

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARIA LORENA SERENO

Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas  
dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob condições  
de estresse

Piracicaba

2009

MARIA LORENA SERENO

Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas  
dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob condições  
de estresse

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na  
Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no  
Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas de Oliveira Figueira

Piracicaba

2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
**Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP**

Sereno, Maria Lorena

Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob condições de estresse / Maria Lorena Sereno; orientador Antonio Vargas de Oliveira Figueira. - - Piracicaba, 2009.

164 p.: fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Biologia molecular vegetal 2. Expressão gênica 3. Estresse oxidativo  
4. Metais pesados I. Título

CDU 577.21:633.21

*A minha família*

*A meu pai Novo e minha mãe Nidia, mais uma vez, como sempre.....*

*A porta sempre aberta, que me deixou partir e ainda espera meu regresso*

*A minha irmã Lupe,*

*minha amiga e companheira. Eu... do outro lado do espelho.....*

*Ao Alfredo, meu conceito de amor*

**DEDICO**

**Ana**

*Em seus olhos eu me enxergo,*

*é você quem me define.*

*Eu sou apenas sua mãe.....*

*mas tudo*

*finalmente*

*faz sentido!*

**OFEREÇO**

*“Takotsubo ya  
hakanaki yume yo  
natsu no tsuki”*

*“O polvo num pote.  
É tão breve o sonho  
sob a lua do verão”.*

*Matsuo Basho  
(1644-1694)*

## **AGRADECIMENTOS**

Faz muito tempo da primeira vez que cheguei ao Brasil com a ilusão de completar meus estudos e “ser alguém” na vida, mas hoje parece que foi ontem. Quem diria que seriam os melhores anos de minha vida até agora?!. Levo embora comigo muito mais do que trouxe, e saudade já é enorme. Meu mais sincero obrigado a todos que de uma forma simples e perseverante ficaram do meu lado em todas as horas, me ajudando a crescer e completar cada etapa. Não foi fácil, mas valeu a pena.

Ao Prof. Dr. Antonio Figueira por todas as oportunidades oferecidas, paciência e amizade nestes anos.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura pela oportunidade de realizar meu curso de doutorado.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira pelo fornecimento do material vegetal e apoio permanente, especialmente as Dras Sabrina M. Chabregas e Maria Cristina Falco pela ajuda nos experimentos com patógenos.

Ao Centro de cana do Instituto Agrônomo de Campinas pelo fornecimento do material vegetal, especialmente a Dr Silvana Crestes Dias de Sousa.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Siu Mui Tsai do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP e ao Dr. Rodrigo Rocha Latado do Instituto Agrônomo de Campinas, (IAC), Cordeirópolis, SP pelo auxílio no sequenciamento.

Aos integrantes do Laboratório de Melhoramento de Plantas: Aline, Ângela, Celso, Cláudio, Danielle, Eduardo, Felipe, Felipe Nebó, Geovana, João Fernando, Laura, Layanne, Mariana, Matheus, Michelle, Onildo, Paula, Renato, Tais e Thaísa por todos os momentos compartilhados, boas discussões e contribuições constantes ao meu crescimento.

Em especial, agradeço aos amigos: Gildemberg pelas incansáveis horas de discussão e a Déborah, Raquel e Lúgia pela ajuda inestimável durante a obtenção dos resultados, apoio e amizade permanente.

Aos funcionários do laboratório de Melhoramento de Plantas: Benedita Inês Possignolo Rodrigues, José Benedito Alves, Luís Eduardo Fonseca, Paulo Cassieri, Raquel Orsi e Wlamir Godoy pelo auxílio constante em todas as etapas deste trabalho.

Aos amigos e professores da Química Analítica do CENA pelas boas conversas, apoio e momentos de descontração recheados de muita ciência.

A Profa Dra Adriana Pinheiro Martinelli por toda ajuda e amizade oferecida nas horas mais difíceis.

Às secretárias da Pós-Graduação do CENA/USP: Cláudia Corrêa, Neuda Fernandes de Oliveira e Sônia Barrios de Campos e as bibliotecárias: Marília Henyei, Raquel Carvalho e Renata Mazzero pela boa disposição para ajudar sempre.

Aos meus pais queridos, pelo apoio infinito, paciência e amizade, mas principalmente por me ensinar que estudar e aprender sempre vale a pena. A minha irmã Lupe pela amizade e auxílio constante, presente na minha vida sempre.

A meu marido Alfredo, amigo incansável, obrigada por toda a paciência, força e companheirismo em todos os momentos. A nossa preciosa Ana, obrigada pela compreensão, por tantos (tantos) finais de semana trabalhando.

A todos os que de alguma maneira possam ter contribuído para a realização deste trabalho pois não se chega a lugar algum sozinho, Obrigada.



## RESUMO

### **Caracterização e análise de expressão dos genes de metalotioneínas dos tipos 1, 2 e 3 de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob condições de estresse**

Autora: Maria Lorena Sereno

Orientador: Prof. Dr. Antonio Vargas De Oliveira Figueira

As metalotioneínas (MTs) constituem uma superfamília de proteínas de baixo peso molecular (5-10 kDa), ricas em cisteínas. As MTs de plantas são classificadas em quatro tipos de acordo com o arranjo de cisteínas na cadeia polipeptídica. A função das metalotioneínas em plantas é ainda desconhecida, mas as evidências sugerem que teriam um papel na regulação da homeostasia de metais essenciais, detoxificação de metais pesados e proteção contra espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho foram identificados e caracterizados seis genes de metalotioneína a partir das seqüências codificantes para MTs depositadas em banco de dados de cana-de-açúcar, mediante análise filogenética e comparações por alinhamento com os membros da família gênica de metalotioneínas de arroz (*Oryza sativa*) e *Arabidopsis*. Os seis genes MTs de cana de açúcar foram classificados como sendo dois do tipo 1 (*SoMT1a* e *SoMT1b*); dois do tipo 2 (*SoMT2a* e *SoMT2b*); um do tipo 3 (*SoMT3*); e um tipo 4 *SoMT4* (*Ec*). A região promotora presumível de quatro genes (*SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2b* e *SoMT3*) foi caracterizada e os motivos cis-regulatórios identificados. A distribuição de éxons e íntrons foi estabelecida, e dois éxons separados por único íntron foram identificados na estrutura dos genes *SoMT1a* e *SoMT2b*. Um segundo íntron parece estar presente na estrutura dos genes *SoMT2a* e *SoMT3*, mas os resultados não foram conclusivos. O gene *SoMT1b* não foi caracterizado para composição éxons/íntrons. Foi avaliada a expressão constitutiva de *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* em diferentes tecidos/órgão (colmo, inflorescência, limbo foliar, meristema e raiz). *SoMT1a* e *SoMT1b* foram mais abundantemente expressos em todos os

tecidos, seguidos de *SoMT2b* e *SoMT3*. *SoMT2a* apresentou a menor expressão. A expressão dos cinco genes *SoMTs* foi também avaliada em parte aérea e raízes de plântulas de cana-de-açúcar em resposta a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, crescidas *in vitro*. Não houve modulação da expressão dos genes *SoMTs* nos tecidos examinados para as doses de cobre utilizadas, as 6, 24, 48 e 96 h após imposição dos tratamentos. A resposta dos genes *SoMTs* também foi avaliada para o tratamento com 200g  $\text{L}^{-1}$  ha $^{-1}$  de paraquat, aos 15 min, 6 e 24 h após aplicação do herbicida em folhas de plantas de 'SP80-3280'. Houve uma tendência a repressão da expressão dos genes *SoMTs*, significativa as 6 e 24 h somente para *SoMT1a*. A expressão de *SoMT1b*, *SoMT2a* e *SoMT3* foi significativamente reprimida as 24 h após a imposição do tratamento, enquanto que não houve efeito significativo sobre a expressão de *SoMT2b*. Em relação a expressão dos cinco genes *SoMTs* em resposta a inoculação com patógenos, plântulas de 'SP70-1143' e 'RB72-454', consideradas suscetíveis e resistentes, respectivamente ao fungo da ferrugem, foram inoculadas e não inoculadas com *Puccinia melanocephala*, enquanto que plântulas de 'SP78-4467' e 'SP82-1176', consideradas suscetíveis e resistentes, respectivamente a bactéria da escaldadura, foram inoculadas ou não com *Xanthomonas albilineans*. As coletas de parte aérea das plântulas foram realizadas aos 15 min, 4, 8, 24, 48, 96 e 240 h após inoculação. Foi observado aproximadamente 4 vezes mais transcritos de *SoMT1a* em plantas de 'SP70-1143', suscetível a *Puccinia melanocephala*, em relação a cultivar resistente 'RB72-454'. Entretanto, houve uma tendência a repressão de *SoMT1a* nas plantas suscetíveis inoculadas com o fungo, significativamente as 8 e 24 h após tratamento, não havendo diferenças para as plantas da cultivar resistente após inoculação. A expressão constitutiva dos genes *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* foi similar entre ambas as cultivares e manteve-se inalterada após inoculação com o fungo. Não houve diferenças significativa entre as cultivares suscetíveis e resistentes em relação a expressão basal dos genes *SoMTs*, nem foi observado efeito significativo sobre a expressão dos genes *SoMTs* após inoculação das plântulas com *X. albilineans*. Por fim, transcritos dos cinco genes *SoMTs* foram clonados em vetor de expressão para expressão heteróloga em *Escherichia coli* e

proteína presumível pode ser observada em géis de poliacrilamida SDS-PAGE. Entretanto, não foi caracterizada uma modulação importante dos cinco genes *SoMT* em resposta a condições de estresse bióticos (patógenos) e abióticos (Paraquat e metais), que permitisse a associação direta desses genes com a resposta a estresse oxidativo.

## ABSTRACT

### **Characterization and analyses of expression of sugarcane (*Saccharum* spp.) metallothionein type, 1, 2 and 3 gene under stress conditions**

Author: Maria Lorena Sereno

Advisor: Prof. Dr. Antonio Vargas De Oliveira Figueira

Metallothioneins (MTs) are part of a low molecular weight (5-10 kDa) cysteine-rich protein super-family. Plant MTs are classified into four types according to cysteine location in the protein sequence. MTs function is largely unknown, but evidences suggested their role in metal homeostasis, heavy metal detoxification, and protection against reactive oxygen species. This work identified and characterized six sugarcane MT genes from expressed sequences available in databases, by alignment and phylogenetic analyses using members from the MT gene family from rice (*Oryza sativa*) and *Arabidopsis*. The six sugarcane MT genes were classified as two of type 1 (*SoMT1a* and *SoMT1b*); two of type 2 (*SoMT2a* and *SoMT2b*); one of type 3 (*SoMT3*); and one *SoMT4* (*Ec*). The gene putative promoter region of four genes (*SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2b* and *SoMT3*) were characterized, with the cis-regulatory motifs identified. Exon and intron location were established, with two exons and one intron identified for *SoMT1a* and *SoMT2b*, A second intron appeared to be present on *SoMT2a* and *SoMT3*, but results were inconclusive. *SoMT1b* could not be characterized for exons and introns. Gene expression analyses was conducted for *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* and *SoMT3* in various tissues/organs (stem; inflorescence; leaf; meristem; and root). *SoMT1a* and *SoMT1b* were the most expressed genes in all tissues, followed by *SoMT2b* and *SoMT3*; *SoMT2a* was the least expressed. Expression of the five *SoMTs* genes were evaluated in shoots and roots from in vitro plant grown on 100 or 500  $\mu\text{M}$  copper. There was no modulation of expression in the evaluated tissues at 6, 24, 48 and 96 h after treatment. Gene expression was also evaluated at 15 min, 6 and 24 h after treatment with 200g L<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup> Paraquat. There was a trend to repress expression of the *SoMT* genes, being

significant only for *SoMT1a* at 6 and 24 h. Expression of *SoMT1b*, *SoMT2a* and *SoMT3* were significantly repressed at 24 h after treatment, while there was no significant effect on *SoMT2b* expression. In relation to the expression of the five *SoMTs* in response to biotic stress, plants from cultivars 'SP70-1143' and 'RB72-454', considered susceptible or resistant respectively, to the rust fungus, were inoculated or not with *Puccinia melanocephala*, whereas plants of 'SP78-4467' e 'SP82-1176', considered susceptible or resistant respectively, to the sugarcane leaf scald, were inoculated or not with *Xanthomonas albilineans*. Shoots were sampled at 15 min, 4, 8, 24, 48, 96 and 240 h after inoculation. Plants of the susceptible 'SP70-1143' contained 4 times *SoMT1a* transcripts than the resistant 'RB72-454'. However, there was a trend to decrease *SoMT1a* transcripts in susceptible plants, significantly 8 and 24 h after *P. melanocephala* inoculation, while no difference was observed for expression in resistant plants. The constitutive expression of the other genes (*SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* and *SoMT3*) were similar between cultivars, and remained unchanged after inoculation. There was no significant differences for constitutive *SoMTs* expression between the *X. albilineans* susceptible and resistant cultivars, nor an inoculation effect of gene expression. Transcripts from the five *SoMTs* genes were cloned into vector for heterologous expression in *Escherichia coli*, and putative proteins were seen in polyacrylamide gels. Therefore, the modulation of the five *SoMT* genes in response to various abiotic (Paraquat or metals) or biotic (pathogen) stress condition was not characterized to allow definite conclusions about the direct role of metallothioneins in response to oxidative stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCCC	<i>Brazilian Clone Collection Centre</i>
BCM	<i>Baylor College of Medicine</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CanMT	<i>gene tipo metalotioneína de Cicer arietinum</i>
cDNA	ácido desoxirribonucléico complementar ao mRNA
CTC	<i>Centro de Tecnologia Canavieira</i>
DEPC	<i>Diétil pirocarbonato</i>
EDTA	<i>Ácido etilenodiaminotetracético</i>
EST	etiqueta de seqüência expressa
IAC	<i>Instituto Agronômico de Campinas</i>
IPTG	<i>Isopropil <math>\beta</math>-thiogalactopiranosídeo</i>
LAMP	<i>Laboratório de Melhoramento de Plantas</i>
LB	<i>meio líquido Luria-Bertani</i>
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
MT	<i>Metalotioneína</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
Pb	<i>Pares de bases</i>
PCR	reação em cadeia da polimerase
poli-T	polímero de nucleotídeos de base timina
RT-PCR	transcrição reversa seguida de PCR
RT-qPCR	transcrição reversa seguida de PCR quantitativo em tempo-real
SAGE	Análise serial da expressão gênica
SB	<i>Sodium Borato</i>
SDS	<i>Dodecil sulfato sódico</i>
SoMTs	<i>Metalotioneína de Saccharum officinalis</i>
SUCEST	Projeto transcriptoma de cana-de-açúcar (ESTs), FAPESP
TC	<i>Tentative Consensus</i>
TE	<i>Tis-HCl-EDTA</i>
X-gal	<i>5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	<i>graus centígrados</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
g	Gramma
h	Hora
kV	Kilovoltios
L	Litro
M	<i>Molar</i>
mA	Miliamper
min.	<i>Minuto</i>
mL	<i>Mililitro</i>
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	graus Celsius
pb	pares de bases
rpm	revoluções por minuto
s	Segundo
U	unidade de enzima (Weiss)
V cm <sup>-1</sup>	<i>Voltios por centímetro</i>
µL	<i>Microlitro</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	Identificação de genes de metalotioneína e análise filogenética.....	36
3.2	Clones de EST.....	37
3.2.1	Sequenciamento.....	39
3.3	Caracterização da presença e distribuição de éxons / íntrons dos genes SoMTs.....	40
3.3.1	Extração de DNA.....	41
3.3.2	Extração de RNA.....	41
3.3.2.1	Tratamento com DNase I.....	43
3.3.3	Síntese de cDNA.....	43
3.3.3.1	Avaliação da qualidade do cDNA por PCR.....	44
3.3.4	Clonagem, transformação gênica e sequenciamento.....	44
3.4	Clonagem da região promotora dos genes SoMTs mediante a técnica Genome Walking.....	45
3.4.1	Genome walking.....	46
3.4.2	Caracterização das seqüências promotoras.....	49
3.5	Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).....	49
3.5.1	Desenho de iniciadores específicos para RT-qPCR e validação mediante amplificação dos clones de EST.....	49
3.5.2	Ensaio para determinar a expressão basal de SoMTs em diversos tecidos/órgãos.....	50



3.5.3	Ensaio para promover estresse oxidativo.....	53
3.5.3.1	Experimento com doses de cobre.....	53
3.5.3.2	Experimento com dose de herbicida Paraquat.....	53
3.5.4	Ensaio com patógenos.....	54
3.5.5	Análise estatística da expressão por RT-qPCR.....	54
3.6	Produção heteróloga de metalotioneínas em <i>Escherichia coli</i> .....	55
3.6.1	Seleção de vetor de expressão e desenho de iniciadores.....	55
3.6.2	Clonagem e expressão heteróloga.....	58
3.6.2.1	Subclonagem e confirmação dos genes SoMTs.....	58
3.6.2.2	Digestão, transformação e indução para expressão da proteína heteróloga.....	59
3.6.2.3	Lise por choque térmico utilizando nitrogênio líquido.....	60
3.6.2.4	Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	60
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
4.1	Identificação de Genes de Metalotioneína e Análise Filogenética.....	63
4.2	Desenvolvimento de iniciadores específicos para genes SoMTs.....	75
4.3	Caracterização da sequência inteira dos genes de SoMTs.....	75
4.4	Clonagem da região promotora dos genes SoMTs, mediante Genome walking.....	88
4.4.1	Metalotioneína tipo 1: SoMT1a e SoMT1b.....	89
4.4.2	Metalotioneína tipo 2: SoMT2a e SoMT2b.....	91
4.4.3	Metalotioneína tipo 3: SoMT3.....	94
4.5	Elementos cis-regulatórios presentes na região promotora dos genes...	95
4.6	Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo.....	107
4.6.1	Expressão basal de SoMTs em diferentes tecidos/órgão.....	109

4.6.2	Ensaio para estresse oxidativo.....	114
4.6.2.1	Experimento com doses de cobre.....	114
4.6.2.2	Experimento com paraquat.....	123
4.6.3	Experimento com patógenos.....	128
4.6.3.1	Análise da expressão dos genes <i>SoMTs</i> em cultivares suscetíveis e resistentes de cana-de-açúcar, infectadas com <i>Puccinia melanocephala</i> .....	128
4.6.3.2	Análise da expressão dos genes <i>SoMTs</i> em plantas de cana-de-açúcar infestadas com <i>Xanthomonas albilineans</i> .....	134
4.7	Produção heteróloga de metalotioneínas em <i>Escherichia coli</i> .....	135
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>139</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>142</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>154</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>156</b>
	<b>APÊNDICE C</b> .....	<b>158</b>
	<b>APÊNDICE D</b> .....	<b>159</b>
	<b>APÊNDICE E</b> .....	<b>161</b>
	<b>APÊNDICE F</b> .....	<b>162</b>
	<b>APÊNDICE G</b> .....	<b>163</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As metalotioneínas (MTs) constituem uma extensa e diversa superfamília de proteínas de baixo peso molecular (5-10 kDa), ricas em aminoácido cisteína, capazes de ligar metais via os grupos tiois destes resíduos (HAMER, 1986). As MTs tem sido encontradas numa ampla variedade de organismos sendo tradicionalmente classificadas, com base no arranjo das cisteínas, em duas classes. A classe I incluía as metalotioneínas de vertebrados, enquanto que a classe II possuía aquelas de plantas, fungos e invertebrados. A classe II foi subdividida em quatro tipos (tipo 1, 2, 3 e 4 ou Ec), de acordo com o número e distribuição de cisteínas na cadeia polipeptídica (ROBINSON et al., 1993; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Devido ao crescente número de seqüências tipo MT identificadas, e baseada nas relações filogenéticas, a superfamília de metalotioneínas foi subdividida em 15 famílias, sendo que as MTs de plantas foram incluídas na décima quinta família, e os quatro tipos distintos foram considerados subfamília (BINZ; KÄGI 2001).

As MTs dos vários tipos são codificadas por um ou mais genes, sendo que cada gene possui padrão de expressão temporal e espacial específicos (GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003). A maioria das proteínas previstas de plantas não foi isolada, exceto em trigo (LANE et al., 1987) e *Arabidopsis* (MURPHY et al., 1997), e a capacidade de cada proteína em se ligar a metais não foi demonstrada, exceto para 'Ec' de trigo (LANE et al., 1987). Todas as outras seqüências de aminoácidos de MTs de plantas derivam de tradução conceitual de seqüências de mRNA / cDNA identificadas em estudos de expressão gênica ou projetos de sequenciamento. Atualmente, cerca de 25% de todas as anotações no banco de dados de seqüências de proteínas *Swiss-Prot* estão listadas sob o nome de 'metalotioneínas' (FREISINGER, 2008). As proteínas MTs não possuem atividade enzimática reconhecida, e a purificação dessa proteína a partir de extratos vegetais tem-se mostrado difícil possivelmente devido à instabilidade e suscetibilidade das metalotioneínas a degradação na presença de oxigênio (MURPHY et al., 1997). Até o presente apenas nove proteínas de MT foram caracterizadas, sendo que oito delas foram exclusivamente expressas como proteínas recombinantes em *Escherichia coli* (FREISINGER, 2008).

A função das metalotioneínas em plantas é ainda desconhecida, mas as evidências indicam que elas possuem um papel importante na homeostasia de metais essenciais, como zinco e cobre, provavelmente associadas com transporte (COZZA et al., 2006), assim como também de elementos tóxicos não essenciais, como cádmio (ROOSENS et al. 2004; ZIMERI et al. 2005). Em animais, as metalotioneínas foram associadas a homeostasia de metais essenciais, respostas a metais pesados e estresse oxidativo (STANKOVIC et al., 2007). Em fungos, foram propostas funções similares primeiramente envolvidas com resposta a toxicidade por metais, ou como proteínas de respostas ao estresse de um modo geral (LANFRANCO et al., 2002; TUCKER et al., 2004). A expressão de genes de MT de plantas pode ser afetada, por diversos estímulos associados a estresses, tais como choque térmico, vírus e ferimentos mecânicos, amadurecimento dos frutos, desenvolvimento das raízes, desenvolvimento de sementes, suberização; deficiência de nutrientes e de açúcar, senescência foliar e abscisão (BUCHANAN-WOLLASTON; AINSWORTH, 1997; CHATTHAI et al., 1997; CLENDENNEN; MAY, 1997; BRKLJACIC et al. 2004; MIR et al., 2004; MOYLE et al., 2005; YUAN et al., 2008). Há também evidências crescentes que indicam um papel na resposta a patógenos associada a proteção contra espécies reativas de oxigênio (CHOI, et al., 1996; BUTT et al., 1998; AKASHI et al., 2004; WONG et al., 2004).

Na tentativa de contribuir na elucidação da função das metalotioneínas de plantas e baseado na hipótese de que teriam um papel importante na proteção contra o estresse oxidativo, o presente trabalho teve por objetivo investigar a expressão dos genes de metalotioneína de cana-de-açúcar, mediante RT-qPCR, em resposta a fatores bióticos e abióticos capazes de promover estresse oxidativo. Para isto foi feita primeiramente a identificação dos diversos tipos de metalotioneína de cana-de-açúcar, por meio de análises filogenética e comparativa, com a família gênica de MTs de arroz e *Arabidopsis*. A caracterização das seqüências promotoras presumíveis, a distribuição de éxons e íntrons na estrutura dos genes e expressão heteróloga das proteínas dos genes MTs também foram propostas.

## *2. REVISÃO DE LITERATURA*

As metalotioneínas (MTs) constituem uma superfamília de proteínas de baixo peso molecular (5-10 kDa) com distribuição ubíqua na natureza (FREISINGER, 2008). A característica dominante das metalotioneínas é o elevado conteúdo de resíduos cisteína, e conseqüentemente íons metálicos bivalentes ( $Zn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ) ligam-se aos grupos tióis dos resíduos de cisteínas (FREISINGER, 2008). A primeira descrição das MTs ocorreu a mais de 50 anos, quando Margoshes e Vallee (1957) identificaram no córtex renal de cavalo uma proteína quelante de cádmio, responsável pelo acúmulo desse elemento nos rins. Desde então, sua presença tem sido vastamente detectada em espécies animais, vegetais, algas e microrganismos eucarióticos e procarióticos (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). As funções fisiológicas presumíveis das MTs incluem a transferência de íons metálicos essenciais, zinco e cobre a várias metalo-enzimas e fatores de transcrição (VALLEE, 1991), assim como também armazenamento e detoxificação de íons metálicos incluindo cádmio e mercúrio (GIORDANI et al., 2000; ZIMERI et al., 2005), e crescentemente, papéis na proteção contra espécies ativas de oxigênio (CHUBATSU; MENEHINI, 1993, MIR et al., 2004, AKASHI et al., 2004).

O primeiro sistema de nomenclatura de MTs proposto (NORDBERG e KOJIMA, 1979) foi ampliado pela introdução de uma subdivisão de todas as MTs em três classes (I-II-III) com base em características estruturais (FOWLER et al., 1987). A Classe I incluía a maioria das MTs de animais (KAGI, 1991), de *Neurospora crassa* e outros fungos (MUNGER; GERMANN; LERCH, 1987). A classe II continha polipeptídeos característicos das plantas superiores ou com relações evolutivamente distantes das MTs de mamíferos, como são os polipeptídeos de ouriço de mar, nematóides, leveduras (KAGI, 1991; ROBINSON et al., 1993), e da cianobactéria *Synechococcus* sp. (ROBINSON et al., 1990). As Classes I e II eram compostas por proteínas codificadas por genes, enquanto a Classe III continha polipeptídeos não diretamente codificados por genes, sintetizados por reações enzimáticas sequenciais, compostos de unidades atípicas como, por exemplo,  $\gamma$ -glutamilcisteína e fitoquelatinas (KAGI, 1991).

Com o crescimento do número de seqüências de MTs, essa subdivisão tornou-se inadequada. Embora mantendo a definição de MTs aceitável, o comprimento de suas seqüências; a composição de aminoácidos; o número e repartições em domínios contendo cisteínas foram reconhecidos como sendo altamente variáveis. Adicionalmente, as seqüências de genes atualmente disponíveis, freqüentemente contêm elementos potencialmente relacionados a propriedades funcionais das MTs, que não foram consideradas inicialmente no sistema de classificação original. Dessa maneira, foi proposto um novo sistema de classificação, baseado nas similaridades das seqüências e nas relações filogenéticas (KOJIMA; BINZ; KAGI, 1999). Assim, a superfamília da MT ficaria subdividida em 15 famílias, sendo que as MTs de planta fazem parte da décima quinta (15) família. Esse sistema de classificação proposto também inclui subfamílias, subgrupos, isoformas e alelos isolados (BINZ; KÄGI, 2001).

A maioria das MTs de plantas contém dois domínios ricos em cisteína, separados por um domínio central sem cisteínas, mas com amino ácidos hidrofóbicos e aromáticos (exclusivo de plantas). Todas estas MTs de plantas podem ser subdivididas com base na seqüência de amino ácidos, em quatro tipos de acordo com a distribuição de resíduos de cisteína nos dois domínios (ROBINSON et al., 1993; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Metalotioneínas do Tipo 1 possuem 6 pares de cisteína, agrupadas num arranjo Cys-X-Cys, distribuídas igualmente nos domínios amino e carboxi terminal, enquanto que as proteínas do Tipo 2 contêm 4 pares de cisteínas no extremo amino terminal, iniciando por uma configuração Cys-Cys e terminando o primeiro domínio com Cys-X-X-Cys, não havendo outras diferenças para os outros três pares de cisteína no extremo carboxi terminal (ROBINSON et al., 1993; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). As MTs do Tipo 3 exibem um arranjo de cisteínas distinto, com quatro cisteínas na terminação amino (Cys-X-X-Cys-X-Cys-X-X-X-X-Cys). As MTs relacionadas ao gene de trigo Ec, expresso durante o desenvolvimento de embriões são classificadas como do Tipo 4 e possuem resíduos cisteínas nos três domínios (ROBINSON et al., 1993; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).



Entretanto, a única proteína MT isolada de plantas foi a MT tipo 4 ou 'Ec' (*early cysteine labeled protein*) [LANE et al, 1987; MURPHY et al, 1997], e a capacidade de cada proteína em se ligar a metais não foi demonstrada, exceto para Ec de trigo. Todas as outras seqüências de aminoácidos de MTs de plantas derivam de tradução conceitual de seqüências de mRNA / cDNA identificadas em estudos de expressão gênica ou projetos de sequenciamento. Atualmente, cerca de 25% de todas as anotações no banco de dados de seqüências de proteínas *Swiss-Prot* estão listadas sob o nome de 'metalotioneínas' (FREISINGER, 2008), e mais de 140 seqüências de genes MTs codificando para proteínas ricas em cisteína, identificadas em inúmeras espécies e tecidos, podem ser encontradas nos bancos de dados públicos.

As plantas contêm genes que em termos estruturais e funcionais são homólogos a genes de MT de animais e fungos (ROBINSON et al., 1993; RAUSER, 1999). A similaridade entre MT de fungos e animais está restrita aos resíduos de cisteínas, com baixa identidade entre as seqüências de nucleotídeos (ZHOU; GOLDSBROUGH, 1994).

As MTs dos vários tipos são codificadas por pequenas famílias gênicas com dois ou mais genes, mesmo no reduzido genoma de *Arabidopsis* (ZIMMERI et al., 2005) onde 9 membros dos quatro tipos foram relatados. Em arroz foram também identificados nove genes de MTs distribuídos em vários cromossomos (WONG et al., 2004). Recentemente, mais três genes de um novo tipo foram encontrados em arroz totalizando onze genes de MT nesta espécie (ZHOU, et al 2006). Na maioria das espécies foram relatadas uma ou várias das isoformas de alguns dos quatro tipos de MTs, mas não todos. Em *Populus trichocarpa x deltoides* foram encontrados seis genes MTs, representantes dos tipos 1, 2 e 3 (dois de cada tipo) (KOHLENER et al., 2004). Seis genes de MTs foram identificados em algodão separadamente em diversos trabalhos, sendo três do tipo 1; um do tipo 2; e dois do tipo 3 (HUDSPETH, et al., 1996; JORDAN et al., 2005; XUE et al., 2009). Em tomate foram relatados três genes MTs somente do tipo 2 (GIRITCH et al., 1998). Cada gene possui padrões de expressão temporal e espacial específicos (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). De forma geral, genes de MT tipo 1 são mais espessas constitutivamente para a

maioria dos tecidos examinados, mas principalmente em raízes. Transcritos de MTs tipo 2 são abundantemente detectados em folhas em diversas fases de desenvolvimento, flores e frutos, e em menor proporção em raízes, enquanto que a expressão de MT tipo 3 é quase que exclusiva de frutos carnosos e folhas de plantas sem frutos. Transcritos de MT tipo 4 ou Ec, são exclusivos de sementes (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008). Em *Arabidopsis*, os MTs do tipo 1 foram mais expressos em raízes do que em folhas, enquanto que os transcritos de MT dos tipos 2 e 3 foram mais detectados em folhas do que raízes (ZHOU; GOLDSBROUGH, 1995; MURPHY et al., 1997). Guo, Bundithya e Goldsbrough (2003) observaram a mesma tendência para algumas das isoformas dos diferentes tipos de MT de *Arabidopsis* associada a presença de cobre, concluindo que essas proteínas provavelmente possuem papéis distintos na homeostasia de metais. Recentemente, foi investigada a contribuição da maioria das isoformas de MTs de *Arabidopsis* para tolerância a metais, principalmente cobre e cádmio, com idênticas conclusões (GUO; MEETAM; GOLDSBROUGH, 2008).

No projeto SUCEST de cana-de-açúcar, foram encontrados pelo menos 54 agrupamentos de ESTs, todos com a seqüência completa, com valores  $E < 10^{-7}$ , derivados de 849 seqüências (FIGUEIRA; KIDO; ALMEIDA, 2001). Esses agrupamentos foram alinhados com representantes de MT de outras espécies e classificados nos quatro tipos de MTs. Entre esses agrupamentos, 27 foram classificados como tipo 1, 21 grupos como do tipo 2, cinco grupos como MT do tipo 3, e apenas um grupo foi identificado como MT do tipo 4. Dos 291.689 ESTs seqüenciados no projeto SUCEST, um total de 849 (0,29%) codificavam metalotioneínas, expressos nas diversas bibliotecas (FIGUEIRA; KIDO; ALMEIDA, 2001). Os transcritos de MT tipo 1 foram os mais abundantes, com um total de 501 ESTs, principalmente em bibliotecas de sementes, e também de raízes. Os transcritos de MT do tipo 2 foram o segundo tipo mais abundante (324), principalmente em bibliotecas de parte aérea. Apenas 24 ESTs continham transcritos de metalotioneína do tipo 3, que eram mais abundantes em bibliotecas de parte aérea. O nível de transcritos de MT em cana sob condições não indutoras de estresse foi elevado indicando que esses genes são

expressos constitutivamente, principalmente aquelas do tipo 1. Esses dados foram confirmados posteriormente em experimentos empregando análise por *northern blot* realizados em nosso laboratório (SERENO et al., 2007). A expressão de MT 1 em plântulas de cana-de-açúcar foi maior nas raízes que nas folhas. Já os genes MT 2 e MT 3 foram mais expressos em folhas que em raízes. A expressão dos genes para metalotioneínas dos tipo 1, 2 e 3 demonstraram possuir expressão constitutiva, sendo elevada para MT 1 e MT 2, tanto em folhas como em raízes de cana de açúcar. Não foi evidenciada uma modulação clara da expressão de MT 1, MT 2 ou MT 3 quando as plantas foram submetidas a doses crescente de metais (50, 100 e 250  $\mu\text{M}$  de Cu; ou 100, 250, e 500  $\mu\text{M}$  de Cd) nos tempos avaliados (11 e 33 dias após imposição do tratamento) (SERENO et al., 2007).

O padrão diverso de expressão dos diferentes genes MTs sugere que as isoformas das MTs de plantas podem ser diferentes não só em seqüência, como também na sua função e especificidade (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Até o momento, uma descrição abrangente sobre a expressão de todos os genes MTs, só foi feita em *Arabidopsis* (GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003; GUO; MEETAM; GOLDSBROUGH, 2008) e em arroz (ZHOU et al., 2006).

Os mRNAs de MT têm sido identificados utilizando abordagens de expressão diferencial por diversos tratamentos, principalmente sob estresses (FORDHAM-SKELTON et al., 1997; MA et al., 2003), ou freqüentemente no curso de vários projetos de seqüenciamento de EST (Etiquetas de Seqüências Expressas) (MORIGUCHI et al., 1998; FIGUEIRA et al., 2001; MOYLE et al., 2005; LIN et al., 2009); ou mediante SAGE (*Serial analysis of gene expression*) (GIBBINGS et al., 2003; WHITE et al., 2006; CALSA; FIGUEIRA, 2007), indicando que vários desses genes de MTs de plantas são altamente expressos.

A investigação das funções das metalotioneínas tem focado principalmente no papel destas no metabolismo e detoxificação de metais nos organismos biológicos. Em animais, as metalotioneínas estão associadas a numerosas funções celulares, incluído a homeostase de metais essenciais, e respostas a metais pesados e estresse oxidativo (STANKOVIC et

al., 2007). Em fungos, foram propostas funções similares primeiramente envolvidas com resposta a toxicidade por metais ou como proteínas de respostas ao estresse de um modo geral (LANFRANCO et al., 2002; TUCKER et al., 2004). Em plantas, as MTs participam da homeostase de elementos essenciais como zinco e cobre, assim como também de elementos tóxicos não essenciais, como cádmio (ROOSENS et al. 2004; ZIMERI et al. 2005). Há indicações da importância de MTs para tolerância a cobre em *Arabidopsis*, que podem estar associada a homeostasia de metais em plantas, regulando a concentração de íons (ROBINSON et al., 1993; ZHOU; GOLDSBROUGH, 1995). Genes de MTs de *Arabidopsis* (*MT1a* e *MT2a*) quando expressos em leveduras mutantes para ausência do gene de metalotioneína (*CUP1*), reconstituíram a tolerância a Cu e aumentaram a tolerância a Cd, em função do gene usado, sendo que *MT2a* restabeleceu o crescimento em maiores níveis de Cd (ZHOU; GOLDSBROUGH, 1994). O mesmo gene *MT2a* de *Arabidopsis* restabeleceu o crescimento parcial de um mutante de cianobactéria (deleção do gene *smtA*) na presença de Zn (FORDHAM-SKELTON et al., 1997). Recentemente, foi investigada a capacidade de ligação a metais de MTs dos 4 tipos de *Arabidopsis* (GUO; MEETAM; GOLDSBROUGH, 2008). Para isto, seis isoformas (*MT1a*, *MT2a*, *MT2b*, *MT3*, *MT4a*, e *MT4b*) foram introduzidas e expressas em leveduras mutantes sensíveis ao cobre e zinco,  $\Delta cup1$  e  $\Delta zrc1\Delta cot1$ , respectivamente. Os quatro tipos de MTs conferiram níveis similares de tolerância e acúmulo de cobre ao mutante  $\Delta cup1$ . Entretanto, as MT tipo 4a e 4b conferiram maior tolerância e acúmulo de Zn aos mutantes  $\Delta zrc1\Delta cot1$ , evidenciando certa preferência por diferentes metais (GUO; MEETAM; GOLDSBROUGH, 2008). No mesmo trabalho, plantas de *Arabidopsis* duplo mutantes para *MT1a* e *MT2b* foram transformadas com *MT1a* restituindo o acúmulo de cobre nas raízes. A ausência de *MT1a*, mas não de *MT2b* provocou uma diminuição de 30% na concentração de cobre nas raízes (GUO; MEETAM; GOLDSBROUGH, 2008).

Previamente, o gene *tyMT*, um gene MT tipo 2 isolado a partir de *Typha latifolia* (ZHANG; TAM; WONG, 2004), foi também introduzido em leveduras mutantes ( $\Delta cup1$ ) permitindo a sobrevivência e crescimento das células em meios com altas concentrações de

metais: 0,1 mM Cd, 2 mM Cu, 1 mM Zn e 6 mM Pb. Por outro lado, a super-expressão do gene *tyMT* em plantas mutante de *Arabidopsis thaliana* (*Columbia-0*) incrementou a tolerância a cobre e cádmio, em comparação ao controle (ZHANG; TAM; WONG, 2004). Estes resultados são consistentes com os obtidos num trabalho, onde plantas transgênicas de *A thaliana* transformadas com o gene MT 1 de ervilha (*PsMTa*) acumularam 8 vezes mais cobre do que os controles não transformados, e a proteína expressa de forma heteróloga em *E. coli*, aumentou a capacidade de acúmulo de cádmio e cobre nas células, em meio enriquecido para esses metais (EVANS et al., 1992). A ausência de indução de MT por cobre em outros sistemas e/ou genes pode advir de uma expressão elevada constitutiva antes da presença do metal; ou mesmo uma falta de indução por metais (GOLDSBROUGH, 1999; ROOSENS et al., 2004; ROOSENS et al., 2005). Transcritos de *MT1* se acumulam em folhas de *Arabidopsis* expostas a  $\text{Cu}^{2+}$ , e em menor escala por  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Cd}^{2+}$  (ZHOU; GOLDSBROUGH, 1994; GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003), enquanto que aqueles de *MT2* aumentam na presença de  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ou choque térmico. A expressão constitutiva de *PsMT* em raízes de ervilha em soluções nutritivas na ausência de altas dosagens de metais parece estar associada à deficiência de ferro e ao conseqüente acúmulo de cobre nas raízes (ROBINSON et al., 1993). De forma similar, a MT tipo 3 de cevada (*HvMT3a*) [USHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2009] foi altamente induzida pela deficiência de cobre no meio de crescimento das plantas.

Uma função de MT relacionada à desintoxicação de cádmio tem sido claramente demonstrada em mamíferos (COYLE, 2002), mas em plantas essa função era atribuída às fitoquelatinas. Recentemente, foi relatado que a expressão das MTs 2a e 3 de *Arabidopsis* em células guarda de *Vicia faba*, protege este tipo celular da degradação após exposição ao cádmio (LEE et al., 2004). O gene *BjMT2* que codifica para uma MT tipo 2 de *Brassica juncea* confere tolerância ao cobre e cádmio quando introduzido em *Arabidopsis* (ZHIGANG et al., 2006). Gorinova e colaboradores (2007) demonstraram que plantas de tabaco transformadas com o gene *MThis* de *Silene vulgaris* (MT2b) possuem maior tolerância ao estresse causado pelo cádmio e observaram um aumento no acúmulo deste metal nas

raízes e folhas, confirmando que pelo menos em algumas plantas, as MTs teriam um papel na desintoxicação de Cd também.

A expressão de genes de MT pode ser afetada, por outros estímulos associados ao estresse, além da concentração de metais, tais como choque térmico, amadurecimento dos frutos, desenvolvimento das raízes, desenvolvimento de sementes, suberização; deficiência de nutrientes e de açúcar, senescência foliar e abscisão (BUCHANAN-WOLLASTON; AINSWORTH, 1997; CHATTHAI et al., 1997; CLENDENNEN; MAY, 1997; GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003; BRKLJACIC et al. 2004; MIR et al., 2004; MOYLE et al., 2005; YUAN et al., 2008).

