- Epel BL (1994) **Plasmodesmata: Composition, structure and tracking**. *Plant Mol. Biol*, 26, 1343–1356.
- Evans DE (2003). **Aerenchymaformation**. *New Phytologist*, 161: 35-49.

- Fan M, Zhi J, Richards C, Brown K & Lynch JP (2003) **Physiological roles for aerenchyma in phosphorus-stressed roots.** *Functional Plant Biology* 30 (5), 493-506.
- Forslund K, Henricson A, Hollich V, Sonnhammer ELL (2008) Domain tree-based analysis of protein architecture evolution. *Mol.Biol.Evol.* 25(2):254-264. doi:10.1093/molbev/msm254
- Garthwaite AJ, von Bothmer R, Colmer TD. (2003). **Diversity in root aeration traits associated with waterlogging tolerance in the genus *Hordeum*.** *Functional Plant Biology* 30, 875–889.
- Gaudioso-Pedraza R, Benitez-Affonso Y (2014). **A phylogenetic approach to study the origin and evolution of plasmodesmata-localized glycosyl hydrolases family 17.** *Front Plant Science* 2014; 5:212.
- Goldemberg J, Suani T, Coelho PG (2008). **The sustainability of ethanol production from sugarcane.** *Energy Policy* 36 2086–2097.
- Guerretta JY (2011). **Etanol de segunda geração: cenários de inserção e análise de processos.** XVIII simpósio de engenharia de produção. Sustentabilidade na cadeia de Suprimentos. Bauru, SP, Brasil, Universidade Estadual de Campinas, 7 a 9 nov 2011.
- Gunawardena AHLAN, Pearce DM, Jackson MB, Hawes CR, Evans DE (2001). **Characterisation of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.)** *Planta*, 212:205-214.
- Grandis A, De Souza AP, Tavares EQP and Buckeridge MS (2014). Chapter 13: Using natural plant cell wall degradation mechanisms to improve second generation bioethanol **In: Plants and Bioenergy, McCann et al., pp. 211-230.**
- Grandis A (2015). **Papel das enzimas de degradação da parede celular na formação do aerenquima em raízes de cana-de-açúcar.** Tese (Doutorado) Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica. 122p.
- Grandis A, Leite DCC, Tavares EQP, Aerenque-Musa BC, Gaiarsa JW, Martins MCM, De Souza AP, Gomez LD, Fabbri C, Mattei B, Buckeridge MS (2019) **Cell wall hydrolases act in concert during aerenchyma formation development in sugarcane roots.** *Annals of botany* XX 1-23.
- Han, X.; Kumar, D.; Chen, H.; Wu, S.; Kim, J.-Y. **Transcription factor-mediated cell-to-cell signalling in plants.** *J. Exp. Bot.* 2014, 65, 1737–1749.
- Hayashi T (1989). **Xyloglucans in the primary cell wall.** *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:139-168.
- He CJ, Morgan P, Drew MC (1992) **Enhanced sensitivity to ethylene in nitrogen of phosphate starved roots of *Zea mays* L. during aerenchyma formation.** *Journal of Plant Physiology.* 98:137-142.
- Heinlein M (2000). **Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling.** *Current Opinion in Plant Biology.*
- Henrissat BA (1991). **Classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities.** *Biochem. J.* 280, 309-316.

- Huang HJ, Ramaswamy S, Al-Dajani W, Tschirner U, Cairncross RA (2009) **Effect of biomass species and plant size on cellulosic ethanol: a comparative process and economic analysis.** *Biomass Bioenergy* 33:234–46. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2008.05.007>.
- Iglesias VA, Meins F (2000). **Movement of plant viruses is delayed in a β -1,3-glucanase deficient mutant showing a reduced plasmodesmal size exclusion limit and enhanced callose deposition.** *The Plant Journal*, 21(2), 157-166.
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ, Manners JM (2004). **Comparison of reference genes for qualitative Real-Time polymerase chain reactions analysis of gene expression in sugarcane.** *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 325-337.
- Ithal N, Recknor J, Nettleton D, Maier T, Baum TJ, Mitchum MG (2007) **Developmental transcript profiling of cyst nematode feeding cells in soybean roots.** *Mol. Plant Microbe Interact.* 2007, 20, 510–525.
- Jackson D (2000). **Opening up the communication channels: recent insight into plasmodesmal function.** *Current opinion in Plant Biology*, 3:394-399.
