



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
NORTE
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA**

AMANDA LARISSA MARQUES DE MEDEIROS

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE GENES
EXPRESSOS EM ÁPICES MERISTEMÁTICOS DE CANA-DE-
AÇÚCAR CULTIVADOS EM SP E RN**

**NATAL – RN,
2010**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AMANDA LARISSA MARQUES DE MEDEIROS

**CARACTERIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE GENES
EXPRESSOS EM ÁPICES MERISTEMÁTICOS DE CANA-DE-
AÇÚCAR CULTIVADOS EM SP E RN**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Bioquímica da
Universidade Federal do Rio Grande
do Norte como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica.

Orientador: Kátia Castanho Scortecci

**NATAL
2010**

À Deus,
aos meus pais
e meus avós maternos (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço as professoras Lucymara Fassarela e Sílvia Batistuzzo, por permitirem a execução deste trabalho nas dependências do LBMG.

As professoras Marie-Anne Van Sluys e Márcia Vidal, pelo auxílio em alguns experimentos.

A professora Kátia, pela orientação e compreensão em alguns momentos difíceis desta caminhada.

A todos os colegas do grupo de genética de plantas do LBMG, pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos Delanne, Rita, Ralfo, Iza, Ana Helena, Fábio, Daniele, Fabrícia, Juliana e Thayse, além dos demais colegas de LBMG, pelas conversas nem sempre científicas, pelo apoio, por cada amizade conquistada.

Aos amigos Bruna, Daniele, Candice, Valter, Marcos André, Sângela, Ana Rafaela e Angélica, com quem pude contar sempre, estando perto ou longe. Meus maiores presentes, a família que escolhi ter.

A Marcelo, namorado e amigo, que me apóia e me ama. Juntamente com minha família sentiu minha falta em vários momentos durante este processo. Agora vemos que valeu a pena.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores, em especial ao meu pai que, mesmo sem imaginar, me fez despertar para o interesse científico ainda criança, quando comprou minha primeira revista Globo Ciência.

A Deus, que se mostrou presente em minha vida principalmente quando eu duvidei de que fosse conseguir.

*Toda a nossa ciência, comparada com a realidade,
é primitiva e infantil e, no entanto,
é a coisa mais preciosa que temos.*

Albert Einstein

RESUMO

A cana-de-açúcar é um modelo devido à sua importância na produção de álcool e açúcar. Diferente de outras plantas modelo, ela apresenta um genoma complexo e muita variação alélica. Foram analisadas as bibliotecas SAGE produzidas a partir de ápices meristemáticos de cana-de-açúcar de genótipos tardio e precoce, quanto ao florescimento, cultivados no estado de São Paulo. A expressão destes cDNAs prospectados foi analisada usando amostras de São Paulo e do Rio Grande do Norte. Estes resultados mostraram que os genes apresentavam expressão diferencial apenas para os genótipos cultivados em São Paulo. Entretanto, o cDNA CYP (Citocromo P450), foi escolhido para uma análise *in silico* e caracterização genética por ter sido identificado tanto nas bibliotecas SAGE como em bibliotecas subtrativas realizadas com genótipos cultivados no Rio Grande do Norte. Árvores filogenéticas mostraram a relação evolutiva entre as sequências. Além disso, dados de qRT-PCR para CYP51 mostram um possível papel indutor de floração nas condições do RN. Considerando os resultados apresentados, podemos inferir que o gene CYP51 pode ser utilizado como marcador molecular para o melhoramento clássico.

ABSTRACT

In this work, we used sugarcane as a model due to its importance for sugar and ethanol production. Unlike the current plant models, sugarcane presents a complex genetics and an enormous allelic variation. Here, we report the analysis of SAGE libraries produced using the shoot apical meristem from contrasted genotypes by flowering induction (non-flowering vs. early-flowering varieties) grown under São Paulo state conditions. The expression pattern was analyzed using samples from São Paulo (SP) and Rio Grande do Norte (RN) states. These results showed that cDNAs identified by SAGE libraries had differential expression only in São Paulo state samples. Furthermore, the cDNA identified CYP (Citochrome P450) was chosen for *in silico* and genome characterization because it was found in SAGE libraries and subtractive libraries from samples from RN. Phylogenetic trees showed the relationship for these sequences. Furthermore, the qRT-PCR for CYP showed a potential role as flowering inducer for RN samples considering different isophorms. Considering the results present here, it can be considered that CYP gene may be used as molecular marker.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Integração das vias de sinalização para floração em <i>Arabidopsis</i>	19
Figura 2 Arquitetura do ápice meristemático caulinar.....	22
Figura 3 Diagrama das interações entre os reguladores de identidade floral, do desenvolvimento dos órgãos florais e determinação meristemática.....	23
Figura 4 Desenho esquemático comparando os órgãos florais em monocotiledôneas e dicotiledôneas.....	24
Figura 5: Transição do meristema vegetativo para o floral durante o desenvolvimento do milho.....	25
Figura 5: Fotografia de colmo isoporizado de cana-de-açúcar.....	26
Figura 7: Proteínas da via fotoperiódica da floração.....	28
Figura 8: Fluxograma com os genótipos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real.....	31
Figura 9: Fluxograma com etapas executadas na análise <i>in silico</i>	33
Figura 10: Expressão gênica do genótipo precoce cultivado em SP.....	46
Figura 11: Padrão de expressão dos genótipos cultivados no Rio Grande do Norte.....	49
Figura 12: Árvore gênica da CYP51.....	55
Figura 13: Domínio funcional característico da proteína cyp51.....	56
Figura 14: Expressão gênica de CYP51 nos genótipos de cana-de-açúcar cultivadas no nordeste nos meses de julho, agosto, setembro, outubro, janeiro e fevereiro.....	60