Pouco é sabido sobre a expressão de metalotioneínas em relação a estresse biótico, mas a resposta a patógenos já foi associada a uma função das metalotioneínas na proteção contra espécies reativas de oxigênio (ROS) [CHOI, et al., 1996; BUTT et al., 1998; NAVABPOUR et al., 2003; AKASHI et al., 2004; MIR et al., 2004; WONG, et al., 2004; XUE et al., 2009]. Choi et al. (1996) encontraram que um gene de metalotioneína tipo 1 de tabaco foi fortemente induzido pela presença vírus TMV e por dano mecânico. Diversos experimentos foram realizados para descartar a possibilidade do gene estar sendo induzido pelo etileno produzido, tanto pela infecção por patógeno como por ferimento. A expressão do gene ACC oxidase, foi induzida por tratamento com etileno, mas a expressão de metalotioneína permaneceu estável similar ao controle, comprovando que o acúmulo de RNA desta metalotioneína não é mediado por etileno. Os autores concluíram que um possível papel para as metalotioneínas induzidas por patógenos ou danos mecânicos é o envolvimento destas proteínas na regulação dos íons metálicos disponíveis, os quais, subseqüentemente, afetariam a produção de espécies reativas de oxigênio nas plantas estressadas (CHOI, et al., 1996). Butt e colaboradores (1998) relataram a expressão diferencial de um gene para metalotioneína, *LSC54*, em resposta a *Peronospora parasítica* e *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis*. A região promotora do gene *LSC54*, previamente identificado como altamente induzido durante a senescência em *Brassica napus*, foi fusionada ao gene repórter GUS e introduzido em *Arabidopsis*. Em relação à infecção com

patógenos, foi observado que plantas transgênicas de *Arabidopsis* infectadas com isolados incompatíveis do fungo biotrófico *Peronospora parasitica* e da bactéria necrotrófica *Pseudomonas syringae*, apresentaram rápida resposta de hipersensibilidade com morte celular e uma incrementada expressão localizada do gene repórter GUS. A morte celular acontece em parte, pela produção de espécies reativas de oxigênio, e o aumento na expressão da metalotioneína foi associado a uma função em resposta ao dano excessivo causado por estes compostos. Por outro lado, os isolados compatíveis afetaram os tecidos infectados de uma forma diferente. Uma lenta e discreta expressão de GUS foi observada em correlação com o aparecimento de sintomas prematuros de senescência. Butt et al. (1998) propuseram uma ligação entre a resposta das plantas aos patógenos e a indução de pelo menos um gene relacionado a senescência. A senescência prematura seria uma tentativa das plantas de mobilizar componentes nutricionais das folhas infectadas para limitar o desenvolvimento e propagação dos patógenos. WONG et al. (2004) observaram que plantas de arroz superexpressando o gene *OsMT2b* demonstraram uma susceptibilidade aumentada a bactérias e fungos, enquanto que a repressão de *OsMT2b* permitiu uma resposta de hipersensibilidade das plantas, com a conseqüente resistência a infecção. Os autores associaram a repressão da metalotioneína como uma oportunidade das células para acumular espécies reativas de oxigênio, necessárias no processo de sinalização e defesa contra patógenos. Dauch e Jabaji-Hare (2006) relataram o padrão de expressão temporal de duas MTs (tipo 2 e 3) em *Abutilon theophrasti* (nc: malva indiana), após infecção com o fungo *Colletotrichum coccodes*. Para ambos os tipos de MT, o padrão foi semelhante, com um aumento significativo da expressão (8 vezes para MT tipo 2 e 16 vezes para MT tipo 3), logo no primeiro dia após a infecção (fase assintomática), seguido de uma repressão da expressão abaixo dos níveis dos controles não tratados, já no segundo dia. Entretanto, essa repressão na expressão foi significativa somente para MT tipo 3. Em um curso temporal de 14 dias após a infecção, os valores de expressão oscilaram entre repressão e valores semelhantes ao controle, inclusive após surgimento dos sintomas, e até a completa senescência foliar, mas em nenhum caso foi estatisticamente significativo. Em

paralelo, foi investigada a expressão de um fator de transcrição *bZip*, conhecido por participar na resposta das plantas a patógenos, com padrão de expressão idêntico ao encontrado para as duas MTs. Dauch e Jabaji-Hare (2006) concluíram que *bZip* responde ao ataque do patógeno diretamente e que a expressão temporal mas diferencial das MTs 2 e 3 poderia representar uma resposta combinada das plantas aos processos de resposta a patógenos e senescência. O motivo pelo qual há um declínio importante da expressão dos genes no segundo dia após infecção não fica claro, mas foi proposto que as plantas acumularam grandes quantidades de transcritos logo após a infecção e depois reprimiram a transcrição para manter valores equivalentes aos controles. Provavelmente a repressão da expressão das MTs seria necessária para permitir a resposta ao patógeno mediante formação de ROS, conforme sugerido no trabalho de Wong e colaboradores (2004). Contudo, até agora, não é possível atribuir inequivocamente uma função específica para uma determinada metalotioneína, uma vez que as funções propostas se sobrepõem, se complementam, ou inclusive apresentam resultados contraditórios (FREISINGER, 2008). A característica em comum dos tão diversos estímulos parece ser a elevada produção de ROS resultante da exposição aos diversos estresses, sejam biótico, abiótico ou senescência (ontogenético). A expressão do gene de metalotioneína *LCS54*, previamente identificado como altamente expresso durante a senescência ou morte celular (BUTT et al., 1998), foi intensamente induzido quando folhas de *Arabidopsis* foram tratadas com o inibidor da enzima catalase 3-amino-1,2,4-triazole ou com nitrato de prata (NAVABPOUR, et al., 2003). Nitrato de prata utilizado em combinação com compostos de reconhecida ação contra ROS (ascorbato, tiron e ácido benzóico) não teve efeito sobre a expressão do gene *LSC54*. Esses resultados corroboram a hipótese de que a expressão de genes MTs é induzida pela presença de ROS.

Akashi et al. (2004) fizeram a primeira observação direta de uma proteína MT de plantas com atividade na detoxificação de ROS. *CLMT2* é uma metalotioneína tipo 2 altamente expressa em folhas de melão em resposta aos estresses hídrico e de elevada intensidade de luz. A análise bioquímica, usando a proteína recombinante em ensaios *in vitro*



demonstrou que a proteína *CLMT2* foi capaz de prevenir a degradação de amostras de DNA genômico na presença de radicais hidroxila, constituindo-se de um poderoso agente antioxidante de origem vegetal.

O promotor de um gene é parte essencial na regulação da expressão dos genes, uma vez que contém os sítios de ligação da RNA polimerase assim como também inúmeros sítios de ligação para fatores de transcrição específicos, que por sua vez são ativados sob as mais diversas situações biológicas, tais como, estímulos endógenos (auxinas, giberelinas, ácido salicílico, ácido jasmônico e outros) e estímulos exógenos (luz, pressão, umidade, temperatura). A ação combinatória dos diversos elementos reguladores presentes em regiões promotoras determina a ativação ou repressão da expressão gênica. Os promotores constituem, portanto, uma ferramenta chave em processos biotecnológicos, de modo a garantir que a expressão de um gene de interesse seja efetivamente regulada, na intensidade e local desejado e sob influência de fatores exógenos ou endógenos específicos. A identificação das seqüências promotoras MTs, associados aos perfis de expressão gênica, poderia contribuir a elucidar os complexos eventos regulatórios e função destas proteínas. Além disso, a dificuldade na utilização de promotores efetivos, selecionados para dicotiledôneas em monocotiledôneas (SCHENK et al., 2001), sugere que o conhecimento e obtenção das seqüências promotoras de MTs apresentam grande potencial de aplicação no desenvolvimento de canas transgênicas.

Embora os estudos de expressão gênica providenciem valiosas informações sobre as possíveis funções das metalotioneínas, a estrutura e propriedades das MTs de plantas podem ser elucidadas somente estudando os produtos protéicos. As proteínas MTs não possuem atividade enzimática reconhecida, e a purificação dessa proteína a partir de extratos vegetais tem-se mostrado difícil possivelmente devido à instabilidade e suscetibilidade das metalotioneínas a degradação na presença de oxigênio (MURPHY et al., 1997). Até o presente, apenas nove proteínas de MT foram caracterizadas, sendo que oito delas foram exclusivamente expressas como proteínas recombinantes em *Escherichia coli* (FREISINGER, 2008). Nesse caso a obtenção de proteínas recombinante permitiria a

investigação da função das MTs em ensaios bioquímicos de resposta antioxidante e/ou estruturais de ligação de metais. Por outro lado, a obtenção de anticorpos que possam ser utilizados na detecção de MTs em ensaios de expressão poderiam também, contribuir a elucidação da função destas proteínas

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

O trabalho foi desenvolvido principalmente no Laboratório de Melhoramento de Plantas (LAMP), do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP). Os experimentos com patógeno foram montados nas instalações do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP, e o experimento com herbicida Paraquat foi na casa de vegetação do LAMP no CENA.

### 3.1. Identificação de genes de metalotioneína e análise filogenética

Foi realizada a busca de seqüências dos genes de metalotioneína (MT) tipo 1, 2, 3 e 4 de cana-de-açúcar no banco de dados *Saccharum officinarum Gene Index* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) por meio de palavra-chave (*metallothionein*) ou BLAST, baseando-se nas seqüências dos nove genes para metalotioneína identificados em arroz (WONG et al., 2004). Mais tarde, esses dados foram atualizados usando as 11 seqüências para metalotioneína e a nova classificação, apresentadas por ZHOU et al., (2006). Das seqüências identificadas por BLAST, somente aquelas que apresentaram alta similaridade ( $E\ value \leq 10^{-7}$ ) em relação aos genes de arroz foram selecionadas. As seqüências identificadas de cana-de-açúcar foram traduzidas pelo *ORF Finder* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) ou pelo *BCM Search Launcher six-frame translation* (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-util/seq-util.html>), a partir da identificação do melhor quadro de leitura, e confirmado por análise de BLAST gerado no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). O programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) foi utilizado para o alinhamento das seqüências de cana-de-açúcar e arroz. As análises filogenéticas foram realizadas no *MEGA version 4.02* (TAMURA et al., 2007) por máxima parcimônia.

### 3.2 Clones de EST

A partir da seqüência consenso dos genes MTs de cana-de-açúcar, foram escolhidos clones de EST no banco de dados de *Saccharum Gene Index* (TIGR). Foram selecionados cinco clones de genes codificadores de metalotioneínas, sendo dois do tipo 1, dois do tipo 2 e um do tipo 3, do Centro Brasileiro de Estocagem de Genes (BCCC- *Brazilian Clone Collection Centre*, Jaboticabal - SP) [Tabela 1]

Após o recebimento, as colônias isoladas da placa de cada clone foram transferidas para 5 mL de meio líquido Luria-Bertani (meio LB) [10 g L<sup>-1</sup> triptona; 10 g L<sup>-1</sup> NaCl; e 5 g L<sup>-1</sup> extrato de levedura] adicionado de 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, e mantidas sob agitação constante de 150 rpm à 37°C durante aproximadamente 16 h. Em seguida 1,5 mL do meio foi submetido à centrifugação por 1 min a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado, e esse procedimento repetido por mais uma vez para aumentar o rendimento da mini-preparação, seguindo o protocolo de extração de DNA plasmidial por lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). O precipitado de células foi totalmente ressuspendido em 200 µL de Solução I (50 mM glucose; 25mM Tris-HCl pH 8,0 e 10 mM Na<sub>2</sub>.EDTA pH 8,0) com a ajuda do vortex e incubado a temperatura ambiente por 10 min. No próximo passo foi acrescentado 200 µL de Solução II (0,2 M NaOH e 1,0% SDS), misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min. A seguir, foi acrescentado 150 µL de Solução III (3 M KOAc pH 5,5), também misturado por inversão e incubado no gelo por 5 min. Posteriormente, foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 10 min. Após a mesma, o sobrenadante foi transferido para outro tubo, onde foi adicionados 500 µL de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e novamente centrifugado por 1 min. A fase aquosa superior foi transferida para um novo tubo, adicionado 1 mL de 100% etanol, misturado por inversão e incubado a -20°C por aproximadamente 30 min. Depois de incubado, o precipitado foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e o líquido sobrenadante foi descartado. Foi realizada a lavagem do precipitado com 500 µL de 70% etanol e novamente centrifugado a 12.000 g por 5 minutos. O precipitado (DNA plasmidial)

foi deixado à temperatura ambiente até a secagem, e posteriormente ressuspenso em 30  $\mu\text{L}$  de TE (10 mM Tris HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) com RNase (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O DNA plasmidial foi verificado por eletroforese em gel de 0,8% agarose em tampão SB (10 mM NaOH pH 8,5; ajustado com ácido bórico) [BRODY; KERN, 2004] a 3 V  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram coradas com SYBR *Gold Nucleic Acid Gel Stain* 10X (0,25% azul de bromofenol; 0,25% xilenocianol; e 15% ficoll tipo DL) e visualizadas com luz ultravioleta (302 nm). A aquisição da imagem do gel foi feita com câmera digital e documentada com programa Kodak Digital Science 1D (Kodak, Japão). A quantificação foi feita com fluorômetro *DyNA Quant 200*. Após a confirmação da integridade do DNA plasmidial, a identidade dos clones MTs foi confirmada por seqüenciamento usando os iniciadores universais T7 e SP6

Tabela 1 - Descrição dos clones selecionados a partir da identificação dos genes de MT de cana-de-açúcar; listados com suas respectivas siglas do TC (*Tentative Consensus*); clone de *EST*; e tamanho estimado (pb).

METALOTIONEÍNA	TC	Clone	pb
SoMT1a	TC48237	SCSFHR1044C11.g	657
SoMT1b	TC48217	SCQGST1032D09.g	1.028
SoMT2a	TC48398	SCRUFL3063A10.g	513
SoMT2b	TC48485	SCACHR1035F08	693
SoMT3	TC57180	SCSGHR1071G06	417

### 3.2.1 Sequenciamento

O sequenciamento dos diversos segmentos de DNA obtidos ao longo de todo o trabalho de tese foi conduzido por meio de protocolos padronizados (<http://sucest.lad.dcc.unicamp.br/en/Downloads>), consistindo basicamente na extração do DNA plasmidial por lise alcalina, reação cíclica de sequenciamento (*DyEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Biosciences*), precipitação alcoólica dos produtos da reação, ressuspensão em tampão específico contendo formamida e em seguida, sequenciamento automático no Analisador Genético ABI-3100 (Applied Biosystems, Foster City, CA. EUA). O sequenciamento feito foi conduzido com a colaboração da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Siu Mui Tsai no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA-USP e do Dr. Rodrigo Rocha Latado no Instituto Agrônomo de Campinas, (IAC), Cordeirópolis, SP.

Em detalhe, a reação de sequenciamento foi realizada em volume final de 10 µL contendo 100 ng de DNA plasmidial; 2 µL de 2,5X tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9.0; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O); 2 µL do kit *DyEnamic<sup>TM</sup> ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham *Biosciences*); 0,25 µM do iniciador universal T7 (*forward*) ou SP6 (*reverse*). O perfil de amplificação consistiu de 30 ciclos de 20 s a 95°C; 15 s a 50°C; 1 min a 60°C, finalizando com 10 min a 4°C. Os produtos amplificados foram precipitados com 60 µL de 100% etanol e 2 µL de 3 M acetato de sódio, centrifugados por 15 min a 8.000 g a 4°C, seguido por lavagem com 150 µL de 70% etanol, centrifugado novamente por 15 min e a secagem do *pellet* foi realizada a 37°C por 1 h. O precipitado foi então ressuspensionado em tampão de sequenciamento (80% v/v formamida deionizada; 20% *loading buffer*) para análise em seqüenciador automático ABI-3100 *Genetic Analyzer*.

Os cromatogramas gerados foram examinados para qualidade no programa *Chromas Lite* v.2.01 e presença de vetor com a ferramenta *VecScreen* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>). As seqüências resultantes foram

submetidas à busca por similaridade no NCBI (*Blastn*) para a confirmação de que se tratava do gene de interesse.

### 3.3 Caracterização da presença e distribuição de éxons / íntrons dos genes *SoMTs*

Para a identificação e caracterização dos éxons / íntrons dos genes *SoMTs* foram desenhados iniciadores correspondentes aos genes de metalotioneína tipo 1: TC48237 e TC48217; MT tipo 2: TC48398 e MT tipo 3: TC57180 (Tabela 2) baseado na sequência correspondente dos clones ESTs (Tabela 1). Mais tarde, os iniciadores utilizados em outras abordagens dentro do trabalho (expressão gênica por RT-qPCR e expressão heteróloga) foram também utilizados em diferentes combinações para este fim (Tabelas 4 e 6). Em todos os casos os iniciadores foram desenhados usando o programa *\_Primer3*, ajustado com os parâmetros padrão. Em seguida, o programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer>) permitiu selecionar aqueles com as melhores características. Os iniciadores foram utilizados em ciclos de amplificação com o cDNA e DNA genômico total da cultivar SP 80-3280, e clones ESTs como molde. As reações de PCR foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCRSystem 9700* (Applied Biosystems). O volume total padrão das reações de amplificação foi de 25 µL; adicionando-se 1 µL do DNA molde; 0,2 mM de dNTPs; 0,2 µM de cada iniciador; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1 U da enzima Platinum *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado. A amplificação foi conduzida inicialmente a 94°C por 4 min; seguido de 40 ciclos de 94°C por 40 s, 57°C por 40 s, e 72°C por 60 s; finalizando a 72°C por 7 min.



Tabela 2 – Iniciadores desenhados e utilizados especificamente para caracterização da presença e distribuição de éxon / íntron dos genes *SoMTs* de cana de açúcar. O TC (*Tentative consensus*) correspondente e o tamanho esperado baseado na seqüência de EST são apresentados.

Gene (tipo)	Nome iniciador	Seqüência	Tentative consensus	pb
MT tipo 1	SoMT1-5'	For 5' AAGTACCCTGACCTGGAGGAG	TC48237	147 pb
		Rev 5' TGCATATCATCGGTCTTCGTT	TC48217	144 pb
	SoMT1-interno	For 5' AAGTACCCTGACCTGGAGGAG	TC48237	208 pb
		Rev 5' TGCATATCATCGGTCTTCGTT		
MT tipo 2	SoMT2-5'	For 5' GCGAGCTTCGTGTTCTTGTT	TC48398	182 bp
		Rev 5' TGATGAGAGTCTGGGTGGTG		
MT tipo 3	SoMT3-5'	For 5' ACAAAGCTCGACCGTACCAA	TC57180	167 bp
		Rev 5' TCCTCCTCAACGATCTCCAC		
	SoMT3-maior	Rev 5' AGGCAACACAACACACCGTA		474 pb

### 3.3.1 Extração de DNA

Foram utilizadas folhas novas da cultivar SP80-3280 crescidas no campo do CTC. O DNA foi extraído mediante protocolo de extração de DNA para cana-de-açúcar proposto por Al-Janabi, Forget e Dookun (1999). A concentração do DNA total foi quantificada usando fluorômetro DyNA Quant 200 e/ou eletroforese em gel de 0,8% agarose em tampão TAE (40 mM Tris-acetato; 1 mM EDTA).

### 3.3.2 Extração de RNA

As extrações de RNA total foram feitas seguindo as recomendações básicas do fabricante do reagente TRIzol (Invitrogen) que consiste em uma solução monofásica de

isotiocianato de guanidina / fenol. Cerca de 350 mg de tecido fresco de folhas e raízes da cultivar SP 80-3280 foram pulverizado em cadinhos na presença de nitrogênio líquido. Foram tomados todos os cuidados necessários visando manter a integridade do RNA, tanto no processo de extração como nos passos seguintes. Para tanto, todos os utensílios utilizados foram previamente tratados com água ultrapura (Milli-Q) estéril adicionada de 0,01% dietilpirocarbonato (DEPC) e submetidos à esterilização em autoclave por 40 min a 120°C e 1 atmosfera de pressão. Cada amostra foi macerada com a adição de 5% polivinilpolipirrolidona (PVPP), mantida em nitrogênio líquido e em seguida adicionada de 1 mL de Trizol® (Invitrogen), submetendo-se à agitação em vórtex por 30 s. O extrato foi homogeneizado e incubado por 5 min a temperatura ambiente, para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Em seguida centrifugado a 12.000 g por 10 min a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em uma fase inferior vermelha (fase fenol:clorofórmio), interfase e a fase aquosa superior incolor. A fase aquosa foi transferida para um tubo novo, onde foram acrescentados 200 µL de clorofórmio, que foi emulsificado mediante leve agitação, seguido de incubação a temperatura ambiente por 5 min. A emulsão foi então centrifugada a 12.000 g por 15 min a 4°C; e o sobrenadante transferido novamente para um novo tubo onde o RNA foi precipitado com 500 µL de isopropanol, por 30 min a -20°C. Seguiu-se uma centrifugação nas mesmas condições, sendo o sobrenadante descartado cuidadosamente e adicionando-se ao precipitado (*pellet*) 1 mL de 75% etanol gelado preparado com água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC, passando por nova agitação e centrifugação a 7.500 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram mantidas em temperatura ambiente até a secagem total, e então foram ressuspensas em 50 µL de água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC e mantidas em freezer a -80°C. O diagnóstico da qualidade das amostras foi feito em gel 1,2% agarose em tampão SB. Para a determinação da concentração e pureza do RNA total extraído, uma alíquota de 2 µL foi retirada para leitura da densidade óptica no espectrofotômetro *Smartspech 3000* (BioRad, Hercules, CA, EUA) em 260 nm e razão de 260/280 nm, respectivamente.

### 3.3.2.1 Tratamento com *DNase I*

Depois da quantificação, cerca de 5 µg do RNA extraído de cada amostra foi submetido a tratamento com a enzima *DNase I* (Fermentas Life Sciences) para remoção total de DNA genómico das amostras. Para tanto, seguiu-se as especificações do fabricante utilizando-se 1 U de *DNase I* acrescida de tampão apropriado, 20 U de *RNAseOut* (Invitrogen) e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final da reação de 10 µL. O tubo foi incubado no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (a 37°C por 30 min. Em seguida foi adicionado 1 µL de 25 mM EDTA e incubado 65°C por 10 min para a inativação da enzima.

### 3.3.3 Síntese de cDNA

A síntese da primeira fita de cDNA foi realizada utilizando-se cerca de 5 µg do RNA tratado com *DNase I*, seguindo as especificações do *kit Improm-II Reverse Transcriptase* (Promega). O RNA foi adicionado de 500 ng do iniciador oligo-dT (18 pb), desnaturado a 70°C por 10 min e depois resfriado a 4°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado 3 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,5 mM de dNTPs; 20 U de *RNAseOut* (Invitrogen); 200 U da enzima *Improm-II Reverse Transcriptase* em tampão apropriado; e água ultrapura (Milli-Q) estéril tratada com 0,01% DEPC para um volume final da reação de 20 µL. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* nas seguintes condições de termociclagem: 25°C por 5 min, 42°C por 60 min e 70°C por 15 min; depois armazenada a -20°C.

### 3.3.3.1 Avaliação da qualidade do cDNA por PCR

O cDNA assim obtido foi testado em ampliações por amplificação enzimática gene-específica para o gene constitutivo *rp/35-4* de cana-de-açúcar. As condições da reação foram às seguintes: 1X solução tampão (20 mM de Tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl), 2 mM  $MgCl_2$ ; 0,2 mM dNTPs; 0,25  $\mu$ M de cada iniciador específico; 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) para um volume final de 25  $\mu$ L. A amplificação foi realizada em um ciclo de 4 min a 94°C, seguido de 40 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s a 60°C e 1 min a 72°C e uma extensão final de 8 min a 72°C. Os produtos da PCR foram separados eletroforicamente em gel de 1,2% agarose em tampão SB 1X.

### 3.3.4 Clonagem, transformação gênica e sequenciamento.

Os produtos de amplificação das seqüências gênicas a partir de cDNA e DNA genômico total da cultivar 'SP80-3280', e clones ESTs foram separado eletroforicamente em gel de 1,2 % agarose - tampão SB a 3 V  $cm^{-1}$ . Após a separação, a banda obtida foi isolada com o auxílio de um bisturi estéril e purificada usando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences), seguindo as recomendações do fabricante. Verificou-se a integridade do produto purificado, submetendo o mesmo novamente à eletroforese em gel de 1,2% agarose em tampão SB a 3 V  $cm^{-1}$ . Após a quantificação em fluorômetro *DyNA Quant 200*, foi realizada a ligação do fragmento purificado no vetor de clonagem *pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit* (Promega). A ligação foi mantida a 4°C por 16 h. Após esse período, 2  $\mu$ L da ligação foram transferidos para um tubo contendo 40  $\mu$ L células competentes de *E. coli* DH10B. Em seguida, as bactérias foram transformadas utilizando-se um eletroporador modelo *Micropulser* (BioRad) e cubetas de 0,1 mm. Foi aplicado um pulso de corrente elétrica de 1,8 kV durante 3,4 s. Logo em seguida, foi adicionada à cubeta 1 mL de meio SOC (2 g  $L^{-1}$  de triptona; 0,5 g  $L^{-1}$  de extrato de levedura;

1 mM NaCl; 0,25 mM KCl; 2 mM Mg<sup>2+</sup>; 2 mM glicose), que após a transferência para um tubo foi mantidas durante 1 h em agitação constante a 37°C. Um volume de 100 µL de célula foi plaqueado em meio sólido LB contendo 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina; adicionado de 80 µL de 100 mM IPTG (isopropil β-thiogalactopiranosidae); e 20 µL de 120 mM X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosideo) para selecionar colônias brancas (com inserto) de colônias azuis transformadas com vetor sem inserto. As placas foram mantidas a 37°C por 16 h. As colônias brancas isoladas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB com 100 µg mL<sup>-1</sup> de ampicilina, e mantidas em agitação constante a 37°C durante aproximadamente 15 h. Após o crescimento das bactérias, 3 mL do volume foi submetido a protocolo de lise alcalina para obtenção de plasmídeo como relatado acima. Para a verificação do DNA plasmidial, foi realizada uma eletroforese em gel de 0,8% agarose em tampão SB. A confirmação da integridade do DNA plasmidial foi feita por eletroforese e a identidade das seqüências de *SoMTs* foram confirmadas por sequenciamento usando os iniciadores universais T7 / SP6. Os cromatogramas gerados foram examinados, para qualidade e presença de vetor e as seqüências resultantes foram submetidas a alinhamento usando o programa ClustalW (<http://align.genome.jp/>) para caracterização da distribuição èxons / ìntrons dos genes.

### **3.4 Clonagem da região promotora dos genes *SoMTs* mediante a técnica *Genome walking***

Para clonar a região 5' flanqueadora dos genes de metalotioneína: *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3*, foi utilizada a técnica de Zhang e Gurr (2000). A técnica consiste em usar iniciadores específicos para região codante (*reverse*) em combinação com iniciadores para adaptadores em sítios de restrição enzimática (*forward*). Os iniciadores específicos que ancoram dentro da região codante dos genes *SoMTs* foram

desenhados baseados na seqüência de clones ESTs dos TCs correspondentes (Tabela 1), usando o programa Primer 3 ([http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)). Os iniciadores arbitrários foram os mesmos relatados por Zhang e Gurr (2000) [Tabela 3].

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para clonagem da região promotora dos genes MTs, mediante *Genome walking* baseados no protocolo de Zhang e Gurr, (2000).

Tipo	Nome do Iniciador	Seqüência
Adaptador	Pad1	5'GTAATACGACTCACTATAGGGGCACGCGTGGTGGCC
	PPR1	PO <sub>4</sub> -CTAGGGCCACCACG-NH <sub>2</sub>
Iniciador de adaptador	PP1	5'GTAATACGACTCACTATAGGGC
	PP2	5'ACTATAGGGCACGCGTGGT
MT tipo 1	SoMT1a-R1	5'TGTGGTGCAAGAACGAAGAAGCTCAAGA
	SoMT1a-R2	5'ATCTACCAAAGGGCGTCTTACAAAGTCGTT
	SoMT1b-R1	5'AAGACATCCTTGTTTTGTGGTGCAGAGAA
	SoMT1b-R2	5'TCTACCAAAGGGCGTCTTACAAAGTCGTCT
MT tipo 2	SoMT2a-R1	5'ACATCCTCCTCCTCGCAGTCGTCC
	SoMT2a-R2	5'CTTCCTCCTCGCAAACAAGAACACG
	SoMT2b-R1	5'GATCACAGGCGAAGGGAGCAGGTG
	SoMT2b-R2	5'TTTGCTACTGAAAGAAGAGGGTGTTGCC
MT tipo 3	SoMT3-R1	5'TGGGTCTTGTCACGCAGTCGCAGT
	SoMT3-R2	5'GACACAGAGAGGGTCTTGGTACGGTCG

### 3.4.1 Genome walking

Alíquotas de 1 µg de DNA de cana-de-açúcar foram clivadas individualmente com as enzimas de restrição (*NheI*, *SpeI* e *XbaI*) em 50 µL de tampão apropriado para cada enzima. Após 12 h de digestão a 37°C, o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio e precipitado com isopropanol. O adaptador Pad1:PPR1 (100 pmoles) foi ligado aos fragmentos de DNA digeridos (1 µg) [Zhang e Gurr, 2000] em volume final de 25 µL, na presença do tampão de ligação, 6 U de T4 ligase e 6 U de enzima de restrição *AvrII*. As ligações foram feitas em termociclador com a seguinte configuração de ciclos: seis ciclos de 12°C por 60 min, e 25°C por 20 min, seguido de um ciclo a 8°C por 120 min. Em seguida, as ligações foram

interrompidas a 70°C por 6 min, e adicionados 180 µL de TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM EDTA). O volume de 1 µL de cada reação de ligação foi utilizado para realização da amplificação primária por PCR (PCR-1). A PCR-1 foi feita em solução contendo 1 X tampão PCR (20 mM Tris-HCl pH 8,4; e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,3 mM dNTPs; 10 pmol do iniciador PP1 do adaptador 1; e 10 pmol do iniciador específico para metalotioneína (SoMT-R1) [Tabela 3]. Para *SoMT1a* e *SoMT1b* os seguintes ciclos de amplificação foram usados: 3 ciclos de 2 s a 94°C e 3 min a 72°C; 3 ciclos de 2 s a 94°C e 3 min a 70°C; 3 ciclos de 2 s a 94°C e 3 min a 68°C; 26 ciclos de 2 s a 94°C, 20 s a 66°C e 3 min a 68°C; e uma extensão final por 8 min a 68°C. Para *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3*, a termociclagem seguiu idêntico formato de ciclos mas a temperatura de anelamento dos iniciadores nos primeiro 3 ciclos foi de 70°C por 3 min, caindo 2°C até 64°C, seguido de 26 ciclos de 2 s a 94°C, 20 s a 64°C e 3 min a 68°C; e uma extensão final por 8 min a 68°C. Os produtos da reação PCR-1 foram diluído 5 vezes em TE, e 2 µL eram então usados na reação secundária (PCR-2). A reação PCR-2 foi realizada com o mesmo perfil da reação 1 mudando apenas os iniciadores dos adaptadores e do gene-específico (PP2 e SoMT-R2) [Tabela 3]. A figura 1 exemplifica o processo. Os produtos da PCR-2 foram separados por eletroforese em gel de 1% agarose e as bandas mais abundantes de tamanhos entre 700 e 2.000 pb foram purificadas com kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences), e clonadas no vetor *pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit* (Promega) para sequenciamento a partir de ambos os extremos, usando os iniciadores universais T7 / SP6.

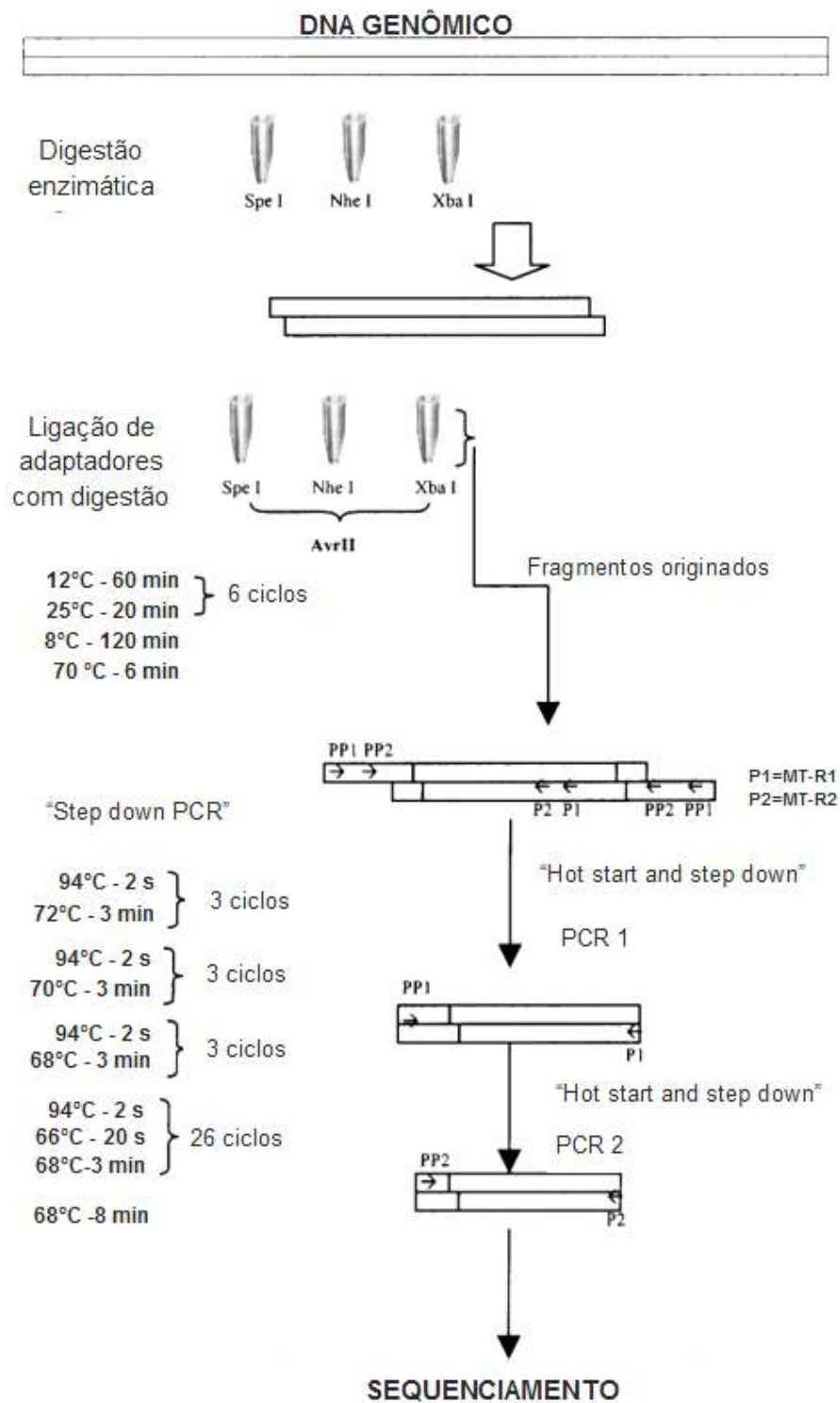


Figura 1 - Esquema simplificado dos passos necessários para obtenção de fragmentos de DNA relativos á região promotora (Adaptado de Zhang; Gurr, 2000).



### **3.4.2 Caracterização das seqüências promotoras**

Os fragmentos clonados foram seqüenciados, e suas seqüências analisadas pelo programa *MatInspector professional* (<http://www.genomatix.de>) [CARTHARIUS et al., 2005], que busca motivos regulatórios na seqüência em questão por comparações com uma biblioteca contendo sítios de ligação a fatores de transcrição encontrados em promotores de plantas. Adicionalmente, os bancos de dados PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) [HIGO et al., 1999] e PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant-care>) [LESCOT et al., 2002] foram também utilizados para confirmar e/ou encontrar outros motivos regulatórios.

## **3.5 Análise da expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR).**

### **3.5.1 Desenho de iniciadores específicos para RT-qPCR e validação mediante amplificação dos clones de EST**

Iniciadores específicos para serem utilizados em análise de expressão gênica por RT-qPCR (Tabela 4) foram desenhados a partir das seqüências dos TCs correspondentes a cada um dos cinco genes *SoMT* identificados (Tabela 1). Reações de amplificação foram realizadas para comprovar a especificidade de cada par de iniciador com seu respectivo gene. O volume total da PCR foi de 25 µL contendo 5 ng de DNA plasmidial; 0,2 mM de dNTPs; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,2 µM de cada iniciador; 1 U de enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) em tampão apropriado. A termociclagem foi conduzida a 94°C por 4 min;

seguido de 40 ciclos de 94°C por 40 s, 60°C por 40 s e 72°C por 60 s; e finalizando a 72°C por 7 min. O produto da PCR foi separado por eletroforese em gel de 1,5 % agarose em tampão SB a 3 V cm<sup>-1</sup>. Em seguida, uma réplica da PCR foi corrida em gel 1% em tampão TAE para recuperação dos fragmentos. A purificação foi feita usando o kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences), seguido de clonagem no vetor *pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit* (Promega), transformação e sequenciamento como descrito previamente.

Tabela 4 - Iniciadores para amplificação dos genes de metalotioneína dos tipos 1, 2 e 3, de cana-de-açúcar a partir dos TCs (*tentative consensus*) correspondentes.

Gene (tipo)	Nome iniciador	Seqüência	Tentative consensus	Tamanho esperado (pb)
MT tipo 1	SoMT1a	For 5'ATGCATGCTGCTGCTTATTG	TC48237	209
		Rev 5'CGTACAAGGGCAGAGAATGA		
MT tipo 1	SoMT1b	For 5'TGCAACTGCTGATCCTATCG	TC48217	305
		Rev 5'CCCTGGACGCAAATTAAG		
MT tipo 2	SoMT2a	For 5'CCGTGATGAGGAAGGAGATACA	TC48398	139
		Rev 5'CGTTCCCATCAGTACCACCAC		
MT tipo 2	SoMT2b	For 5'ACGAGGAGGAAGGAGGAGAC	TC48485	143
		Rev 5'GTTGAGATGAACCCAGGAG		
MT tipo 3	SoMT3	For 5'GTGCGGCAACTGCGACTG	TC57180	118
		Rev 5'CACGGTCACCTCCTCCTCAA		

### 3.5.2 Ensaio para determinar a expressão basal de *SoMTs* em diversos tecidos/órgãos

A expressão gênica basal dos genes *SoMTs* foi investigada em cinco tecidos/órgãos de cana-de-açúcar. As plantas de cana-de-açúcar foram obtidas no CTC de Piracicaba, SP. Os

tecidos/órgãos avaliados foram: colmo (C), inflorescência (I), limbo foliar (L), meristema (M) e raiz (R). As amostras foram coletadas de plantas cultivadas sem nenhum tratamento. Amostras do meristema foram obtidas da cultivar 'SP87-432'; de colmo da F1 derivada do cruzamento entre as cultivares 'SP80-180 x SP 80-4966'; e as amostras de inflorescência, limbo foliar e raiz foram coletados da cultivar 'SP80-3280'. As amostras vegetais foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de RNA total e síntese de cDNA como descrito previamente.

As reações de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas no volume final de  $10\ \mu\text{L}$ , utilizando-se  $1\ \mu\text{L}$  do cDNA na diluição 1:10 (v:v),  $0,15\ \mu\text{M}$  a  $0,50\ \mu\text{M}$  de cada iniciador, dependendo da eficiência de cada par,  $5\ \mu\text{L}$  de *2x Platinum SYBR green qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). A amplificação foi conduzida em termociclador *RotorGene 3000* (Corbett Research, Austrália), em 1 ciclo a  $50^{\circ}\text{C}$  por 2 min, 1 ciclo a  $95^{\circ}\text{C}$  por 2 min e 40 ciclos a  $95^{\circ}\text{C}$  por 15 s e  $60^{\circ}\text{C}$  por 30 s, com detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Após a termociclagem, foram determinadas as curvas de dissociação de cada produto amplificado entre  $72^{\circ}\text{C}$  e  $95^{\circ}\text{C}$  (curva de *melting*). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas mais o controle negativo (água ultrapura) em duplicata. A eficiência de amplificação de cada par de iniciadores foi determinada por curva padrão com 3 diluições seriais do pool de cDNA ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) e pelo coeficiente  $R^2$  resultante. A ausência de dímeros de iniciadores foi verificada em análise da curva de *melting* e em eletroforese dos produtos em gel de 1,2% agarose. A aquisição dos dados em tempo real é efetuada com o programa *RotorGene Real-Time Analysis 6.1* (Corbett Research, Austrália), o qual fornece os valores de ciclo-limite de leitura (Ct, ou *cycle threshold*), eficiência da PCR (E) e coeficiente  $R^2$ . As eficiências dos iniciadores ficaram entre 98%-102% e foi considerada de 100% para análise estatística. De forma geral, o limite de detecção da fluorescência (*threshold*) foi estabelecido em torno de 5%, ajustado de forma automática, pelo programa *Rotor Gene* para o melhor *threshold*. Para a normalização da expressão gênica em cada uma das amostras analisadas, calculou-se a variação quantitativa de expressão dos genes de MT (alvo) de

forma relativa ao gene referência. Assim, com o auxílio do programa *GeNorm* <http://www.gene-quantification.de/bestkeeper.html> (VANDESOMPELE et al., 2002), o gene de referência ideal para ser utilizado na normalização dos dados foi estabelecido. Para isto foi investigada a estabilidade de seis genes candidatos: (Tabela 5) submetendo-se cada um deles a ciclos de amplificações quantitativas de um *pool* de amostras de cada tecido/órgão na diluição 10<sup>-1</sup>.

Tabela 5 - Genes de referência candidatos a normalizadores da expressão dos genes SoMT de cana-de-açúcar. Os iniciadores para o gene *gapdh* foram propostos por Iskandar et al. (2004). O gene *rpl35-4* foi relatado por Calsa e Figueira (2007). Os iniciadores para os genes *actina*, *tubulina*, *Ubiquitina 1* e *Ubiquitina 2* foram utilizados por Almeida (2007).