- Jackson MB & Armstrong W (1999) **Formation of aerenchyma and the processes of plant ventilation in relation to soil flooding and submergence.** *Plant Biol* 1:274–287.
- Jaiswal D, De Souza AP, Larsen S, LeBauer D, Miguez FE, Sparovek G, Bollero G, Buckeridge MS, Long SP (2017) **Brazilian sugarcane ethanol as an expandable green alternative to crude oil use.** *Nature Climate Change* 7, 788–792.
- Jarvis MC, Briggs SP, Knox JP (2003) **Intercellular adhesion and cell separation in plants.** *Plant, Cell & Environment* 26 (7), 977–989.
- Joshi R & Kumar P (2012). **Lysigenous aerenchyma formation involves non-apoptotic programmed cell death in rice (*Oryza sativa* L.) roots.** *Physiol. Mol. Biol. Plants* (Jan-Mar. 2012) 18(1):1–9.
- Jung J, Lee SC, Choi HK (2008) **Anatomical patterns of aerenchyma in aquatic and wetland plants.** *J Plant Biol* 51:428–439.
- Jung KH, Cao P, Seo YS, Dardick C, Ronald PC (2010) **The Rice kinase phylogenomics database: a guide for systematic analysis of the Rice kinase superfamily.** *Trends Plant Sci.* 15, 595–599. doi:10.1016/j.tplants.2010.08.004
- Katoh K, Standley DM (20013). **MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.** *Molecular Biology And Evolution*, vol. 30, N° 4, p. 772–780.
- Kauss H (1996) **Callose synthesis. In Membranes: Specialized Functions in Plants** (Smallwood, M., Knox, J.P. and Bowles, D.J., eds). Oxford: BIOS, pp. 77–92.
- Kawai M, Samarajeewa PK, Barrero RA, Nishiguchi M, Uchimiya H (1998). **Cellular dissection of the degradation pattern of cortical cell death during aerenchyma formation of rice roots.** *Planta*, 204, pp. 277–287.
- Kim JY (2005) **Regulation of short-distance transport of RNA and protein.** *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 45–52.

- Lam E, Carrer H, Silva JA da, Kole C Buckeridge MS, Santos WD dos, Tiné MAS, De Souza AP (2016) **Chapter 3 The Cell Wall Architecture of Sugarcane and its Implications to Cell Wall Recalcitrance**. Subjects Engineering & Technology, Environment & Agriculture /Compendium of Bioenergy Plants Sugarcane 1 29 doi:https://doi.org/10.1201/b19601
- Lee JY & Lu H (2011). **Plasmodesmata: the battleground against intruders**. Trends in Plant Science, april, vol. 16, nº 4.
- Lee, JY (2014) **New and old roles of plasmodesmata in immunity and parallels to tunneling nanotubes**. Plant Sci, 221, 13–20.
- Leite DCC (2017). **Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots**. *Annals of Botany*, Volume 120, Issue 5, 10 November 2017, Pages 693–708.
- Leite DCC, Grandis, Tavares EQP, Piovezani AR, Pattathil S, Avci U, Rossini A, Cambler A, De Souza AP, Hahn MG, Buckeridge MS. (2017)**Cell wall changes during the formation of aerenchyma in sugarcane roots**. *Annals of Botany* 120: 693–708.
- Levy A, Erlanger M, Rosenthal M, Epel BL (2007). **A plasmodesmata-associated b-1,3-glucanase in Arabidopsis**. Plant J. 49: 669–682.
- Lima DU, Chaves RO, Buckeridge MS, (2003) **Seed storage hemicelluloses as wetend additives in papermaking**. Carbohydr. Polym. 52, 367–373.
- Liu F, Zou Z and Dilantha Fernando WG (2018) **Characterization of Callose Deposition and Analysis of the Callose Synthase Gene Family of Brassica napus in Response to Leptosphaeria maculans** Int. J. Mol. Sci. **2018**, 19, 3769; doi:10.3390/ijms19123769
- Lotan T, Ori N, Fluhr R (1989). **Pathogenesis-related proteins are developmentally regulation in tobacco flowers**. The Plant Cell, vol. 1, 881-887, Sept
- Lucas WJ (1995) **Plasmodesmata: Intercellular channels for macromolecular transport in plants**. Curr. Opin. Cell Biol, 7, 673–680.