Figura 15: Gráfico da expressão gênica de cyp no genótipo precoce de cana-de-açúcar para floração cultivada em São Paulo nos meses de fevereiro (vermelho), março (azul) e abril (amarelo).....60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Similaridade das proteínas codificadas pelas sequências utilizadas na árvore filogenética.....	56
Tabela 2: Resultados gerados pelo programa Rest para expressão do gene CYP51.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS / SIGLAS

AG AGAMOUS

AGL24 AGAMOUS LIKE 24

AP1 APETALLA1

AP3 APETALA3

AVR9 Avirulence factor 9

BLAST Conjunto de programas de alinhamentos de seqüências (do inglês, Basic Local Alignment Search Tool)

BRI BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1

CAL CAULIFLOWER

CDD Conserved Domain Database - Banco de domínios conservados do NCBI

cDNA DNA complementar

CLV CLAVATA

CLV3 CLAVATA3

CO CONSTANS

Conab Conselho Nacional de Abastecimento

CRY1 CRYPTOCHROME1

CRY2 CRYPTOCHROME 2

CT Threshold cycle

CTC Centro de Tecnologia Canavieira

CYP Citocromo P450

CZ Zona central

DNA Ácido desoxirribonucléico

DNase Desoxiribonuclease

dNTP Desoxinucleotídeo trifosfatado

DO Densidade óptica

EST Sequências diferencialmente expressas (do inglês, Expressed Sequence Tags)

FCA FLOWERING TIME CONTROL LOCUS A

FLC FLOWERING LOCUS C

FLD FLOWERING LOCUS D

PPF1 FLOWERING PROMOTING FACTOR 1

FRI FRIGIDA

FT FLOWERING LOCUS T

GA1 GIBERELINA 1

GI GIGANTEA

HMG Grupo de alta mobilidade (do inglês High Mobility Group)

IAC Instituto Agronômico de Campinas

LB Luria-Bertani

LD LUMINIDEPEDENS

LFY LEAFY

LP Primórdio foliar

MAF1 MADS AFFECTING FLOWERING 1

MAF2 MADS AFFECTING FLOWERING 2

NCBI National Center for Biotechnology Information

ORF Matriz de leitura aberta (do inglês, Open Reading Frame)

PCR Reação em cadeia da polimerase

PFT1 PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1

PHYA PHYTOCHROME A

PHYB PHYTOCHROME B

PI PISTILLATA

PIE1 PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1

PIF3 PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3

PZ Zona periférica

qRT-PCR Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa em tempo real

RAM Meristema apical radicular

RGA REPRESSOR DE GA1

RIDESA Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro

RN Rio Grande do Norte

RNA Ácido ribonucleotídeo

RNA_m RNA mensageiro

RNA_{se} Ribonuclease A

RPM Rotações por minuto

RR6 Response Regulator 6

RZ Zona medular

SAGE Análise serial de análise gênica (do inglês, Serial Analysis of Gene Expression)

SAM Meristema apical caulinar

SIAMIG Sindicato da Indústria de Fabricação do Alcool no Estado de Minas Gerais

SOC1 SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1

SOC SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS

SP SELF-PRUNING

SP São Paulo

SPY SPINDLY

SUCEST Genoma de ESTs de Cana-de-Açúcar (do inglês, *Sugarcane Expressed Sequence Tag*)