Gene	Seqüência	Tentative consensus	Tamanho esperado (pb)
gapdh	For 5'CCGTCAACGACCCCTTCAT Rev 5'GCAGCCTTGTCTTGTCTCAGT	TC64714	236
rpl35-4	For 5'CTGAAGACGGAGAGGGAAAA Rev 5'GGCGAAGAGAACTAACAC	TC57186	264
actina	For 5'CTCAACCCCAAGGCTAACAG Rev 5GGCATGAGGAAGGGCATAA	TC23717	195
tubulina	For 5'CTCCACATTCATCGGCAACTC Rev 5TCCTCCTCTTCTTCCTCCTCG	TC48524	103
ubiquitina 1	For 5'AGCCTCAGACCAGATTCCAA Rev 5AATCGCTGTCGAACTACTTGC	TC56495	158
ubiquitina 2	For 5'CTTCTTCTGTCCCTCCGATG Rev 5'TCCACCCAACTGCTGCTC	TC56667	159

### 3.5.3 Ensaio para promover estresse oxidativo

#### 3.5.3.1 Experimento com doses de cobre

Plântulas da cultivar SP-3028 de cana-de-açúcar, cedidas pelo Instituto Agronômico de Campinas (IAC) [Campinas-SP], em fase de enraizamento, foram mantidas em vidros estéreis com meio MSIII (MURASHIGE; SKOOG, 1962) em sala aclimatada para 28°C e fotoperíodo de 12 h. O experimento consistiu em uma amostra controle (sem metal) e dois tratamentos: 100 e 500 µM de cobre. As coletas foram feitas em triplicata no período de 6; 24; 48; e 96 horas após a imposição do tratamento com o metal, sendo que cada uma das replicatas consistiu de um *pool* do material contido em três vidros com aproximadamente 4 plântulas cada um. Os tecidos, separados em raízes e parte aérea, foram armazenados a -80°C. As reações de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas como descrito previamente no item 3.5.2.

#### 3.5.3.2 Experimento com dose de herbicida Paraquat

Plantas da cultivar SP80-3280 de cana-de-açúcar do CTC de Piracicaba-SP, foram crescidas em vasos de 3 L com substrato comercial (*Plantmax*, *Eucatex*) e tratadas com 200 g L<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup> de herbicida paraquat (*N,N'*-Dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride), produto comercial *Gramoxone Syngenta*, na casas-de-vegetação do LAMP, CENA. Amostras de folhas de cana-de-açúcar foram obtidas em triplicatas para cada tratamento (com e sem paraquat), aos 15 min, 6 e 24 h após aplicação do herbicida. A aplicação foi feita considerando o equivalente a ½ dose de herbicida para tratamento a campo e as plantas foram localizadas sob luz solar direta para permitir a incorporação do herbicida pelas folhas. Cada replicata consistiu de uma mistura de folhas originárias de 5 plantas. O material foi

congelado em nitrogênio líquido e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As reações de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas como descrito previamente no item 3.5.2.

#### **3.5.4 Ensaios com patógenos**

Plântulas das cultivares ‘SP78-4467’ e ‘SP82-1176’ de cana-de-açúcar, consideradas suscetíveis e resistentes, respectivamente ao agente causal da “escaldadura”, a bactéria *Xanthomonas albilineans*, foram inoculadas com caldo de plantas apresentando a doença, diretamente no palmito. Os controles foram plantas de ambas as cultivares não inoculadas. Por outro lado, plantas das cultivares ‘SP70-1143’ e ‘RB72-454’ consideradas suscetíveis e resistentes, respectivamente ao fungo da ferrugem, *Puccinia melanocephala*, foram espanadas com folhas de cana apresentando a doença, já em estágio de esporulação. Os controles foram plantas das mesmas cultivares espanadas com folhas saudáveis. As coletas de material vegetal (parte aérea de ambos os experimentos) foram feitas aos 15 min; 4; 8; 24; 48; 96 e 240 h após a imposição dos tratamentos congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . As plantas foram mantidas até aparecimento dos sintomas das doenças. As quatro cultivares foram gentilmente cedidas pelo CTC e os ensaios montados nas casas de vegetação de tal centro com colaboração da Dra. Sabrina Moutinho Chabregas e da Dra. Cristina Falco. As reações de amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR) foram realizadas como descrito previamente no item 3.5.2.

#### **3.5.5 Análise estatística da expressão por RT-qPCR**

O significado estatístico da expressão diferencial dos cinco genes *SoMTs* investigados nos diversos experimentos foi determinado calculando o intervalo de confiança

de 95% para as três replicatas biológicas. Toda a análise foi baseada na estatística utilizada por Willems et al. (2008), fornecida através de planilhas de *Microsoft Excel* no material suplementar do artigo. Resumidamente, os dados de nível de expressão dos genes MTs foram normalizados pelo gene *rp135-4* escolhido como gene de referência, e este valor foi submetido a uma série de correções seriais que incluem **transformação logarítmica, centralização na média; auto-escalar os dados** e mais um passo extra de multiplicação de todas as replicatas biológicas pela média do desvio padrão do experimento. A transformação logarítmica reduz o efeito dos *outliers* (aqueles valores que se afastam demais da média), atribuindo igual peso a todos os dados. Centralização da média permite equalizar as médias experimentais, e consiste em calcular a média de cada replicata biológica e subtraí-la de cada valor individual dentro de cada grupo. Auto-escalar significa centralizar os dados na média, e dividí-los pelo respectivo desvio padrão experimental, equalizando assim o desvio padrão de cada replicata biológica. O passo extra de multiplicar pela média dos desvios de todas as replicatas, permite que o valor de expressão obtido reflita o valor experimental original preservando as quantidades relativas que foram transformadas logaritmicamente.

### **3.6 Produção heteróloga de metalotioneínas em *Escherichia coli***

#### **3.6.1 Seleção de vetor de expressão e desenho de iniciadores**

Baseado na seqüência dos clones EST de cana-de-açúcar dos genes de metalotioneínas dos tipos 1, 2 e 3 (Tabela 1), foram desenhados iniciadores específicos para expressão heteróloga, capazes de amplificar desde o ATG inicial até o códon de final de parada de cada proteína (Tabela 6). Cada iniciador foi adicionado de seqüência para sitio

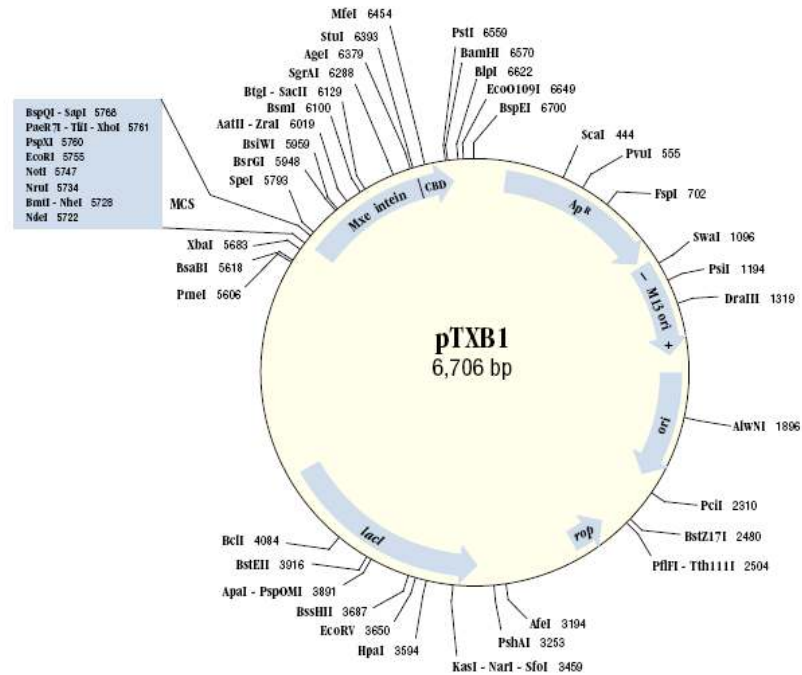
de corte enzimático para permitir a clonagem em vetor de expressão apropriado, assim como também de nucleotídeos extras para facilitar a ligação e corte das enzimas de restrição (Tabela 6). O desenho dos iniciadores foi feito seguindo instruções do manual de vetor de expressão pTXB1 do kit IMPACT (*Intein Mediated Purification with an Affinity Chitin-binding Tag*) [BioLabs, New England Labs]. A figura 2 mostra o plasmídeo pTXB1 utilizado. As proteínas-alvo são fusionadas a uma proteína, micro-inteína modificada, que pode ser purificada por afinidade numa coluna de quitina. Na presença de DTT, a inteína é capaz de clivar a proteína alvo liberando-a para o meio, onde é facilmente eluída e coletada numa fração para posterior análise em SDS-PAGE. Para permitir a clonagem direta em quadro de leitura com a enzima inteína os fragmentos foram amplificados e um sítio de corte para enzima *NdeI* foi adicionado na extremidade 5' do gene. Na extremidade 3' foi adicionado um sítio de corte para enzima *SpeI* no caso do gene *SoMT1a* (TC48237) e *SapI* em *SoMT2a*, *SoMT2b*, *SoMT3*. Outros requerimentos foram devidamente atendidos para que nenhum aminoácido extra fosse adicionado ao final da proteína MT expressa. A tabela 5 mostra a seqüência e nome dos iniciadores assim como o tamanho dos fragmentos esperados.

Tabela 6 - Iniciadores para expressão heteróloga dos cinco genes *SoMTs* de cana-de-açúcar em *Escherichia coli*

Gene	Iniciadores	Seqüência	Amplicon (pb)
MT tipo 1	SoMT1a-ATG/TCA	For 5'ggtggtcatatgTCTTGCAGCTGCGGATC	228
		Rev 5'ggtggttactagttcgGCAGTTGCAGGGGTTGC	
MT tipo 2	SoMT2a-ATG/TCA	For 5'ggtggtcatatgTCGTGCTGCGGAGGCAA	246
		Rev 5'ggtggttgctcttccgcaCTTGCAGGTGCAGGGGT	
MT tipo 2	SoMT2b-ATG/TCA	For 5'ggtggtcatatgTCTTGCTGCAACGGCAA	249
		Rev 5'ggtggttgctcttccgcaGTTGCAGCTGCAGCAGG	
MT tipo 3	SoMT3-ATG/TCA	For 5'ggtggtcatatgTCGGGCACGTGCGGCAA	198
		Rev 5'ggtggttgctcttccgcaCTTGCCGAGCTGCAGC	



A)



B)

pTXB1

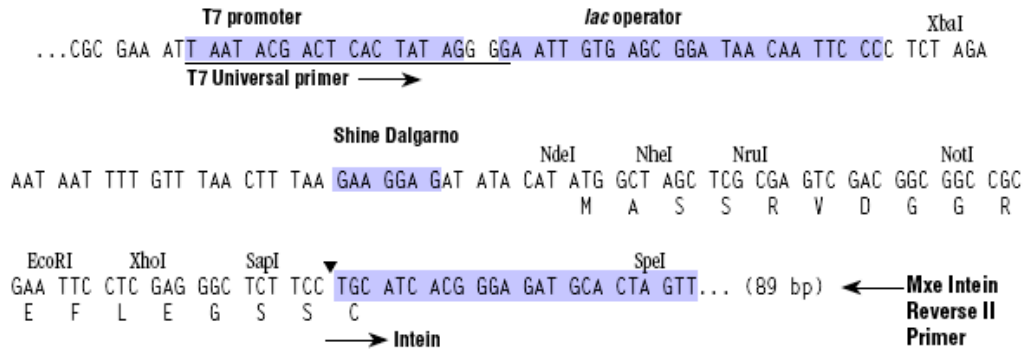


Figura 2 – A) esquema do plasmideo pTXB1 utilizado para expressão heteróloga dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar em *Escherichia coli*. B) Detalhe da região de clonagem em quadro de leitura com a proteína inteína.

### 3.6. 2. Clonagem e expressão heteróloga

#### 3.6.2.1 Subclonagem e confirmação dos genes *SoMTs*

Para a amplificação do gene específico (*SoMT*), submeteram-se as amostras dos plasmídeos dos clones para metalotioneína (5 ng) a reações de PCR utilizando 1 U de *Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen), 1X *PCR High Fidelity Buffer*, 0,2 mM dNTP mix, 3 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,3 µM *primer forward*; 0,3 µM *primer reverse* (Tabela 6) em volume final de 25 µL. A temperatura para anelamento dos oligonucleotídeos variou de acordo com cada iniciador, e programas de termociclagem independentes foram criados. Os fragmentos amplificados foram analisados através de eletroforese em gel de 1% agarose em tampão 1X SB. De acordo com o tamanho esperado (Tabela 6) os fragmentos de interesse foram recortados e purificados utilizando kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences) e clonados no pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega). Células bacterianas da cepa DH10B eletrocompetentes foram transformadas. Os plasmídeos foram extraídos das colônias positivas via protocolo de lise alcalina. A confirmação da presença do inserto foi feita por PCR usando os iniciadores específicos (Tabela 6) e pelo menos três clones positivos de cada gene foram sequenciados usando os iniciadores T7 / SP6.

### 3.6.2.2 Digestão, transformação e indução para expressão da proteína heteróloga

O vetor de expressão pTXB1 do kit IMPACT, assim como o vetor pGEM-T Easy PCR Product Cloning kit (Promega), confirmados por sequenciamento para a presença dos genes *SoMT* de cana-de-açúcar, foram digeridos em duas etapas com as enzimas *SpeI* ou *SapI* e *NdeI*. Os fragmentos produto de digestão foram separados em gel de 1% agarose, corados com corante *SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain*, recortados com bisturi estéril e purificados com kit *GFX PCR DNA and gel band purification* (Amersham Biosciences). Em seguida procedeu-se a ligação entre o gene *SoMT* de cada tipo com o vetor de expressão pTXB1, devidamente digerido, a 4°C por 15h.

A linhagem de *E. coli Origami* foi utilizada para transformação por eletroporação. Foram transformadas bactérias com o plasmídeo pTXB1 ligado a cada gene *SoMT* assim como também com o vetor pTXB1 vazio (controle negativo) e com o vetor pMXB10 (controle positivo de indução da expressão). O vetor pMXB10 é providenciado com o *kit IMPACT* de expressão e consiste de uma construção do vetor pTXB1 com o gene *MBP (maltose-binding protein)* inserido em quadro de leitura com a proteína inteína. Em seguida, a transformação foi plaqueada em meio LB sólido acrescido de 100 µg mL<sup>-1</sup> ampicilina. Uma colônia da bactéria *Origami* contendo o plasmídeo com o gene a ser expresso de cada tipo de MT, assim como também os controles positivo e negativo foi inoculada em 5 mL de meio LB, contendo ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>). Após 17 h de crescimento a 37°C com agitação, 500 µL da cultura foram utilizados como um novo inóculo para um volume de 50 mL de meio LB contendo ampicilina (100 µg mL<sup>-1</sup>). Após aproximadamente 5 h de crescimento a 37°C, quando a cultura atingiu uma densidade óptica de 0.5 a 600 nm, uma alíquota de 2 mL e outra de 200 µL da cultura foi retirada para serem utilizadas como controle antes da indução da expressão. Em seguida, ao restante da cultura foi adicionado 0,5mM IPTG e a indução da expressão foi realizada a 30°C. Alíquotas de 2 mL e 200 µL foram retiradas as 4 h, e 16 h

(*overnight*). As amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 2 min e o precipitado de células foi conservado a -20°C.

### **3.6.2.3 Lise por choque térmico utilizando nitrogênio líquido**

O precipitado das alíquotas de 2 mL foi ressuscitado em 200 µL de tampão de lise STE (10mM Tris HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 1 mM PMSF e 100 µg mL<sup>-1</sup> lisozima ) e incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida foi colocado em nitrogênio líquido durante 10 s e rapidamente transferidas para um banho-maria a 38°C por 10 s, sendo que este procedimento foi repetido dez vezes. A seguir, as suspensões foram centrifugadas a 12.000 g por 2, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo.

### **3.6.2.4 Eletroforese de proteína em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Os extratos protéicos providos da lise da bactéria foram misturados a tampão dissociante (11% Tris-HCl pH 6.8; 0,5 M; 18% glicerol; 4% SDS, 5% β-mercaptoetanol; 20% azul de bromofenol) e fervidas à 100 °C por 10 min. Em seguida foram aplicados em gel 12,5% poliacrilamida. Os precipitados providos das alíquotas de 200 µL de cada amostra de cada gene *SoMT*, não passaram por lise, e foram diretamente ressuscitados em 50 µL de tampão dissociante, fervidos e carregados em gel 12,5% poliacrilamida. As análises eletroforéticas foram realizadas na cuba Mini Protean (BIORAD) em tampão de corrida (5x) [25 mM Tris; 192 mM glicina pH 8,3; 1% SDS]. Os géis de poliacrilamida são compostos por dois tipos de géis, o gel de resolução (12,5% acrilamida), Tris 25mM, pH 8.9 ajustado com HCl, 0,65% de persulfato de amônio, 0,5% SDS e 15 µL de TEMED, o gel de empacotamento (5% de acrilamida), Tris 25 mM, pH 6.7 ajustado com HCl, 0,1% de persulfato de amônio, 0,1% de SDS e 5 µL de TEMED (Invitrogen). As corridas tiveram duração de 90 min a 30 mA os géis foram corados com 0.2% azul de Comassie 250 G. A

descoloração foi feita utilizando a solução descorante (40% metanol; 7% ácido acético glacial). O marcador de baixo peso molecular *BenchMark-Protein Ladder* (Invitrogen) foi utilizado para identificação das proteínas em estudo.

#### 4. *RESULTADOS E DISCUSSÃO*

#### 4.1. Identificação de Genes de Metalotioneína e Análise Filogenética

Inicialmente, foram identificados no banco de dados de *Saccharum officinarum Gene Index* (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>), 27 agrupamentos (*Tentative Consensus* ou TCs) de ESTs (*expressed sequence tag*) e 136 seqüências sem agrupamento ou *singletons*, baseado na busca por palavra-chave (*metallothionein*), e também mediante *BLAST* usando as seqüências dos mRNAs dos nove genes de metalotioneína relatados em arroz (WONG et al., 2004), que totalizavam 1.306 transcritos das 255.635 seqüências disponíveis (0,51%). Uma análise individual e detalhada, levando em conta as seqüências completas e considerando somente aquelas de menor *e-value* ( $E \leq 10^{-7}$ ) permitiu selecionar 15 TCs e 22 *singletons* num total de 983 transcritos (0,38% do total de ESTs do banco). De acordo com a assinatura característica de cada tipo de MT, segundo a distribuição das cisteínas nos dois domínios mais o espaçador inter-domínios (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002), os 15 agrupamentos de *ESTs* de cana de açúcar foram classificados como: quatro de MT tipo 1, com um total de 529 *reads* em 983 transcritos (54% das MTs completas identificadas); sete de MTs tipo 2 (363 *reads*; 37 %); três MT do tipo 3 (65 *reads*; 6,6%); e apenas uma MT tipo 4 com quatro *reads* (0,4%) (Tabela 7). As 22 seqüências sem agrupamento (*singleton*) foram classificadas como sendo nove representantes do tipo 1 (0,9 %); doze do tipo 2 (1,2 %), e uma do tipo 3 (0,1%), não havendo *singletons* para o tipo 4 (não mostrado).

A análise filogenética inicial utilizando a abordagem de máxima parcimônia foi conduzida para as seqüências traduzidas completas dos 15 TCs e dos 22 *singletons* de cana-de-açúcar, acrescido de nove genes de metalotioneína de arroz (WONG et al., 2004), e mais nove de *Arabidopsis thaliana* (ZIMERI et al., 2005). A árvore gerada (dado não mostrado) evidenciou a necessidade de analisar cada um dos tipos de MT separadamente para permitir uma melhor classificação das metalotioneínas de cana-de-açúcar, de acordo com seus ortólogos de arroz. Novamente, agrupamentos por alinhamento múltiplo de

seqüências de cana-de-açúcar, arroz e arabidopsis foram obtidos e em seguida analisados filogeneticamente, desta vez separada por tipo. A partir desta segunda análise, foi possível selecionar seqüências representativas de cada tipo, e descartar as que foram consideradas idênticas. Assim, todos os *singletons*, a exceção de CA287650, foram descartados, restando os 15 TCs descritos na tabela 7 para classificação. O *singleton* CA287650 foi incluído na análise por ter sido originalmente utilizado como sonda para investigar a expressão de MT tipo 1 (SERENO et al., 2007).



Tabela 7 – Agrupamentos (TCs - *Tentative Consensus*) selecionados como mais representativos das seqüências identificadas dos quatro tipos de metalotioneínas no banco de dados *Saccharum officinarum Gene Index*. Apresenta-se também o número de *reads* que compõem cada TC, e o *e-value* relativo à similaridade com seqüências ortólogas de arroz.

METALOTIONEINA	TC	Reads	e-value
<b>MT tipo 1</b>	TC48237	361	$10^{-33}$
	TC48051	8	$10^{-32}$
	TC48217	114	$10^{-32}$
	TC48218	46	$10^{-31}$
	<b>Total</b>	<b>529</b>	
<b>MT tipo 2</b>	TC48389	29	$10^{-37}$
	TC48425	100	$10^{-36}$
	TC48398	180	$10^{-35}$
	TC48411	3	$10^{-34}$
	TC48485	37	$10^{-28}$
	TC48449	2	$10^{-23}$
	TC48428	12	$10^{-20}$
<b>Total</b>	<b>363</b>		
<b>MT tipo 3</b>	TC57181	16	$10^{-24}$
	TC57180	46	$10^{-18}$
	TC57183	3	$10^{-18}$
	<b>Total</b>	<b>65</b>	
<b>MT tipo 4</b>	TC61385	4	$10^{-25}$

Zhou et al. (2006) publicaram uma análise mais abrangente dos genes da família das MTs em arroz, onde foram inclusas 2 novas seqüências (totalizando 11 genes) em relação a Wong et al. (2004), apresentando uma nova classificação das MTs de arroz (Tabela 8). Da mesma forma que proposto por Cobbett e Goldsbrough (2002), o novo sistema de classificação para as metalotioneínas de arroz (ZHOU et al., 2006), agrupa as MT de acordo com a distribuição dos aminoácidos cisteína. A diferença é que reconhece cinco tipos diferentes de metalotioneína ao invés de apenas quatro (*OsMT-I-1*, *OsMT-I-2*, *OsMT-I-3*, *OsMT-I-4* e *OsMT-II-1a*). Primeiramente, Zhou et al., (2006) classificam as MTs de arroz como sendo quatro tipos da classe I (*OsMT-I*), e um tipo da classe II. O único integrante da classe II é *OsMT-II-1a*, antigamente nomeada Ec ou MT tipo 4, característica de sementes. A classe I passou a comportar os tipos 1, 2, 3 e 4, sendo que os tipos 1, 2 e 3 seguem a classificação tradicional de arranjo de cisteínas encontrado em plantas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Entretanto, a metalotioneína da classe I do tipo 4 corresponde a um novo tipo de MT formado por antigos membros do tipo 1 de arroz, que possuem uma diferença no arranjo de cisteínas no domínio NH-terminal. Além disso, as antigas isoformas *OsMT2b* e *OsMT2c* foram invertidas, se tornando *OsMT-I-2c* e *OsMT-I-2b*, respectivamente. Zhou et al., (2006) também descreveram duas novas seqüências, classificadas como uma do tipo 1 e uma do tipo 4 (Tabela 8). A tabela 8 compara as classificações feitas por WONG et al. (2004) e ZHOU et al. (2006) para as MTs de arroz.

Tabela 8 - Classificação dos genes de metalotioneínas em arroz (*Oryza sativa*) comparando os trabalhos realizados por Wong et al. (2004) e Zhou et al. (2006). O acesso do gene de cada MT, depositado no banco de dados do NCBI é também apresentado.

Zhou et al. (2006)	Wong et al. (2004)	Acesso NCBI
OsMT-I-1a	OsMT1a(rgMT)	U43529
OsMT-I-1b	n.o.	AK059587
OsMT-I-2a	OsMT2a (OsMT2-1)	D15602
OsMT-I-2b	OsMT2c (ricMT)	AB002820
OsMT-I-2c	OsMT2b	U77294
OsMT-I-3a	OsMT3a (OsMT3)	AF001396
OsMT-I-3b	OsMT3b	AF009959
OsMT-I-4a	OsMT1b	AK103445
OsMT-I-4b	OsMT1c	BE039194
OsMT-I-4c	n.o.	BE039221
OsMT-II-1a	OsMT4	Ak102405

n.o.: não observada.

Considerando estas novas informações, foi feita uma busca por palavra chave (*Oryza sativa metallothionein*) no banco de dados *EMBL* (*European Molecular Biology Laboratory*), e foram confirmadas as 11 seqüências de proteínas relatadas por Zhou e colaboradores (2006), e mais quatro seqüências completas foram encontradas ainda sem anotação, as quais provavelmente representam a três novos membros do tipo *OsMT-I-4* (*Os-Q2QNF2*, *Os-Q2QNC4*, *Os-Q2QNE5*) e um membro do tipo *OsMT-I-2* (*Os-O22488*).

De posse destas informações, os TCs e *singletons* de cana foram re-examinados com o intuito de encontrar seqüências que poderiam ser homólogas as seqüências tipo 4 de arroz (*OsMT-I-4*). Para isto, as seqüências nucleotídica de cada uma destas seqüências *OsMT-I-4* foram alinhadas para buscar identidade no banco de dados de *Saccharum officinarum Gene Index*, mediante o uso de BLAST. Assim, mais um agrupamento com

quatro *reads* (TC68889) e uma seqüência sem agrupamento (CA290339) foram identificadas para cana-de-açúcar. Curiosamente, o agrupamento TC68889 e o *singleton* já tinham sido identificados quando a busca foi feita alinhando as seqüências do antigo tipo 1 de arroz (atualmente re-classificadas como tipo 4), mas o TC tinha sido desconsiderado porque a seqüência traduzida da proteína aparecia inexplicavelmente truncada, não acontecendo o mesmo com os *reads* que o compõem que apresentam seqüência inteira. Simultaneamente, foi conduzida uma atualização das informações sobre metalotioneínas de *A. thaliana*, e foram identificadas mais duas seqüências expressas, adicionadas ao banco de dados de ESTs de *Arabidopsis* (At-Q8LDX5 e At-Q0WLF1) em data posterior à publicação do artigo de ZIMERI et al., (2005).

Uma vez obtidas tais seqüências, foram realizadas novas análises filogenéticas só que agora utilizando as 15 seqüências traduzidas dos genes de metalotioneínas de arroz, os 11 de *Arabidopsis* e os 15 TCs de cana-de-açúcar. Somente dois *singletons* foram incluídos na análise (CA287650 e CA290339), assim como também os quatro *reads* representantes do TC68889, os quais apresentam seqüências completas em relação ao mesmo.

A classificação dos TCs e *singletons* de cana-de-açúcar foi baseada em valores de re-amostragem (2.000 repetições) com reposição aleatória dos dados (*bootstrap*), que revela a consistência interna da topologia da árvore filogenética. Para a construção da árvore, o TC61385 correspondente a MT tipo Ec foi usado como *outgroup*. Houve a formação de seis grupos distintos (Figura 3). Os grupos foram denominados por tipo, seguindo a classificação tradicional de MTs de plantas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Os TCs considerados como MT tipo 1 de cana de açúcar (TC48237, TC48218, TC48051 e TC48217) mais o *singleton* CA287650 agruparam-se junto com os dois genes MT 1 de arroz (*OsMT-I-1a* e *OsMT-I-1b*), não apresentando semelhança mais específica dentro do grupo. Uma das quatro seqüências novas encontradas neste trabalho para arroz (*Os-Q2QNC4*) se juntou a este grupo.

Todos os quatro *reads* do TC68889, mais o *singleton* CA290339, se agruparam com as MT tipo 4 de arroz (*OsMT-I-4a*, *OsMT-I-4b* e *OsMT-I-4c*) [Figura 3, quadro em vermelho],

assim como também duas das quatro novas seqüências de arroz (Os-Q2QNE5 e Os-Q2QNF2).

Os sete TCs tipo 2 de cana-de-açúcar (TC48425, TC48389, TC48398, TC48411, TC48428, TC48449, e TC48485e) formaram um grupo maior com as MTs tipo 2 de arroz (*OsMT-I-2a*, *OsMT-I-2b* e *OsMT-I-2c*) [ZHOU, et al., 2006], e a quarta nova seqüência encontrada neste trabalho para arroz (*Os-22488*) [Figura 3 - MT tipo 2]. As metalotioneínas tipo 2 de *Arabidopsis* (*AtMT2a* e *AtMT2b*) [ZIMERI et al, 2005], assim como uma das duas novas seqüências, encontradas neste trabalho para arábido ( *At-Q0WLF1*), uniram-se a este grupo (Figura 3 - MT tipo 2). Entretanto, podemos observar que seis dos sete TCs de cana de açúcar tipo 2 (TC48425, TC48389, TC48398, TC48411, TC48428 e TC48449) formaram um subgrupo com *OsMT-I-2a* de arroz e *AtMT2a* de *Arabidopsis*. O TC48485 remanescente de cana-de-açúcar juntou-se a ele mais distante. As três seqüências restantes de arroz (*OsMT-I-2b*, *OsMT-I-2c* e *Os-22488*) e as duas de arábido (*AtMT2b* e *At-Q8LDX5*) se agruparam entre si em dois subgrupos (Figura 3 - MT tipo 2).

Todos os TCs considerados tipo 3 de cana-de-açúcar (TC57180, TC57181 e TC57183) se agruparam às MTs tipo 3 de arroz (*OsMT-I-3a* e *OsMT-I-3b*) e à MT tipo 3 de *Arabidopsis* (*AtMT3*) num único grupo (Figura 3 – MT tipo 3).

Por fim, o TC61385 de cana-de-açúcar, presumível da classe II de MT (antigo tipo 4), considerado homólogo a proteína Ec de trigo, se agrupou com a única metalotioneína da classe II de arroz (*OsMT-II-1a*), também considerada homóloga a proteína Ec de Trigo. As MTs tipo Ec de *Arabidopsis* (*AtMT-Ec1*, *AtMT-Ec2* e *AtMT-Ec3*) junto com as MTs tipo 1 (*AtMT1a*, *AtMT1b* e *AtMT1c*) e uma das duas novas seqüências encontradas neste trabalho para arábido (*At-Q0WLF1*), formaram um único grupo entre elas (Figura 3). Entretanto, dois subgrupos podem ser identificados dentro deste grupo, separando as metalotioneínas tipo Ec das MTs tipo 1. A nova seqüência, *At-Q0WLF1*, ficou no mesmo subgrupo das MT tipo 1 (Figura 3).

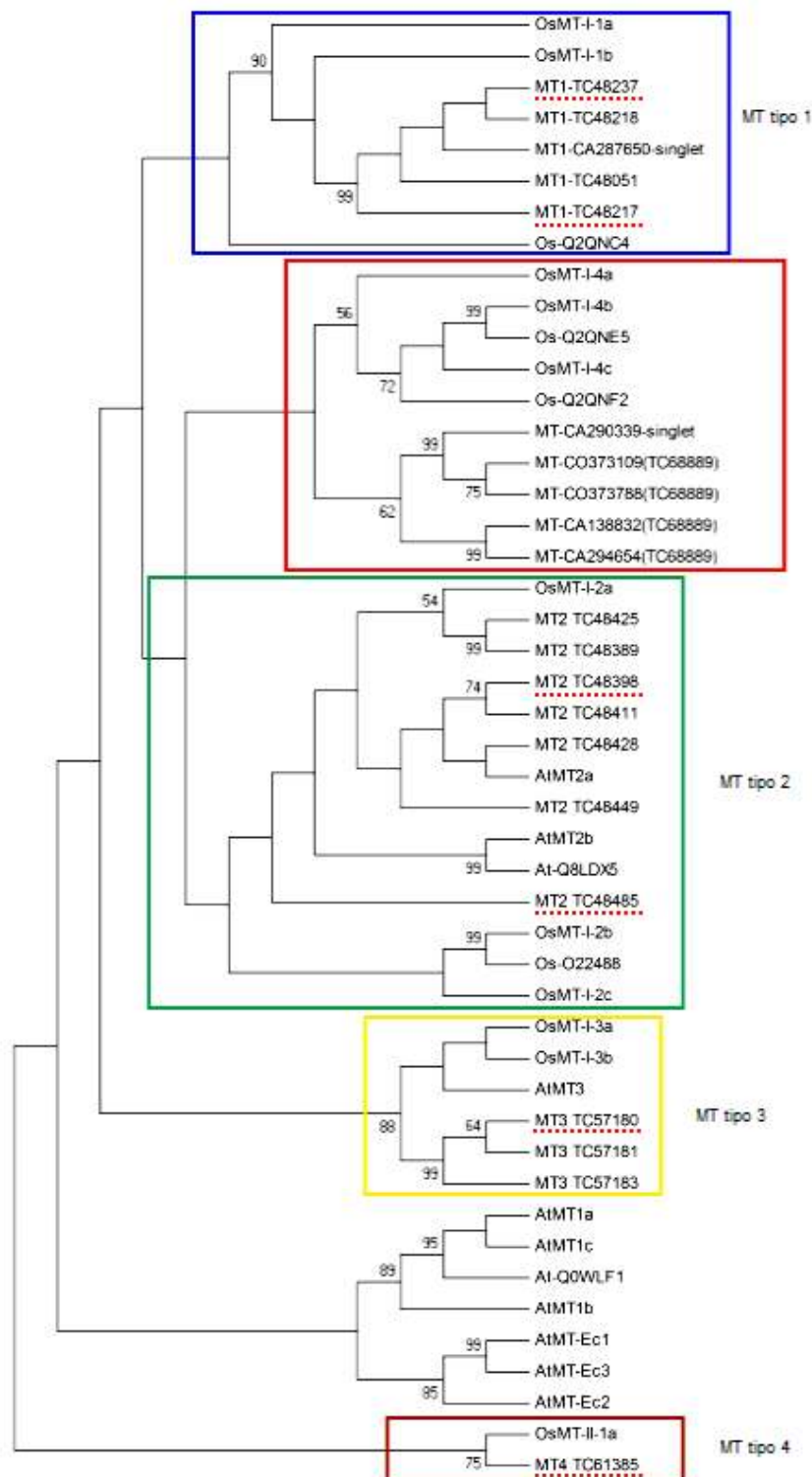


Figura 3 - Árvore filogenética das metalotioneínas de arroz e *Arabidopsis* para caracterização dos genes (TCs e *singletons*) de cana-de-açúcar. Os alinhamentos das seqüências de aminoácidos foram feitos com o auxílio do programa *ClustalW* e a árvore foi construída utilizando as funções de máxima parcimônia no programa *MEGA* version 4.02. Os valores de *bootstrap* baseado em 2.000 repetições aparecem nos nós da árvore. As seqüências de TC escolhidos como representantes de cada tipo de MT de cana-de-açúcar se encontram sublinhadas em vermelho.

A partir da árvore gerada (Figura 3), os TCs de cana-de-açúcar foram classificados dentro dos tipos 1, 2, 3 e 4 usando a nomenclatura proposta por Cobbett e Goldsbrough, (2002), sendo metalotioneína tipo 1: TC48237, TC48218, TC48051 e TC48217; tipo 2: TC48485, TC48449, TC48428, TC48411, TC48398, TC48389 e TC48425; tipo 3: TC57180, TC57181 e TC57183 e tipo 4: TC61385.

Observou-se que mais de um TC de cana-de-açúcar se agrupou com um gene de arroz. Assim, foi conduzida uma análise de similaridade, que permitiu selecionar cinco dos 15 TCs de cana-de-açúcar, considerados distintos entre si, e homólogos aos genes para metalotioneínas de arroz. Para classificar cada um dos TCs de cana-de-açúcar, primeiramente, foram alinhadas as seqüências nucleotídicas dos TCs de cada grupo entre si, mediante alinhamento dois a dois, usando a ferramenta *Blast 2 Sequences* (NCBI). O TC homólogo a Ec que agrupou com *OsMT-II-1a* foi retirado desta análise.

Para as metalotioneínas do tipo 1, a análise demonstrou que o TC48237 possui identidade acima de 90% em relação os outros TC componentes do grupo (TC48218 e TC48051), com exceção de TC48217, com quem apresentou 60% de identidade. O mesmo foi observado para o TC48217, quem apresentou o máximo de 73% de identidade com alguns dos outros TCs do grupo. Assim, os TCs TC48237 e TC48217 foram selecionados como sendo dois genes distintos para metalotioneína tipo 1. Devido ao fato que ambos TC agruparam com os dois membros do tipo 1 de arroz (*OsMT-I-1a* e *b*), as seqüências traduzidas dos TC selecionados de cana-de-açúcar foram alinhadas individualmente com as seqüências de proteínas de cada gene de arroz (*OsMT-I-1a* e *OsMT-I-1b*), para determinar com qual deles teriam maior identidade. O resultado foi praticamente idêntico para os dois TCs de cana-de-açúcar, pois ambos possuem 80% de identidade com *OsMT-I-1a* e cerca de 82% com *OsMT-I-1b*. Portanto, essa diferença na identidade não permitiu uma classificação mais precisa, e os genes de cana-de-açúcar foram nomeados arbitrariamente como *SoMT1.a* (TC48237) e *SoMT1.b* (TC48217) sendo 'So' por: *Saccharum officinarum*., 'MT' de metalotioneína, '1' de tipo 1 e a letra 'a' ou 'b' para diferenciar dois genes do mesmo baseado na seqüência de aminoácidos da proteína traduzida.

Da mesma maneira foi possível selecionar dois TC referentes a MT do tipo 2, e um do tipo 3. Novamente, as seqüências nucleotídicas das seis TC tipo 2 (TC48425, TC48389, TC48398, TC48411, TC48428, e TC48449) que agruparam com *OsMT-I-2a* (Figura 3) foram alinhadas dois a dois, indicando que o TC48398 possuía em media 80% de identidade com os outros TC (TC48449, TC48428, TC48411, TC48389 e TC48425), sendo arbitrariamente definido como um dos representantes do tipo 2. O alinhamento comparando a seqüência traduzida deste TC com a seqüência de proteína do gene *OsMT-I-2a* mostrou que existe 79% de identidade entre elas, e apenas 41% e 55% em relação a *OsMT-I-2b* e *OsMT-I-2c*, respectivamente. Por outro lado, o TC48485 de cana-de-açúcar, que agrupou mais distante dentro do grupo MT tipo 2 (Figura 3) apresentou 25% de identidade no alinhamento da seqüência nucleotídica com o TC48398, tratando-se claramente de gene distinto do mesmo tipo de MT. A seqüência traduzida da proteína referente ao TC48485 exibiu 61 e 78% de identidade, respectivamente às seqüências protéicas de *OsMT-I-2b* e *OsMT-I-2c*, mas somente 48% em relação a *OsMT-I-2a*. Deste modo, os TC48398 e TC48485 foram denominados como *SoMT2a* e *SoMT2b*, respectivamente.

Por último, entre os TCs que agruparam como MT tipo 3 (TC57180, TC57181 e TC57183), o TC57180 foi escolhido como representante das MTs tipo 3 de cana-de-açúcar, uma vez que sua seqüência nucleotídica foi a mais completa, e apresentou 72% e 100% de identidade com os agrupamentos TC57181 e TC57183, respectivamente. Embora a identidade das seqüências nucleotídicas entre os agrupamentos TC57180 e TC57181 foi de 72%, a proteína traduzida para ambos foi 100% idêntica. A seqüência de proteína do TC57180 apresentou 62% e 52% de identidade com as proteínas traduzidas dos genes *OsMT-I-3a* e *OsMT-I-3b* de arroz. De todos os genes MTs encontrados para cana, este foi quem apresentou menor identidade com seus ortólogos de arroz, e portanto foi denominado de *SoMT3*.

Portanto, após a identificação e a caracterização das seqüências codificantes para metalotioneínas depositadas no banco de dados de cana-de-açúcar, mediante análise filogenética e comparações por alinhamento com os membros da família gênica de



metalotioneínas de arroz, foi possível classificar os TCs encontrados como sendo dois do tipo 1 (*SoMT1a* e *SoMT1b*); dois do tipo 2 (*SoMT2a* e *SoMT2b*), um do tipo 3 (*SoMT3*) e um tipo 4 *SoMT4 (Ec)* ou *OsMT-II-1a* de arroz. Embora os genes MTs de arroz tenham sido re-classificados (Zhou et al., 2006) como classe I, a seqüência de proteína dos tipos 1, 2, 3 e *Ec*, utilizadas para classificar os genes ortólogos de cana-de-açúcar, ainda segue o critério de classificação utilizado por Cobbett e Goldsbrough (2002), para metalotioneínas de plantas. Assim, os genes tipo MT identificados neste trabalho foram classificados como Classe II, tipos 1, 2, 3 e 4 como mencionado acima.

Não foi possível determinar se o TC68889 pode ser considerado como um representante do tipo 4 da classificação de Zhou et al, (2006), por apresentar irregularidades em sua anotação no banco de dados de cana-de-açúcar. A seqüência deste TC traduzida encontra-se truncada, com apenas 29 aminoácidos, e os 4 *reads* que compõem o TC68889 foram recentemente re-classificados dentro de outros TCs que não foram analisados neste trabalho.

O número de genes integrantes da família de MTs em plantas é variável, sendo a de arroz a mais numerosa, com onze descritos por Zhou e colaboradores (2006), e mais quatro seqüências de proteínas distintas identificados mediante BLAST neste trabalho. Como mencionado anteriormente, foram identificados nove membros da família MT em *Arabidopsis thaliana* (ZIMERI, 2005), e mais duas seqüências de proteína foram encontradas aqui. Em cevada, foram identificados nove transcritos tipo MT a partir de bibliotecas de cDNA de folhas e raiz (Heise et al., 2007), sendo quatro do tipo 1; três do tipo 2; e um de cada um dos tipos 3 e 4.