- Lucas WJ, Gilbertson RL (1994). **Plasmodesmata in relation to viral movement within leaf tissues**.Annu. Rev. Phytopathonol, 34:387-411.
- Lucas WJ, Ham BK, Kim JY (2009) **Plasmodesmata - Bridging the gap between neighboring plant cells**. Trends Cell Biol, 19, 495–503.
- Manochio C, Andrade BR, Rodriguez RP, Moraes BS (2017) **Ethanol from biomass: A comparative overview**– Renewable and sustainable energy reviews 80 (2017) 743-755.
- Matsukura C, Kawai M, Toyofuku K, Barrero RA, Uchimiya H, Yamaguchi J (2000) **Transverseve indifferentiation associated with gas space formation fate of the middle cell layer in leaf sheath development of rice**. *Annals of Botany* 85 (1), 19–27.
- Maule, AJ (2008) Plasmodesmata: Structure, function and biogenesis. Curr. Opin. Plant Biol, 11, 680–686.
- McCann MC, Roberts K (1991) Architecture Of The Primary Cell Wall. In: Lloyd CW (ed) **The cytoskeletal basis of plant growth and form**. Academic Press, London, pp 109–129.
- McCAnn MC, Welles B, ROBERTS K (1990) **Direct visualization of cross-links in the primary cell wall**. Journal of Cell Science 96: 323–334.

- McLean BG, Hempel FD, Zambryski PC (1997) **Plant intercellular communication via plasmodesmata.** *Plant Cell*, 9, 1043–1054.
- Meikle PJ, Bonig I, Hoogenraad NJ, Clarke AE, Stone BA (1991). **The location of (1 → 3)- β -glucans in the walls of pollen tubes of *Nicotiana alata* using a (1 → 3)- β -glucan-specific monoclonal antibody.** *Planta* 185: 1 – 8.
- Meikle PJ, Hoogenraad NJ, Bonig I, Clarke AE, Stone BA (1994). **(1 → 3,1 → 4)- β -glucan-specific monoclonal antibody and its use in the quantification and immunocytochemical location of (1 → 3, 1 → 4)- β -glucans.** *Plant Journal* 5: 1 1-9.
- Memelink J, Linthorst HJM, Schilperoort RA and Hoge JHC (1990). **Tobacco gene encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns.** *Plant Mol. Biol.*, 14, 119-126.
- Meshi T, Watanabe Y, Saito T, Sugimoto A, Maeda T, Okada Y (1987). **Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication.** *The EMBO Journal*, vol. 6. n°9 pp.2557-2563.
- Mitsutani C (2010). **A logística do etanol de cana-de-açúcar no Brasil: condicionantes e perspectivas.** Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Energia) EP/FEA/IEE/ IF da Universidade de São Paulo.
- Morgan PW, Drew MC (2004). Plant Cell death and cell differentiation. **In: Plant Cell death processes**, Elsevier, INC. pp.19-36.
- Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Bonnett HT, Kelly A, Meeks-Wagner DR, Peacock WJ, Dennis ES (1990). **Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation.** *The Plant Cell*, vol. 2, 673-684.
- Nguyen LT, Schmidt HA, Haeseler Av, Minh BQ (2015). **IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies.** *Molecular Biology And Evolution*, vol. 32, N° 1, p. 268–274.
- Northcote D, Davey R, Lay J (1989). **Use of antiserum to localize callose, xylan and arabinogalactan in the cell-plate, primary and secondary walls of plant cells.** *Planta* 178: 353 – 366.
- Parlanti S, Kudahettige NP, Lombardi L, Mensuali-Sodi A, Alpi A, Perata P, Pucciariello C. (2011) **Distinct mechanisms for aerenchyma formation in leaf sheaths of rice genotypes displaying a quiescence or escape strategy for flooding tolerance.** *Annals of Botany* 107 (8), 1335–1343.
- Peaucelle A, Braybrook S, Höfte H (2012) **Cell wall mechanics and growth control in plants: the role of pectins revisited.** *Frontiers in Plant Science* 3, 121.
- Pfaffl MW (2001). **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Research*, vol. 29, N° 900.
- Piovezani AR (2017) **System Integratio Tool: uma ferramenta para integração e visualização de dados em larga escala e sua aplicação em cana-de-açúcar.** Tese de Doutorado – Bioinformática. Universidade de São Paulo, São Paulo 1-164.