SVP SHORT VEGETATIVE PHASE

TFL TERMINAL FLOWER

TFL1 TERMINAL FLOWER 1

TFL2 TERMINAL FLOWER 2

VIN3 VERNALIZATION INSENSITIVE 3

VRN1 VERNALIZATION 1

VRN2 VERNALIZATION 2

WUS WUSCHEL

X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo

ZTL ZEITLUPE

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Cana-de-açúcar	16
1.2 Floração	17
1.2.1 Via fotoperiódica	19
1.2.2 Via de vernalização	20
1.2.3 Via autônoma	21
1.2.4 Via da giberelina	21
1.3 Transições no ápice meristemático	21
1.4 Floração em cana-de-açúcar	23
1.5 Produção de cana-de-açúcar	25
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Abordagem experimental	31
3.1.1 Análise da expressão gênica	31
3.1.2 Análise <i>in silico</i>	33
3.2 Coleta do material vegetal	34
3.3 Reagentes e equipamentos	34
3.4 Bactéria utilizada	35
3.5 Obtenção de bactérias competentes	35
3.6 Extração de RNA	35
3.7 Síntese do cDNA	36
3.8 Condições de PCR	37

3.8.1 Clonagem em vetor	37
3.9 Clonagem e transformação de bactérias competentes	37
3.10 Eletroforese em gel de agarose	38
3.11 Extração do DNA plasmidial em pequena escala	38
3.11.1 Protocolo padrão	38
3.13 Análise <i>in silico</i>	40
3.14 Análise da expressão dos genes através da metodologia de PCR em tempo real	41
3.15 Digestão enzimática	42
4. RESULTADOS	45
4.1. Análise de expressão dos cDNAs identificados nas bibliotecas de SAGE	
4.3. Análise <i>in silico</i>	51
4.4 Análise da expressão gênica	56
CYP	59
5.DISSCUSSÃO	63
6.CONCLUSÕES	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

1. Introdução

1.1 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma importante cultura tropical e tem sido utilizada como fonte para a produção de açúcar há centenas de anos, sendo cultivada em mais de 20 milhões de hectares nas regiões tropical e subtropical do mundo. Sua produção tem ganhado maior notoriedade devido à produção de outro derivado, o etanol, uma importante fonte energética renovável (revisado em MENOSSI *et al.*, 2008). No Brasil, esta planta é cultivada desde os primórdios da colonização, ocupando atualmente quase nove milhões de hectares em duas regiões que se encontram separadas pelo regime de chuvas: Centro-Sul e Norte-Nordeste (Fonte: Conab, 2008).

O Brasil contribui com 45% da produção mundial de cana-de-açúcar (Fonte: Guia da Cana-de-açúcar, 2009), sendo a região nordeste responsável por apenas cerca de 12% da produção nacional (Fonte: Conab, 2008). Estima-se que o Brasil processará 654 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra 2010/2011, sendo a região Centro-Sul responsável pela obtenção de 590 milhões de toneladas e a região nordeste por 64 milhões de toneladas (Fonte: SIAMIG, 2010).

A região nordeste apresenta vários fatores atualmente que podem ser considerados como limitantes para a cultura da cana-de-açúcar em específico: fotoperíodos longos de 12 horas, baixo índice pluviométrico, alta evapotranspiração, altas temperaturas e solo de granulometria arenosa. Além disso, a alta evaporação da água nas regiões irrigadas acarreta uma grande concentração de sais no solo, acabando por agravar ainda mais as condições para a implementação de uma agricultura empresarial.

O gênero da cana-de-açúcar, *Saccharum*, é complexo e caracterizado por apresentar uma alta poliploidia. O genoma dos cultivares modernos correspondem a híbridos que apresentam de 70 a 120 cromossomos e são derivados essencialmente de hibridizações envolvendo *Saccharum officinarum* com *Saccharum spontaneum* (CONTESOTTO *et al.*, 2001). A maioria dos cromossomos se originaram da *S. officinarum*, enquanto de 10% a 25% foram herdados da *S. spontaneum* (D'HONT, 1996).

Diante da grande importância da cana-de-açúcar, tem sido realizado ao longo de várias décadas seu melhoramento genético clássico, apesar da sua complexidade genética. No Brasil, três grandes programas de melhoramento têm sido realizados: o da Rede Interuniversitária de Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA), o do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e o programa do Instituto Agrônomo de Campinas (IAC). As variedades obtidas nestes projetos de melhoramento respondem por quase todas as variedades de cana-de-açúcar utilizadas na obtenção de açúcar e etanol no país (Fonte: Guia da Cana de Açúcar, 2009).

É interessante para programas de melhoramento que o genoma da cana-de-açúcar seja completamente seqüenciado, mas estes dados ainda não encontram-se disponíveis (revisado em MENOSSI *et al.*, 2008). Avanços significativos no estudo do genoma da cana ocorreram em 2001, com a conclusão do Projeto Genoma de Seqüenciamento de ESTs da Cana-de-açúcar (SUCEST - *Sugarcane Expressed Sequence Tag*). Com este projeto, foram geradas 26 bibliotecas de ESTs e 43.141 clusters, estimando-se mais de 30.000 genes (VETTORE *et al.*, 2001; VETTORE *et al.*, 2003; TELLES *et al.*, 2001). Entretanto, estas bibliotecas foram geradas utilizando apenas as espécies cultivadas na região sudeste. Com isto, em 2005 foi realizado em nosso laboratório uma análise transcriptômica utilizando bibliotecas subtrativas com o intuito de identificar cDNAs que estejam associados ao processo de florescimento ou de seqüências expressas no ápice meristemático em algumas das variedades cultivadas na região nordeste (FURTADO, 2007).