Poucas espécies possuem sua família completa de genes MTs bem caracterizada, com representantes dos quatro tipos identificados, como é o caso de arroz, cevada e arabidopsis. A maioria dos trabalhos relata que foram investigadas apenas uma ou várias isoformas de alguns dos quatro tipos de MTs, mas não todos. A espécie arbórea *Populus trichocarpa x deltoides* é um bom exemplo disto, pois embora tenham sido encontrados seis genes MTs, representam somente aos tipos 1, 2 e 3 (dois de cada tipo) (KOHLENER et al.,

2004). O tipo Ec não foi relatado, possivelmente por ele ser específico de sementes, enquanto que a biblioteca investigada foi construída a partir de raiz. Seis genes de MTs foram identificados em algodão separadamente em diversos trabalhos, sendo três do tipo 1; um do tipo 2; e dois do tipo 3 (HUDSPETH, et al., 1996; JORDAN et al., 2005; XUE et al., 2009)

Embora os seis genes encontrados para cana-de-açúcar estejam de acordo com o observado para a maioria das espécies, onde se encontra uma pequena família multigênica, era esperado que devido ao tamanho e complexidade do genoma da cana, a família de MTs fosse tão numerosa como na gramínea arroz, ou pelo menos que tivesse tantos membros como o pequeno genoma de *Arabidopsis*. Deve ser considerado, entretanto, que as análises foram conduzidas em banco de dados de seqüências expressas, enquanto que a de arroz e *arabidopsis* derivam de seqüenciamento completo do genoma. Por outro lado, a poliploidia de cana-de-açúcar dificulta a interpretação dos dados para o estabelecimento do número de cópias de genes. Grivet et al. (2003) discutem que um gene num único loco no genoma da cana estaria presente com pelo menos dez alelos, cada um sendo potencialmente um haplotipo com 8 ou 9 alelos de *Saccharum officinarum* e 1 ou 2 de *S. spontaneum*. Recentemente, encontramos que esse número de cópias esperado por genoma (cerca de dez) é consistente com o número de fragmentos estimados em análises de *Southern blot* para os genes de MT tipo 1, 2 e 3 (SERENO et al., 2007), concluindo que esses genes são codificados por pequenas famílias gênicas, sendo cada tipo de metalotioneína representada por um ou alguns poucos membros no genoma haplóide, mas com diversas cópias no genoma poliplóide. Isto faz ainda mais sentido se observamos que os possíveis papéis atribuídos aos diferentes tipos de metalotioneína (homeostase de metais, resposta a estresses bióticos e abióticos, fases do desenvolvimento, etc) se superpõem e, no contexto de um poliplóide, as diferentes cópias seriam suficientemente abundantes para uma divisão de tarefas sem necessidade de uma diversificação maior dos tipos de MTs.

#### 4.2. Desenvolvimento de iniciadores específicos para genes *SoMTs*

Após identificação dos cinco genes de metalotioneína de cana-de-açúcar *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3*, foram desenhados diversos iniciadores específicos para cada um deles para serem utilizados na caracterização da estrutura éxons / íntrons do gene, região promotora e ensaios para análises de expressão gênica e expressão heteróloga das proteínas correspondentes (Tabelas 2 a 6). A seqüência do agrupamento TC de cada tipo de metalotioneína foi utilizada para o desenho dos iniciadores pelos programas *Primer3* e *NetPrimer*. Clones de EST representativos de cada gene foram adquiridos (Tabela 1), e após confirmação de identidade por sequenciamento (Apêndice A), estes clones foram utilizados para validar a especificidade de cada par de iniciadores relativo as análises de expressão gênica em reações de PCR. Os fragmentos obtidos foram avaliados em gel de agarose e a identidade confirmada por sequenciamento (Apêndices B).

#### 4.3 Caracterização da seqüência inteira dos genes de *SoMTs*

Com o objetivo de caracterizar as seqüências completas dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar foi extraído DNA e RNA total de folhas e raízes da cultivar 'SP80-3280'. O DNA genômico e o cDNA obtido a partir deste RNA foram utilizados em reações de amplificação enzimática para obtenção de fragmentos dos diversos genes MTs. Os fragmentos obtidos (Figura 4) foram clonados e seqüenciados. Os produtos do sequenciamento das amostras amplificadas a partir de cDNA e DNA genômico foram alinhados e uma seqüência consenso para cDNA e outra para DNA genômico foram obtidas. Em seguida, ambas as seqüências foram alinhadas entre si, e as regiões correspondentes aos éxons e íntrons determinadas. A proteína presumível foi deduzida mediante tradução da seqüência consenso. A tabela 9 resume os resultados obtidos a partir de produtos de amplificação de todos os iniciadores utilizados na identificação da estrutura éxon/íntron dos genes *SoMTs*.

Tabela 9 – Iniciadores utilizados na caracterização éxon / íntron dos genes *SoMT* de cana de açúcar. O TC correspondente e o tamanho esperado baseado na sequência de EST são apresentados.

Gene MT (tipo)	Nome iniciador	Seqüência	TC	Amplicon (EST)
MT tipo 1	SoMT1-5'	For-AAGTACCCTGACCTGGAGGAG	TC48237	147 pb
		Rev-TGCATATCATCGGTCTTCGTT	TC48217	144 pb
	SoMT1-interno	For-AAGTACCCTGACCTGGAGGAG	TC48237	208 pb
		Rev-TGCATATCATCGGTCTTCGTT	TC48217#	
	SoMT1a*	For-ATGCATGCTGCTTATTG	TC48237	209 pb
		Rev-CGTACAAGGGCAGAGAATGA		
SoMT1b*	For-TGCAACTGCTGATCCTATCG	TC48217	305 pb	
	Rev-CCCTGGACGCAAATTAAG			
SoMT1-ATG/TCA**	For-ggtggtcatatgTCTTGACGCTGCGGATC	TC48237	228 pb	
	Rev-ggtggttactagttcgGCAGTTGCAGGGGTTGC	TC48217		
MT tipo 2	SoMT2-5'	For-GCGAGCTTCGTGTTCTTGTT	TC48398	182 pb
		Rev-TGATGAGAGTCTGGGTGGTG		
	SoMT2a*	For-CCGTGATGAGGAAGGAGATACA	TC48398	139 pb
		Rev-CGTTCCCATCAGTACCACCAC		
	SoMT2b*	For-ACGAGGAGGAAGGAGGAGAC	TC48485	143 pb
		Rev-GTTGAGATGAACCCAGGAG		
SoMT2a-ATG/TCA**	For-ggtggtcatatgTCGTGCTGCGGAGGCAA	TC48398	246 pb	
	Rev-ggtggttgcctctccgcaCTTGACAGGTGCAGGGGT			
SoMT2b-ATG/TCA**	For-ggtggtcatatgTCTTGCTGCAACGGCAA	TC48485	249 pb	
	Rev-ggtggttgcctctccgcaGTTGCAGCTGCAGCAGG			
MT tipo 3	SoMT3-5'	For-ACAAAGCTCGACCGTACCAA	TC57180	167 pb
		Rev-TCCTCCTCAACGATCTCCAC		
	SoMT3-maior	Rev-AGGCAACACAACACACCGTA	TC57180	474 pb
	SoMT3*	For-GTGCGGCAACTGCGACTG	TC57180	118 pb
Rev-CACGGTCACCTCCTCCTCAA				
SoMT3-ATG/TCA**	For-ggtggtcatatgTCGGGCACGTGCGGCAA	TC57180	198 pb	
	Rev-ggtggttgcctctccgcaCTTGCCGCAGCTGCAGC			

\* Iniciadores desenvolvidos e utilizados em análise de expressão gênica.

\*\* Iniciadores desenvolvidos para utilização em ensaios de expressão heteróloga.

# Unicamente o iniciador *forward* de *SoMT1-interno* ancora no TC48217.

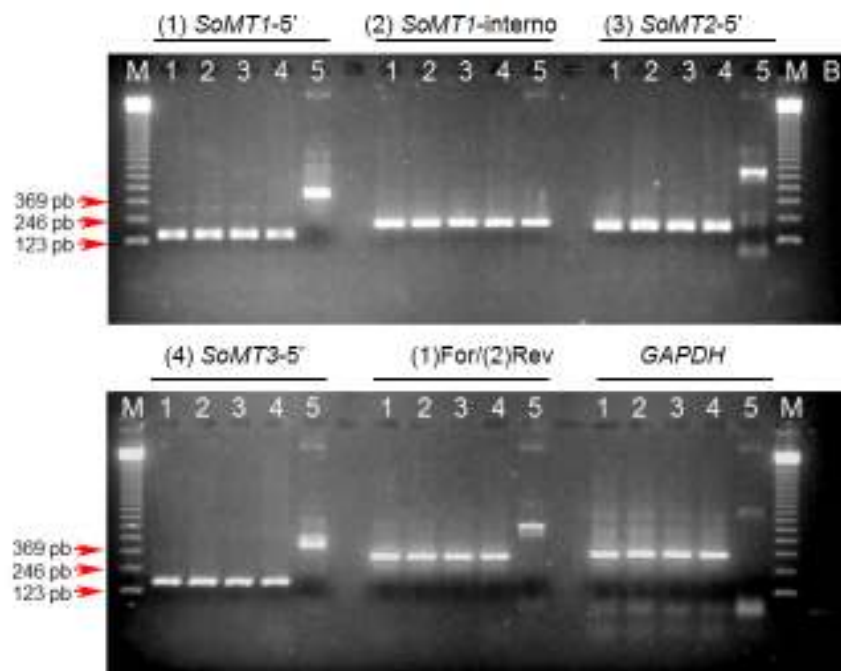


Figura 4 - Fragmentos amplificados de DNA da cultivar 'SP80-3280' de cana-de-açúcar obtidos usando os iniciadores desenhados para metalotioneína *SoMT* tipo 1, 2 e 3. Amostras 1 e 2: cDNA de folha; 3 e 4: cDNA de raiz; 5: DNA genômico; B: branco. O gene para enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foi usado como controle positivo de amplificação. M: marcador de peso molecular 123 pb. (1)For/(2)Rev se refere a combinação de iniciadores *SoMT1-5'* (*forward*) e *SoMT1-interno* (*reverse*).

A análise virtual do sítio de ancoragem dos iniciadores *SoMT1-5'* (*forward* e *reverse*) [tabela 9] mostra que eles são capazes de amplificar um fragmento quase idêntico nessa região em ambos clones de ESTs correspondentes aos genes *SoMT1a* e *SoMT1b*. Assim, quando utilizados em amostras de cDNA, o fragmento de aproximadamente 145 pb obtido (Figura 4) corresponde possivelmente a um *pool* dos dois tipos de *SoMT1* presentes em cana-de-açúcar. O DNA genômico amplificado com este par de iniciadores apresentou um fragmento único de aproximadamente 500 pb (Figura 4), evidenciando a presença de um íntron nesta região do gene. As diferenças existentes para essa porção amplificada entre ambos os genes *SoMT1* fica restrita à seqüência do íntron presente no DNA genômico. Entretanto, essa diferenciação não foi possível de ser elucidada porque todos os fragmentos seqüenciados apresentaram a mesma seqüência. Por outro lado, o iniciador *SoMT1-interno*

*reverse* (tabela 9) ancora somente na seqüência de EST correspondente ao gene *SoMT1a*, portanto, a combinação *SoMT1-5 (forward)* / *SoMT1-interno (reverse)*, amplifica somente fragmentos correspondentes a *SoMT1a*, tanto a partir de cDNA como de DNA genômico (Figura 4), permitindo a caracterização da seqüência deste gene. Os fragmentos obtidos com essa combinação de iniciadores foram purificados, clonados e seqüenciados. O resultado do alinhamento entre as seqüências consenso de amostras de cDNA e DNA genômico pode ser observado na figura 5.

Baseado nesse alinhamento foi possível notar que o gene *SoMT1a* possui um único íntron de 289 pb, inserido a 53 nucleotídeos do ATG inicial, dividindo a trinca da glicina adjacente à última cisteína do domínio amino terminal rico em cisteínas (Figura 5), exatamente como previsto para as MTs tipo 1 das gramíneas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). O gene *mcMT1* de *Festuca rubra* cv. Merlin possui um único íntron de 214 pb (MA et al., 2003), na mesma posição que o aqui identificado para cana. Em arroz, os genes *OsMT-I-1a* e *OsMT-I-1b* possuem um único íntron na mesma posição em ambos genes, sendo o íntron de *OsMT-I-1b* o dobro do tamanho daquele presente em *OsMT-I-1a* (Zhou et al. 2006). Nas dicotiledôneas, esse íntron é comumente observado antes da última cisteína do domínio amino terminal (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

Essa característica estrutural de dois éxons separados por um íntron, do gene MT tipo 1 é constantemente observada na maioria das seqüências gênicas completas depositadas em bancos de dados sob o nome metalotioneína tipo 1 de plantas. No entanto, exceções foram observadas no caso do gene MT tipo 1 de álamo (*Poplar*) (KOHLENER et al., 2004), e para o gene *MT1A* de algodão (HUDPESTH et al., 1996), que possuem dois introns.



Posteriormente, os iniciadores desenhados para análise da expressão gênica por RT-qPCR (Tabela 9) foram utilizados em diversas tentativas de se obter para *SoMT1b* uma seqüência similar a aquela do gene *SoMT1a*. Considerando que estes iniciadores (*SoMT1a forward* e *reverse*, e *SoMT1b forward* e *reverse*) amplificam especificamente os genes homônimos *SoMT1a* ou *SoMT1b*, o *reverse*, de cada um deles foi utilizado em combinação com *SoMT1-5' forward* ou *SoMT1-interno forward* (Tabela 9), tanto a partir de ampliações com cDNA ou DNA genômico. Cada amostra de cDNA amplificada com cada combinação de iniciadores apresentou dois fragmentos de distintos tamanhos. Assim, foram obtidos um fragmento de 538 pb e outro de 587 pb na amostra amplificada com *SoMT1-5' forward* / *SoMT1a* ou *SoMT1b reverse*, respectivamente, e um fragmento de 412 pb e outro de 464 pb na amostra amplificada com *SoMT1-interno forward* / *SoMT1a* ou *SoMT1b reverse*, respectivamente (dado não mostrado). Isto ocorreu como esperado baseado nas seqüências de EST dos genes *SoMT1a* e *SoMT1b*. Do mesmo modo, devido ao conhecimento da presença do íntron no gene *SoMT1a* (Figura 5), dois fragmentos maiores, distintos, eram esperados a partir de ampliações no DNA genômico. Usando a combinação de iniciadores *SoMT1-5' forward* / *SoMT1a* ou *SoMT1b reverse* com amostras de DNA genômico como molde, foram amplificados dois fragmentos muito próximos um do outro de aproximadamente 800 - 850 pb (dado não mostrado). Para a segunda combinação de iniciadores, *SoMT1-interno forward* / *SoMT1a* ou *SoMT1b reverse*, os fragmentos obtidos apresentaram o mesmo tamanho que aqueles amplificados em amostras de cDNA, reforçando a idéia de que na região examinada com a primeira combinação de iniciadores existia um único íntron presente em ambas *SoMT1*. Todas as etapas até o sequenciamento foram repetidas, mas só pode ser confirmada a seqüência do tipo *SoMT1a* (Figura 5). Não foi possível obter resultados do sequenciamento para o gene *SoMT1b* a partir dos produtos genômicos amplificados com a combinação de iniciadores *SoMT1-5' forward* / *SoMT1b reverse*. As seqüências obtidas para o DNA genômico usando a combinação de iniciadores *SoMT1-interno forward* / *SoMT1b reverse* foram idênticas às obtidas no cDNA deste gene (dado não mostrado), confirmando que o íntron estaria presente mais a montante na



seqüência, provavelmente no fragmento identificado com os iniciadores SoMT1-5' *forward* / SoMT1b *reverse*. Assim, a caracterização da estrutura éxon/intron do gene SoMT1b não foi completada neste trabalho.

A presença / distribuição de introns nos genes *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* foi investigada com procedimentos idênticos aos realizados para os genes *SoMT1a* e *SoMT1b*. Foram realizados ciclos de amplificação com diversas combinações de iniciadores em amostras de cDNA, DNA genômico e clones EST. Para o gene *SoMT2b* foi possível amplificar e seqüenciar um fragmento de 447 pb a partir de amostras de cDNA e outro de aproximadamente 900 pb de DNA genômico, empregando os iniciadores SoMT2-5' (*forward*) e SoMT2a (*reverse*) (Tabela 9). Após o alinhamento das seqüências correspondentes, foi possível identificar apenas um íntron de 491 pb, situado no códon da última cisteína do domínio amino terminal (Figura 6), mas em geral, as MTs do tipo 2 apresentam dois introns em sua estrutura gênica. Nas gramíneas, o primeiro íntron é localizado após a última cisteína, e o mesmo ocorre com o único íntron das MTs tipo 2 de *Arabidopsis* (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). As três MTs tipo 2 de arroz possuem dois introns (ZHOU et al., 2006), com o primeiro localizado no mesmo lugar para os três genes, antes do final do domínio amino terminal, e o segundo íntron localizado no meio do domínio central. Mir et al., (2004) identificaram dois introns no gene tipo 2 de *Quercus suber*, com o primeiro íntron localizado na trinca codificadora da glicina anterior à última cisteína, do domínio amino terminal, de forma idêntica as MTs tipo 1, inclusive encontrado para *SoMT1a* de cana-de-açúcar. O segundo íntron situa no meio do domínio central. O segundo íntron em *SoMT2a* de cana parece estar localizado também no meio do domínio central (Figura 6), mas a seqüência obtida encontra-se truncada, evidenciando a necessidade de novos iniciadores que possa caminhar a partir deste fragmento intrônico no sentido 3' do gene.



Do mesmo modo para *SoMT2b*, foram amplificados fragmentos de 409 pb a partir de cDNA e 564 pb usando DNA genómico derivados da cultivar 'SP80-3280' como molde. Os iniciadores utilizados foram *SoMT2b*-ATG/TCA (*forward*) e *SoMT2b* (*reverse*) [Tabela 9]. O alinhamento da seqüência consenso do produto de sequenciamento de ambos DNAs permitiu identificar um único íntron (Figura 7), quebrando o códon anterior à última cisteína, como observado para a MT tipo 2 de *Q. suber* (MIR et al., 2004) e para *SoMT1a* de cana-de-açúcar. Nesse caso, o alinhamento entre o produto de sequenciamento obtido a partir de amostras de cDNA e DNA genómico (Figura 7) não deixa dúvidas sobre a ausência de um segundo íntron em *SoMT2b*. A seqüência do iniciador *reverse* pode ser claramente observada no final do alinhamento (Figura 7). A seqüência traduzida a proteína do gene *SoMT2b*, possui um arranjo de cisteínas típico de MTs tipo 2, com quatro pares de cisteínas no domínio amino terminal, seguindo o modelo Cys-Cys, Cys-X-Cys, Cys-X-Cys, Cys-X-X-Cys, onde X representa qualquer aminoácido menos cisteína (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Entretanto, apesar de um segundo íntron ter sido identificado nos genes MTs tipo 2 de arroz, *Quercus* e *Typha latifolia* (MIR et al., 2004; ZANG; TAM; WONG, 2004; ZHOU et al., 2006), e parece estar presente no gene *SoMT2a* de cana-de-açúcar, genes codificadores de MTs tipo 2 que possuem um único íntron já foram relatados para tomate, *Arabidopsis* e *Prosopis juliflora* (WHITELAW, et al., 1997; COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; USHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2009).



Para caracterizar a estrutura éxon / íntron do gene *SoMT3*, amostras de cDNA de folha e DNA genômico da cultivar 'SP80-3280' foram empregadas como molde em ciclos de amplificação enzimática usando os iniciadores *SoMT3-5'* (*forward* e *reverse*) e *SoMT3-5'* (*forward*) / *SoMT3-maior* (*reverse*) [Tabela 9]. Um fragmento de aproximadamente 170 pb e outro de 480 pb foram obtidos a partir de amostras de cDNA com ambas combinações de iniciadores respectivamente (dado não mostrado). Para amostras de DNA genômico, foi obtido um fragmento de aproximadamente 430 pb usando os *SoMT3-5'* (*forward* e *reverse*) na amplificação, mas a combinação *SoMT3-5'* (*forward*) / *SoMT3-maior* (*reverse*) falhou em amplificar fragmentos nestas amostras (dados não mostrados). Os iniciadores *SoMT3* (*forward* e *reverse*) também foram utilizados em amostras de DNA genômico e cDNA de cana-de-açúcar e produtos de aproximadamente 380 pb e 120 pb foram amplificados respectivamente (dado não mostrado). Todos esses fragmentos foram purificados, clonados e seqüenciados. A seqüência de pelo menos três amostras de cada um foi alinhada para obtenção de seqüência consenso. As seqüências consenso resultantes de cDNA e DNA genômico foram alinhadas entre si para identificação de éxons e íntrons (Figura 8). Assim, foi encontrado um íntron de 259 pb localizado no final do domínio amino terminal (Figura 8) conforme esperado para as metalotioneínas tipo 3 de monocotiledôneas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002). Entretanto, o segundo íntron comumente encontrados em MTs tipo 3 (ETSCHEID; KLÜMPER; RIESNER, 1999; ABDULLAH; CHEAH; MURPHY, 2002; CHATTHAI et al., 2004; ZHOU et al., 2006; ENDO et al., 2007; USHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2009) não foi obtido devido à seqüência genômica não estar completa, da mesma forma que ocorreu com *SoMT2a*.

Os genes MTs tipo 3 das coníferas (ETSCHEID; KLÜMPER; RIESNER, 1999; CHATTHAI et al., 2004) possuem íntrons pequenos em torno de 130 pb e 100 pb para o primeiro e o segundo íntron, respectivamente. Em *Citrus*, os dois íntrons identificados também foram pequenos sendo o primeiro de 145 pb e o segundo de apenas 18 pb (ENDO et al., 2007). Na algaroba (*Prosopis juliflora*) o primeiro íntron possui aproximadamente 145 pb e o segundo 340 pb (USHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2009). Entretanto o primeiro

íntron de *MT3A* de *Elaeis guineensis* demonstrou ter 1.432 pb enquanto que o segundo possui 306 pb (ABDULLAH; CHEAH; MURPHY, 2002). Em arroz, os dois genes MTs tipo 3 apresentam o primeiro íntron de aproximadamente 250 pb, na mesma posição encontrada para cana, enquanto que o segundo íntron quebra o domínio central ao meio, e possui 500 pb em *OsMT-I-3a* e mais de 2.000 pb em *OsMT-I-3b* (ZHOU et al., 2006). Provavelmente, o segundo íntron de *SoMT3* de cana-de açúcar seja de tamanho similar ao encontrado na gramínea arroz. Essa diferença em tamanho pode ser uma limitante à obtenção da sequência completa por amplificação indicando a necessidade de uma metodologia que permita avançar dentro do segundo íntron.



#### 4.4 Clonagem da região promotora dos genes *SoMTs*, mediante *Genome walking*

Promotores representam as regiões responsáveis na regulação da expressão dos genes, contendo informações sobre o controle local, temporal, ontogenético, e respostas a estímulos ou sinalizações. O nível de expressão das MTs, de cerca de 0,51% em banco de ESTs ou em tecidos (Figueira et al., 2001) indicam que pelo menos para MT tipo 1 se trata de um promotor com potencial biotecnológico para regular a expressão de transgenes com indução por estresses bióticos e abióticos. A identificação de elementos *cis* regulatórios é um dos principais objetivos da bioinformática e integra a genômica funcional e estrutural.

Baseado na seqüência dos TCs classificados como *SoMT1a* (TC48237), *SoMT1b* (TC48217), *SoMT2a* (TC48398), *SoMT2b* (TC48485) e *SoMT3* (TC57180) foram desenvolvidos iniciadores (Tabela 3) para serem utilizados nos experimentos de isolamento e clonagem das regiões promotoras, mediante a técnica de *genome walking* (Figura 1) [ZANG; GURR, 2000]. DNA genômico foi digerido individualmente com enzimas de restrição *NheI*, *SpeI* e *XbaI*, e ligados a adaptadores para construção de bibliotecas específicas. Após as duas reações de amplificações primárias (PCR-1) e secundárias (PCR-2) foram obtidos fragmentos com tamanhos entre 500 e 2.500 pb para *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* (figura 9, 12A-B e 14). Fragmentos entre 800 e 2.500 pb foram selecionados, purificados, clonados, e a presença do fragmento de interesse no vetor foi confirmada por PCR usando os iniciadores para adaptador PP2 e reverso correspondente a cada *SoMT* (Tabela 3).



#### 4.4.1 Metalotioneína tipo 1: *SoMT1a* e *SoMT1b*

Após amplificação com os iniciadores PP2 e reverso específico R2 para cada MT tipo 1 (Tabela 3), foram obtidos fragmentos de aproximadamente 800 pb e 1.500 pb nas amostras de DNA digerido com as enzimas de restrição *NheI* e *XbaI* para *SoMT1a* (Figura 9, painel a direita), e de aproximadamente 800 pb obtido com *NheI*, para *SoMT1b* (Figura 9, painel a esquerda). Os resultados da amplificação prévia, usando os iniciadores PP1 e MT-R1 específico, também se encontram exemplificados nesta figura 9. Os fragmentos foram clonados e seqüenciados.

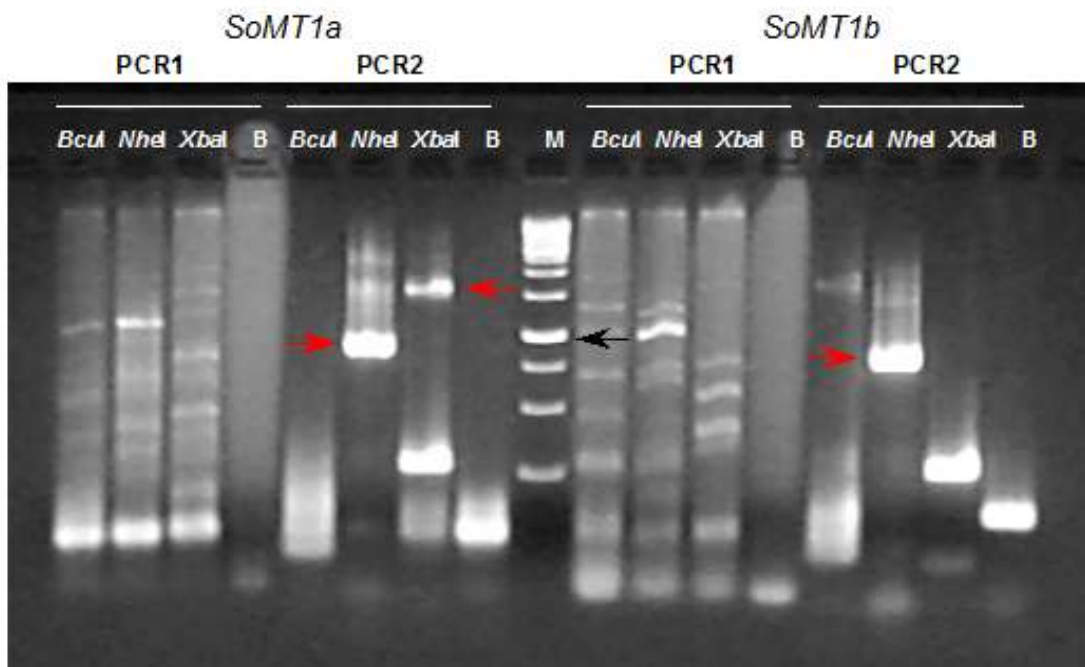


Figura 9 – Resultado da PCR 1 e PCR 2 para os genes *SoMT1a* e *SoMT1b* de cana-de-açúcar nas bibliotecas obtidas da digestão de DNA genômico da cultivar 'SP80-3280', usando as enzimas de restrição *BcuI*, *NheI* e *XbaI*. As setas vermelhas indicam os fragmentos de 800 pb e 1.500 pb para *SoMT1a* e de 800 pb para *SoMT1b*. A seta preta indica o fragmento de 1.000 pb do marcador de peso molecular (M). B: controle negativo

Para ambas as *SoMT1* foram obtidas seqüências dos fragmentos de 800 pb (*NheI*) (Figuras 10 e 11) . Um alinhamento 2 a 2 usando a ferramenta *blast2seq* (NCBI) entre ambas seqüências de *SoMT1a* e *SoMT1b*, evidenciou que os dois segmentos apresentavam cerca de 80% de identidade, e continham uma região sem alinhamento entre elas, correspondente a aproximadamente 100 nucleotídeos, presente só em *SoMT1a*. Baseado no EST utilizado para o desenho dos iniciadores, estimou-se o tamanho da seqüência promotora presumível de 863 pb para *SoMT1a* e 809 pb para *SoMT1b* considerando como +1 o nucleotídeo de início da tradução (Figuras 10 e 11). As seqüências consenso de cada tipo, foram submetida a análise comparativa com seqüências depositadas no banco de dados NCBI e TIGR. A posição dos iniciadores foi confirmada assim como a identidade com a seqüência promotora de MT1 de milho (Gene id: 542432 *mtl1*) (de FRAMOND, 1991).

```

T7 →
CAANCTGGGTCGGACGTCGCATGCTCCCGGNCCGCCATGGGGGCCGCGGGAATTCGATT
ACTATAGGGCACGCGTGGT
-863
GGCCCTAGCTAGTGAACCTTGTAGATCGATGCGAGGGAAGTTCTCACACGCTAGGTATATATGCTTCA
GTAATTGACACTGGAACAGCAATGGTACATCATAAAAAGAAGCTGAAGATTTCCACTGATTATAGT
TGTGTTGCTTTGAGCTCAGCTCTTAACGTGTTGCATTTAAATTTGCGACATCAACCCCTGNCAGGT
CCACAATCAATTTTTCGCACATCAGCCCTGCGCAGGTCCCTGTTTTTGAATATAAGATTTTTTTC
AGTTATTAATTCATCCTGTTTCTGCAAGACTACTTCAGCAGTAATTTTCATCGAATGAACAATGTT
TTCCTCTCACAACAAATCAGTACAAGCATAAAGGCAAATTTTCATGTTTGGAGCAAATCTATAGAA
AAGAGAAAATATTGCATCATTGATACGACCTTCTTGTGACAGAAGACGTTAATACTCTTCTCTA
TAAGGTTGATCAAACCTTAGATGATTTAACTTAGCGGTGACAAATGATAAAGGGACTACCAATAA
ATAAAAAATAAAAAATTGAATTGAATTACCATGTGAAATCGAAATAAATATATACTNCCAAGGTAG
AATAATTCTGGAGACAAGTGGTGGGCATCGATCGGATTGGAGGCCAGGAGGACTTGTCTGGAGGG
AGCCTATGGCTTGCTGACACGGCGCGTTGCGTGCCTGTGTTGGCTTAATAATTGGCCGAATCCTCC
ATCCGCTGCTATAAAAACCGGTGCTGGGGCTCATTTGTGCTCAAGCTCAACCAAAGCGAAAACGAC
TTTGTAAAGACGCCACTTTGGTAGAT -46
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCGAGGTGACCATATGGGAGAGCGTCCCAACGCGTTGGAT
GCANAGCTGNGAGTNT ← SP6

```

Figura 10 - Seqüência consenso representando aproximadamente 863 pb da região promotora do gene *SoMT1a* de cana de açúcar. T7 e SP6 indicam o sentido do sequenciamento. Em negrito e sublinhado, encontram-se as seqüências dos iniciadores PP2 e *SoMT1a*-R2.

**T7** →  
**AATTGCAC**TAGTTGATTACGNTG...**AGGGCNCGCGTGGT**  
**-809**  
GGCCCTAGCTAGTGAACCTGTGGATCGATGCGAGGAAGTGTTACACGCTAGTGTATATATGCTTC  
AATAATTGACACTGGTGCAGAAATGATACACGCATCATAAAAGAGACTTAAATCTAATTGTGCACT  
GATTATTATTAGTTGTGTTCCCTTCATCTGAGCTCTTAACGTGTTATATTTTAAATTCGCACATCA  
ACAACCCCTGGCAGGTCCACAAGCATTCTTTGGTCTGGTAGCATCTACTACCCCTGCTTTCTGAAAT  
CTAAGATTTTTTTAGTTATTTATGTAAGACAAACTATTTAAGTTTGACCCAATTTTATAGAAAAGA  
AGAAAAATATTACATCGTTCTGGTACATCTTGCTGTGCGCTACAAGGACGTTAATATTTCTTTCTCT  
ATATTAAGGCTTNGATCAAACCTTAAGATGATTTGACTTTTGTAATCGACGAGAACATATGGGGG  
AGGGACCACAACAACAAAAAGAAGAAGAAAAATGGAATCGAATTACCAAGTCGAAATCGAAATAT  
ATACTCCAATCTAGAACAATCTGGAGACAAGTGGTGGGCATTGGATTCCGGAGGACCAAGGAGGAC  
TTGTTCTGGAGGGAGCCTATGGCGTGGTGTACACGGCACGTTGCGTGCCGTGTGTTGGCTCAATTGGC  
CGAATCCTCCATCCACTGCTATAAAAACCGGTGTTGGGGTTCACTTTGTTGCTCAAGCTCAAACAC  
AAGCAANGACGAGCTTTGTAGACGCCCTTTGGTAG, **-47** ← **SP6**

Figura 11 - Seqüência consenso representando aproximadamente 809 pb da região promotora do gene *SoMT1b* de cana-de-açúcar. T7 e SP6 indicam o sentido do sequenciamento. Em negrito e sublinhado, encontram-se as seqüências dos iniciadores PP2 e *SoMT1b*-R2

#### 4.4.2 Metalotioneína tipo 2: *SoMT2a* e *SoMT2b*

Para caracterização da região promotora do gene *SoMT2a*, foram seqüenciados fragmentos de aproximadamente 700 pb e 2.000 pb, obtidos na amostra de DNA digerido com a enzima de restrição *BclI*, e de aproximadamente 2.500 pb da amostra de DNA digerida com *XbaI* (Figura 12A). No caso do gene *SoMT2b*, foram isoladas e seqüenciadas as bandas de aproximadamente 900 pb e 1.100 pb na amostra de DNA digerido com a enzima de restrição *XbaI* (Figura 12B). A amplificação prévia com os iniciadores PP1 e *SoMT2b*-R1 encontra-se ilustrada para o gene *SoMT2b* (figura 12B).

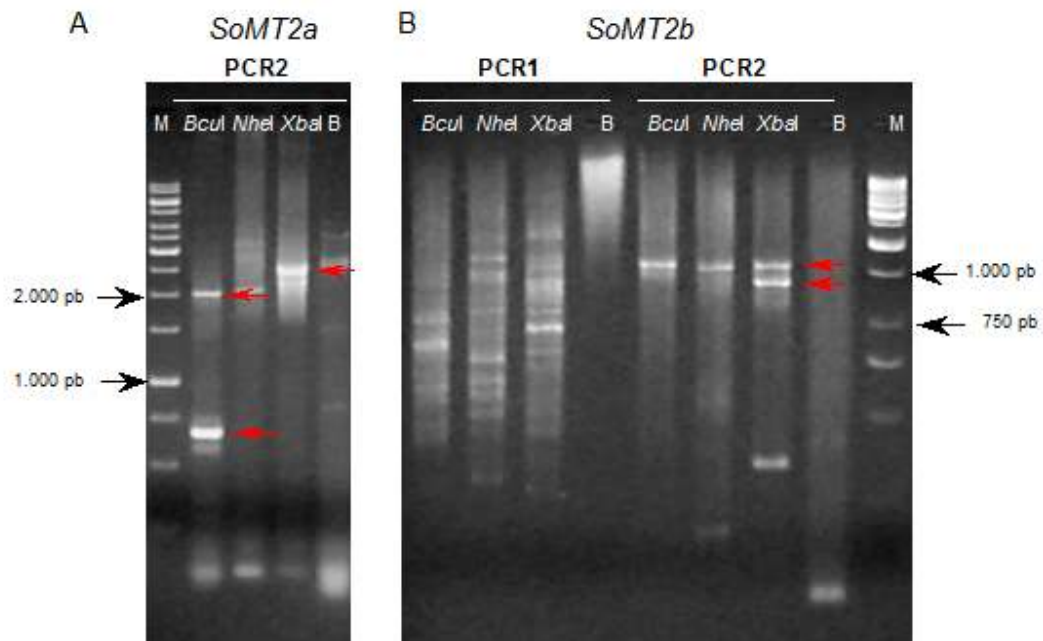


Figura 12 – (A) Resultado da PCR 2 para o gene *SoMT2a* de cana-de-açúcar nas bibliotecas obtidas da digestão de DNA genômico da cultivar ‘SP80-3280’, usando as enzimas de restrição *Bcul*, *Nhel* e *Xbal*. As setas vermelhas indicam os fragmentos de 700 pb, 2.000 pb e 2.500 pb. As setas pretas indicam as bandas de 1.000 pb e 2.000 pb do marcado de peso molecular (M). B: controle negativo. (B) Resultado das PCR1 e PCR 2 para o gene *SoMT2b* de cana-de-açúcar nas bibliotecas obtidas da digestão de DNA genômico da cultivar ‘SP80-3280’, usando as enzimas de restrição *Bcul*, *Nhel* e *Xbal*. As setas vermelhas indicam os fragmentos de 900 pb e 1.100 pb. As setas pretas indicam as bandas de 1.000 pb e 750 pb do marcado de peso molecular (M). B: controle negativo.

Não foi obtida seqüência correspondente à região promotora do gene *SoMT2a* apesar das várias tentativas, que apresentaram problemas de qualidade e tamanho insuficiente para análise. As amplificações primárias e secundárias (PCR-1 e PCR-2) usando os iniciadores PP1 e *SoMT2a*-R1, seguida de amplificações com PP2 e *SoMT2a*-R2 específicos para este gene também foram repetidos, e os fragmentos obtidos foram consistentes e idênticos, mas não puderam ser caracterizado neste trabalho.

As seqüências completas para a região promotora do gene *SoMT2b* foram obtidas do sequenciamento da banda de 900 pb (Figura 12 B) [*Xbal*]. Uma seqüência consenso de

aproximadamente 520 pb foi obtida a partir do alinhamento de todos os clones seqüenciados em ambos sentido (Figura 13). A comparação por alinhamento de essa seqüência com o banco de dados do TIGR identificou a seqüência do iniciador SoMT2b-R2 e mais uns poucos nucleotídeos a montante deste como sendo metalotioneína de cana de açúcar. O alinhamento da mesma seqüência no banco de dados do NCBI identificou uma metalotioneína de arroz só na região do iniciador (não mostrado). Uma maior identidade foi obtida para dois trechos desta seqüência, de mais de 150 pb cada um, com um *cluster* no DNA genômico de sorgo associado a estresses, mas não ficou claro que se trate de uma metalotioneína (não mostrado). Considerando que ambos os iniciadores específicos SoMT2b-R1 e SoMT2b-R2 alinharam somente com ESTs de cana de açúcar correspondentes a metalotioneína no banco de dados do *Saccharum officinarum Gene index*, prosseguiu-se com a análise.

O tamanho de 553 pb da seqüência promotora putativa de *SoMT2b* foi calculado considerando como +1 o nucleotídeo de início da tradução.

```

T7 →
-553
AATCNTAAANTGATNTCAACAGTCNTGANTTATTTGNTGTCNTGCAGTTTGTGTTGATTGATTGGTGG
GTGCTTACCATAAANTGTTTCAGAGTTTGAGTTATATTAATTTGTGCCTCATCATTCATCCCCTTGC
ATATATCTNTGTGTGTTTATGATGAATGAAAAAGACAAACTTCTCCTTGCCGCGATATTATGTATA
TGACGGCCGACAGACAGACACCGCTCGCTCGCTCAAAGTAAAGTGAAATTAAGTGCAGAAAAATTCC
CTGCACCCCTTTGGACCCTTTCACTCCAAAAGACGGAGAGAGAGAGAGGGAAAGAGAGGCTGCTGTGTC
TCTCTATCCATATTCTGCTCCCAAAGCAGACTGGTGGTNCCGTGGTGGTCACTGGCTNGTCCGCG
TCCATTCTTTCCGGCCTCCGGCTGCCGTCCTCCACTCCGCCACCCCGGCCTATTTATACCCCGCTT
CGCCCAACCTGCCATCCTCATCACAAGCAAGCACNACACCCNGNTCTTTAGTAGCAA -32
                                     SP6 ←

```

Figura 13 - Seqüência consenso representando aproximadamente 553 pb da região promotora do gene *SoMT2b* de cana de açúcar. T7 e SP6 indicam o sentido do sequenciamento. Em negrito e sublinhado, encontra-se a seqüência do iniciador SoMT2b-R2 específico.

#### 4.4.3 Metalotioneína tipo 3: *SoMT3*

Idênticos procedimentos foram realizados para obtenção de um fragmento de aproximadamente 1.500 pb para caracterizar a região promotora de *SoMT3* a partir de amostras de DNA digeridos com a enzima *BclI* (Figura 14). Foi obtida uma seqüência consenso de aproximadamente 800 pb a partir do alinhamento de três fragmentos seqüenciados em ambos os sentidos (Figura 15). A seqüência foi confrontada com o banco de dados NCBI, e a região de 50 nucleotídeos correspondente ao iniciador e mais uns nucleotídeos na posição 5'UTR, apresentaram 100% de identidade com várias EST de cana-de-açúcar. O tamanho de 820 pb da seqüência promotora presumível de *SoMT3* foi calculado considerando como +1 o nucleotídeo de início da tradução.

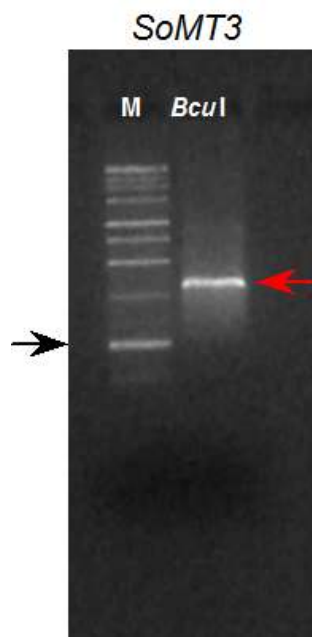


Figura 14 - Resultado da purificação do fragmento obtido na PCR 2 para o gene *SoMT3* de cana-de-açúcar, na biblioteca de DNA genômico da cultivar 'SP80-3280', digerido com a enzima de restrição *BclI*. A seta vermelha indica o fragmento de aproximadamente 1.500 pb. A seta preta indica a banda de 1.000 pb do marcado de peso molecular (M).