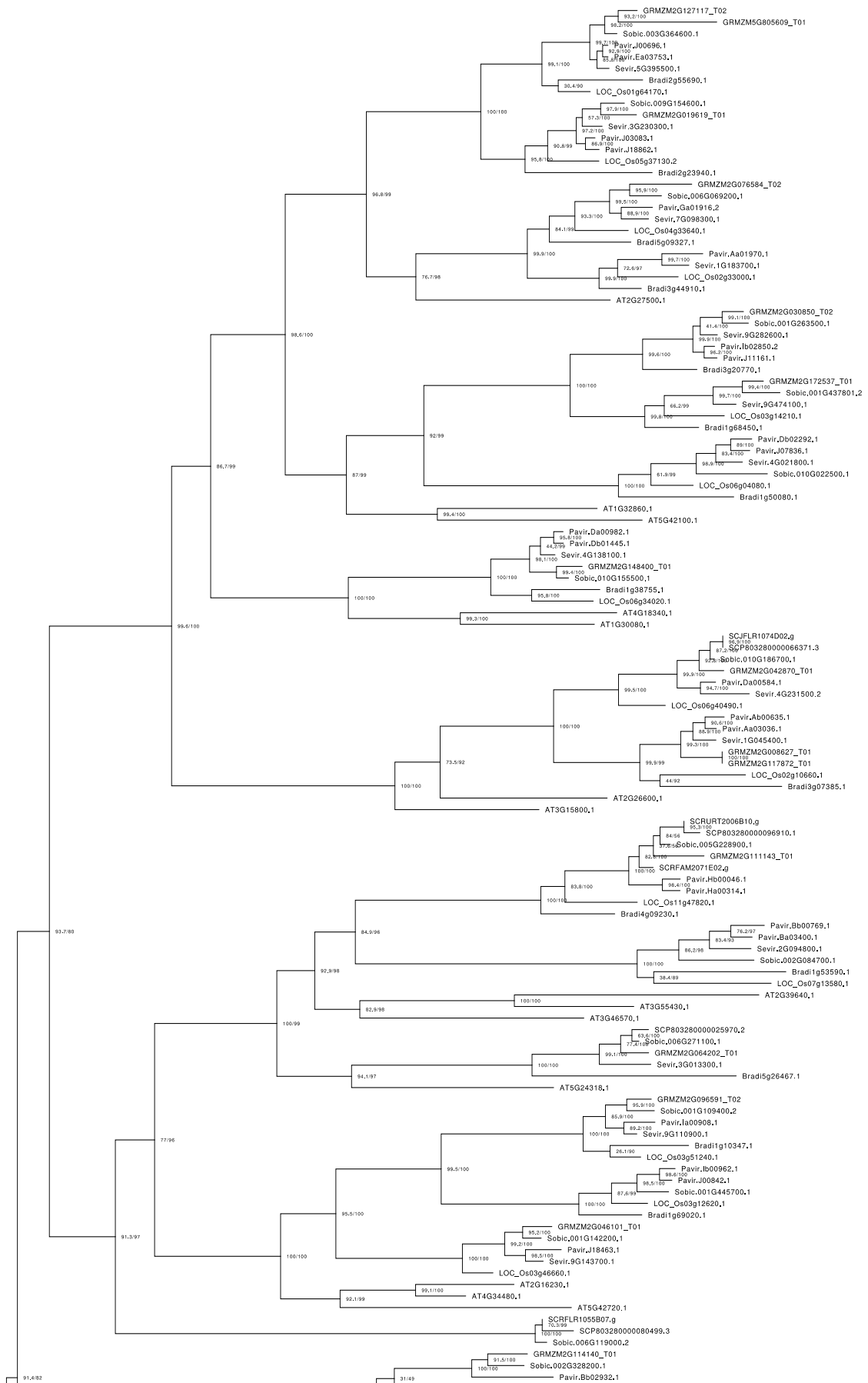
- Promkhambut A, Polthanee A, Akkasaeng C, Younger A (2011). **Growth, yield and aerenchyma formation of sweet and multi purpose sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench) as affected by flooding at different growth stages.** AJCS 5(8):954-965.
- Radford JE, White RG (2001). **Effecting of tissue preparation induced callose synthesis on estimates plasmodesma size limits.** Protoplasma, vol.216, issue 1-2, pp 47-55.