SP6 →  
 AATTGCACTAGTTGATTACGNTG  
 -820 **AGGGCNCGCGTGGT**GGCCCTAGCTAGTGAACCTGTGGATCGATGCGAGGAAGTGTTCACACG  
 CTAGTGTATATATGCTTCAATAATGACACTGGTGCAGAAATGATACACGCATCATAAAAGA  
 GACTTAAATCTAATTTGTGCACTGATTATTATTAGTTGTGTTCTTTT CATCTGAGCTCTTAAC  
 GTGTTATATTTTAAATTTGCGCACATCAACAACCCTGGCAGGTCCACAAGCATTTTTTGGTCT  
 GGTAGCATCTACTACCCGCTTTCTGAAATCTAAGATTTTTTTAGTTATTTATGTAAGACAA  
 ACTATTTAAGTTTGACCCAATTTTATAGAAAAGAAGAAAAATATTACATCGTTCGTGGTACAT  
 CTTGCTGTGCGCTACAAGGACGTTAATATTCTTTCTCTATATTAAGGCTTNGATCAAACTTT  
 AAGATTGATTTGACTTTTGTAAATCGACGAGAACATATGGGGGAGGGACCACAACAACAAAA  
 AGAAGAAGAAAAATGGAATCGAATTACCAAGTCGAAATCGAAATATATACTCCAATCTAGAA  
 CAATTTCTGGAGACAAGTGGTGGGCATTTGGATTCTGGAGGACCAAGGAGGACTTGTTCGGAGG  
 GAGCCTATGGCGTGGTGACACGGCACGTTGCGTGCCTGTGTTGGCTCAATTTGGCCGAATCCT  
 CCATCCACTGCTATAAAAAACCGGTGTTGGGGTTCACTTTGTGCTCAAGCTCAAACACAAGC  
**AAAGACGAGCTTTGTAAGACGCCCTTTGGTAGA** -43  
 ATCGAATTCCCGCGAGGCCGCCANAGCCGGNGCGGGAGCATGCGACGTCAGAANCCCNCGTTG  
 NG ←← T7

Figura 15 - Seqüência consenso representando aproximadamente 820 pb da região promotora do gene *SoMT3* de cana de açúcar. T7 e SP6 indicam o sentido do sequenciamento. Em negrito e sublinhado, encontra-se a seqüências do iniciador *SoMT3-R2* específico.

#### 4.5 Elementos cis-regulatórios presentes na região promotora dos genes *SoMTs*

As seqüências consenso obtidas das regiões promotoras presumíveis dos genes das metalotioneínas *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2b* e *SoMT3* de cana-de-açúcar foram analisadas em busca de motivos regulatórios conservados em plantas usando os programas “*MatInspector professional*”, *PLACE* e *PlantCARE*. Os três programas disponibilizam informações referentes aos motivos regulatórios identificados baseados na base de dados do *PLACE (Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements Database)*.

Comparações entre as seqüências consenso das quatro *SoMTs* e seqüência ESTs de cana depositadas no banco de dados do *Saccharum officinarum Gene Index* revelaram a existência de uma região 5' não traduzida (UTR) de escassos nucleotídeos, que inclui a seqüência do iniciador *reverse* específico de cada gene. A seqüência a montante desta região de cada gene foi submetida a análises computacionais e os resultados obtidos

revelaram a presença de motivos típicos de regiões promotoras de eucariotos, tais como o TATA-box, normalmente presente a ~30 pb do ponto de início da transcrição. O Início da transcrição (CA<sub>a</sub>) e elementos proximais, tipicamente localizados a aproximadamente 100 pb acima deste ponto (CCAAT-box), também foram estimados (STEPHEN e JAMES, 2003). Um quarto motivo regulatório comumente encontrado em eucariotos, o elemento GC-box, não foi identificado. Entretanto, é comum a ausência de um ou dois dos quatro elementos característicos nas seqüências promotoras (SMALÉ; KAGONAGA, 2003). Zhou e colaboradores (2006) identificaram os motivos TATA-box e início da transcrição em todas as regiões promotoras das 11 metalotioneína em arroz, mas somente duas MTs tipo 2 apresentaram GC-box, o que corrobora os dados aqui descritos.

Após intensa seleção, levando em consideração os valores de probabilidade da seqüência do motivo regulatório aparecer ao acaso, assim como a detecção de motivos repetidos (mesma posição) entre os diferentes programas utilizados, foram selecionados como relevantes 34 motivos regulatórios para o gene *SoMT1a*, 36 para *SoMT1b*, 21 para *SoMT2b* e 20 para *SoMT3* (Tabela 10). Esses valores se referem ao total de motivos escolhidos, sendo que alguns deles estão representados mais de uma vez (Tabela 10). Elementos regulatórios específicos, especialmente àqueles relacionados com a indução por fatores bióticos e abióticos e de expressão tecido específica, foram previstos para todas as seqüências de MTs.



Tabela 10 – Elementos cis regulatório encontrados nas regiões promotoras presumíveis dos genes *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2b* e *SoMT3* de cana-de-açúcar. N°: quantidade de elementos de cada tipo. ( ): posição do motivo regulatório.

Nome	Seqüência	Descrição	<i>SoMT1a</i>	<i>SoMT1b</i>	<i>SoMT2b</i>	<i>SoMT3</i>
			N° (posição)			
<i>TATA box</i>	TATAAAAT	Sítio para RNA pol-II eucariótica	*	*	*	*
<i>CCAAT-box</i>	(C)CAAT	Sítio para fator de transcrição CTF/NF1	*	*		*
<i>ITE</i>	CAa	Início da transcrição	*	*	*	*
<i>BRRE</i>	CGTG	resposta a brassinoesteróides	1(-772)	1(-717)		3 (-467; -381; -355)
<i>enhancer</i>	TTTCTTCTCT	ativador da expressão gênica	1(-424)	1(-437)	1(-230)	
	TGTCACA		1(-381)			
<i>OSE</i>	GAAA	expressão específica em grãos de pólen		2(-673, -372)	1(-264)	
	TCCACCATA					1 (-444)
	AGCGGG	expressão específica em tecido vascular			1 (-65)	
	GNNGTT	expressão específica em anteras		1(-330)		
	CTCTT	expressão específica em nódulos de raízes	2(-664, -364)	2(-655, -587)	1(-206)	
	TAAAG	expressão específica em células guarda	1(-306)	1(-342)	1(-284)	
	CNAACAC	expressão específica no endosperma e embrião	2(-682, -154)			
<i>DOF=DNA</i>	AAAG	expressão específica no endosperma		1(-710)		
<i>HDZip1</i>	CAAT(A/T)ATTG	diferenciação de células do mesófilo		1(-697)		
<i>SURE</i>	GAGACA	resposta à deficiência de enxofre	1(-210)	2(-650, -207)	1(-187)	2 (-410; -259)
<i>AuxRE</i>	TGTCTC	resposta à auxina	2 (-381, -210)	2(-650, -207)	1(-187)	
	ATTTCA		1(-306)	1(-342)	1(-284)	
<i>AuxRE/SAUR</i>	CATATG		1(-309)			
<i>ASF1</i>	TGACG	resposta à auxina, ácido salicílico e luz			1(-321)	

Continua ...

Nome	Seqüência	Descrição	SoMT1a	SoMT1b	SoMT2b	SoMT3
	YTGTC(A/T)C	Repressão de genes de defesa a patógenos	2(-381, -210)	1(-207)		
<i>W-box</i>	(T)TGAC(C)	resistência a doenças	1(-742)	1(-329)		
	TTGACC			1(-455)		
	TGACT					2 (-535;-515)
<i>BIHD1</i>	TGTCA	resistência a doenças	3(-742, -384, -142)	2(-682, -329)		
<i>ABRE</i>	ACACNNG	ABA	2(-744, -142)	5(-682, -590, -117, -72, -37)		
	GCAACGTGT			1(-146)		1 (-260)
<i>QAR</i>	AACGTGT	estresse tênsil e fermentos	1(-657)	1(-587)		
<i>DRE</i>	RCCGAC	tolerância à seca, ou estresse hídrico			1(-315)	3 (-416; -387; -302)
	GTTA		1(-551)	1(-382)		
<i>Core CRT/DRE</i>	GTCGAC	estresse hídrico ou baixas temperaturas	1(-318)			
<i>GT1</i>	GAAAAA	resistência ao patógenos/doenças e salinidade	1(-557)	1(-407)	1(-358)	1 (-602)
	GTGG	estresse salino			1(-146)	
	AGAA	resistência ao choque térmico	1(-160)	1(-158)		
<i>ERSE</i>	CCACG	resposta ao estresse do reticulo endoplasmático	1(-145)	1(-143)	1(-140)	2 (-462; -144)
<i>ERE</i>	AWTTCAAA TCCC	resposta ao etileno	1(-577)			
					1(-170)	
	GAGAAGAATA	respostas ao ácido salicílico	1(-369)			
<i>Sucrose-box</i>	AAATCA	respostas aos açúcares	1(-563)			
<i>Amy-box</i>	TATCCAT				1(-185)	
<i>HSE-like motif</i>	CNNGAANNNTTCNNG	resposta a choque térmico		1(-222)		
<i>MeJaER</i>	CGTCA	resposta ao Metil jasmonato			1(-332)	
<i>Anaero</i>	AGCAGC	Anaerobiose	1(-82)		1(-200)	2 (-115; -73)
	AACAAAC				1(-471)	
	TCATCAC				1(-41)	

Para uma melhor interpretação dos resultados e evitar descrições redundantes, as regiões promotoras putativas de *SoMT1a* e *SoMT1b* foram descritas de forma comparativa entre si. Os elementos encontrados para *SoMT2b* e *SoMT3* foram descritos comparados às primeiras.

As regiões promotoras presumíveis de *SoMT1a* e *SoMT1b* compartilham a maioria dos motivos encontrados em ambas seqüências, mas alguns deles são exclusivos de cada tipo, evidenciando uma possível diferença regulatória na expressão destes genes (Tabela 10). Uma seqüência rica em pirimidinas ['TTTCTTCTCT'], anotada no banco de dados como um ativador da expressão gênica (*Py-rich enhancer*) se encontra presente em ambas *SoMT1a* e *SoMT1b* a aproximadamente 400 nucleotídeos do início da transcrição.

Motivos presentes em seqüências promotoras de genes com expressão específica de tecidos também foram observados. A seqüência 'CTCTT' se encontra duas vezes representada em cada *SoMT* tipo 1, e corresponde a um elemento especificamente expresso em células infectadas dos nódulos das raízes. O mesmo acontece com a seqüência 'TAAAG' específicas de regiões promotoras de genes com expressão em células guarda, a qual foi encontrada uma vez em cada *SoMT* tipo 1. Por outro lado, a seqüência 'CNAACAC' foi indicada pela análise em duas posições distintas em *SoMT1a*, mas se encontra ausente em *SoMT1b*. Essa seqüência foi identificada na região promotoras de um gene de *Brassica napus* como sendo necessária para a transcrição específica deste gene no endosperma e embrião. O motivo 'AAAG' (DOF=*DNA binding with one finger*), também necessário para a expressão específica no endosperma, se encontra presente na região promotora de *SoMT1b*, mas não de *SoMT1a*, evidenciando provavelmente a superposição de funções das *SoMT1* em resposta a diferentes estímulos.

O motivo 'TGTCACA', exclusivamente encontrado em *SoMT1a*, corresponde a um *enhancer* da expressão gênica, necessário para que o gene que o possui seja expresso em frutas. Esse elemento foi identificado num gene de *Cucumis melo* L. (melão) segundo anotação no banco de dados. Da mesma maneira, a região analisada de *SoMT1b* apresentou elementos tecido específicos que não foram encontrados em *SoMT1a*. Exemplo

destes são os motivos HDZip1 ['CAAT(A/T)ATTG'], envolvido na regulação durante a diferenciação de células do mesófilo, e 'GAAA' específico para expressão em grãos de pólen. Este último foi encontrado em dois trechos diferentes da região promotora de *SoMT1b*. Também, próximo do segundo motivo para expressão em grãos de pólen, foi observado um elemento responsável pela expressão tecido específica em anteras ('GNNGTT') de certos genes *myb* em tabaco.

Dentre os elementos presentes em ambas as seqüências promotoras, encontramos um elemento de resposta a brassinoesteróides ('CGTG'). Os brassinoesteróides são hormônios naturalmente presentes nas plantas que favorecem o crescimento vegetal. Em arroz, foi observado também, que reduzem o impacto do estresse salino e outros estresses ambientais mediante incremento da atividade da enzima nitrato redutase (ANURADHA; SEETA RAM RAO, 2003). Outros elementos, característicos de seqüências promotoras, específicos de resposta a fatores bióticos e abióticos foram encontrados em ambas *SoMT1*. Notadamente, foi observado que um mesmo sitio *cis-acting* pode conter uma seqüência de nucleotídeos capaz de ser reconhecido por diferentes fatores de transcrição num sentido ou no outro de sua seqüência, ou até mesmo superpostos no mesmo sentido. Um exemplo disto é o elemento 'GAGACA' (SURE = *core of sulfure-responsive element*) [MARUYAMA-NAKASHITA et al. 2005], envolvido em resposta á deficiência de enxofre. Este elemento comporta em sua seqüência antisense: o motivo AuxRE de resposta á auxina ('TGTCTC'), e se encontra uma vez na região promotora presumível de *SoMT1a* e duas vezes na de *SoMT1b*. O motivo AuxRE ('TGTCTC') aparece mais uma vez na seqüência promotora de *SoMT1a*, fazendo parte de novo, de outro motivo regulatório, já mencionado acima, o 'TGTCACA', *enhancer* específico de expressão em frutas encontrado em melão. Outro elemento AuxRE distinto ('ATTTCA') se encontra em ambas *SoMT* tipo 1 no *core* antisense do elemento específico de expressão em células guarda. A seqüência promotora do gene *SoMT1b* apresenta um terceiro motivo ('CATATG') envolvido em respostas a auxina. Este motivo AuxRE é chamado de SAUR (*small auxin-up RNA*) e foi relatado em soja (XU; HAGEN; GUILFOYLE, 1997). Os motivos do tipo AuxRE totalizaram três ocorrências em

*SoMT1a* e quatro em *SoMT1b*. Em arroz, a região promotora dos genes *OsMTI-1a* e *OsMTI-1b* apresentaram três e cinco motivos envolvidos com respostas a auxina, respectivamente (ZHOU et al., 2006). Os autores encontraram quatro motivos de resposta a auxina distintos, sendo três iguais aos aqui apresentados para cana-de-açúcar, entretanto não fazem distinção em relação a qual deles foi especificamente encontrado em cada tipo de MT.

O elemento ['YTGTC(A/T)C'] é reconhecido por proteínas repressoras (SEBF) (*silencing element binding factor*), e foi bem caracterizado em genes de batata associados a patogêneses (PR-10a) [BOYLE; BRISSON, 2001]. Esse elemento foi encontrado na região promotora de *SoMT1a* de cana-de-açúcar, na mesma região dos dois elementos AuxRE. Em *SoMT1b* aparece uma única vez e faz parte do primeiro core SURE/AuxRE mas não do segundo. Assim, este elemento é mais um exemplo de uma seqüência *cis*-regulatória presente no contexto molecular de outro elemento regulatório. Exemplos deste tipo ampliam o leque de possibilidades em relação a respostas aos mais diversos estímulos, e são forte evidência para a superposição de funções dos diversos genes MTs.

Os motivos '(T)TGAC(C)' ou 'TGAC', reconhecidos por membros da família de fatores de transcrição *W-box* estão associados a resistência a doenças. Este motivo é especialmente reconhecido por uma proteína WRKY induzida por ácido salicílico (CHEN; CHEN, 2000), e se encontra presente no início de ambas seqüências promotoras *SoMT1*. A forma 'TTGACC' pertencente a mesma família *W-box*, é especificamente induzida por elicitores fúngicos (EULGEM et al., 1999) e foi observada somente para *SoMT1b*. Esta seqüência é encontrada nos elementos *W1* e *W2* dos promotores dos genes *PR1-1* e *PR1-2* de salsa (*Petroselinum crispum*), sendo *PR1* um gene induzido por patógenos (RUSHTON et al., 1996).

Um segundo elemento relacionado á resistência a doenças pode ser reconhecido na mesma posição do elemento '(T)TGAC(C)' acima mencionado, na seqüência antisense, nas regiões promotoras de ambas *SoMT1*. Trata-se do motivo 'TGTCA', que reconhece o produto do gene de arroz OsBIHD1, que codifica para um fator de transcrição induzido durante patogênese (LUO et al., 2005). Mais duas cópias deste elemento estão presentes

na região promotora de *SoMT1a* e só mais uma em *SoMT1b* (Tabela 10). Os programas de busca de motivos cis-regulatórios identificaram a presença de um terceiro elemento nesta região. Trata-se do motivo ABRE 'ACACNNG', que se refere a um sítio de indução por ácido abscídico (ABA). Este elemento se encontra repetido uma vez na região promotora de *SoMT1a* e mais quatro em *SoMT1b*. O motivo 'GCAACGTGT', também reconhecido por ABA foi encontrado exclusivamente na seqüência promotora de *SoMT1b*, constituindo-se no sexto elemento deste tipo neste gene. Em arroz, Zhou e colaboradores (2006) descreveram dois elementos ABRE: 'ACACNNG' (identificado em cana-de-açúcar) e 'CATGCA' (não identificado neste trabalho). Sete cópias destes elementos foram identificadas na região regulatória de *OsMTI-1a* e três em *OsMTI-1b*. (ZHOU et al. 2006), evidenciando a importância da indução destes genes por ABA.

O motivo 'AACGTGT' foi encontrado uma vez, representado em cada seqüência *SoMT1*. Este elemento, responsivo ao estresse provocado por ferimentos e estresse tênsil, foi identificado na região promotora do gene *extA* (extensina) de *Brassica napus* (ELLIOT; SHIRSAT, 1998).

Vários elementos em ambas seqüências *SoMT1* correspondem às diferentes seqüências reconhecidas pelos diversos tipos de proteínas MYB. Alguns estão presentes em uma ou outra *SoMT1*, mas aqueles envolvidos com tolerância á seca ou estresse hídrico ('GTTA') estão presentes pelo menos uma vez na região promotora de ambas *SoMT1*. O mesmo ocorre com o motivo 'GAAAAA', conhecido como motivo GT-1, associado à resistência a patógenos/doenças e salinidade (HYEONG et al., 2004).

Por último, dois motivos associados a resposta a estresse abiótico foram encontrados em ambos genes *SoMT1*. O elemento 'AGAA', responsivo a choque térmico, também foi encontrado em *OsMTI-1a*, mas não em *OsMTI-1b* (ZHOU et al., 2006), e 'CCACG', conhecido como ERSE-I (elementos de resposta ao estresse do retículo endoplasmático ou elementos de resposta às proteínas não enoveladas). Em plantas, esses elementos parecem estar envolvidos em processos específicos, como o desenvolvimento da semente e em resposta a patógenos (VITALE e CERIOTTI, 2004). Cabe mencionar que

diversos motivos regulatórios responsivos a luminosidade e/ou diferentes tipos e intensidade de luz estão presentes em ambos genes MTI distribuídos em todo o comprimento das seqüências analisadas (dado não mostrado).

Outros motivos regulatório estão presentes exclusivamente na região promotora dos genes *SoMT1a* ou *SoMT1b*. O elemento ERE ('AWTTCAAA') de resposta ao etileno, é comumente observado na região promotora de genes induzidos durante a senescência ou amadurecimento dos frutos (MONTGOMERY et al., 1993), e foi encontrado somente em *SoMT1a*. O gene *OsMTI-1a* de arroz também apresentou esse motivo em sua região promotora (ZHOU et al., 2006). Um elemento *cis-acting* relatado no banco de dados PLACE como responsivo ao ácido salicílico ('GAGAAGAATA') foi encontrado adjacente ao elemento *AuxRE* de resposta a auxina somente na região promotora de *SoMT1a*.

O motivo 'GTCGAC' faz parte do chamado *Core CRT/DRE motif*, (SHIMAMURA et al., 2006) e participa da regulação de genes que respondem às baixas temperaturas. Este é mais um dos elementos observados somente em *SoMT1a*. Um motivo similar foi relatado por Zhou e colaboradores (2006), para os genes de metalotioneína tipo 2 de arroz, mas se encontra ausente de *OsMTI-1a* e *b*, homologas às *SoMT1* aqui descritas.

O *Sucrose-box* é um motivo regulatório presente na seqüência promotora de alguns genes responsivos a açúcares, que aumentam sua expressão durante o amadurecimento dos frutos. Existem pelo menos três desses elementos relatados na literatura e um deles, o motivo 'AAATCA', previamente caracterizado num gene de *Vitis vinifera* (CAKIR et al., 2003), foi identificado na região promotora de *SoMT1a*. Um outro elemento, localizado bem próximo do TATA-box, possui a seqüência 'AGCAGC' e foi anotado no banco de dados como sendo um dos 16 motivos presentes em 13 genes de diferentes espécies vegetais induzidos por anaerobioses e que participam em vias de processos fermentativos.

A região promotora do gene *SoMT1b* apresentou mais um motivo regulatório que não esta presente em *SoMT1a*. Trata-se da seqüência 'CNGAANNNTTCNNG', que pode ser lida nos dois sentidos, correspondente a um elemento *cis*-regulatório que recebe o nome de *HSE-like motif*, e está envolvido em resposta a choque térmico. Este motivo foi identificado

na região promotora do gene PR-1 ácida de tabaco de resposta a patógenos, sugerindo uma relação molecular entre ambos processos em plantas (*PLACE databank*).

Em relação a *SoMT2b*, foram identificados 21 elementos disponíveis nos banco de dados (Tabela 10). Quatro elementos regulatórios, envolvidos na expressão tecido específica, incluindo os motivos 'CTCTT'; 'TAAAG' e 'GAAA', que são elementos característicos de expressão em nódulos de raízes, células guarda, e grãos de pólen respectivamente, foram encontrados uma vez cada na região promotora de *SoMT2b*. Esses motivos também estão presentes nas regiões promotoras presumíveis dos genes *SoMT* tipo 1. Um elemento de expressão específica em tecido vascular ('AGCGGG') foi encontrado exclusivamente em *SoMT2b*, próximo ao início da transcrição.

Outros motivos, associados com resposta a fatores bióticos e abióticos, assim como também necessários para a transcrição de certos genes nas diversas fases do desenvolvimento foram identificados. Três elementos regulatórios responsivos a auxina foram encontrados. O primeiro, *ASF1* ('TGACG'), anotado como responsivo a auxina, ácido salicílico e possivelmente a luz, é preferencialmente expresso na ponta das raízes, especialmente em tecido meristemático deste órgão (KLINEDINST et al., 2000). O segundo motivo ('TGTCTC') compartilha do core do motivo *SURE*, responsivo a deficiência de enxofre, e o terceiro ('ATTTCA') é reconhecido pelos fatores de transcrição na fita antisense do elemento de expressão específico em células guardas. Zhou et al. (2006) identificaram cinco motivos *AuxRE* no promotor do gene *OsMT-I-2a*, quatro em *OsMT-I-2b* e um em *OsMT-I-2c*.

Vários outros elementos já descritos para *SoMT* tipo 1 foram encontrados na região promotora de *SoMT2b*, incluindo ERSE-I ('CCACG'), GT-1 ('GAAAAA'); e *Py-rich enhancer* ('TTTCTTCTCT') [Tabela 10]. O motivo 'CGTCA' é reconhecido por regular a expressão dos genes em resposta ao metil-jasmonato, mediante interação com a seqüência 'TGACG' (complementar), localizada a 15 pb de distância (ROUSTER et al., 1997). Na região promotora presumível de *SoMT2b*, esses dois elementos foram encontrados a 25 nucleotídeos um do outro, tendo sido identificado só em *SoMT2b*. Outros motivos



regulatórios estão presentes em *SoMT2b*, que não foram observados em *SoMT* tipo 1: *ERE* ('TCCC') de resposta ao etileno; 'GTGG' supostamente responsivo a estresse salino; *DRE/CTR* (G'CCGAC'A) responsivo a estresse hídrico; e *Amy-box* ('TATCCAT'), presente em genes regulados por açúcares e hormônios durante déficit de açúcares ou estresse por desnutrição (HWANG et al., 1998) (Tabela 10). O elemento *ERE* ('TCCC') é diferente do elemento encontrado em *SoMT1a*, e daqueles encontrados em arroz. O gene *OsMT-1-2c* é o único dos três genes tipo 2 de arroz que possui motivos *ERE* na sua região promotora, mas nenhum dos elementos relatados pelos autores é idêntico ao *ERE* encontrado em *SoMT2b* de cana-de-açúcar. Por último, três motivos de resposta à anaerobiose foram identificados, sendo um já observado para *SoMT1a* ('AGCAGC'), e os outros dois exclusivos de *SoMT2b: anaero* ('AACAAAC') e ('TCATCAC').

*SoMT3* demonstrou possuir 20 elementos presumíveis caracterizados em sua seqüência promotora. Foram identificados os tradicionais 'TATA-box', situado a cerca de 30-35 pb antes do início de transcrição presumível, 'CAa' e o 'CAAT-box', aproximadamente 90-100 pb acima do TATA-box. Motivos presentes nas outras *SoMTs* também foram identificados (Tabela 10) a saber: *ERSE* ('CCACG'); *GT1* ('GAAAAA'); *SURE* ('GAGACA') presentes em todas as *MTs*; *BRRE* ('CGTG') presente nas *SoMT* tipo 1; *DRE* ('RCCGAC') presente em *SoMT2b*; *anaero* ('AGCAGC') presente em *SoMT1a* e *SoMT2b*; e *ABRE* ('ACGTG') unicamente em *SoMT1b* (Tabela 10).

Exclusivamente em *SoMT3* foram encontrados em linha, dois elementos tipo *W-box* de resistência a doenças 'TGACT', e o motivo 'TCCACCATA' específico de expressão em grãos de pólen (Tabela 10).

Apesar dos genes *MTs* de plantas serem freqüentemente associados com resposta a metais, principalmente ao cobre, elementos responsivos a metais (*MRE*) não foram identificados nas regiões promotoras presumíveis dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar. Esses motivos foram amplamente encontrados na região regulatória de muitos genes *MTs* em mamíferos (COYLE et al., 2002; HAQ et al., 2003). A seqüência 'TGCRCBCG' do elemento *MRE*, (R representa uma purina e B pode ser qualquer nucleotídeo com exceção

de adenina), é crucial no reconhecimento de fatores de transcrição que induzem a expressão de MTs na presença de metais. Entretanto, poucas vezes até agora esta seqüência foi encontrada em genes metalotioneína de plantas (EVANS et al., 1990; WHITELAW, et al., 1997; FORDHAM-SKELTON et al., 1998; CHATTHAI et al., 2004; ZHOU et al., 2006). Zhou e colaboradores (2006) identificaram o elemento *MRE* em seis dos onze membros da família de MTs de arroz. Concomitantemente, foi encontrado um motivo ('CTGCCA') específico para cobre (*CuRE*) em três dos seis genes que possuem motivo *MRE* em sua região promotora. Dos cinco genes em que o elemento *MRE* se encontra ausente, um deles (*OsMT-I-3a*) apresentou o motivo *CuRE*, sugerindo que outros motivos regulatórios / fatores de transcrição, podem estar envolvidos com resposta a metais nas regiões promotoras dos MTs de plantas independentemente do motivo *MRE* (ZHOU et al., 2006). Entretanto, o elemento *CuRE* só foi encontrado até agora na região promotora de *FeMT3* do trigo sarraceno *Fagopyrum esculentum* Moench e de *PjMT1* de *Prosopis juliflora* (BRATIC et al., 2008; USHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2009), além dos genes MTs de arroz (ZHOU, et al., 2006). De acordo com a hipótese de que outros elementos ainda não identificados poderiam estar envolvidos em resposta a metais, QI; ZHANG e CHAI (2007) identificaram duas seqüências, de menos de 40 nucleotídeos cada uma, responsiva a metais pesados (*HMRE*) na região promotora do gene *PvSR2* de *Phaseolus vulgaris*, um gene que responde a metais pesados mas não a outros estresses ambientais. A primeira delas contem um motivo quase idêntico ao *MRE* das regiões promotoras dos genes MTs de animais e plantas. A segunda região apresentou um motivo novo 'ATTCAA', que não tinha similaridade com nenhum elemento *cis* envolvido em resposta a metais previamente identificados: *MRE*, *CuRE*, *ZRE* (responsivo ao Zinco) e/ou *FRE* (responsivo a ferro) [QI; ZHANG; CHAI, 2007]. Ensaio com sistemas de gene repórter indicaram que o motivo 'ATTCAA' foi altamente responsivo a metais quando investigada a expressão do promotor de *PvSR2* em plantas transgênicas de tabaco. Isto sugere que motivos responsivos a metais diferentes, ou que apresentam modificações em relação à aqueles comumente anotados

nos bancos de dados podem estar presentes nas regiões promotoras dos genes MTs, mas ainda precisam ser identificados e sua função comprovada.

A presença de tantos elementos *cis-acting*, relacionados com estresses tão diversos, assim como também vinculados a expressão tecido específico, nas regiões promotoras dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar, sugere que estes genes são controlados por uma complexa rede de mecanismos regulatórios em resposta á vários estresses. Embora isso esteja de acordo com os relatos sobre expressão dos genes MTs em resposta a estresses bióticos e abióticos, assim como em diversos tecidos e etapas do desenvolvimento (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008), é importante observar que tais implicações devem ser comprovadas com ensaios apropriados, e que estes resultados devem ser entendidos como uma caracterização da região promotora que nos oferece um ponto de partida na busca da função dos genes para metalotioneína em cana de açúcar e / ou em aplicações biotecnológicas.

#### **4.6 Análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo**

Os iniciadores desenvolvidos especificamente para cada gene *SoMT* de cana-de-açúcar foram empregados para análise de expressão gênica por amplificação quantitativa de transcritos reversos (RT-qPCR). Para se calcular o nível de expressão dos genes são necessários os valores de Ct das amostras na reação e os valores da eficiência de cada par de iniciador. O Ct não indica diretamente o valor de expressão dos genes, pois este depende também da eficiência da amplificação obtida para o cDNA com cada par de iniciadores específicos. Por outro lado, a curva de dissociação de cada produto de amplificação deve ser obtida para certificar a qualidade e especificidades dos iniciadores (PFAFFL, 2004). Assim, com objetivo de determinar a eficiência de amplificação,  $R^2$  e curva de dissociação dos iniciadores, foi inicialmente utilizado como molde um *pool* de cDNA dos diversos tecidos/órgãos limbo foliar, colmo, inflorescência, meristema e raiz, diluídos

serialmente a  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ . Os cinco pares de iniciadores para MTs foram validados com uma eficiência de amplificação (E) de aproximadamente 2, variando de 1,98 a 2,02, com coeficiente  $R^2$  maior que 0,99. As curvas de dissociação apresentaram picos únicos com distintos  $T_m$  (Tabela 11).

Tabela 11 – Eficiência de amplificação e  $R^2$  dos cinco iniciadores específicos dos genes de MT de cana-de-açúcar. Os valores de temperatura de dissociação dos produtos amplificados na curva de dissociação ( $T_m$ ) são apresentados.

<b>Gene</b>	<b>Eficiência (E)</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b><math>T_m</math> (°C) produto</b>
<b>SoMT1a</b>	2,0	0,997	83,2-83,7
<b>SoMT1b</b>	1,98	0,998	85,0-85,3
<b>SoMT2a</b>	2,02	0,997	86,2-86,7
<b>SoMT2b</b>	2,0	0,996	85,5-85,8
<b>SoMT3</b>	2,0	0,994	88,5-89,2

O método escolhido para análise da expressão gênica é considerado relativo, uma vez que a transcrição do gene de interesse não será expressa em número absoluto de transcritos da amostra, senão em relação à quantidade relativa de transcritos de outro gene tido como constante, denominado gene de referência. A quantificação consiste em obter a razão de expressão entre um gene alvo (de interesse) numa amostra de cDNA, em relação à expressão do gene de referência para a mesma amostra de cDNA (PFAFFL, 2004).

Dentre os candidatos a gene de referência (Tabela 5), o gene *rp/35-4* codificando uma proteína ribossômica (CALSA JR; FIGUEIRA, 2007) foi o que apresentou a menor variação quantitativa de expressão nas amostras de tecidos/órgãos de cana-de-açúcar analisados (dados não mostrados).

#### 4.6.1 Expressão basal de *SoMTs* em diferentes tecidos/órgão.

Para avaliar o nível de expressão basal dos genes *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3*, amostras de tecido fresco de três plantas de cana-de-açúcar de cada uma das variedades, sendo meristema de 'SP87-432', inflorescência, limbo foliar, e raiz de 'SP80-3280' e colmo de um indivíduo F1 do cruzamento 'SP80-180 x SP80-4966' foram congeladas em nitrogênio líquido, moídas e o RNA extraído foi utilizado para síntese de cDNA. As amostras de colmo foram usadas como controle para expressão relativa e o gene *rpI35-4* como normalizador da expressão. O controle negativo utilizou água ultrapura como molde. (WILLEMS, LEYNS, VANDESOMPELE, 2008).

Quando as diversas amostras dos tecidos foram analisadas, observou-se que *SoMT1a* e *SoMT1b* foram os genes com maior expressão em todos os tecidos, seguidos de *SoMT2b* e *SoMT3*. *SoMT2a* teve a menor expressão de todos (Tabela 12). Essa tendência está de acordo com o observado para a grande maioria dos genes de metalotioneína, que, de modo geral seguem a fórmula: MT1> MT2> MT3 (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008).

Tabela 12 – Expressão relativa dos genes de *SoMTs* nos diferentes tecidos/órgãos em relação ao colmo. Os valores da expressão correspondem à razão entre o gene de interesse (*SoMT*) e o de referência (*rp135-4*). Valores acima de 1 (um) representam a expressão maior no tecido/órgão (inflorescência, limbo, meristema e raiz), valores abaixo de 1 (um) representam a expressão maior no colmo.  $\pm$  erro padrão.

Gene	Inflorescência	Limbo	Meristema	Raiz
<b><i>SoMT1a</i></b>	42,97 $\pm$ 2,59	3,66 $\pm$ 1,59	0,04 $\pm$ 0,0	10,39 $\pm$ 3,4
<b><i>SoMT1b</i></b>	24,74 $\pm$ 1,25	2,71 $\pm$ 0,54	0,10 $\pm$ 0,02	13,82 $\pm$ 0,41
<b><i>SoMT2a</i></b>	0,94 $\pm$ 0,23	0,0002 $\pm$ 0,0	0,0004 $\pm$ 0,0	0,22 $\pm$ 0,03
<b><i>SoMT2b</i></b>	2,54 $\pm$ 0,20	0,05 $\pm$ 0,0	1,00 $\pm$ 0,12	1,85 $\pm$ 0,25
<b><i>SoMT3</i></b>	0,07 $\pm$ 0,01	3,86 $\pm$ 0,89	0,01 $\pm$ 0,0	1,12 $\pm$ 0,18

Com exceção de *SoMT2a* e *SoMT3*, todos os genes foram mais expressos em inflorescência do que em colmo (Tabela 12). *SoMT2a* teve expressão similar em ambos tecidos, e *SoMT3* foi aproximadamente 14 vezes menos expresso na inflorescência. As raízes foram o órgão com a segunda maior expressão de MTs, principalmente *SoMT1a* e *SoMT1b* seguido de *SoMT2b* > *SoMT3* > *SoMT2a*. A maior expressão em limbo foliar foi de *SoMT3* (~4x mais que no colmo). O meristema foi o tecido com menor expressão de *SoMTs*, sendo *SoMT2b* o mais abundante, senão o único gene MT transcrito, levando em consideração os valores relativos de expressão dos outros genes MTs (Tabela 12)

Os resultados de expressão das metalotioneínas nos diversos tecidos se apresentaram de acordo com o esperado, seguindo a tendência observada nos últimos 15 anos de pesquisas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008). A expressão constitutiva de genes de metalotioneínas tem sido extensamente investigada em folhas, raízes e frutos assim como também em diversos tecidos destes órgãos. Porém a expressão dos genes MT em flores e inflorescências tem sido menos descrita. O padrão de expressão dos genes para os diversos tipos de metalotioneínas foi também deduzido da grande

quantidade de dados sobre MTs, nas diferentes bibliotecas de EST de tecidos, para algumas espécies (FIGUEIRA; KIDO; ALMEIDA, 2001; KOHLER, et al., 2004).

Para a maioria das espécies vegetais, a expressão de metalotioneínas nos diversos tecidos é estudada separadamente por tipo de MT, e o conhecimento de quantas isoformas distintas poderiam fazer parte de cada tipo é limitado. Geralmente, as MTs tipo 1 são mais expressas em raízes do que em caule e folhas, mas também foi observada em frutos, flores e semente (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008). Num experimento para determinar quais os genes mais expressos nos diversos tecidos de *Pisum sativum* (EVANS et al, 1990), foi isolada uma metalotioneína tipo 1 com expressão amplamente superior nas raízes, mas que ainda pôde ser detectada nas folhas jovens. Entretanto não foi observado em nenhum dos tecidos avaliados das folhas maduras (EVANS et al, 1990). Em milho, foi determinado mediante *northern blots*, um padrão de expressão de MT tipo 1 semelhante ao observado em *P. sativum*, mas neste caso pode ser detectado nas folhas maduras e nas sementes também (de FRAMOND, 1991). Para *Brassica napus* o resultado da análise de expressão de genes MT tipo 1 foi contrario ao comumente observado (BUCHANAN-WOLLASTON, 1994). Os experimentos de *northern blot*, a partir de bibliotecas para genes diferencialmente expressos em diversos tecidos, demonstraram que houve uma elevada expressão de transcritos de MT tipo 1 em folhas em diversos estágios de senescência, assim como também em flores, com detecção fraca em folhas jovens e gemas, enquanto que nenhuma expressão foi detectada em raízes (BUCHANAN-WOLLASTON, 1994). MTs tipo 2 são predominantemente expressas nas partes aérea das plantas, incluindo folhas e flores, mas a expressão em raízes foi freqüentemente observada assim como também em frutos (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008). Transcritos do gene MT tipo 2a e 2b de *Arabidopsis thaliana* foram observados em raízes maduras, folhas e flores, sendo que *MT2b* também foi modestamente expresso nas vagens (ZHOU; GOLDSBROUGH, 1995). Contrariamente ao esperado, a expressão de *mt2* de *Malus domestica* foi praticamente inexistente em folhas, mas encontra-se abundantemente expresso em flores e frutos nos primeiros estágios do desenvolvimento (REID; ROSS,

1997). Entretanto, o gene tipo *mt3* de maçã foi altamente induzido nas folhas de plantas com frutos maduros (REID; ROSS, 1997). MT tipo 3 é o gene de metalotioneína de maior expressão em frutos carnosos, seguida de uma abundante expressão em folhas, principalmente em plantas que não produzem frutos (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002; FREISINGER, 2008). Transcritos de *mt3* foram altamente expressos na casca da banana (*Musa acuminata*), mas também em folhas, onde a expressão foi mais elevada do que a de *mt2* (CLENDENNEN; MAY, 1997). Contudo, a expressão de genes MT tipo 3 é observada para a maioria das espécies, quase que exclusivamente em frutos, onde costuma ser o gene mais abundantemente transcrito também. O projeto de sequenciamento de EST de frutos de *Citrus unshiu* identificou 20% dos clones como seqüências codificantes de metalotioneína tipo 3 (MORIGUCHI et al., 1998). Do mesmo modo, o clone Ac180, identificado como MT tipo 3, foi extremamente abundante em bibliotecas obtidas a partir de frutos maduros e imaturos de abacaxi, representando 40% do total dos clones isolados (MOYLE et al., 2005). A metalotioneína Ac180 foi 50 vezes mais expressa do que o gene da  $\beta$ -actina em tecidos de frutas maduras. Expressão em raízes de MTs tipo 3 foi poucas vezes relatada (ZHOU, et al, 2006). Alguns desses resultados aparentemente contrários ao esperado, costumam aparecer quando não se investiga qual é a isoforma de um determinado tipo de gene de MT em estudo. Possivelmente, análises detalhadas de várias MTs de um mesmo tipo podem evidenciar qual delas é a isoforma tida como mais expressa no tecido em questão, sem invalidar o novo resultado encontrado para as outras isoformas.

Transcritos dos três tipos de MTs podem ser concomitantemente detectados (GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003; KOHLER, et al., 2004; ZHOU et al., 2006). Mediante avaliação semiquantitativa de expressão (RT-PCR) Kohler et al., (2004) caracterizaram a expressão específica das duas isoformas, para cada um de três tipos de metalotioneína, em diversos tecidos da espécie arbórea álamo (*Poplar*). Os autores observaram que as duas MTs tipo 1 (*PtdMT1a* e *PtdMT1b*) foram específicas de raízes, e as duas MTs tipo 2 (*PtdMT2a* e *PtdMT2b*) foram altamente expressas em folhas, com menor expressão em ramos, e menor ainda em raízes. *MT3b* foi altamente expressa em folhas e discretamente



em raízes, enquanto que *MT3a* apresentou expressão quase nula em todos os tecidos. Em arroz todos os membros da família MT foram avaliados por *northern blot* em diversos tecidos e estágios de desenvolvimento (ZHOU, et al., 2006). Curiosamente, os dois genes de MT do tipo 1 (*OsMT-I-1a* e *OsMT-I-1b*) foram altamente expressos em folhas e bainhas, preferencialmente maduras, mas não em raízes. De fato, o único gene expresso em raízes foi um dos genes tipo 3 (*OsMT-I-3b*), também diferentemente do esperado. O outro gene tipo 3 (*OsMT-I-3a*) foi altamente expresso em folhas e bainhas assim como um dos três genes tipo 2 (*OsMT-I-2a*). Todos os genes tipo 2 foram altamente expressos em colmo e inflorescência (ZHOU, et al., 2006).

Sistemas de gene repórter usando o gene *uidA* da enzima  $\beta$ -glucoronidase bacteriana em *Arabidopsis*, identificaram a expressão dos genes *MT1a*, *MT2a*, *MT2b* e *MT3* associada a diversos tecidos (GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003). *MT1a* e *MT2b* é altamente expressa em tecido vascular de todos os órgãos, e predominantemente na região madura da raiz, enquanto que a expressão de *MT2a* e *MT3* foi localizada mais especificamente em células do mesófilo das folhas. A expressão destes genes nas raízes maduras foi discreta, mas foi intensa nas pontas. A expressão de todos os genes mudou com a idade das plantas aumentando com o envelhecimento e um papel na homeostase de metais essenciais durante a senescência foi proposto (GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003).

Portanto, os diversos genes de *SoMTs* de cana-de-açúcar seguem um padrão de expressão tecido específico, similar ao encontrado para a grande maioria das espécies investigadas. A precisão com que esses dados podem ser observados e confirmados parece depender da sensibilidade do método de detecção e principalmente do conhecimento das diversas isoformas.

## 4.6.2 Ensaio para estresse oxidativo

### 4.6.2.1 Experimento com doses de cobre

O cobre é um elemento essencial para o desenvolvimento normal das plantas, participando de vários processos fisiológicos, sendo co-fator para muitas metaloproteínas. Entretanto, o excesso deste micronutriente pode ser potencialmente tóxico. O cobre livre (não ligado a proteínas) tem uma comprovada capacidade de iniciar dano oxidativo, catalisando a formação de espécies reativas de oxigênio, interferindo no transporte de elétrons na fotossíntese e inibindo o crescimento das plantas (YRUELA, 2005).

Ambas situações envolvendo cobre (micronutriente ou agente causador de estresse oxidativo), fazem dele um elemento de estudo que se encaixa nas possíveis funções atribuídas às metalotioneínas: homeostasia ou tolerância a metais. Entretanto a resposta dos genes MT ao cobre é variada, podendo a expressão ser induzida, reprimida ou até mesmo ficar sem efeito, dependendo do sistema analisado (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002).

Plântulas da cultivar SP-3028 de cana-de-açúcar cultivadas *in vitro* na presença de 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre foram empregadas para investigar a expressão dos cinco genes tipo metalotioneína: *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* por RT-qPCR. As amostras de raízes e parte aérea foram coletadas em triplicata no período de 6; 24; 48; e 96 h após a imposição do tratamento com metal. Cada replicata consistiu de um *pool* do material contido em três vidros com aproximadamente 4 plântulas cada um. O gene usado como referência para normalização foi *rp/35-4*. Os dados foram analisados seguindo o procedimento descrito por Willems, Leyns e Vandesomepele (2008).

Os resultados obtidos indicaram que a presença do cobre nas doses utilizadas e tempo de imposição do tratamento, não causou nenhum efeito significativo sobre a expressão dos genes MT, em ambos tecidos avaliados (Figuras 16 – 20 [A e B]). A única diferença significativa indicada pela análise estatística se refere a um aumento da expressão

de *SoMT1b* nas raízes de cana-de-açúcar as 6 h após exposição a 500  $\mu\text{M}$  de cobre (Figura 17B).

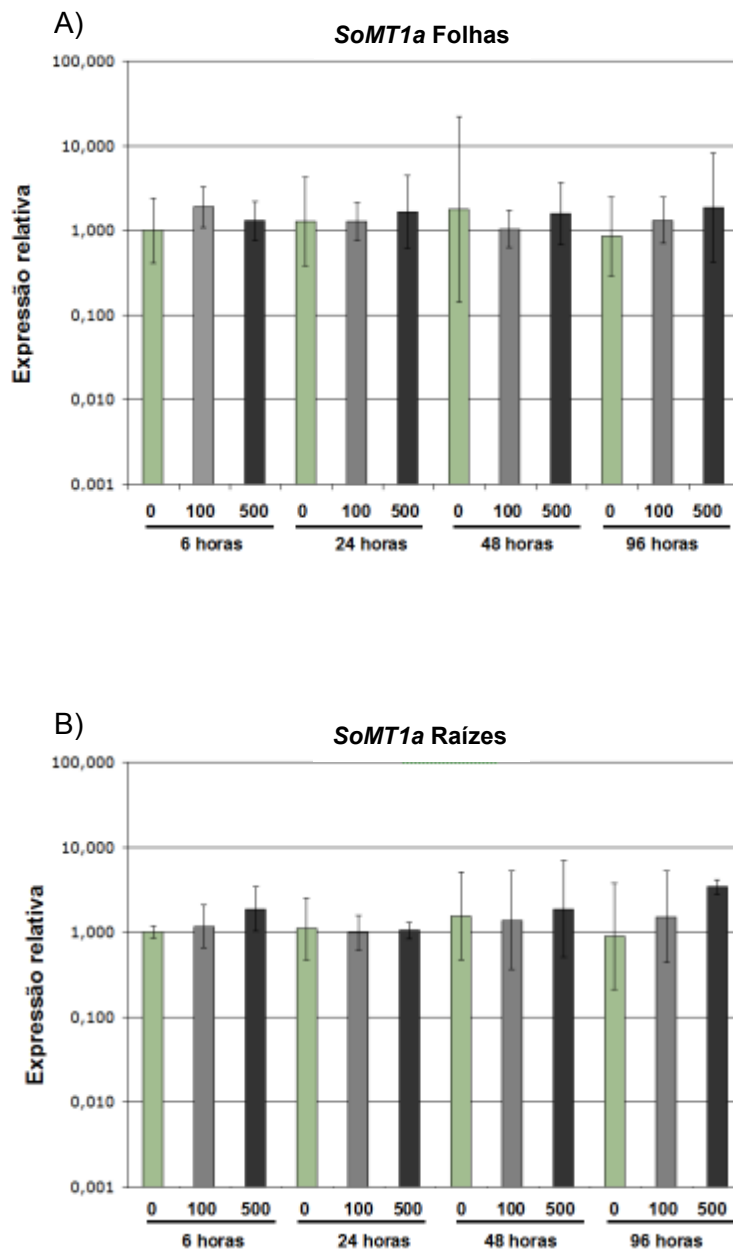


Figura 16 – Expressão relativa do gene de metalotioneína *SoMT1a* de cana-de-açúcar a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, após 6, 24, 48h e 96h de tratamento. A) Expressão em folhas; B) Expressão em raízes. A expressão do gene *rp135-4* foi usada para normalização. n= 3 repetições biológicas  $\pm$  erro padrão.

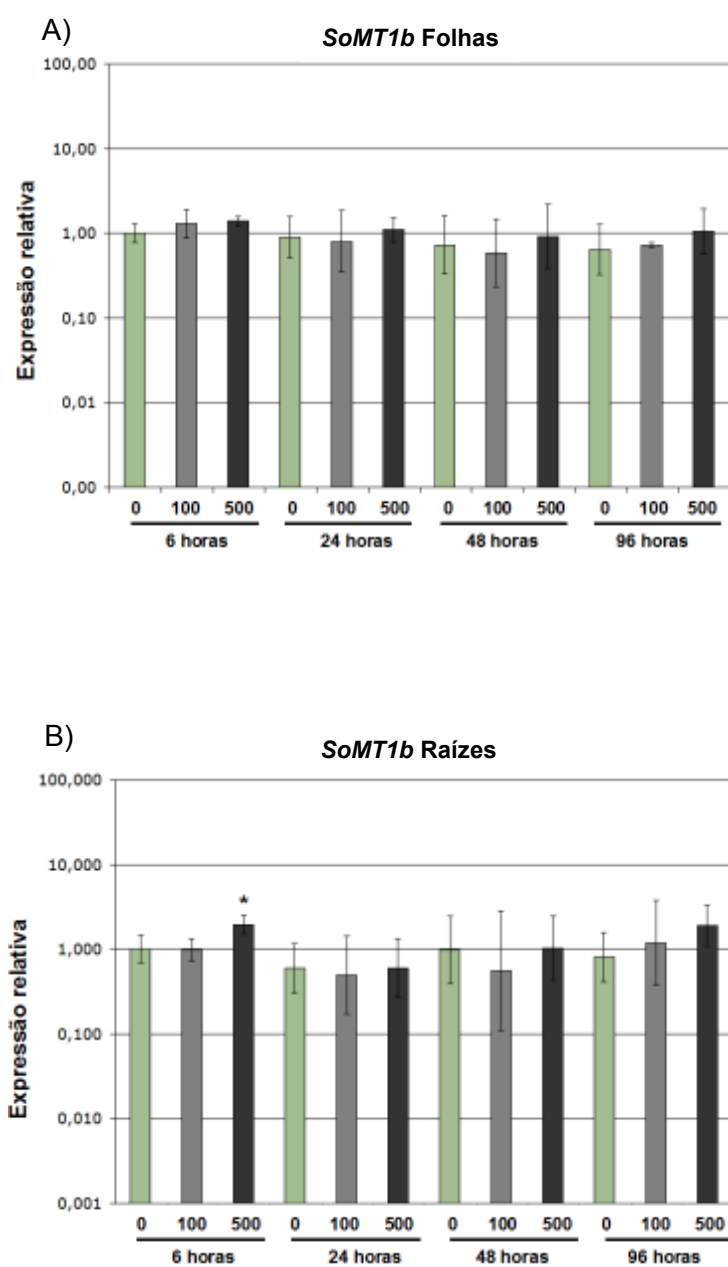


Figura 17 – Expressão relativa do gene de metalotioneína *SoMT1b* de cana-de-açúcar a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, após 6, 24, 48h e 96h de tratamento. A) Expressão em folhas; B) Expressão em raízes. A expressão do gene *rp/35-4* foi usada para normalização.  $n= 3$  repetições biológicas  $\pm$  erro padrão. \*  $p=0,05$  diferentemente significativo.

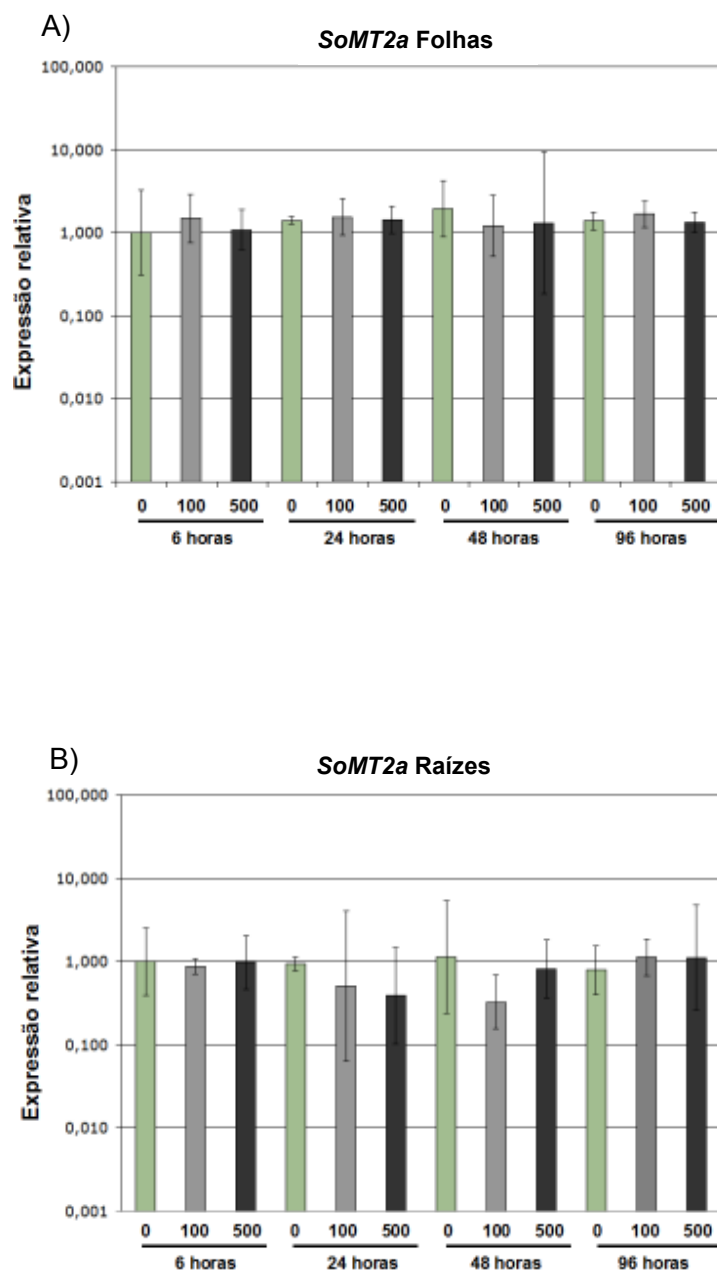


Figura 18 – Expressão relativa do gene de metalotioneína *SoMT2a* de cana-de-açúcar a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, após 6, 24, 48h e 96h de tratamento. A) Expressão em folhas; B) Expressão em raízes. A expressão do gene *rp/35-4* foi usada para normalização.  $n = 3$  repetições biológicas  $\pm$  erro padrão.

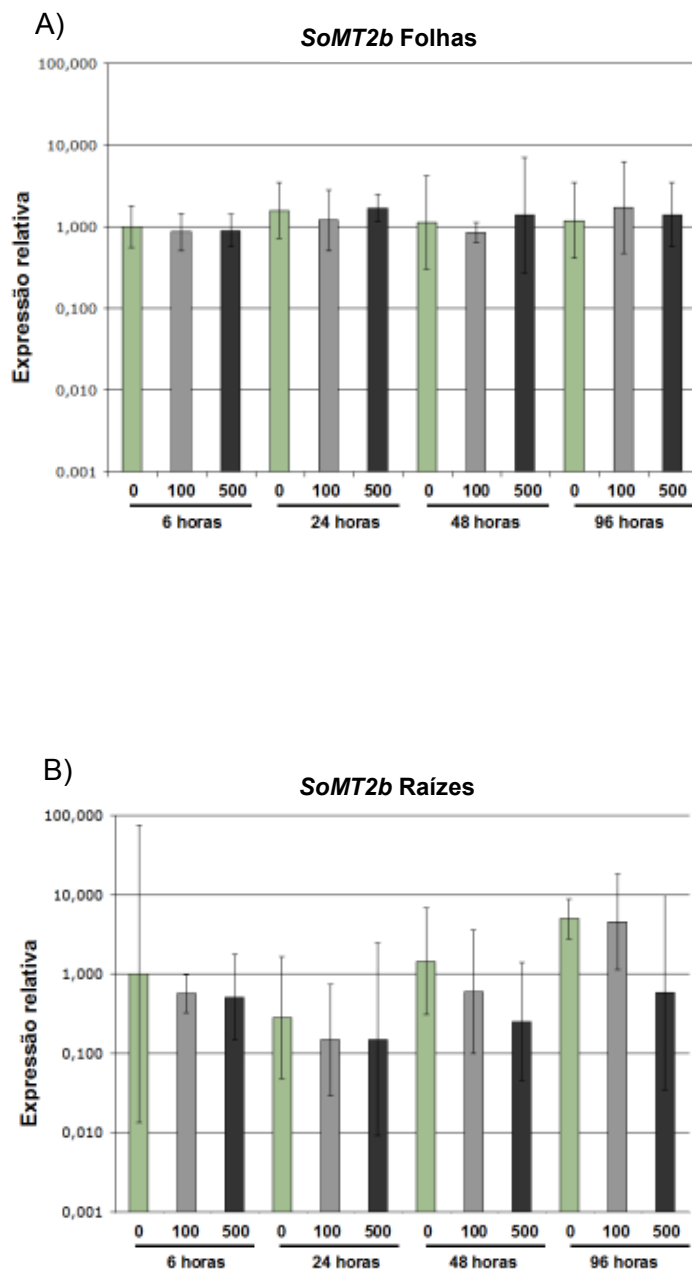


Figura 19 – Expressão relativa do gene de metalotioneína *SoMT2b* de cana-de-açúcar a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, após 6, 24, 48h e 96h de tratamento. A) Expressão em folhas; B) Expressão em raízes. A expressão do gene *rp135-4* foi usada para normalização. n= 3 repetições biológicas  $\pm$  erro padrão.

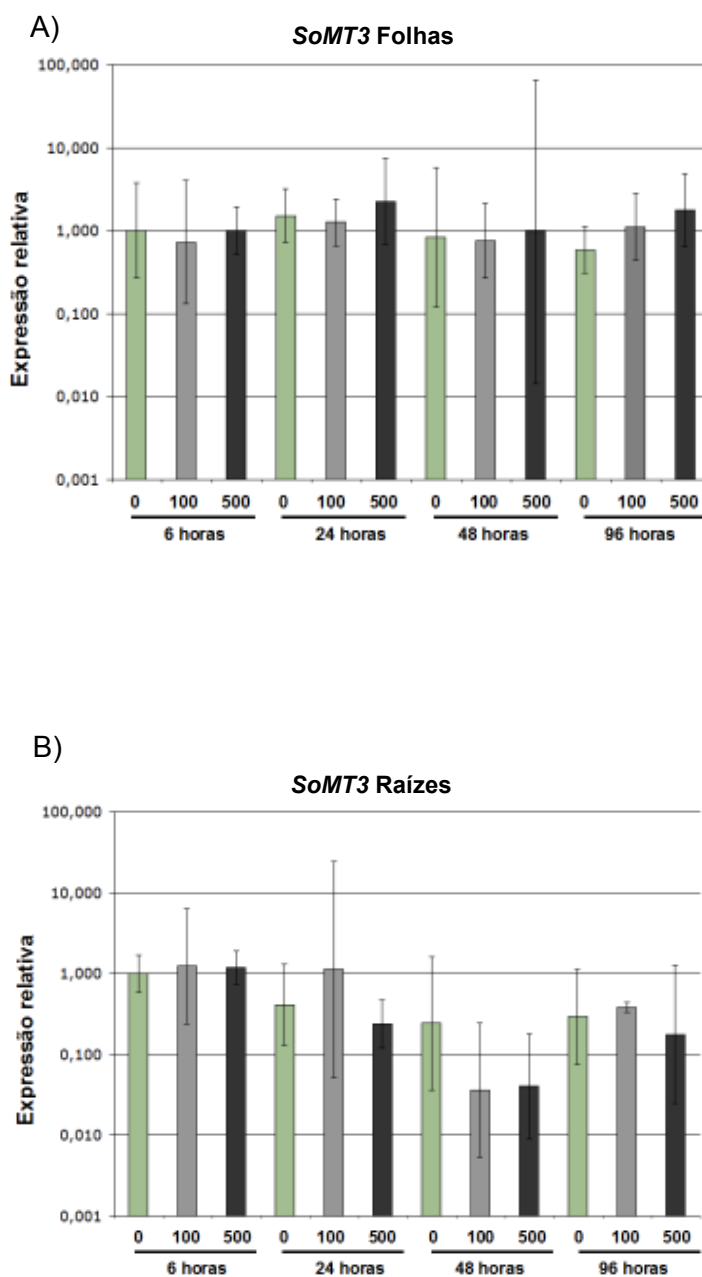


Figura 20 – Expressão relativa do gene de metalotioneína *SoMT3* de cana-de-açúcar a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, após 6, 24, 48h e 96h de tratamento. A) Expressão em folhas; B) Expressão em raízes. A expressão do gene *rp35-4* foi usada para normalização.  $n = 3$  repetições biológicas  $\pm$  erro padrão.

A indução por cobre de MTs tipo 1 e / ou tipo 2 já foi relatada em diversos trabalhos para arroz, trigo, *Douglas fir*, *Arabidopsis* e *Festuca rubra* (JIN et al., 2006; HSIEH, et al., 1996; SNOWDEN; RICHARDS; GARDNER, 1995; CHATTHAI et al. 1997; GARCIA-HERNANDEZ; MURPHY; TAIZ, 1998; GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003; MA et al., 2003). Em tabaco, baixas concentrações de cobre aumentaram a expressão de um gene MT do tipo 2, enquanto que altas doses a inibiram (CHOI et al., 1996). Por outro lado, a expressão da MT tipo 1 de *Mimulus guttatus*, uma planta tolerante ao cobre é reprimida na presença deste metal (de MIRANDA et al., 1990). O mesmo acontece com a expressão do gene MT tipo 2 *BjMT2*, em plântulas de *Brassica juncea* tolerantes a metais (SCHAFER et al., 1997). Em *Heliantus tuberosus*, a expressão do gene *htMT2* foi reduzida de forma inversamente proporcional á concentração de cobre (CHANG, et al., 2004). Em tomate, o cobre provocou respostas contrastantes entre três genes tipo MT 2 (*LEMT1*, *LEMT3* e *LEMT4*), sendo que, houve um pequeno aumento na expressão de *LEMT1*, repressão na expressão de *LEMT3*, e não houve mudanças na expressão de *LEMT4* (GIRITICH et al., 1998). Em *Silene vulgaris*, uma planta tolerante ao cobre, a expressão do gene MT tipo 2, também não evidenciou mudanças na presença de cobre (VAN HOOFF et al, 2001). O nível de transcrito de MT tipo 1 e 2, investigados em *Vicia faba*, é mais um exemplo no qual o tratamento com cobre não teve nenhum efeito sobre a expressão de genes MTs (FOLEY; SINGH, 1994). O gene MT tipo 3 de *Arabidopsis* (*AtMT3*) é induzido por cobre nas pontas das raízes e nas folhas jovens, enquanto que nas folhas mais velhas, onde MT3 é expresso mais abundantemente, não houve mudanças no nível de transcritos (GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH, 2003). Em algodão, o gene *GhMT3* foi rapidamente induzido pela presença de cobre. Níveis elevados de transcrito foram observados com apenas uma hora após tratamento com cobre, atingindo o máximo de expressão com três horas (XUE et al., 2009). O gene MT tipo 3 de *Prosopis juliflora* (*PjMT3*), uma espécie arbórea acumuladora de metais, foi induzido por cobre só após 48 h de tratamento, entretanto o gene tipo 1, *PjMT1*, foi rapidamente induzido nas primeiras 24 h. Por outro lado, a expressão de MT tipo 2 *PjMT2*, manteve-se elevada, mas estável durante imposição do tratamento com cobre



(USHA; VENKATARAMAN; PARIDA, 2009). O perfil de expressão de três genes tipo MT, dos nove identificados em *Hordeum vulgare* L, foi investigado durante exposição ao cobre (HEISE et al., 2007). Os resultados mostraram que mais uma vez um gene MT tipo 1 (*HvMT1a*) foi induzido por 1 mM de cobre enquanto que a expressão do gene MT tipo 2 (*HvMT2a*) manteve-se inalterada. Por outro lado, um gene de MT tipo 3 (*HvMT3a*) foi altamente expresso num experimento desenvolvido para promover déficit de cobre. Plantas crescidas em água de torneira, sem adição de qualquer metal, aumentaram intensamente a expressão do gene *HvMT3a* em relação à expressão observada em plantas crescidas em meio MS ou água, com adição de 1 mM de cobre. Em resumo, esses resultados indicam que a resposta dos genes MT ao cobre é extremamente variada, podendo a expressão ser induzida tanto pela presença como pelo déficit do metal. Repressão ou mesmo ausência de efeito sobre a expressão dos genes MTs também foi observada.

Recentemente, investigamos a modulação de três genes de metalotioneína tipo 1, 2 e 3, em plântulas de cana de açúcar tratadas com doses crescentes de cobres (50, 100, 250 e 500  $\mu$ M) (SERENO et al., 2007). Os resultados foram idênticos aos aqui encontrados, não havendo efeito da presença do cobre sobre a expressão das MTs. Nesse experimento, as amostras de folha e raiz de cana de açúcar foram investigadas mediante *northern blots* e sem especificidade por isoformas. Na época, pensamos que o conhecimento das possíveis isoformas de cada tipo de MT de cana de açúcar, aliado de técnicas mais sensíveis pudessem oferecer um resultado mais preciso. Entretanto, nenhuma diferença foi evidenciada. Por outro lado, foi observado que cana de açúcar era capaz de acumular cobre em parte aérea e raízes com teores comparáveis a aqueles encontrados em plantas indicadoras da presença de metais. Roosens et al., (2004), investigaram a expressão de *TcMT3*, um gene de MT tipo 3 do hiperacumulador de metais *Thlaspi caerulescens*, em resposta ao cobre. Os autores encontraram que a indução de metalotioneína tipo 3 por cobre foi restrita às populações que expressaram esse gene menos abundantemente de forma constitutiva. Foram utilizadas três populações diferentes: St Felix-de-Pallière (França), Prayon (Bélgica) e Puente Basadre (Espanha), caracterizadas de acordo com a capacidade

de acumularem, ou tolerarem, cádmio naturalmente nas regiões de origem. A expressão constitutiva de *TcMT3* na parte aérea da população St Felix-de-Pallière foi três e sete vezes mais abundante, que a expressão deste gene nas populações de Prayon (que acumula menos cádmio) e Puente Basadre (que tolera menos cádmio), respectivamente. A expressão de *TcMT3* nas raízes foi similar entre as três populações. A presença de 50  $\mu\text{M}$  de cobre, por 72 h, foi suficiente para induzir a expressão de *TcMT3* nas populações de Prayon e Puente Basadre, enquanto que na população St Felix-de-pallière se manteve elevada mas sem efeito. Não houve qualquer efeito do cobre sobre *TcMT3* nas raízes das três populações (ROOSENS et al., 2004). No mesmo trabalho, Roosens et al. (2004) observaram que transcritos de *TcMT3* eram 2,5 vezes mais abundantes, na parte aérea de populações de Prayon, de *T. caerulescens*, do que transcritos *AtMT3* na parte aérea de *Arabidopsis thaliana*. Os autores concluíram que a expressão constitutiva, elevada, de *TcMT3* nas populações provindas de solos do tipo calaminas e serpentinas serve para garantir a homeostase do cobre num ambiente celular com elevado conteúdo de cádmio.

Num trabalho semelhante, Roosens et al. (2005) encontraram que *TcMT1* e *TcMT2* eram 2,5 e 4 vezes, respectivamente, mais expressas em parte aérea de *T. caerulescens* que os genes ortólogos de *Arabidopsis*. Por outro lado, foi observado que em plantas sem nenhum tratamento, *TcMT2* é abundantemente expresso em parte aérea e raízes de plantas de *T. caerulescens*, enquanto que *TcMT1* é expresso em menor medida na parte aérea, e é quase inexistente em raízes. Quando investigaram a expressão de *TcMT1* e *TcMT2* em resposta ao cobre, os resultados do *northern blot* mostraram que, o tratamento com 30 e 100  $\mu\text{M}$  de cobre, por três dias, induziu a expressão de *TcMT1* na parte aérea das plantas mas *TcMT2* não foi afetada. Mais uma vez foi observada a indução por cobre da metalotioneína menos expressa constitutivamente. Do mesmo modo que para *TcMT3*, os autores enfatizam a possível função de *TcMT1* na homeostase de cobre.

Por outro lado, a indução de genes MT dos diversos tipos por cobre foi repetidamente encontrada em plantas de *A. thaliana* (ZHOU; GOLDSBROUGH, 1994; GARCIA-HERNANDEZ; MURPHY; TAIZ, 1998; GUO; BUNDITHYA; GOLDSBROUGH,

2003). Entretanto, a abundancia de transcritos MTs em *Arabidopsis* é relativamente menor se comparada a *T. caerulescens* com o qual haveria a necessidade de aumento da expressão destes genes em relação ao cobre, seja pela presença excessiva do metal, numa possível função antioxidante ou pelo insuficiência de cobre necessário para o bom funcionamento de metalo-proteínas envolvidas em diversos procesos celulares. Portanto, a indução de genes MTs por cobre parece depender da concentração inicial de transcrito nas plantas. Assim, altas concentrações de cobre não teriam efeito sobre a expressão de genes MTs em espécies vegetais onde estes genes se encontram em abundancia.

#### 4.6.2.2 Experimento com paraquat

Diversas condições e agentes ambientais, assim como processos normais do desenvolvimento, são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio com o conseqüente dano celular por estresse oxidativo (APEL; HIRT, 2004). Embora a possível função mais aceita, das metalotioneínas em plantas se refere a um papel na homeostasia/detoxificação de metais, alguns estudos têm indicado que estas proteínas poderiam ter uma função na proteção contra o efeito de espécies reativas de oxigênio (AKASHI et al., 2004; MIR et al, 2004; WONG et al., 2004).

O herbicida paraquat (metil viologen) interfere no sistema de transferência de elétrons gerando radicais superóxido e causando estresse oxidativo. Assim, a expressão dos cinco genes tipo metalotioneína: *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3*, de cana-de-açúcar foi investigada em resposta ao paraquat, na parte aérea de plantas da variedade 'SP80-3280'. O experimento foi montado ao ar livre e a aplicação do 200g L<sup>-1</sup> ha<sup>-1</sup> herbicida foi feita às 11:00 h para melhor aproveitamento da luz solar intensa. Os efeitos do herbicida costumam ser fracos em ausência de luz e os primeiros sintomas de dano às folhas, em plantas de ervilha, começam a aparecer a aproximadamente 5 h após a aplicação de luz (MOSKOVA et al., 2009). Em cana-de-açúcar foram observados sintomas

de toxicidade visual nas folhas e reduzida atividade fotossintética, 18 h após exposição ao paraquat (CHAGAS et al., 2008). Os tempos de coleta de amostras vegetais, neste experimento, ocorreram a 15 min, 6 h e 24 h após aplicação do herbicida. A expressão dos genes *SoMTs* obtida por RT-qPCR foi normalizada usando a expressão do gene *rpl35-4*.

Os sintomas visuais, foram identificados nas plantas já as 6 h após tratamento com paraquat, com perda do turgor considerável e um enegrecimento das folhas semelhante a queimaduras. Após 24 h, houve uma intensificação dos sintomas com manchas necróticas e enrolamento do limbo foliar (dados não mostrados) que prejudicou o rendimento da extração de RNA desse material. Entretanto, três semanas após a imposição do tratamento, as plantas de cana-de-açúcar foram capazes de exibir rebrotação.

Os resultados da análise da expressão (Figura 21 A-D) mostram que não houve diferenças significativas na expressão dos diversos genes *SoMTs* entre as plantas controles e tratadas com paraquat 15 min após tratamento. Houve uma tendência à repressão da expressão as 6 e 24 h após a aplicação do herbicida, mas esses valores foram significativos somente para *SoMT1a* (Figura 21-A). Para os genes *SoMT1b*, *SoMT2a* e *SoMT3*, a redução da expressão apresentou significância estatística somente nas amostras coletadas às 24 h (Figura 21-B, C e E), onde o efeito deletério do herbicida sobre as plantas foi contundente (dado não mostrado). *SoMT2b* não apresentou diferenças significativas para acúmulo de transcritos entre controle e tratamento em nenhum tempo avaliado (Figura 21-D).

O efeito indutor do paraquat sobre as MTs já foi amplamente demonstrado em animais (revisado por Haq, Mahoney e Koropatnick, 2003). Em relação às plantas, há poucos relatos. Mir et al (2004) encontraram por meio de hibridação *in situ*, que a MT tipo 2 de *Quercus suber* aumenta sua expressão em células embrionárias e xilema dos cotilédones na presença de 5  $\mu$ M de paraquat. A MT tipo 1 da gramínea *Chloris virgata* (*ChIMTI*) foi também induzida por 5  $\mu$ M de paraquat nas folhas e raízes da planta 6 h após tratamento, e as 12 h houve uma diminuição da expressão até valores idênticos a folhas não tratadas, mas manteve-se elevado nas raízes por mais de 24 h. (NISHIUCHI; LIU; TAKANO, 2007). Recentemente, Xue et al. (2009) observaram que 100  $\mu$ M de paraquat ou 10 mM de

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) causaram o mesmo efeito sobre a expressão do gene MT tipo 3 (*GhMT3a*) de plântulas de algodão, com os níveis de transcrito de *GhMT3a* aumentando consideravelmente às três horas após tratamento, com mais um aumento às 6 h e mantendo-se assim por doze horas. Mais dois exemplos foram encontrados na literatura sobre o efeito do paraquat na expressão de genes MTs mas ambos se referem a metalotioneínas de fungos. A expressão de *GintMT*, o primeiro gene tipo MT isolado do fungo micorrízico arbuscular *Glomus intraradices*, foi induzida nos micélios tratados com paraquat (GONZÁLEZ-GUERRERO, et al., 2007). Por outro lado, BERGERO et al., (2007) avaliaram a atividade transcricional do promotor do gene *GmarMT1*, do fungo *Gigaspora margarita* em leveduras. Os resultados mostraram que a presença de paraquat no meio, não teve efeito sobre a expressão do gene.

Os escassos relatos envolvendo a resposta dos genes MTs de plantas ao paraquat, indicam um aumento na expressão destes genes. Entretanto, os resultados apresentados para os genes MTs de cana-de-açúcar mostraram que, com exceção de *SoMT2b*, houve uma repressão da expressão de todos os genes. Não fica claro se esse declínio é devido a regulação específica do paraquat sobre os genes MTs ou uma consequência da superprodução de ROS, os quais causam morte celular. Por outro lado, sabe-se que outros agentes capazes de gerar estresse oxidativo reprimiram a expressão de genes tipo metalotioneína. Esses dados foram encontrados por Brkljacic e colaboradores (2004) quando investigavam a resposta de um gene MT tipo 3 no trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum* Moench). Tratamentos com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e/ou altas concentrações salinas (NaCl) diminuíram drasticamente os níveis de *FeMT3* em folhas verdes / jovens. No entanto, nenhum dos tratamentos teve efeito sobre a expressão de *FeMT3* em folhas senescentes onde a expressão do gene se manteve inalterada. A presença de altos níveis de transcritos de metalotioneína encontrados em folhas durante a senescência foi sugerida como um mecanismo celular de proteção ao DNA do dano oxidativo (BUCHANAN-WOLLASTON; AINSWORTH, 1997). Embora, Brkljacic e colaboradores (2004), não apresentem qual é o mecanismo provável que sustenta uma

elevada expressão de *FeMT3* nas folhas senescente a pesar da imposição do tratamento com  $H_2O_2$ /sal, parece claro que, do mesmo modo que observamos para o cobre, os compostos geradores de ROS não teriam qualquer efeito sobre a expressão de genes de metalotioneínas altamente expressos constitutivamente.

Em relação ao paraquat, poucos estudos foram conduzidos para concluir qual seria o efeito deste sobre a expressão dos genes MTs em plantas. Experimentos que incluam diversos agentes capazes de gerar espécies reativas de oxigênio poderiam ajudar a esclarecer este ponto.

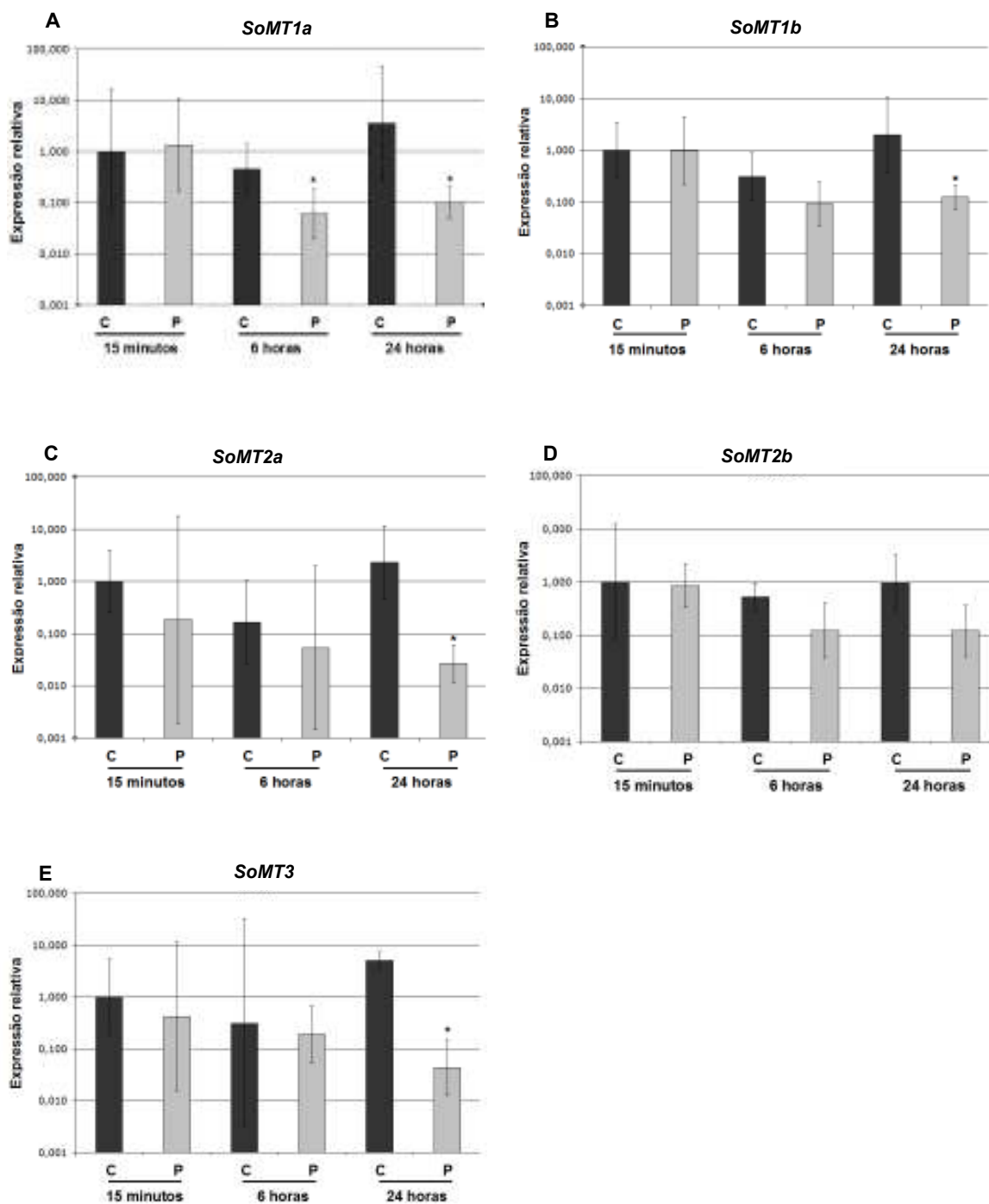


Figura 20 – Resposta dos genes de metalotioneína (*SoMT*) de cana-de-açúcar a presença de paraquat. A) *SoMT1a*; B) *SoMT1b*, C) *SoMT2a*, D) *SoMT2b* e E) *SoMT3*. C: controle sem tratamento; P: paraquat. As coletas foram feitas aos 15 minutos, 6 e 24 horas após imposição do tratamento. n= 3 repetições biológicas  $\pm$  erro padrão. \* p=0,05 diferença significativa.

### 4.6.3 Experimento com patógenos

Devido a pouca informação disponível na literatura em relação à modulação da expressão dos genes de metalotioneína induzido pela infecção por patógenos, foi montado um experimento com a intenção de investigar a expressão dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar, quando submetidas a estresse biótico produzido pela infestação com o fungo *Puccinia melanocephala* e a bactéria *Xanthomonas albilineans*. Assim, plântulas das cultivares 'SP70-1143', 'RB72-454', 'SP78-4467' e 'SP82-1176', foram utilizadas num ensaio estabelecido nas instalações do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), Piracicaba, SP. As cultivares 'SP70-1143' e 'RB72-454' são consideradas suscetíveis (S) e resistentes (R), respectivamente, ao fungo *Puccinia melanocephala*, enquanto as cultivares 'SP78-4467' e 'SP82-1176', são consideradas suscetíveis (S) e resistentes (R) a bactéria *Xanthomonas albilineans*, respectivamente. Plantas das mesmas cultivares sem inoculação foram usadas como controle. As coletas da parte aérea das plantas em ambos experimentos foram realizadas aos 15 min, 4, 8, 24, 48, 96 e 240 h após inoculação, e as amostras foram armazenadas a -80°C até a extração de RNA total. Plantas inoculadas foram mantidas até aparecimento dos sintomas (dados não mostrados).

#### 4.6.3.1 Análise da expressão dos genes *SoMTs* em cultivares suscetíveis e resistentes de cana-de-açúcar, infectadas com *Puccinia melanocephala*

Primeiramente foi avaliada a expressão dos genes *SoMTs* em plantas de cada cultivar não inoculadas (controle), nos diversos períodos de tempo amostrados, usando aquela coletada aos 15 minutos após a inoculação como referência. Isto permitiu observar se existiam variações significativas na expressão dos genes *SoMTs* devidas a mudanças relacionadas com a fisiologia ou ciclo circadianos da planta, ou algum outro fator de estresse diferente da presença do patógeno. Não houve diferenças significativas na expressão dos



genes *SoMTs* entre os tempos de coleta avaliados nas plantas não inoculadas de ambas as cultivares 'SP70-1143' (suscetível) e 'RB72-454' (resistente) [Apêndice C; Tabela 13-A e 13-B]. Em seguida, foi obtido um valor de expressão médio para cada gene, a partir dos valores de expressão dos sete pontos de coleta (15 min, 4, 8, 24, 48, 96 e 240 h) para cada cultivar (suscetível não inoculada: SNI e resistente não inoculada: RNI). Esses valores de expressão foram usados como referência para calcular a expressão relativa da seguinte maneira:

- 1) Expressão basal dos genes *SoMTs* nas cultivares resistentes em relação as cultivares suscetíveis (RNI/SNI) para todos os tempos de coleta;
- 2) Expressão dos genes *SoMTs* após inoculação com *Puccinia melanocephala* dentro de cada cultivar: suscetível inoculada (SI) e resistente inoculada (RI) em relação à media dos controles não inoculados, para todos os tempos de coleta (SI/SNI e RI/RNI).

Houve diferenças significativas apenas para a expressão do gene *SoMT1a* (Apêndice D; Tabela 13). A expressão basal (constitutiva) do gene *SoMT1a* nas plantas da cultivar resistente ao patógeno 'RB72-454' foi significativamente inferior à expressão basal encontrada nas plantas suscetíveis 'SP70-1143' para todos os tempos, a exceção das amostras coletadas as 240 h após a inoculação (Tabela 13-C). Em relação inoculação com o patógeno, observou-se uma tendência a repressão da expressão do gene *SoMT1a* para a cultivar suscetível (SP70-1143) [Tabela 13-D], mas foi estatisticamente significativa somente as 8 e 24 h após a inoculação das plantas. Entretanto, não houve diferenças significativas para a expressão de *SoMT1a* nas plantas resistentes a doença em nenhum dos tempos avaliados (Tabela 13-E).