- Reagan BC, Ganusova EE, Fernandez JC, McCray TN, Burch-Smith TM (2018) **RNA on the move: The plasmodesmata perspective.** Plant Sci, 275, 1–10.
- Remmert M, Biegert A, Hauser A, Söding J (2012). **HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment.** Nat Methods 9, 173-175.
- Riaño-Pachón DM and Mattiello L (2017). **Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280** [version 2; referees: 2 approved]. F1000Research 2017, 6:861.
- Ridley BL, O'Neill MA, Monhen D (2001). **Pectins: structure, biosynthesis, and oligogalacturonide-related signaling.** Phytochemistry, 57:929-967.
- Roberts AG & Oparka KJ (2003). **Plasmodesmata and the control of symplastic transport.** Plant, Cell And Environment, 26:103–124.
- Ruan YL, Xu SM, White R and Furbank, RT (2004). **Genotypic and developmental evidence for the role of plasmodesmatal regulation in cotton fiber elongation mediated by callose turnover.** Plant Physiology, vol. 136, pp. 4104-4113.
- Sachs JA (1882). **A textbook of botany: morphological and physiological.** Oxford, UK: Oxford University Press.
- Santos FA, Queiróz JH, Colodette JL, Fernandes AS, Guimarães VM, Sebastião T (2012). **Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol.** Quim. Nova, vol. 35, nº. 5, 1004-1010.
- Schuetz M, Benske A, Smith RA, Watanabe Y, Tobimatsu Y, Ralph J, Demura T, Ellis B, Samuels AL (2014) **Laccases direct lignification in the discrete secondary cell wall domains of protoxylem.** Plant Physiol. 2014, 166, 798–807.
- Seago JL Jr, Marsh LC, Stevens KJ, Soukup A, Votrubova O, Enstone DE (2005). **A reexamination of the root cortex in wetland flowering plants with respect to aerenchyma.** Ann Bot 96:565–579.
- Silva AM (2005). **Caracterização da parede celular de *Saccharum officinarum* L. (cana-de-açúcar) e *Brachiaria decumbens* Stapf (braquiária).** Tese (Biologia Celular e Estrutural) Cidade Universitária Zeferino Vaz, UNICAMP.
- Simpson C, Thomas C, Findlay K, Bayer E, Maule AJ (2009). **Na Arabidopsis GPI-Anchor plasmodesmal neck protein with callose binding activity and potential to regulate cell-to-cell trafficking.** The Plant Cell, Vol. 21: 581-594.
- Smith BG, Harris PJ (1999) **The polysaccharide composition of Poales cell walls: Poaceae cell walls are not unique.** Biochem. Syst. Ecol. 27, 33–53.
- Soccol CR, Vandenberghe LPDS, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, Pitarelo AP, Ferreira-Leitão V, Gottschalk LMF, Ferrara MA, da Silva Bon EP, de Moraes LM, Araújo

- JdeA, and Torres FA. (2010) **Bioethanol from lignocelluloses: Status and perspectives in Brazil**. Bioresource technology 101:4820-5.
- Steffens B, Geske T, Sauter M (2011) **Aerenchyma formation in the Rice stem and its promotion by H₂O₂**. The New Phytologist 190 (2), 369–378.
- Tavares, EQP (2015). **Regulação da degradação da parede celular durante a formação do aerênquima em raízes de cana-de-açúcar**. Tese doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento Botânica.
- Tavares EQP, Grandis A, Lembke CG, Souza GM, Purgatto E, De Souza AP, Buckeridge MS (2018) **Roles of auxin and ethylene in aerenchyma formation in sugarcane roots**. Plant Signaling & Behavior.
- Trethewey JAK, Harris PJ (2002). **Location Of (1 → 3)- and (1 → 3), (1 → 4)-β-D-glucans in vegetative cell walls of barley (Hordeum vulgare) using immunogold labeling**. New Phytologist 154: 347–358.
- Turner A, Wells B, Roberts K (1994). **Plasmodesmata of maize root tips: structure and composition**. Journal of Cell Science 107: 3351 – 3361.
- UNICA - União da Indústria de Cana-de-açúcar. Disponível em <<http://www.unicadata.com.br/>>acessado em 20 de março De 2019.