Tabela 13 – Resultados da análise de expressão relativa do gene *SoMT1a* em cultivares suscetíveis e resistentes de cana-de-açúcar, infectadas com *Puccinia melanocephala*. A) Expressão basal de *SoMT1a* na cultivar ‘SP70-1143’ no período amostral sem inoculação. A coleta feita aos 15 min foi usada como referência de expressão. B) Expressão basal de *SoMT1a* na cultivar ‘RB72-454’ no período amostral sem inoculação. A coleta feita aos 15 min foi usada como referência de expressão. C) Expressão basal relativa do gene *SoMT1a* na cultivar ‘RB72-454’ sem inoculação em relação a cultivar ‘SP70-1143’ sem inoculação. O valor médio de expressão da cultivar ‘SP70-1143’ sem inoculação, no período amostral, foi usado como referência. D) Expressão relativa do gene *SoMT1a* na cultivar ‘SP70-1143’ após inoculação com *Puccinia melanocephala*. O valor médio de expressão da cultivar ‘SP70-1143’ não inoculada, no período amostral, foi usado como referência. E) Expressão relativa do gene *SoMT1a* na cultivar ‘RB72-454’ após inoculação com *Puccinia melanocephala*. O valor médio de expressão da cultivar ‘RB72-454’ não inoculada, no período amostral, foi usado como referência. Em todas as análises a expressão relativa de *SoMT1a* foi normalizada usando a expressão do gene *rpl35-4*.

A)

<i>SoMT1a</i>					
	Tempo amostragem	Expressão relativa	-95% IC	+95%IC	p<0,05
SP70-1143 Suscetível não inoculada (SNI)	15 min (referência)	1,00	0,12	8,45	a
	4h	1,02	0,30	3,43	a
	8h	0,88	0,27	2,92	a
	24h	1,03	0,30	3,62	a
	48h	3,04	1,09	8,53	a
	96h	1,86	1,11	3,12	a
	240h	4,09	1,46	11,44	a

B)

<i>SoMT1a</i>					
	Tempo amostragem	Expressão relativa	-95% IC	+95%IC	p<0,05
RB72-454 Resistente não inoculada (RNI)	15 min (referência)	1,00	0,66	1,51	a
	4h	1,44	0,73	2,85	a
	8h	0,76	0,36	1,63	a
	24h	1,50	0,29	7,83	a
	48h	1,64	0,58	4,64	a
	96h	2,92	1,23	6,95	a
	240h	2,61	0,45	15,13	a

C)

<i>SoMT1a</i>					
Cultivares	Tempo	Expressão relativa	-95% IC	+95%IC	p<0,05
SP70-1143 Suscetível não inoculada (SNI)	Média (referência)	1,00	0,94	1,07	a
	15 min	0,11	0,08	0,17	b
	4h	0,16	0,08	0,33	b
RB72-454 Resistente não inoculada (RNI)	8h	0,09	0,04	0,19	b
	24h	0,17	0,03	0,91	b
	48h	0,18	0,06	0,52	b
	96h	0,33	0,13	0,82	b
	240h	0,29	0,05	1,65	a

D)

<i>SoMT1a</i>					
Cultivares	Tempo	Expressão relativa	-95% IC	+95%IC	p<0,05
SP70-1143 Suscetível não inoculada (SNI)	Média (referência)	1,00	0,72	1,38	a
	15 min	0,40	0,09	1,78	a
	4h	0,49	0,15	1,63	a
SP70-1143 Suscetível inoculada (SI)	8h	0,12	0,02	0,70	b
	24h	0,29	0,17	0,50	b
	48h	0,24	0,02	2,83	a
	96h	0,60	0,15	2,34	a
	240h	1,98	0,86	4,58	a

E)

<i>SoMT1a</i>					
Cultivares	Tempo	Expressão relativa	-95% IC	+95%IC	p<0,05
RB72-454 Resistente não inoculada (RNI)	Média (referência)	1,00	0,37	2,67	a
	15 min	0,44	0,13	1,44	a
	4h	0,86	0,45	1,62	a
RB72-454 Resistente inoculada (RI)	8h	0,33	0,21	0,53	a
	24h	0,64	0,20	2,10	a
	48h	0,71	0,20	2,45	a
	96h	1,00	0,11	8,94	a
	240h	1,27	0,67	2,40	a

A resposta a patógenos tem sido associada a produção de espécies reativas de oxigênio pelas plantas como um mecanismo de sinalização da infecção, assim como também para provocar a morte celular do tecido infectado evitando a colonização (SHETTY et al., 2008). Por outro lado, a indução das metalotioneínas foi vinculada a presença de ROS, atribuindo as metalotioneínas um papel na remoção destes compostos para evitar o dano produzido pelo estresse oxidativo (AKASHI et al., 2004; MIR et al, 2004; WONG et al., 2004). Baseado nos resultados encontrados para o gene *SoMT1a* de expressão relativamente menor nas plantas resistentes a *Puccinia melanocephala* em relação a plantas da cultivar suscetível (Tabela 13 C), e a ausência de indução de *SoMT1a* após inoculação com o fungo (Tabela 13 E), pode se supor que a rápida detecção da presença do patógeno por mecanismos de percepção de sinais moleculares do patógeno evitaria a sinalização mediante acúmulo de ROS, não afetando a modulação da regulação dos genes de MT. Entretanto, a elevada expressão constitutiva de *SoMT1a* nas plantas suscetíveis em relação às plantas da cultivar resistente a *P. melanocephala*, com ausência de mecanismos de percepção da infecção permitiria a colonização inicial pelo patógeno, interferindo com os mecanismos de sinalização, uma vez que a metalotioneína estaria envolvida no controle das espécies reativas de oxigênio. Entretanto a tabela 13-D, mostra que há uma tendência a repressão de *SoMT1a* após inoculação com o fungo, sendo significativa as 8 e 24 horas. Assim, pode-se hipotetizar que após percepção da presença ou dano celular promovido pelo patógeno, as células vegetais são capazes de ativar algum mecanismo de defesa que inclui a repressão da expressão de *SoMT1a* numa tentativa de permitir uma resposta celular mais agressiva contra infecção do fungo, embora isto pareça não ser suficiente, uma vez que o patógeno consegue infectar as plantas suscetíveis. WONG et al. (2004) superexpressaram o gene de metalotioneína tipo 2 *OsMT2b* em plantas de arroz, e observaram uma susceptibilidade aumentada a infecção por *Xanthomonas oryzae* e *Magnaporthe grisea*, enquanto que a repressão de *OsMT2b* permitiu uma resposta de hipersensibilidade das plantas, com a conseqüente resistência a infecção. A repressão de *OsMT2b* foi promovida em experimentos que incluíam a superexpressão da GTPase *OsRac1* e o tratamento com

N-acetil quitol-oligossacarídeo. A proteína *OsRac1* tem reconhecida função em estimular a produção de ROS e morte celular no processo de defesa das plantas e o elicitador N-acetil quitol-oligossacarídeo é conhecido por promover a indução de genes de defesa, assim como também a rápida produção de ROS. Os autores associaram a repressão de *OSMT2b* com o acúmulo de espécies reativas de oxigênio, necessárias no processo de sinalização e defesa contra patógenos. Em *Abutilon theophrasti* (nc: malva indiana) foi investigado o padrão de expressão temporal de duas metalotioneínas (tipo 2 e 3), após infecção com o fungo *Colletotrichum coccodes* (DAUCH; JABAJI-HARE, 2006). Os resultados mostraram que a expressão de ambos os tipos de MT teve um aumento significativo (8 vezes para MT tipo 2 e 16 vezes para MT tipo 3) logo no primeiro dia após a infecção (fase assintomática), seguido de uma repressão da expressão abaixo dos níveis observado nas plantas controles, já no segundo dia. Entretanto, essa repressão na expressão foi significativa somente para MT tipo 3. Os valores de expressão foram monitorados durante 14 dias inclusive após surgimento dos sintomas (5º dia) e até completa senescência foliar. Em *Abutilon theophrasti*, a expressão oscilou entre repressão e valores semelhantes ao controle, mas em nenhum caso foi estatisticamente significativo. Em paralelo, foi investigada a expressão de um fator de transcrição *bZip*, conhecido por participar na resposta das plantas a patógenos, com padrão de expressão idêntico ao encontrado para as duas MTs. Dauch e Jabaji-Hare (2006) concluíram que *bZip* responde ao ataque do patógeno diretamente e que a expressão temporal, mas diferencial das MTs 2 e 3, poderia representar uma resposta combinada das plantas aos processos de resposta a patógenos e senescência. O motivo pelo qual há um declínio importante da expressão dos genes no segundo dia após infecção não foi discutido pelos autores, mas foi proposto que as plantas acumularam grandes quantidades de transcritos logo após a infecção, e depois disso reprimiram a transcrição para manter valores equivalentes aos controles. Genes de metalotioneínas costumam ser altamente expressos de forma constitutiva na maioria dos sistemas biológicos, assim valores de expressão aproximados aos controles seriam necessários, provavelmente, para manter a homeostasia nos tecidos senescentes. Por outro lado, a repressão da expressão das MTs

(principalmente MT tipo 3) seria necessária para permitir a resposta ao patógeno mediante formação de ROS, conforme sugerido no trabalho de Wong e colaboradores (2004).

No caso da cana-de-açúcar aqui estudado, não houve efeito significativo da inoculação com o fungo *P. melanocephala* sobre a expressão dos outros genes *SoMTs*. Os resultados são apresentados no apêndice D.

#### **4.6.3.2 Análise da expressão dos genes *SoMTs* em plantas de cana-de-açúcar infestadas com *Xanthomonas albilineans***

Primeiramente foi avaliada a expressão dos genes *SoMTs* em plantas de cada cultivar (suscetível ou resistente) não inoculadas (controle), nos diversos períodos de tempo amostrados, usando aquela coletada aos 15 minutos após a inoculação como referência, da mesma forma que realizado no item 4.6.3.1. Não houve diferenças significativas na expressão dos genes *SoMTs* entre os tempos de coleta avaliados nas plantas não inoculadas de ambas as cultivares 'SP78-4467' (suscetível) e 'SP82-1176' (resistente) [Apêndice E]. Os dados de expressão relativos aos genes *SoMT2a* e *SoMT3* não foram apresentados devido a dificuldades na obtenção de valores de Ct na terceira planta avaliada para estes genes. As outras duas plantas de cana-de-açúcar analisadas também apresentaram resultados de expressão inconsistentes, inclusive opostos. Entretanto, o gene *rp/35-4* apresentou valores de Ct equivalentes nas três plantas, não podendo ser explicado o porque da ausência de valores de expressão congruentes para estes dois genes entre as plantas investigadas. Por outro lado, não houve diferenças significativas na expressão basal dos genes *SoMT1a*, *SoMT1b* e *SoMT2b* nas cultivares resistentes em relação às cultivares suscetíveis (RNI/SNI), nem após inoculação com *Xanthomonas albilineans* dentro de cada cultivar: suscetível inoculada (SI) e resistente inoculada (RI) em relação à media dos controles não inoculados, para todos os tempos de coleta (SI/SNI e RI/RNI) [Apêndice F]. Assim, podemos concluir que não houve diferenças na expressão dos genes *SoMT1a*,

*SoMT1b* e *SoMT2b* entre as cultivares suscetíveis e resistente nem modulação significativa da expressão mediada pela inoculação com *Xanthomonas albilineans*. No entanto, uma análise mais detalhada dos dados obtidos deve ser feita numa tentativa de esclarecer as possíveis causas dos resultados para *SoMT2a* e *SoMT3*

#### 4.7 Produção heteróloga de metalotioneínas em *Escherichia coli*

Iniciadores específicos para expressão heteróloga dos genes *SoMTs* em *Escherichia coli* foram desenhados e utilizados na amplificação das seqüências dos clones EST de cana-de-açúcar (Tabela 1). Os fragmentos amplificados possuem sítios de corte para enzima de restrição específicas (Tabela 6) que permitem a clonagem em marco de leitura com a proteína inteína do vetor de expressão pTXB1. A proteína inteína possui aproximadamente 28 kDa e a seqüência traduzida de metalotioneína varia de aproximadamente 7,35 kDa para *SoMT1a* e *SoMT1b* a 6,8 kDa para *SoMT3*, sendo as *SoMT2* intermediárias em tamanho. Primeiramente os fragmentos de interesse foram clonados em vetor pGEM-T e após confirmação da presença do inserto por PCR (não mostrado), e seqüenciamento (Apêndice G), todos os passos até a obtenção dos cinco genes *SoMTs* (*SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3*), clonados em pTXB1 foram seguidos como descrito em materiais e métodos. Em seguida foi feita mais uma confirmação da presença do inserto, agora em pTXB1, por PCR usando os iniciadores específicos (não mostrado) e os clones selecionados foram utilizados para transformação e expressão heteróloga em bactérias da cepa *Origami* de *E. coli*. Transformações com o plasmídeo pTXB1 vazio foram usadas como controle. Amostras de bactérias transformadas foram coletadas antes da indução da expressão assim como também às 4 e 16 h após indução com IPTG. As amostras bacterianas foram lisadas e os extratos protéicos misturados a tampão dissociante e aplicados em géis de poliacrilamida. O resultado da eletroforese das amostras protéicas coletadas as 0 h (antes da indução) para todos os plasmídeos com

insertos *SoMTs* e o controle (pTXB1 sem inserto) pode ser observado na figura 22. Considerando o tamanho da inteína mais o tamanho estimado da proteína *SoMT* traduzida, espera-se que após indução da expressão por IPTG possa ser observada uma banda de aproximadamente 28 kDa no vetor pTXB1, correspondente a expressão da inteína e bandas de mais o menos 35 kDa para os genes *SoMTs* equivalentes as metalotioneínas fusionadas com a inteína. A figura 23 mostra os resultados obtidos às 4 h após indução da expressão com IPTG.

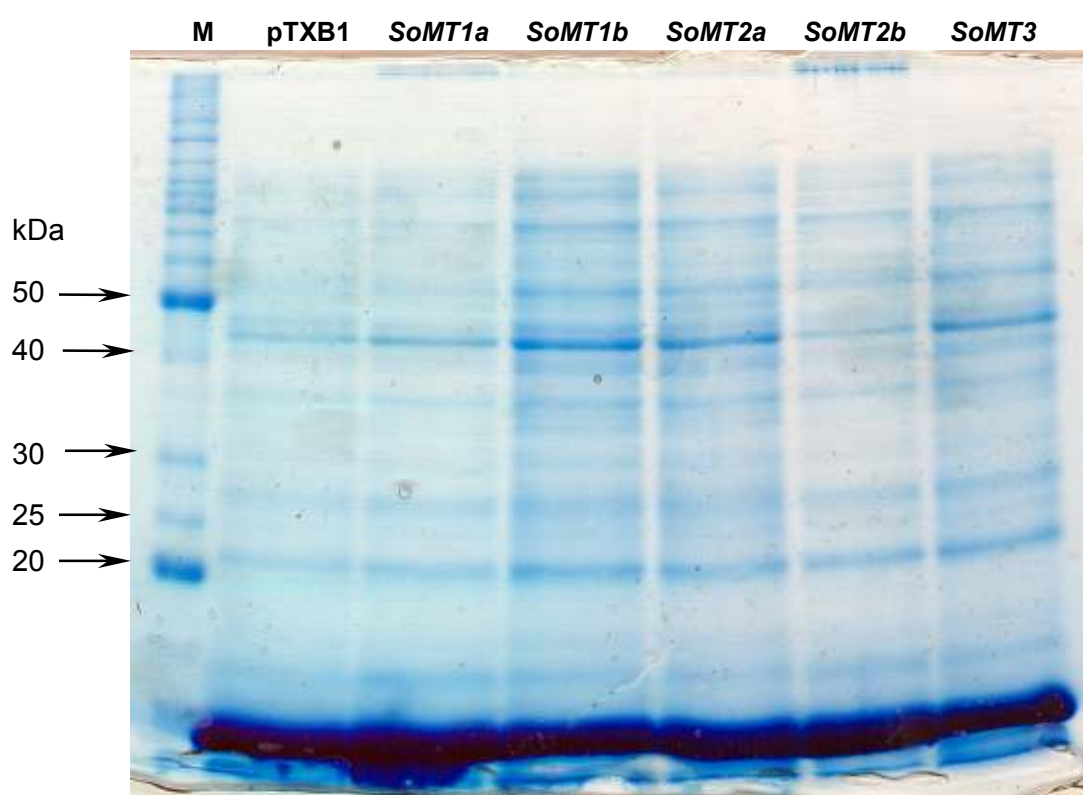


Figura 22 – Gel 12,5% de poliacrilamida corado com azul de Coomassie 250 G. Extratos protéicos de células bacterianas de *Escherichia coli* antes da indução com IPTG. pTXB1 se refere a amostras protéicas obtidas a partir de bactérias transformadas com o plasmídeo de expressão vazio sem inserto *SoMTs*. As raias *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* se referem a amostras protéicas extraídas de bactérias *E. coli* transformadas com pTXB1 carregando o inserto para o gene respectivo. M: marcador de peso molecular *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen)



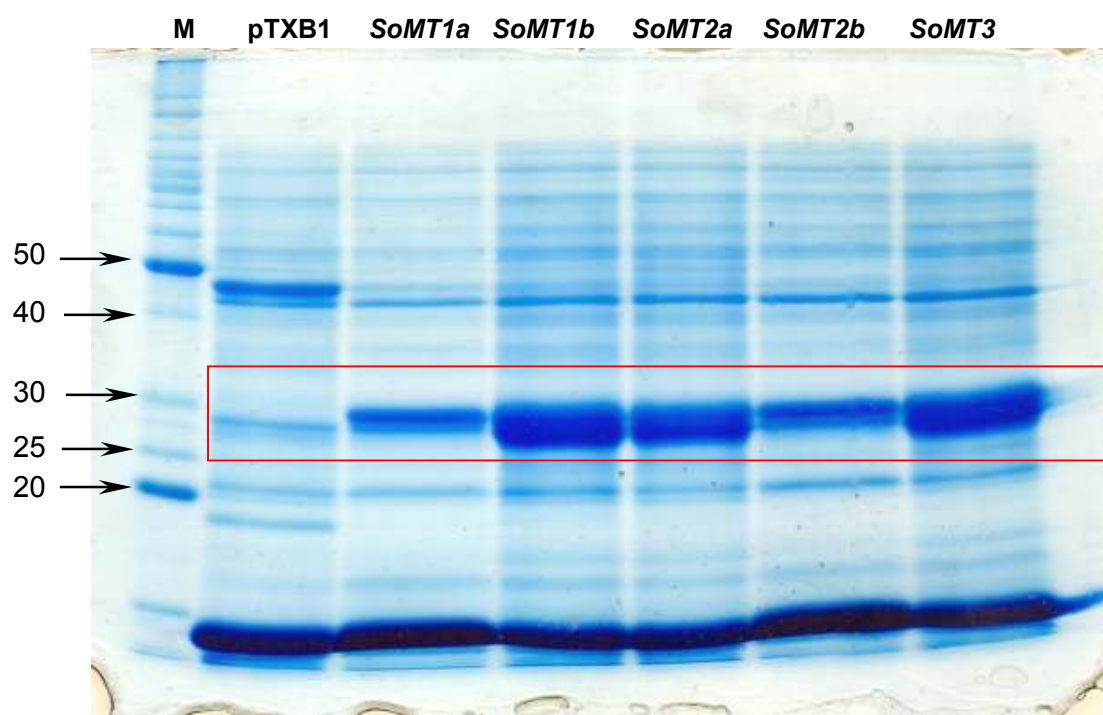


Figura 23 – Gel 12,5% de poliacrilamida corado com azul de Comassie 250 G. Extratos protéicos de células bacterianas de *Escherichia coli* 4 h após indução com 0,5 mM IPTG. pTXB1 se refere a amostras protéicas obtidas a partir de bactérias transformadas com o plasmídeo de expressão vazio sem inserto SoMTs. As raías *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* se referem a amostras protéicas extraídas de bactérias *E. coli* transformadas com pTXB1 carregando o inserto para o gene respectivo. M: marcador de peso molecular *BenchMark Protein Ladder* (Invitrogen). O cuadro vermelho destaca a presença de proteínas que foram induzidas pelo IPTG.

Os resultados preliminares apresentados mostram que não houve expressão heteróloga em nenhuma das amostras protéicas coletadas antes da indução por IPTG como esperado (Figura 22). Entretanto, às 4 horas da aplicação de 0,5 mM de IPTG é possível observar uma banda discreta de aproximadamente 28 kDa para a amostra derivada da transformação de *E. coli* somente com pTXB1 (Figura 23), e duas bandas nas amostras protéicas derivadas da transformação com pTXB1 carregando o gene de interesse, que estavam ausentes antes da indução com IPTG (Figura 23- recuadro vermelho). Uma dessas bandas de aproximadamente 28 kDa foi também observada na raia do pTXB1 e poderia

corresponder a inteína. Entretanto a segunda banda, aparece altamente induzida, entorno de 30 kDa somente nas amostras transformadas com o gene de interesse. Estes resultados são preliminares e a presença da proteína MT presumível precisa ser confirmada por seqüenciamento. Futuramente, a proteína purificada pode ser utilizada para a obtenção de anticorpos para aplicação em ensaios de *western blot* e / ou ensaios bioquímicos para afinidade por metais.

## 5. CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados apresentados no presente trabalho conclui-se que:

- Foram identificados seis genes presumivelmente codificadores de metalotioneínas (MTs) de cana-de-açúcar, classificados por meio de análise filogenética em comparação aos genes ortólogos de arroz e *Arabidopsis* como sendo dois do tipo 1 (*SoMT1a* e *SoMT1b*); dois do tipo 2 (*SoMT2a* e *SoMT2b*), um do tipo 3 (*SoMT3*) e um do tipo 4 ou Ec (*SoMT4*).
- A região promotora presumível de quatro genes *SoMTs* (*SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2b* e *SoMT3*) foi caracterizada e os motivos identificados sugerem que uma complexa rede de mecanismos regulatórios é acionada em resposta aos mais diversos estresses bióticos e abióticos. A partir do conhecimento destas seqüências novos experimentos podem ser desenvolvidos para avaliar o potencial biotecnológico destas regiões promotoras presumíveis.
- A distribuição de éxons e íntrons foi estabelecida para quatro genes *SoMTs* (*SoMT1a*, *SoMT2a*, *SoMTb* e *SoMT3*). A identificação da estrutura dos genes *SoMTs*, mesmo no complicado genoma poliplóide da cana-de açúcar, fortalece as diferenças encontradas entre estes genes.
- A expressão constitutiva de *SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a*, *SoMT2b* e *SoMT3* em diferentes tecidos/órgão (colmo, inflorescência, limbo foliar, meristema e raiz) de cana-de-açúcar mostrou que os genes *SoMTs* seguem um padrão similar de expressão a aquele encontrado para a maioria das espécies investigada.
- Não houve efeito sobre a expressão dos genes *SoMTs* nas raízes e parte aérea de plântulas de cana-de-açúcar em resposta a 100 e 500  $\mu\text{M}$  de cobre, nos tempos avaliados (6, 24, 48 e 96 h após imposição dos tratamentos).

- Houve uma tendência a repressão da expressão dos genes *SoMTs*, no tratamento das plantas com paraquat significativa as 6 e 24 h somente para *SoMT1a*. A expressão de *SoMT1b*, *SoMT2a* e *SoMT3* foi significativamente reprimida as 24 h após a imposição do tratamento, enquanto que não houve efeito significativo sobre a expressão de *SoMT2b*. Não foi possível determinar se a repressão da expressão se deve a o efeito direto do paraquat sobre os *SoMTs* ou devido a produção excessiva de ROS com a conseqüente muerte celular.
- Em relação a expressão dos genes *SoMTs* em resposta a inoculação com patógenos houve resultados diferentemente significativos somente para a expressão de *SoMT1a* em plântulas suscetíveis ou resistentes a *Puccinia melanocephala*. As plantas suscetíveis apresentaram 4 vezes mais transcritos de *SoMT1a* em relação a cultivar resistente 'RB72-454'. Entretanto, houve uma tendência a repressão de *SoMT1a* nas plantas suscetíveis inoculadas com o fungo, significativamente as 8 e 24 h após tratamento, não havendo diferenças para as plantas da cultivar resistente após inoculação. Uma resposta das plantas suscetíveis aos patógenos associada a ROS foi sugerida. Entretanto, não foi caracterizada uma modulação importante dos cinco genes *SoMT* em resposta a condições de estresse bióticos (patógenos) e abióticos (Paraquat e metais), que permitisse a associação direta desses genes com a resposta a estresse oxidativo.
- A expressão heteróloga dos cinco genes *SoMTs* foi promovida em *Escherichia coli* e proteína presumível pode ser observada em géis de agarose-SDS, mas a sua identidade não foi confirmada.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, S.N.A.; CHEAH, S.C.; MURPHY, D.J. Isolation and characterisation of two divergent type 3 metallothioneins from oil palm, *Elaeis guineensis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v.40, n.3, p.255-263, 2002.

AKASHI, K.; NISHIMURA, N.; ISHIDA, Y.; YOKOTA, A. Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.323, p.72-78, 2004.

AL-JANABI, S.M.; FORGET, L.; DOOKUN, A. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide- and polyphenol-free sugarcane DNA. **Plant Molecular Biology Reporter**, Berlin, v.17, p.1-8, 1999.

ALMEIDA, R.S. Perfil fisiológico e da expressão de transportadores de fosfato da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) durante a simbiose. 2007. Tese. Doutorado em Ciências (Biologia e Agricultura no Ambiente). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP, Brasil. 2007.

ANURADHA, S.; SEETA RAM RAO, S. Application of brassinosteroids to rice seeds (*Oryza sativa* L.) reduced the impact of salt stress on growth, prevented photosynthetic pigment loss and increased nitrate reductase activity. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v.40, p.29-32, 2003.

APEL, K; HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.55, p.373-399, 2004.

BERGERO, R.; LANFRANCO, L.; GHIGNONE, S.; BONFANTE, P. Enhanced activity of the *GmarMT1* promoter from the mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita* at limited carbon supply. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v.44, p. 877–885, 2007.

BINZ, P.A.; KÄGI, J.H.R. **Metallothionein**. Zurich: Department of Biochemistry, University of Zurich, 2001. Disponível em: <http://www.bioc.unizh.ch/mtpage/MT.html>. Acesso em: maio de 2009.

BOYLE, B.; BRISSON, N. Repression of the defense gene PR-10a by the single-stranded DNA binding protein SEBF **Plant Cell**, Montreal, v.13, n°11, p. 2525-2537, 2001.

BRATIC, A.M.; MAJIC, D.B.; SAMARDŽIC, J.T.; MAKSIMOVIC, V.R. Functional analysis of the buckwheat metallothionein promoter: Tissue specificity pattern and up-regulation under complex stress stimuli. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.166, n.9, p.996-1000, 2009.

BRKLJACIC, J.M.; SAMARDŽIC, J.T.; TIMOTIJEVIC, G.S.; MAKSIMOVIC, V.R. Expression analysis of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Metallothionein-like gene (MT3) under different stress and physiological conditions. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.161, p.741–746, 2004.

BRODY, J.R.; KERN, S.E. Sodium boric acid: A Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v.36, n.2, p. 214-216, 2004.

BUCHANAN-WOLLASTON, V. Isolation of cDNA clones for genes that are expressed during leaf senescence in *Brassica napus*. Identification of a gene encoding a senescence-specific metallothionein-like protein. **Plant Physiology** v.105, n°3, p.839-846, 1994.

BUCHANAN-WOLLASTON, V.; AINSWORTH, C. Leaf senescence in *Brassica napus*: cloning of senescence related genes by subtractive hybridization. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 3, p.821-834, 1997.

BUTT, A.; MOUSLEY, C.; MORRIS, K.; BEYNON, J.; CAN, C.; HOLUB, E.; GREENBERG, J.T.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Differential expression of a senescence-enhanced metallothionein gene in *Arabidopsis* in response to isolates of *Peronospora parasitica* and *Pseudomonas syringae*. **The Plant Journal**, Oxford, v.16, n.2, p. 209-221, 1998

CAKIR, B.; AGASSE, A.; GAILLARD, C.; SAUMONNEAU, A.; DELROT, S.; ATANASSOVA, R. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling. **Plant Cell** v.15 n<sup>o</sup>9, p.2165-2180, 2003

CALSA JUNIOR, T.; FIGUEIRA, A. Serial analysis of gene expression in sugarcane (*Saccharum* spp.) leaves revealed alternative C(4) metabolism and putative antisense transcripts. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.63, p.745-762, 2007.

CARTHARIUS, K.; FRECH, K.; GROTE, K.; KLOCKE, B.; HALTMEIER, M.; KLINGENHOFF, A.; FRISCH, M.; BAYERLEIN, M.; WERNER, T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. **Bioinformatics**, Oxford, v.21, p.2933-2942, 2005.

CHAGAS, R.M.; SILVEIRA, J.A.G.; RIBEIRO, R.F.; VITORELLO, V.A.; CARRER, H. Photochemical damage and comparative performance of superoxide dismutase and ascorbate peroxidase in sugarcane leaves exposed to paraquat-induced oxidative stress, **Pesticide Biochemistry and Physiology**, New York, v.90, n.3, p.181-188, 2008.

CHATTHAI, M.; KAUKINEN, K.H.; TRANBARGER, T.J.; GUPTA, P.K.; MISRA, S. The isolation of a novel metallothionein-related cDNA expressed in somatic and zygotic embryos of Douglas-fir: Regulation by ABA, osmoticum, and metal ions. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.34, n.2, p.243-254. 1997.

CHATTHAI, M.; OSUSKY, M.; OSUSKA, L.; YEVTUSHENKO, D.; MISRA, S. Functional analysis of a Douglas-fir metallothionein-like gene promoter: Transient assays in zygotic and somatic embryos and stable transformation in transgenic tobacco. **Planta**, v.220, n.1, p.118-128, 2004.

CHEN, C., CHEN, Z. Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.42, p.387-396, 2000.

CHOI, D.; KIM, H.M.; YUN, H.K.; PARK, J.-A.; KIM, W.T.; BOK, S.H. Molecular cloning of a metallothionein-like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. **Plant Physiology**, Rockville, v.112, n.1, p. 353-359, 1996.

CHUBATSU, L.S.; MENEGHINI, R. Metallothionein protects DNA from oxidative damage. **Biochemical Journal**, Colchester, v.291, p.193-198, 1993.

CLENDENNEN, S.K., MAY, G.D. Differential gene expression in ripening banana fruit. **Plant Physiology**, Rockville, v.115, n.2, p. 463-469, 1997.

COBBETT, C.S.; GOLDSBROUGH, P.B. Phytochelatins and Metallothioneins: Roles in Heavy Metal Detoxification and Homeostasis. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.53, p.159-182, 2002.



COYLE, P.; PHILCOXA, J.C.; CAREYA, L.C.; ROFEA, A.M. Metallothionein: The multipurpose protein. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v.59, p.627-647, 2002.

COZZA, R., PANGARO, T., MAESTRINI, P., GIORDANI, T., NATALI, L., CAVALLINI, A. Isolation of putative type 2 metallothionein encoding sequences and spatial expression pattern in the seagrass *Posidonia oceanica*, **Aquatic Botany**, v.85, n.4, p.317-323, 2006.

DAUCH, A.L.; JABAJI-HARE, S.H. Metallothionein and bZIP transcription factor genes from velvetleaf and their differential expression following *Colletotrichum coccodes* infection. **Phytopathology**, Lancaster, v.96, n.10, p.1116-1123, 2006.

DE FRAMOND, A.J. A metallothionein-like gene from maize (*Zea mays*): cloning and characterization. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.290, p.103-106, 1991.

DE MIRANDA, J.R.; THOMAS, M.A.; THURMAN, D.A.; TOMSETT, A.B. Metallothionein genes from the flowering plant *Mimulus guttatus*. **FEBS Letters**, v.260, n.2, p.281-284, 1990.

ELLIOTT, K.A.; SHIRSAT, A.H. Promoter regions of the extA extensin gene from *Brassica napus* control activation in response to wounding and tensile stress. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.37, p.675-687, 1998.

ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H.; MORIGUCHI, T.; OMURA, M. Promoter analysis of a type 3 metallothionein-like gene abundant in Satsuma mandarin (*Citrus unshiu* Marc.) fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v.112, n.2, p.207-214, 2007.

ETSCHEID, M.; KLÜMPER, S.; RIESNER, D. Accumulation of a metallothionein-like mRNA in Norway spruce under environmental stress. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.147, n.4, p. 207-213, 1999.

EULGEM, T.; RUSHTON, P.J.; SCHMELZER, E.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. **EMBO Journal**, Oxford, v.18, p.4689-4699, 1999.

EVANS, I.M.; GATEHOUSE, L.N.; GATEHOUSE, J.A.; ROBINSON, N.J.; CROY, R.R.D. A gene from pea (*Pisum sativum* L.) with homology to metallothionein genes. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.262, p.29-32, 1990.

EVANS, K.M.; GATEHOUSE, J.A.; LINDSAY, W.P.; SHI, J.; TOMMEY, A.M; ROBINSON, N.J. Expression of the pea metallothionein-like gene PsMTA. *Escherichia coli* and *Arabidopsis thaliana* and analysis of trace-metal ion accumulation– implications for PsMTA function. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.20, p.1019–1028, 1992.

FIGUEIRA, A.; KIDO, E.A.; ALMEIDA, R.S. Identifying sugarcane expressed sequences associated with nutrient transporters and peptide metal chelators. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, p.207-220, 2001.

FOLEY RC; SINGH KB. Isolation of a *Vicia faba* metallothionein-like gene: expression in foliar trichomes. **Plant Molecular Biology**, v.26, p. 435-44, 1994.

FORDHAM-SKELTON, A.P.; ROBINSON, N.J.; GOLDSBROUGH, P.B. Metallothionein-like genes and phytochelatin in higher plants. In: SILVER, S.; WALDEN, W. (Ed.). **Metal ions in gene regulation**. London: Chapman and Hall, 1997. p.398-431.

FOWLER, B.A.; HIELDEBRAND, C.E.; KOJIMA, Y.; WEBB, M. Nomenclature of metallothionein. In: KAGI, J.H.R.; KOJIMA, Y. (Ed.). **Metallothionein II**. Basel: Birkhauser Verlag, 1987. p.19-22.

FREISINGER, E. Plant MTs - Long neglected members of the metallothionein superfamily. **Dalton Transactions**, Cambridge, v.47, p.6663-6675, 2008.

GARCÍA-HERNÁNDEZ, M.; MURPHY, A.; TAIZ, L. Metallothioneins 1 and 2 have distinct but overlapping expression patterns in Arabidopsis. **Plant Physiology**, Rockville, v.118, n.2, p.387-397, 1998.

GIBBINGS, J.G.; COOK, B.P.; DUFAULT, M.R.; MADDEN, S.L.; KHURI, S.; TURNBULL, C.J.; DUNWELL, J.M. Global transcript analysis of rice leaf and seed using SAGE technology. **Plant Biotechnology Journal**, New York, v.1, p.271-285, 2003.

GIORDANI, T.; NATALI, L.; MASERTI, B.E.; TADDEI, S.; CAVALLINI, A. Characterization and expression of DNA sequences encoding putative type-II metallothioneins in the seagrass *Posidonia oceanica*. **Plant Physiology**, Rockville, v.123, n.4, p.1571-1581, 2000.

GIRITCH, A.; GANAL, M.; STEPHAN, U.W.; BÄUMLEIN, H. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothionein-like gene family of tomato. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.37, p.701-714, 1998.

GOLDSBROUGH, P.B. Metal tolerance in plants: the role of phytochelatins and metallothioneins. In: TERRY, N.; BANUELOS, G.S. (Ed.). **Phytoremediation of contaminated soils soil and water**. Boca Raton: CRC Press, 1999. p.221-233.

GONZÁLEZ-GUERRERO, M.; CANO, C.; AZCÓN-AGUILAR, C.; FERROL, N. GintMT1 encodes a functional metallothionein in *Glomus* intraradices that responds to oxidative stress. **Mycorrhiza**, Berlin, v.17, p.327-335, 2007.

GORINOVA, N.; NEDKOVSKA, M.; TODOROVSKA, E.; SIMOVA-STOILOVA, L.; STOYANOVA, Z.; GEORGIEVA, K.; DEMIREVSKA-KEPOVA, K.; ATANASSOV, A.; HERZIG, R. Improved phytoaccumulation of cadmium by genetically modified tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L.). Physiological and biochemical response of the transformants to cadmium toxicity. **Environmental Pollution**, London, v.145, p.161-170, 2007.

GRIVET, L.; GLASZMANN, J.C.; VINCENTZ, M.; DA SILVA, F.; ARRUDA, P. ESTs as a source for sequence polymorphism discovery in sugarcane: example of the Adh genes. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v.106, p.190-197, 2003.

GUO, W.J.; BUNDITHYA, W.; GOLDSBROUGH, P.B. Characterization of the *Arabidopsis* metallothionein gene family: tissue-specific expression and induction during senescence and in response to copper. **New Phytologist**, London, v.159, p.369-381, 2003.

GUO, W.J.; MEETAM, M.; GOLDSBROUGH, P.B. Examining the specific contributions of individual *Arabidopsis* metallothioneins to copper distribution and metal tolerance. **Plant Physiology**, Rockville, v.146, n.4, p.1697-1706, 2008.

HAMER, D.H. Metallothionein. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.55, p.913-951, 1986.

HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. **Mutation Research**, Amsterdam, v.533, p.211-226, 2003.

HEISE, J.; KREJCI, S.; MIERSCH, J.; KRAUSS, G.; HUMBECK, H. Gene Expression of Metallothioneins in Barley during Senescence and Heavy Metal Treatment. **Crop Science**, Madison, v.47, p.1111-1118, 2007.

HIGO, K.; UGAWA, Y.; IWAMOTO, M.; KORENAGA, T. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database. **Nucleic Acids Research**, London, v.27, n.1, p.297-300, 1999.

HSIEH, H-M.; LIU, W-K.; CHANG, A.; HUANG, P.C. RNA expression patterns of a type 2 metallothionein-like gene from rice. **Plant Molecular Biology**. Dordrecht, v.32, n.3, p.525-529, 1996.

HUDSPETH, R.L. HOBBS, S.L.; ANDERSON, D.M.; RAJASEKARAN, K.; GRULA, J.W. Characterization and expression of metallothionein-like genes in cotton. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.31, n.3, p.701-705, 1996.

HYEONG, C.P., MAN, L.K., YUN, H.K., JOO, M.J., JAE, H.Y., MIN, C.K., CHAN, Y.P., JAE, J.C.; BYEONG, C.M.; JU, H.L.; HAE, W.Y.; , SUNG-HO, L.; CHUNG, W.S.; , CHAE, O.L.; SANG, Y.L.; JONG, C.H.; MOO, J.C. Pathogen- and NaCl-induced expression of the S<sub>CaM</sub>-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. **Plant Physiology**, Rockville, v.135, n.4, p.2150-2161, 2004.

HWANG, Y.S.; KARRER, E.E.; THOMAS, B.R.; CHEN, L.; RODRIGUEZ, R.L. Three *cis*-elements required for rice  $\alpha$ -amylase *Amy3D* expression during sugar starvation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.36, p.331-341, 1998.

ISKANDAR, H.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, Berlin, v.22, p.1-13, 2004.

JIN, S.; CHENG, Y.; GUAN, Q.; LIU, D.; TAKANO, T.; LIU, S. A metallothionein-like protein of rice (rgMT) functions in *E. coli* and its gene expression is induced by abiotic stresses. **Biotechnology Letter**, Kew, v.28, p.1749-1753, 2006.

JORDAN, R.H.; TURLEY, R.B.; DEFAUW, S.L.; STEELE, M. Characterization of a cDNA encoding metallothionein 3 from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *DNA Sequence - Journal of DNA Sequencing and Mapping*, London, v.16, n.2, p.96-102, 2005.

KAGI, J.H.R. Overview of metallothionein. **Methods in Enzymology**, New York, v.205, p.613-626, 1991.

KLINEDINST, S.; PASCUZZI, P.; REDMAN, J.; DESAI, M.; ARIAS, J. A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems. **Plant Molecular Biology** Maryland, v.42, n.5, p. 679-688 2000

KOHLER, A.; BLAUDEZ, D.; CHALOT, M.; MARTIN, F. Cloning and expression of multiple metallothioneins from hybrid poplar. **The New Phytologist**, London, v.164, n.1, p.83-93, 2004.

KOJIMA, Y.; BINZ, P.A.; KAGI, J.H.R. Nomenclature of metallothionein: proposal for a revision. In: KLAASSEN, C. (Ed.). **Metallothionein IV**. Basel: Birkhauser Verlag, 1999. p.3-6.

LANE, B.; KAJIOKA, R.; KENNEDY, T. The wheat germ Ec protein is a zinc-containing metallothionein. **Biochemistry and Cell Biology**, Tokyo, v.65, p.1001-1005, 1987.

LANFRANCO, L.; BOLCHI, A.; ROS, E.C.; OTTONELLO, S.; BONFANTE, P. Differential expression of a metallothionein gene during the presymbiotic versus the symbiotic phase of an arbuscular mycorrhizal fungus. **Plant Physiology**, Rockville v.130, n.1, p. 58-67, 2002.

LEE, J.; SHIM, D.; SONG, W.Y.; HWANG, I.; LEE Y. Arabidopsis metallothioneins 2a and 3 enhance resistance to cadmium when expressed in *Vicia faba* guard cells. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.54, p.805–815, 2004.

LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. PlantCARE: a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, London, v.30, n.1, p.325-327, 2002.

LIN, H.-C.; MORCILLO, F.; DUSSERT, S.; TRANCHANT-DUBREUIL, C.; TREGGAR, J.W.; TRANBARGER, T.J. Transcriptome analysis during somatic embryogenesis of the tropical monocot *Elaeis guineensis*: Evidence for conserved gene functions in early development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.70, n.1-2, p.173-192, 2009.

LUO, H.; SONG, F.; GOODMAN, R.M.; ZHENG, Z. Up-regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. **Plant Biology**, Stuttgart, v.7, p.459-468, 2005.

MA, M.; LAU, P.S.; JIA, Y.T.; TSANG, W.K.; LAM, S.K.S.; TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. The isolation and characterization of Type 1 metallothionein (MT) cDNA from a heavy-metal-tolerant plant, *Festuca rubra* cv. Merlin. **Plant Science**, Amsterdam, v.164, p.51-60, 2003.

MARGOSHES, M.; VALLEE, B.L. A cadmium protein from equine kidney cortex. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.79, p.4813-4814, 1957.

MARUYAMA-NAKASHITA, A., NAKAMURA, Y., WATANABE-TAKAHASHI, A., INOUE, E., YAMAYA, T., TAKAHASHI, H. Identification of a novel *cis*-acting element conferring sulfur deficiency response in *Arabidopsis* roots. **The Plant Journal**, Oxford, v.42, p.305-314, 2005.

MIR, G.; DOMENECH, J.; HUGUET, G.; GUO, W.J.; GOLDSBROUGH, P.B.; ATRIAN, S.; MOLINAS, M. A plant type 2 metallothionein (MT) from cork tissue responds to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.55, p.2483-2493, 2004.

MONTGOMERY, J.; GOLDMAN, S.; DEIKMAN, J.; MARGOSSIAN, L.; FISCHER, R.L. Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a fruit ripening gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v.90, n.13, p.5939-5943, 1993.

MORIGUCHI, T.; KITA, M.; HISADA, S.; ENDO-INAGAKI, T.; OMURA, M. Characterization of gene repertoires at mature stage of citrus fruits through random sequencing and analysis of redundant metallothionein-like genes expressed during fruit development. **Gene**, Amsterdam, v.211, n.2, p.221-227, 1998.

MOSKOVA, I.; TODOROVA, D.; ALEXIEVA, V.; IVANOV S.; SERGIEV I. Effect of exogenous hydrogen peroxide on enzymatic and nonenzymatic antioxidants in leaves of young pea plants treated with paraquat **Plant Growth Regulation**, Sofia, v.57, p.193-202, 2009.

MOYLE, R.; FAIRBAIRN, D.J.; RIPI, J.; CROWE, M.; BOTELLA, J.R. Developing pineapple fruit has a small transcriptome dominated by metallothionein. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.56, p.101–112, 2005.

MUNGER, K.; GERMANN, U.A.; LERCH, K. The *Neurospora crassa* metallothionein gene. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.262, p.7363-7367, 1987.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.15, n.3, p.473-497, 1962.

MURPHY, A.S.; ZHOU, J.; GOLDSBROUGH P.B.; TAIZ, L. Purification and immunological identification of metallothioneins 1 and 2 from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, Rockville, v.113, p.1293-1301, 1997.

NAVABPOUR, S.; MORRIS, K.; ALLEN, R.; HARRISON, E.; A-H-MACKERNESS, S.; BUCHANAN-WOLLASTON, V. Expression of senescence-enhanced genes in response to oxidative stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.54, n.391, p. 2285-2292, 2003.

NISHIUCHI, S.; LIU, S.; TAKANO, T. Isolation and characterization of a metallothionein-1 protein in *Chloris virgata* Swartz that enhances stress tolerances to oxidative, salinity and carbonate stress in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology Letters**, v.29, n.8, p.1301-1305.

NORDBERG, M.; KOJIMA, Y. Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. In: KAGI, J.H.R.; NORDBERG, M. (Ed.). **Metallothionein**. Basel: Birkhauser Verlag, 1979. p.41-124.

PFAFFL, M.W. Quantification strategies in real-time PCR. In: BUSTIN, S.A. (Ed.) A-Z of quantitative PCR. CA: La Jolla, 2004, p.87-112.

QI, X.; ZHANG, Y.; CHAI, T. Characterization of a Novel Plant Promoter Specifically Induced by Heavy Metal and Identification of the Promoter Regions Conferring Heavy Metal Responsiveness. **Plant Physiology**, Rockville, v.143, p.50-59, 2007.

RAUSER, R.W. Structure and function of metal chelators produced by plants: the case for organic acids, amino acids, phytin and metallothioneins. **Cell Biochemistry and Biophysics**, Heidelberg, v.31, p.19-48, 1999.

REID, S.J.; ROSS, G.S. Up-regulation of two cDNA clones encoding metallothioneinlike proteins in apple fruit during cool storage. **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.100, n.1, p.183-189, 1997.

ROBINSON, N.J.; GUPTA, A.; FORDHAM-SKELTON, A.P.; CROY, R.D.R.; WHITTON, B.A.; HUCKLE, J.W. Prokaryotic metallothionein gene characterization and expression: chromosome crawling by ligation-mediated PCR. **Proceedings of Royal Society of London. B**, London, v.242, p.241-247, 1990.

ROBINSON, N.J.; TOMMEY, A.T.; KUSKE, C.; JACKSON, P.J. Plant metallothioneins. **Biochemical Journal**, Colchester, v.295, p.1-10, 1993.

ROOSENS, N.H.; BERNARD, C.; LEPLAE, R.; VERBRUGGEN, N. Evidence for copper homeostasis function of metallothionein (MT3) in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.577, n.1-2, p.9-16, 2004.

ROOSENS, N.H.; LEPLAE, R.; BERNARD, C.; VERBRUGGEN, N. Variations in plant metallothioneins: The heavy metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* as a study case. **Planta**, Berlin, v.222, n.4, p.716-729, 2005.

ROUSTER, J.; LEAH, R.; MUNDY, J.; CAMERON-MILLS, V. Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain. **The Plant Journal**, Oxford, v.11, n.3, p.513-523, 1997.

RUSHTON, P.J.; TORRES, J.T.; PARNISKE, M.; WERNERT, P.; HAHLBROCK, K.; SOMSSICH, I.E. Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR1. **EMBO Journal**, Oxford, v.15, p.5690-5700, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning : a laboratory manual**, segunda ed., Plainview: Cold Spring Harbor Laboratory, em 3 volumes, 1989.

SCHAFER, H.J.; GREINER, S.; RAUSCH, T.; HAAG-KERWER, A. In seedlings of the heavy metal accumulator *Brassica juncea* Cu<sup>2+</sup> differentially affects transcript amounts for  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -ECS) and metallothionein (MT2). **FEBS Letters**, Amsterdam, v.404, n.2-3, p.216-220, 1997.

SCHENK, P.M.; REMANS, T.; SAGI, L.; ELLIOTT, A.R.; DIETZGEN, R.G.; SWENNEN, R.; EBERT, P.R.; GROF, C.P.; MANNERS, J.M. Promoters for pregenomic RNA of banana streak badnavirus are active for transgene expression in monocot and dicot plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.47, p.399-412, 2001.

SERENO, M.L.; ALMEIDA, R.S.; NISHIMURA, D.S.; FIGUEIRA, A. Response of sugarcane to increasing concentrations of copper and cadmium and expression of metallothionein genes. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.164, n.11, p.1499-1515, 2007.

SHETTY, N.P.; JORGENSEN, H.J.L.; JENSEN, J.D.; COLLINGE, D.B.; SHETTY, H.S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.121, n.3, p.267-280, 2008.

SHIMAMURA, C.; OHNO, R.; NAKAMURA, C.; TAKUMI, S. Improvement of freezing tolerance in tobacco plants expressing a cold-responsive and chloroplast-targeting protein WCOR15 of wheat, **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.163, n.2, p.213-219, 2006.

SMALE, S.T.; KADONAGA, J.T. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.72, p.449-479, 2003.

SNOWDEN, K.C.; RICHARDS, K.D.; GARDNER, R.C. Aluminum-induced genes induction by toxic metals; low-calcium; and wounding and pattern of expression in root tips. **Plant Physiology**, v.107, n.2, p.341-348, 1995.

STANKOVIC, R.K.; CHUNG, R.S.; PENKOWA, M. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, New York, v.39, p.484-489, 2007.

STEPHEN, T.S.; JAMES T. The RNA polymerase II core promoter. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v.72, p.449-479, 2003.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.24, n.8, p. 1596-1599, 2007.

TUCKER, S.L.; THORNTON, C.R.; TASKER, K.; JACOB, C.; GILES, G.; EGAN, M.; TALBOT, N.J. A fungal metallothionein is required for pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**, Baltimore, v.16, n.6, p.1575-1588, 2004.

USHA, B.; VENKATARAMAN, G.; PARIDA, A. Heavy metal and abiotic stress inducible metallothionein isoforms from *Prosopis juliflora* (SW) D.C. show differences in binding to heavy metals in vitro. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v.281, n.1, p.99-108, 2009.

VALLEE, B.L. Introduction to metallothionein. **Methods in Enzymology**, New York, v.205, p.3-7, 1991.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, London, v.3, n.7, p.1-11, 2002.

VAN HOOFF, N.A.L.M.; HASSINEN, V.H.; HAKVOORT, H.W.J.; BALLINTIEN, K.F.; SCHAT, H.; VERKLEIJ, J.A.C.; ERNST, W.H.O.; KARENLAMPI, S.O.; TERVAHAUTA, A.I. Enhanced copper tolerance in *Silene vulgaris* (Moench) Garcke populations from copper mines is associated with increased transcript levels of a 2b-type metallothionein gene. **Plant Physiology**. Rockville, v.126, n.4, p.1519-1526, 2001.

VITALE, A.; CERIOTTI, A. Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests. **Plant Physiology**, Rockville, v.136, p.3420-3426, 2004.

WHITE, J.; PACEY-MILLER, T.; CRAWFORD, A.; CORDEIRO, G.; BARBARY, D.; BUNDOCK, P.; HENRY, R. Abundant transcripts of malting barley identified by serial analysis of gene expression (SAGE). **Plant Biotechnology Journal**, New York, v.4, n.3, p. 289-301, 2006.

WHITELAW, C.A.; LE HUQUET, J.A.; THURMAN, D.A.; TOMSETT, A.B. The isolation and characterisation of type II metallothionein-like genes from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.33, n.3, p.503-511, 1997.

WILLEMS, E.; LEYNS, L.; VANDESOMPELE, J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. **Analytical Biochemistry**, New York, v.379, n.1, p.127-129, 2008.

WOLF, W.R.; IRGOLIC, K.J.; LUDWICKI, K.J. Importance and determination of chemical species in biological systems. In: BERNHARD, M.; BRINCKMAN, F.E.; SADLER, P.J. (Ed.). **The importance of chemical speciation in environmental processes**. Berlin: Springer-Verlag, 1986. p.17-25.

WONG, H.L.; SAKAMOTO, T.; KAWASAKI, T.; UEMURA, K.; SHIMAMOTO, K. Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase OsRac1 in rice. **Plant Physiology**, Rockville, v.135, p.1447-1456, 2004.

XU, N., HAGEN, G., GUILFOYLE, T. Multiple auxin response modules in the soibean SAUR 15A promoter. **Plant Science**, Amsterdam, v.126, p.193-201, 1997.

XUE, T.; LI, X.; ZHU, W.; WU, C.; YANG, G.; ZHENG, C. Cotton metallothionein GhMT3a, a reactive oxygen species scavenger, increased tolerance against abiotic stress in transgenic tobacco and yeast. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.60, n.1, p.339-349, 2009.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Londrina, v.17, n.1, 2005.

YUAN, J.; CHEN, D.; REN, Y.; ZHANG, X.; ZHAO, J. Characteristic and expression analysis of a metallothionein gene, OsMT2b, downregulated by cytokinin suggests functions in root development and seed embryo germination of rice. **Plant Physiology**, Rockville, v.146, p.1637-1650, 2008.

ZHANG, Y.W.; TAM, N.F.Y.; WONG, Y.S. Cloning and characterization of type 2 metallothionein-like gene from a wetland plant, *Typha latifolia*. **Plant Science**, Amsterdam, v.167, p.869-877, 2004.

ZHANG, Z.; GURR, S.J. Walking into the unknown: a 'step down' PCR-based technique leading to the direct sequence analysis of flanking genomic DNA. **Gene**, Amsterdam, v.253, p.145-150, 2000.

ZHIGANG, A.; CUIJIE, L.; YUANGANG, Z.; YEJIE, D.; WACHTER, A.; GROMES, R.; RAUSCH, T. Expression of BjMT2, a metallothionein 2 from Brassica juncea, increases copper and cadmium tolerance in Escherichia coli and Arabidopsis thaliana, but inhibits root elongation in Arabidopsis thaliana seedlings. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.57, p.3575-3582, 2006.

ZHOU, G.-K.; XU, Y.-F.; LI, J.; YANG, L.; LIU, J.-Y. Molecular analyses of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Berlin, v.39, p.595-606, 2006.

ZHOU, J.; GOLDSBROUGH P.B. Functional homologs of fungal metallothionein genes from *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Baltimore, v.6, p.875-884, 1994.

ZHOU, J.; GOLDSBROUGH P.B. Structure, organization and expression of the metallothionein gene family in Arabidopsis. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.248, p.318-328, 1995.

ZIMERI, A.M.; DHANKHER, O.P.; MCCAIG, B.; MEAGHER, R.B. The plant MT1 metallothioneins are stabilized by binding cadmium and are required for cadmium tolerance and accumulation. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.58, p.839-855, 2005.



## **APÊNDICES**

Apêndice A – Confirmação dos clones dos cinco genes *SoMTs* de cana-de-açúcar escolhidos para desenho dos iniciadores utilizados no presente trabalho. O início e fim da seqüência codante está destacado em negrita.

***SoMT1a* (CLONE SCSFHR1044C11.g)**

CGNGNGNNNGNNCNNNNNCCTTCAAGGCNTTTACAGCCTTTCANGGAATCCCGNCTCGACCCACGCGTC  
CGAAGCGAAGACGACTTTTGTAAAGACGCCCTTTGGTATATATTTGTTCTTNNNCTTCTTCGTTCTTGCA  
CCACAAAACAAGCAGG**ATGTCCTTGCAGCTGCGGATCAAGCTGCAACTGCGGCTCAAGCTGCAAGTGCG**  
**GCAAGAAGTACCCTGACCTGGAGGAGAAGAGCACCGCCGCGCAGGCCACCGTCGTCTGGGCGTCGCC**  
**CCGGAGAAGACAGCTGCTGCCGAGTTTCGAGGCCGCGGCGGAGTCCGGCGAGAACTCCCACGGCTGCAG**  
**CTGCGGTGACAGCTGCAAGTTGCAACCCTGGCACTGATTA**TCGAACGANCATGGGGAACGAAAGACCG  
ATTGATATTCATTGCTGGCTGCTTATTTGATGAATATCCNATCTTGNTGCCGGGGGACGTACGGTACT  
ANCTNACATTCTGGCTTTAACAAATTGTGTTGCTGTTGTTGACGTATGGTAACTGGGTGGGTTGGAAC  
AATNANGGACAAGCTANCCNTCCGTGTTTTTAATTATATNATGNTCATTCAATCTTGNTGGGCNCCC  
CANCNTTGCATTATNCCGGTCACTCCCCTTGCCCCTGTACCTGTGTTGCTGTGANGGGTTAATTTT  
GNTNNCACTCCTGCTTNGGCCCTTGGGCGTCCAGTAACGTCTTGTGCTCCTGCATTGTTTGGGG

***SoMT1b* (CLONE SCQGST1032D09.g)**

GCNNGGNNNGNCCNNNNNCCTTNGAAANCTTCTANGCNTGTTACGCCTGCAGGGTACCGGGTCCGGA  
ATCCCGGGTTCGACCCACGCGTCCGCGACTNTGTAAAGACGCCCTTTGGTANATATNTGTNCTTGAGCTT  
CTTCGTNCTCGCACCANAAAACAAGG**ATGTCCTTGCANCTGCGGATCAAGCTGCNACTGCGGCTCAAGC**  
**TGCANNTGCGGCAAGAANTACCCGACCTGCAGGAGAAGANCACCGCGGCGCANGCCACCGTCGTCTT**  
**GGGCGTCNNCCGGAGAANAAGGCGNGGCCGANTTCGANGCCGCGGCGGANTCCGGCGAGACCTCCC**  
**ACGGCTGCNNCTGCNGTGACAANTGCAACCCTGCAACTGCTGA**TCCTATCGACNACCGACC  
ATGGGCAAGATCGATGATATATGCATGCTGCCTAAGCTATTGCTATCTTGTGACNGCGACGTACGGTA  
CTACTACTACATCTGCTCTGCAATAGTGTGCTGTGTGACGTATGTATGTATGTAACCTGTGAANGAAC  
AATAATAAGGGCGAGCTAGCCATCGTGTATAATTATATATGTACTTCGATCTGCTGCCTGGCCANNA  
TGCGTATGCGGTCTCTGCCCTTGTACCTGTGTTGTTGNGTGTGTGNTATGTAACCCTCAATTTGGC  
GNCCAGGGGTGATTNATATATATAAACNNGTCTGGTTTTGNCNN

***SoMT2a* (CLONE SCRUF13063A10.g)**

NNNGGNNNNNGNCCNNNNNCCTNTAANNCTCAAAAANGNCCCTGCAGGTACCGGTCCGGAATCCCG  
GGTCGACCCACGCGTCCGCTCGTTCCAGATTTGCATTTGTTGCGAGCTTCGTGTTCTTGTTTGCGAGG  
ANAGGAAGAGGACGACTGCGAGGAGAGGAGG**ATGTCGTGCTGCGGAGGCAACTGCGGGTTCGGCTCCG**  
**GCTGCAAGTGCGGCAGCGGCTGCGGAGGGTGCAAGATGTACCCGGACATGGCTGAGCAGGTGACCACC**  
**ACCCAGACTCTCATCATGGGTGTTGCACCATCCAAGGGGCACGCCGAGGGCGGGTTCGAGGTGGCCAC**  
**CGCCGGAGCTGAGAACGACGGGTGCAAGTGCGGCCCAACTGCAGCTGCAACCCTGCACCTGCAAGT**  
**GAGGCGATGGCGATGACCCTGCAGGGTGCAGGCCGTGATGAGGAAGGAGATACTAGTATACAGTGTGT**  
GTCGTTTTGAGTTTTCAGTCAGTCTCTCANTCAGTCGCGTTGCCATGGCATTGCGTAATTCTCGCTCGCA  
TTGCCGCTTAGTANTGGTGGTACTGATGGGAACGAATAATTGGTACTGAGATGTTGGCGTCTGTTCT  
GTTCTTTCTCCCCTGCCCTGGGGGTCACTAACAATCAATGTTGTGTTGTCTGGGTCCCACANCAA  
CATTGCATGCCATNGTCTGTTTGGACCTCC

***SoMT2b* (CLONE SCACHR1035F08.g)**

NTNGCNAANNGGNNNNNCCTNTAANNCGTATTACNNANGTGNNCNCCTAACGTTAGCTAAGNNTGCGC  
TGNANNATTCTTTCAGTAGCAAAGCAGCAGCACCTGCTCCCTTCGCCGTGATC**ATGTCCTTGTGCAA**  
**CGGCAACTGCGGCTGCGGCTCCGGCTGCCAGTNGGGCAACGGGTGCGGCGGCTGCAAGATGTCCCCTG**







Apêndice C - Resultados da análise da expressão basal relativa dos genes *SoMTs* de cana-de-açúcar em ‘cultivares suscetíveis ‘SP70-1143’ e resistentes ‘RB72-454’ a *Puccinia melanocephala* no período amostral sem inoculação. A coleta feita aos 15 min foi usada como referência de expressão para cada cultivar. A expressão relativa dos *SoMTs* foi normalizada usando a expressão do gene *rpI35-4*. Os valores entre parênteses se referem a  $\pm 95\%$  do intervalo de confiança. [ ]  $p < 0,05\%$ .

Gene	Cultivar	Período Amostral						
		15 min (referência)	4 h	8 h	24 h	48 h	96 h	240 h
SoMT1a	SP70-1143 (SNI)	1,00 (0,12 - 8,5) [a]	1,02 (0,30 - 3,4) [a]	0,88 (0,27-2,92) [a]	1,03 (0,30 -3,62) [a]	3,04 (1,09-8,53) [a]	1,86 (1,11 - 3,12) [a]	4,09 (1,46 - 11,4) [a]
	RB72-454 (RNI)	1,00 (0,66-1,51) [a]	1,44 (0,73-2,85) [a]	0,76 (0,36-1,63) [a]	1,50 (0,29-7,83) [a]	1,64 (0,58-4,64) [a]	2,92 (1,23-6,95) [a]	2,61 (0,45-15,1) [a]
SoMT1b	SP70-1143 (SNI)	1,00 (0,16-6,43) [a]	0,86 (0,38-1,92) [a]	0,88 (0,17-4,63) [a]	1,21 (0,30-4,87) [a]	2,77 (0,57-13,4) [a]	1,43 (0,75-2,69) [a]	3,41 (0,66-17,7) [a]
	RB72-454 (RNI)	1,00 (0,64-1,57) [a]	1,08 (0,41-2,84) [a]	0,83 (0,64-1,07) [a]	2,14 (0,33-13,7) [a]	1,79 (0,96-3,34) [a]	3,51 (1,66-7,44) [b]	1,79 (0,18- 17,9) [a]
SoMT2a	SP70-1143 (SNI)	1,00 (0,25-3,97) [a]	0,21 (0,09-0,48) [a]	0,64 (0,07-6,02) [a]	0,71 (0,14-3,63) [a]	1,21 (0,60-2,44) [a]	0,75 (0,30-1,89) [a]	1,70 (0,42-6,79) [a]
	RB72-454 (RNI)	1,00 (0,32-3,15) [a]	0,92 (0,57-1,49) [a]	0,59 (0,54-0,64) [a]	1,66 (0,10-27,9) [a]	1,21 (0,23-6,35) [a]	2,68 (0,59-12,2) [a]	0,92 (0,11-7,98) [a]
SoMT2b	SP70-1143 (SNI)	1,00 (0,04-27,6) [a]	0,22 (0,08-0,59) [a]	0,54 (0,19-1,57) [a]	0,42 (0,15-1,17) [a]	2,77 (0,84-9,19) [a]	1,53 (0,52-4,56) [a]	2,81 (2,15-3,67) [a]
	RB72-454 (RNI)	1,00 (0,64-1,55) [a]	1,37 (0,43-4,39) [a]	1,11 (0,51-2,42) [a]	2,03 (0,65-6,36) [a]	1,82 (1,24-2,68) [a]	3,19 (2,74-3,71) [b]	2,26 (0,48-10,7) [a]
SoMT3	SP70-1143 (SNI)	1,00 (0,04-23,7) [a]	0,38 (0,05-2,88) [a]	1,12 (0,16-8,10) [a]	0,71 (0,36-1,41) [a]	2,60 (0,19-35,9) [a]	1,11 (0,17-7,29) [a]	5,33 (0,94-30,3) [a]
	RB72-454 (RNI)	1,00 (0,14-6,97) [a]	0,43 (0,07-2,46) [a]	0,37 (0,06-2,38) [a]	0,55 (0,05-5,79) [a]	1,45 (0,28-7,54) [a]	1,63 (0,42-6,32) [a]	0,31 (0,01-8,66) [a]

Apêndice D - Resultados da análise de expressão relativa do gene SoMT1b, SoMT2a, SoMT2b e SoMT3 em cultivares suscetíveis 'SP70-1143' e resistentes 'RB72-454' de cana-de-açúcar, infectadas com *Puccinia melanocephala*. RNI/SNI: Expressão basal relativa dos genes SoMTs na cultivar 'RB72-454' sem inoculação em relação a cultivar 'SP70-1143' sem inoculação. O valor médio de expressão da cultivar 'SP70-1143' sem inoculação, no período amostral, foi usado como referência. SI/SNI: Expressão relativa dos genes SoMTs na cultivar 'SP70-1143' após inoculação com *Puccinia melanocephala*. O valor médio de expressão da cultivar 'SP70-1143' não inoculada, no período amostral, foi usado como referência. RI/RNI: Expressão relativa dos genes SoMTs na cultivar 'RB72-454' após inoculação com *Puccinia melanocephala*. O valor médio de expressão da cultivar 'RB72-454' não inoculada, no período amostral, foi usado como referência. Em todas as análises a expressão relativa dos SoMTs foi normalizada usando a expressão do gene *rpl35-4*. Os valores entre parênteses se referem a  $\pm$  95% do intervalo de confiança. [ ]  $p < 0,05\%$ . As dados de expressão para SoMT1a foram discutidos no item 4.6.3.1.

Gene	Cultivar	Referência	Período Amostral						
			15 min	4 h	8 h	24 h	48 h	96 h	240 h
SoMT1b	RNI/SNI	1,00 (0,3-3,0) [a]	1,07 (0,7-1,5) [a]	1,17 (0,5-2,8) [a]	0,88 (0,7-1,0) [a]	2,22 (0,3-14,4) [a]	1,88 (0,9-4,0) [a]	3,76 (1,7-8,1) [a]	1,9 (0,2-22,3) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,5-1,8) [a]	0,47 (0,1-1,9) [a]	0,74 (0,4-1,3) [a]	0,17 (0,01-2,4) [a]	0,26 (0,12-0,6) [a]	0,20 (0,01-5,2) [a]	0,58 (0,13-2,5) [a]	1,07 (0,3-3,4) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,3-2,9) [a]	0,65 (0,1-2,9) [a]	0,53 (0,1-4,8) [a]	0,47 (0,2-1,2) [a]	0,81 (0,4-1,7) [a]	1,09 (0,4-2,9) [a]	0,89 (0,2-4,8) [a]	1,9 (0,6-5,5) [a]
SoMT2a	RNI/SNI	1,00 (0,5-1,8) [a]	1,28 (0,4-4,3) [a]	1,19 (0,7-2,1) [a]	0,77 (0,6-0,9) [a]	2,11 (0,1-37,3) [a]	1,56 (0,3-8,4) [a]	3,50 (0,8-15,1) [a]	1,21 (0,2-9,2) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,3-3,8) [a]	0,75 (0,4-1,5) [a]	0,44 (0,2-0,9) [a]	0,85 (0,2-4,6) [a]	0,70 (0,1-8,02) [a]	0,69 (0,2-2,2) [a]	1,53 (0,7-3,3) [a]	1,42 (0,2-11) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,2-6,1) [a]	0,89 (0,1-9,8) [a]	0,55 (0,4-0,7) [a]	0,77 (0,3-1,9) [a]	0,59 (0,4-0,9) [a]	0,89 (0,5-1,7) [a]	1,26 (0,3-5,6) [a]	4,00 (3,2-5,0) [a]
SoMT2b	RNI/SNI	1,00 (0,1-8,6) [a]	1,43 (0,5-4,0) [a]	2,20 (0,9-5,4) [a]	1,64 (0,7-3,8) [a]	3,17(1,1-9,50) [a]	2,59 (1,3-5,2) [a]	4,69 (3,6-6,1) [a]	2,92 (0,4-20) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,2-5,4) [a]	0,50 (0,2-1,3) [a]	0,43 (0,2-0,9) [a]	0,25 (0,03-1,8) [a]	0,44 (0,04-4,6) [a]	0,36 (0,0-28,5) [a]	0,44 (0,2-1,0) [a]	1,29 (0,5-3,3) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,4-2,7) [a]	0,37 (0,03-4,4) [a]	0,35 (0,03-4,7) [a]	0,56 (0,05-5,8) [a]	0,72 (0,2-2,8) [a]	1,31 (0,3-6,1) [a]	0,51 (0,0-65,7) [a]	2,18 (0,4-12) [a]

SoMT3	RNI/SNI	1,00 (0,6-1,8) [a]	0,69 (0,10-4,7) [a]	0,29 (0,05-1,7) [a]	0,26 (0,04-1,6) [a]	0,38 (0,04-4,1) [a]	0,99 (0,2-4,6) [a]	1,12 (0,3-4,5) [a]	0,22 (0,0-6,3) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,1-12) [a]	2,58 (0,3-23,8) [a]	0,85 (0,2-3,0) [a]	0,63 (0,23-1,7) [a]	0,77 (0,16-3,7) [a]	1,42 (0,2-9,3) [a]	1,35 (0,5-3,5) [a]	2,06 (0,5-8,2) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,2-5,3) [a]	0,69 (0,11-4,3) [a]	0,66 (0,3-1,6) [a]	0,86 (0,3-2,0) [a]	1,69 (0,3-11,1) [a]	1,35 (0,12-15) [a]	2,09 (0,3-16,1) [a]	2,27 (0,8-6,2) [a]



Apêndice E - Resultados da análise da expressão basal relativa dos genes *SoMT1a*, *SoMT1b* e *SoMT2b* de cana-de-açúcar em ‘cultivares suscetíveis ‘SP78-4467’ e resistentes ‘SP82-1176’ a *Xanthomonas albilineans* no período amostral sem inoculação. A coleta feita aos 15 min foi usada como referência de expressão para cada cultivar. A expressão relativa dos *SoMTs* foi normalizada usando a expressão do gene *rp/35-4*. Os valores entre parênteses se referem a  $\pm$  95% do intervalo de confiança. [ ]  $p < 0,05\%$ .

Gene	Cultivar	Período Amostral						
		15 min (Referência)	4 h	8 h	24 h	48 h	96 h	240 h
<i>SoMT1a</i>	SP78-4467 (SNI)	1,00 (0,54-1,85) [a]	1,14 (0,51-2,56) [a]	0,74 (0,40-1,36) [a]	2,43 (1,58-3,74) [a]	1,92 (1,12-3,29) [a]	1,67 (0,83-3,32) [a]	1,41 (0,31-6,48) [a]
	SP82-1176 (RNI)	1,00 (0,12-8,02) [a]	0,63 (0,16-2,47) [a]	0,44 (0,12-1,64) [a]	1,49 (0,42-5,29) [a]	1,63 (1,03-2,59) [a]	1,33 (0,19-9,62) [a]	1,79 (0,22-14,2) [a]
<i>SoMT1b</i>	SP78-4467 (SNI)	1,00 (0,50-1,99) [a]	1,15 (0,58-2,27) [a]	0,65 (0,30-1,45) [a]	1,69 (0,69-4,12) [a]	2,14 (1,27-3,61) [a]	1,33 (0,41-4,25) [a]	1,25 (0,30-5,24) [a]
	SP82-1176 (RNI)	1,00 (0,09-10,85) [a]	0,50 (0,14-1,75) [a]	0,29 (0,09-0,98) [a]	0,76 (0,10-5,72) [a]	0,99 (0,36-2,69) [a]	0,76 (0,06-10,33) [a]	1,10 (0,13-8,96) [a]
<i>SoMT2b</i>	SP78-4467 (SNI)	1,00 (0,12-8,29) [a]	0,79 (0,46-1,37) [a]	1,19 (0,52-2,73) [a]	1,14 (0,35-3,72) [a]	1,68 (0,43-6,51) [a]	1,62 (1,18-2,22) [a]	1,79 (1,36-2,35) [a]
	SP82-1176 (RNI)	1,00 (0,26-3,85) [a]	1,01 (0,29-3,47) [a]	0,71 (0,47-1,06) [a]	2,15 (0,62-7,40) [a]	2,11 (1,11-4,01) [a]	3,09 (1,77-5,40) [a]	1,77 (0,22-14) [a]

Apêndice F - Resultados da análise de expressão relativa do gene *SoMT1a*, *SoMT1b* e *SoMT2b* em cultivares suscetíveis ‘SP78-4467’ e resistentes ‘SP82-1176’ a *Xanthomonas albilineans*. **RNI/SNI**: Expressão basal relativa dos genes *SoMTs* na cultivar ‘SP82-1176’ sem inoculação em relação a cultivar ‘SP78-4467’ sem inoculação. O valor médio de expressão da cultivar ‘SP78-4467’ sem inoculação, no período amostral, foi usado como referência. **SI/SNI**: Expressão relativa dos genes *SoMTs* na cultivar ‘SP78-4467’ após inoculação com *Xanthomonas albilineans*. O valor médio de expressão da cultivar ‘SP78-4467’ não inoculada, no período amostral, foi usado como referência. **RI/RNI**: Expressão relativa dos genes *SoMTs* na cultivar ‘SP82-1176’ após inoculação com *Xanthomonas albilineans*. O valor médio de expressão da cultivar ‘SP82-1176’ não inoculada, no período amostral, foi usado como referência. Em todas as análises a expressão relativa dos *SoMTs* foi normalizada usando a expressão do gene *rp135-4*. Os valores entre parênteses se referem a  $\pm$  95% do intervalo de confiança. [ ]  $p < 0,05\%$ .

Gene	Cultivar	Referência	Período Amostral						
			15 min	4 h	8 h	24 h	48 h	96 h	240 h
<i>SoMT1a</i>	RNI/SNI	1,00 (0,3-3,1) [a]	0,81 (0,1-6,1) [a]	0,52 (0,16-1,7) [a]	0,37 (0,1-1,4) [a]	1,24 (0,3-4,5) [a]	1,35 (0,8-2,2) [a]	1,09 (0,2-7,4) [a]	1,49 (0,2-13,7) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,2-5,5) [a]	0,96 (0,6-1,6) [a]	0,55 (0,3-0,95) [a]	0,52 (0,2-1,5) [a]	1,40 (0,3-6,1) [a]	1,15 (0,3-4,9) [a]	1,06 (0,4-2,6) [a]	0,93 (0,04-20) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,4-2,7) [a]	1,29 (0,4-4,6) [a]	0,57 (0,36-0,9) [a]	0,44 (0,3-0,75) [a]	0,89 (0,5-1,5) [a]	1,93 (0,6-6,7) [a]	1,35 (0,5-3,9) [a]	2,05 (0,3-11,9) [a]
<i>SoMT1b</i>	RNI/SNI	1,00 (0,5-2) [a]	4,57 (0,4-55,5) [a]	2,42 (0,8-7,05) [a]	1,43 (0,5-4,0) [a]	3,74 (0,5-27,1) [a]	4,61 (1,7-12,1) [a]	3,41 (0,2-54,8) [a]	5,12 (0,6-41,7) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,2-4,2) [a]	1,59 (0,4-6,0) [a]	0,90 (0,60-1,4) [a]	0,67 (0,3-1,4) [a]	2,35 (0,3-15,8) [a]	1,84 (0,3-10,7) [a]	1,30 (0,6-2,9) [a]	4,81 (0,3-87) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,4-2,4) [a]	1,52 (0,4-5,7) [a]	0,74 (0,6-0,9) [a]	0,52 (0,3-0,8) [a]	1,01 (0,9-1,1) [a]	1,53 (0,7-3,4) [a]	1,00 (0,2-6,4) [a]	1,53 (0,2-12,3) [a]
<i>SoMT2b</i>	RNI/SNI	1,00 (0,3-2,9) [a]	0,25 (0,1-1,08) [a]	0,23 (0,1-0,77) [a]	0,17 (0,1-0,3) [b]	0,49 (0,2-1,4) [a]	0,49 (0,3-0,8) [a]	0,74 (0,34-1,6) [a]	0,45 (0,05-3,8) [a]
	SI/SNI	1,00 (0,2-6,3) [a]	0,75 (0,2-2,6) [a]	0,30 (0,2-0,5) [a]	0,29 (0,1-1,04) [a]	0,61 (0,1-4,6) [a]	0,68 (0,03-18) [a]	0,81 (0,1-7,03) [a]	1,94 (0,1-27,4) [a]
	RI/RNI	1,00 (0,4-2,5) [a]	1,29 (0,4-4,0) [a]	0,53 (0,2-1,5) [a]	0,89 (0,2-3,9) [a]	1,10 (0,5-2,4) [a]	1,12 (0,12-10,1) [a]	3,94 (0,5-30,5) [a]	1,94 (0,3-14,1) [a]

Apêndice G - Resultado do seqüenciamento de quatro seqüências referentes aos genes *SoMTs* (*SoMT1a*, *SoMT1b*, *SoMT2a* e *SoMT3*) de cana-de-açúcar obtidas com os iniciadores específicos para expressão heteróloga em *E. coli*. A seqüência do produto de amplificação dos genes se apresenta em vermelho e o par de iniciadores específico sublinhado. A seqüência do vetor de clonagem utilizado aparece em preto. As seqüências de *SoMT1a* e *SoMT2a* foram clonadas de forma invertida.

### ***SoMT1a***

TNTNTGNCGAGTNGCATGCTCCGGTCGCCATGGCGGCCGCGGGAATCGATTGGTGGTtACTAGTTCGGCA  
GTTGGCAGGGGTNGCACTTGCAGCTGTCACCGCAGCTGCAGCCGTGGGAGGTCTCGCCGACTCCGCCGC  
GGCCTCGAACTCGGCAGCAGCTGTCTTCTCCGGGGCGACGCCAGGACGACGGTGGCCTGCGCGGCGGTG  
CTCTTCTCCTCCAGGTCAAGGTACTTCTTGCCGCACCTTGCAGCTTGAGCCGCAGTTGCAGCTTGATCCGC  
AGCTGCAAgACATATGACCACCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAG  
CTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGT  
CATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCACACACAACATACGANTCCGGAANCATAA  
AGTGTAAGCCTGNGGTGCCTAATGAGTGANCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTT  
CCAGTCGGGAAACCTGTCNTGCCANCTGNATNAATGAATCNGTCAACGCNCGGGGAGANGCGGNTTGCNT  
ATNGGGCGCTCTCCGNTTCTCGNTCANTGACTCANNNGNCTCGGTCNTTCGGNTGNNGNANCGGNAN  
NNNTCANNCAANGNNNTANTANTGTTATNCACANAATCANGGANANNNNNGAAAAANNNTTTNANCNA  
ANGNCNTNAAAANGNNNNNANCNTNAAAAGGNNNTTNNNGNNTTNNCNAANGNCCNNTNANAAN

### ***SoMT1b***

TNTNTGGCGAGTNGCATGCTCCGGNCGCCATGGCGGCCGCGGGAATCGATTGGTGGTCATATGTCTTGCA  
GCTGCGGATCANGCTGCAACTGCGGCTCAAGCTGCAAGTGGGCAAGAAGTACCCGANCTGTAGGAGAA  
GAGCANCGCGCGCAGGCCACCGTCGTCTTGGGCGTCGCCCCGAGAAGAAGCGCGGCCGANTTGAG  
GCCGCGCGGAGTCCGCGGAGACCTCCCACGGTGCAGCTGCGGTGACAACCTGCAAGTGCACCCCTGCA  
ACTGCGCAACTAGTACCACCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCT  
CCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCA  
TAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTNATCCGCTCACAATTCACACACAACATACGATCCGGAANCATAAAGT  
GTAAAGCCTGGGGTGNCTAATGAGTGANCTANCTCACATNAATTGCGTNGCGCTCACTGCCCGCTTTCCA  
GTCGGGAAACCTGTCNTGCCANCTGCATNAATGAATCANNANCNCNCGGGANAGGCGNNNGNTATNGG  
GCGCNCNCGNTNCNANNNCNNTGANCTCANNNGNCCNNGNNTTGGNTGNGGNAANGNATNNNTNNTNAAN  
GGGGNAAACNNTATCCNNAANCNGGAAANNCNNGAAANNNTNANNAANGNCNNAANGNCNNANNN  
NAAAAGNNNNNNNGGNNNNNNAAGNCCNNTNANNAANGNCNNAANGNCNNANNN

### ***SoMT2a***

TNTNTGGGCGAGTTGCATGNTCCGGTCGCCATGGCGGCCGCGGGAATCGATTGGTGGTTGCTCTTCCGC  
ACTTGCAGGTGCAGGAGTNGCAGCTGCAGTTGGGGCCGCACTTGCACCCGTCGTTCTCAGCTCCGGCGGT  
GGCCACCTCGAACCCGCCCTCGGCGTGCCCTTGGATGGTGAACACCCATGATGAGAGTCTGGGTGGTG  
GTCACCTGCTCAGCCATGTCCGGGTACATCTTGCACCCCTCGTCAGCCGCTGCCGCACCTTGCAGCCGGAG  
CCGCACCCGNAGTTGCCTCCGNAGCACGACATATGACCACCAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCA  
GGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAGTATTCATAGTGTACCTAAAT  
AGCTTGGCGTAATCATGGTGCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGNTCACAATTCACACAATA  
TANTGATCCGGAANCATAAAGTGTAAGCCTGNGGTGNCTAATGAGTGANCTAACTCACATNAATTGCGT  
NGCGTCACTGCCCGCTTCCANTCGGAAACCTGTCNTGCCATNTGNATNAATGAATCANNCAANGCNC  
GGGGAAANGCGNTGNNTATNGGGCGCTCTCCGNTTCTCANNTCANTGANCTCANNNGNCTCGGNCNTN  
CGGNTGNNGNANNGNATNANTNNNTNAANGNNNAAAANNGTATNCANNAATNNGGGAANNNNTNA  
AAANNNTTTNANNAANGNCNNAANNCNNANCTTAAAAGNNNTNNGNNTNNAAGNNNNCC  
NNANANNNNNAAAANTNNNTNANTNANNNNNANNNNNNNNNNAAAAANNNNTTN

***SoMT3***

TNTNTGGCGAGTNGCATGCTCCGGNCGCCATGGCGGCCGCGGGAATCGATTGGTGGTCATATGTCGGGCA  
CGTGCGGCAACTGCGACTGCGCTGACAAGATCCANTGCACGAAGAANGGCGACAGCTATGGCGCCGTCGT  
AGTNAACACCCGAGAGCCGNGTGGANATCGTTGAGGAGGAGGTGACCGTGGCGGAGCAGCAGGGCTGCAAG  
TGCGGCACCAGCTGCTCCTGCGGCACCAGCTGCAGCTGCGGCAAGTGCGGAAGAGCAACCACCAATCACT  
AGTGAATNCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGAG  
TATCTATAGTGTACCTAAATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTAT  
CCGCTCACAATTCCACACAACATACGANCCGGAAGCATAAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGA  
GCTAACTCACATTAATTGCGTNGCGCTCACTGCCCCTTNCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCANNTGCA  
TNAATGANTCGGNCAANNCGCGGGGANANGCGGNTNGCGTATNGGGCGCTCTNCCGNTNCCTCGNTCACT  
GACTCNNTGNNTCGGNCNTNCGGNTGNNGNANCGGNATNANNTCANTCAAAGGNGGNAANACNGTNAT  
CACANAATCANGGANANNNNGAAAAANATNTGANCAAANGNCNNNAANGNCANAANNNNAAAAGGCNN  
NTGNNGNNTNNNCNAANGNCCNCCCNANANAANNNTNAAAAATNNNNTNANTNNAGNNNNAANCNNNNGN  
NAAAAAANCNNNNTTNCNNNANNNNNTNNNNNNTN