- Visser EJ & Bögemann GM (2006). **Aerenchyma formation in the wetland plant Juncus effusus is independent of ethylene**. New Phytologist, 171: 305–314.
- Wan L, Zha W, Cheng X, Liu C, Lv L, Liu C, Wang Z, Du B, Chen R, Zhu L, He GA (2011). **Rice β-1,3-glucanase gene Osg1 is required for callose degradation in pollen development**. Planta 233:309-323 DOI 10.1007/s00425-010-1301-z
- Wolf S, Deom CM, Beachy RN, Lucas WJ (1989). **Movement protein of Tobacco Mosaic Virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit**. Science, vol. 246 pp. 377-379.
- Wu SW, Kumar R, Iswanto ABB, Kim JY (2018) **Callose balancing at plasmodesmata**. J. Exp. Bot., 69, 5325–5339.
- Yashoda HM, Prabha TN, Tharanathan RN (2007). **Mango ripening – Role of carbohydrases in tissues of tening**. Food Chemistry, 102:691–698.
- Yamauchi T, Shimamura S, Nakazono M and Mochizuki T (2013). **Aerenchyma formation in crop species**: Field Crops Research 152, 8-16.
- Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G (2016) **Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: an overview on feedstocks and technological approaches**. Renew Sustain Energy Rev 66:751–74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2016.08.038>.
- Zavaliev R, Ueki S, Epel BL (2011). **Biology of callose (β-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata**. Protoplasma 248:117-130.

8. APÊNDICE

Tabela 1: Sequências de oligonucleotídeos desenhados na direção 5'–3' forward (Fwd) e reverse (Rev), para as sequências alvos. Oligonucleotídeos para as sequências já conhecida dos genes de normalização dos dados.

Identificação	Alvos	Sequência iniciadora Fwd	Sequência iniciadora Rev
Oligonucleotídeos para β-1,3-glucanase			
SCVPAM1059E12.g	1	TAAAGGCGGTAGGT GCTTTT	GGAAGAGACGAAGGAGAC GAAG
SCJFLR1074D02.g	2	GCTTCATTTTGATCC CCACT	GCTTACGCTGCTCTACATG C
SCEQRT1025C10.g	3	TCTGGTCGGGCTTG GTGTT	CTCGGAGACAACGGCATCA
SCCCRT2004C04.g	4	CGAAGAGGTTCTGG TACGC	ACTTCTCCTACACGGGCAA C
SCEZLB1013D07.g	5	AGCGTCCTCCTCCT GTTGT	GTTCTGCCGTTTGACAGC
SCJLRT1023E06.g	6	AAGAGTCCGAAGTG CCTCTC	GGAGCCATCGAGACCTACA T
SCRFAM2071E02.g	7	GCGTACCCGTACTT CAGCTA	CGTCGAACATGCTCGTGTA
SCEZHR1088G11.g	8	CACTCGCCTCCTCG TTCTTC	TCCCGTAGTTCACCCCTAC C
SCRFLR1055B07.g	9	GGCACTCGTGGAAC TGCTAC	ACTCTCCCTGACTCCCTCCT
SCRURT2006B10.g	10	AAGTCGCAGTCGTA GTCGTG	ACTGTAAGCCGATCCAGAG C
Oligonucleotídeos para genes de expressão constitutiva			
SCJFRZ2009G01.g	60S	GCGAGTGCCTCACC TTTGAC	TCTTAGGTCCCCTCAGCAG AAC
SCRFLR1012H05.g	ACT11	CTGACGCCGAGGAT ATCC	CAGCGTAACCCAGCCTTGA
CA254672	GAPDH	CACGGCCACTGGAA GCA	TCCTCAGGGTTCCTGATGC C
SCCCST2001G02.g	PUB	CCGGTCCTTTAAAC CAACTCAGT	CCCTCTGGTGTACCATTTG
SCBGLR1002D06.g	UB	GGTGGCCGCTTG GA	TTTGTTTCGGTTTCAAGTCG ATAA
SCBGLR1002D06.g	UBE-2	CAGGTCCTGCTGGT GAGGAT	CACCTCCAGCATATGGACT ATCAG
SCCCCL3080A11.g	UBQ-10	CGTCCGCAGTCCCC AAT	TGAGAGGATCGCGAGGATT C



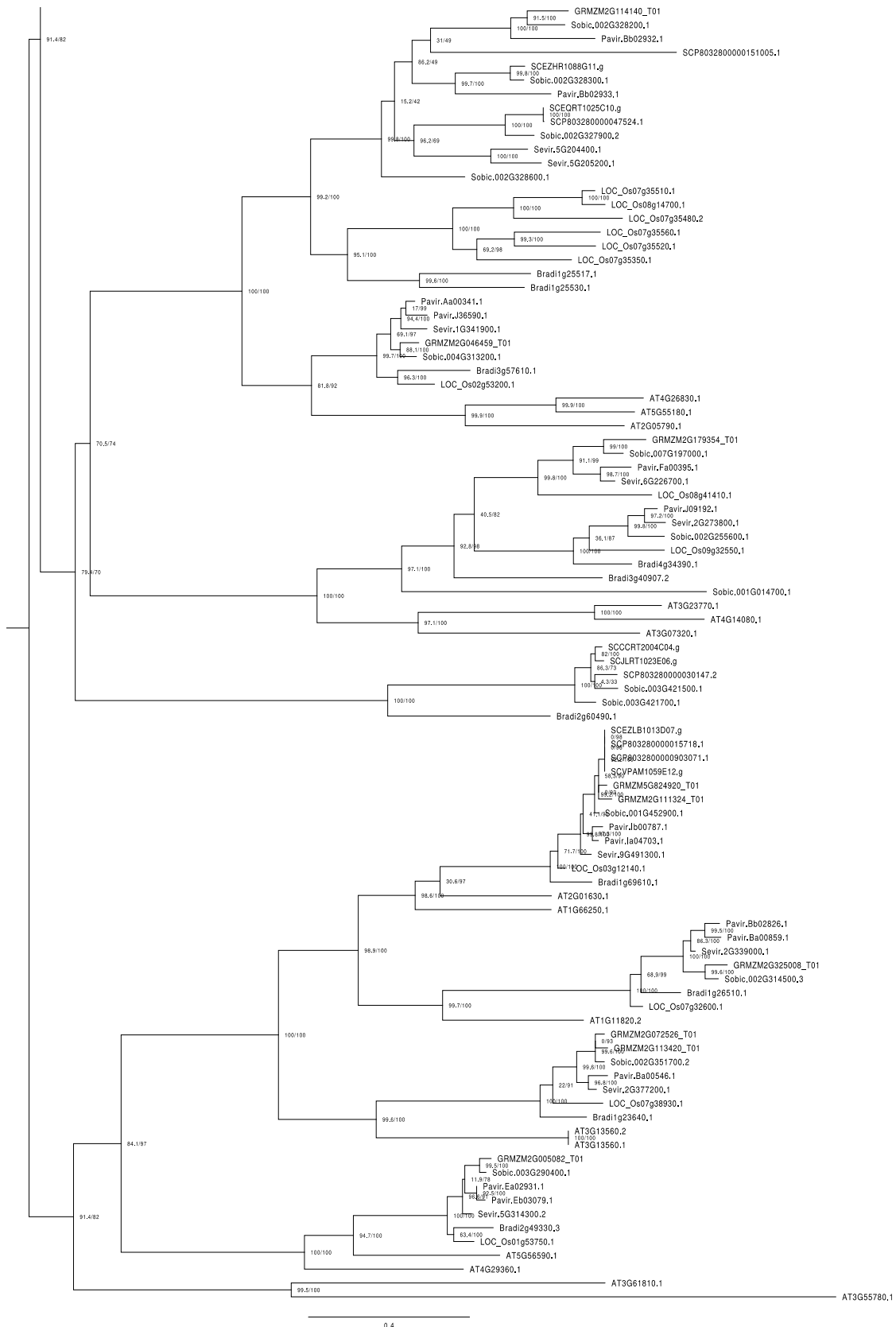


Figura 1: Árvore fenética contendo seqüências proteicas de cana-de-açúcar identificadas no proteoma (Grandis, 2019) e genoma (Riaño-Pachón e Matiello 2017), bem como seqüências de espécies de Poaceae e *A. thaliana* (Gaudioso-Pedraza e Benitez-Alfonso 2014) e seqüências de *Sorghum bicolor*, *Panicum virgatum*, *Setaria viridis*, *Brachypodium distachyon*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, seqüências recuperadas pelo *Phytozome* usando as *Arabidopsis thaliana* como isca