1.2 Floração

O ciclo de vida das plantas é sincronizado com as mudanças que ocorrem no meio em que vivem. Por serem organismos sésseis, este monitoramento é essencial para que a floração e produção de sementes ocorram em condições ideais e, conseqüentemente, o sucesso reprodutivo seja garantido (revisado em IAZUMI e KAY, 2006 e GREENUP *et al.*, 2009).

Apesar de muitos avanços terem sido alcançados ultimamente, na direção da elucidação das vias responsáveis pelo controle da floração em *Arabidopsis*, os estudos sobre floração começaram há mais de um século atrás. O primeiro pesquisador a postular a existência de substâncias que induziam a formação

de flores foi Julius Sachs em 1865, mas evidências mais convincentes foram levantadas por Garner e Allard que, em 1920, introduziram o termo fotoperiodismo. Em 1934, Knott descobriu que o fotoperiodismo era percebido pelas folhas e que a formação das flores ocorria no meristema apical. Esses estudos mostraram que havia uma sinalização a longa distância da folha induzida até o ápice meristemático caulinar (SAM – shoot apical meristem). Mais tarde, foi mostrado que esses sinais também podem ser transmitidos de uma planta doadora em floração, via enxerto, para uma planta receptora que não estivesse competente para florescer. Chailakhyan, em 1936, introduziu o termo “florigeno” para esse estímulo, que ele definiu como um hormônio floral, que exerceria uma função regulatória para a floração.

Depois de vários esforços realizados na tentativa de se isolar o florigeno, e não havendo sucesso em nenhum desses estudos, este hormônio permaneceu apenas como um conceito fisiológico ao invés de uma substância química definida (revisado em ZEEVART, 2006 e IAZUMI e KAY, 2006). Em estudos recentes, tem sido atribuído que o florigeno, na verdade, corresponderia à proteína FT que é translocada da folha para o meristema apical (ABE *et al.*, 2005 e WIGGE, *et al.*, 2005).

BLÁZQUEZ *et al.* (2006) sugeriram que, para a formação das flores, ocorre a associação simultânea de vários programas de desenvolvimento: percepção do estímulo floral, competência desse ápice meristemático para a produção das flores, a especificação da posição para a nova flor, o estabelecimento da simetria e polaridade das estruturas que estão se desenvolvendo, o controle da divisão celular determinando o tamanho da flor e o número dos órgãos florais e o programa que determina a identidade da flor.

Quando as plantas são estimuladas a florescer, o meristema apical vegetativo é transformado em meristema de inflorescência, que posteriormente originará o meristema floral, de onde se formam todos os órgãos florais (revisado em LIU; THONG e YU, 2009). Em algumas plantas, essa transição ocorre diretamente de meristema vegetativo para meristema floral (COLASANTI e SUNDARESANT, 1996). Com o intuito de investigar porque algumas plantas floresciam em determinadas condições, estudos com abordagens fisiológica, bioquímica e genético-molecular foram realizados tendo como alvo, principalmente, a planta modelo *Arabidopsis thaliana*. Estes estudos

levaram a identificação de quatro vias: fotoperiódica, vernalização, autônoma e giberelina (revisado em IAZUMI e KAY, 2006). A figura 1 mostra a integração dessas vias de sinalização no modelo *Arabidopsis*. As vias fotoperiódica e de vernalização são ativadas em resposta a sinais ambientais, tais como luz e temperatura, enquanto as vias autônoma e de giberelina são ativadas por sinais endógenos, relacionados principalmente ao desenvolvimento da planta (MOON *et al.*, 2005).

Figura 1 – Integração das vias de sinalização para floração em *Arabidopsis* (modificado de BERNIER e PÉRILLEUX, 2005). Os fatores ambientais envolvidos em cada uma das vias são mostrados no topo da figura em negrito. VIN3 = VERNALIZATION INSENSITIVE 3; FRI = FRIGIDA; PIE1 = PHOTOPERIOD-INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1; VRN1 = VERNALIZATION 1; VRN2 = VERNALIZATION 2; MAF1 = MADS AFFECTING FLOWERING 1; MAF2 = MADS AFFECTING FLOWERING 2; AGL24 = AGAMOUS LIKE 24; FCA = FLOWERING TIME CONTROL LOCUS A; LD = LUMINIDEPEDENS; FLD = FLOWERING LOCUS D; SVP = SHORT VEGETATIVE PHASE; SOC1 = SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1; LFY = LEAFY; AP1 = APETALLA1; TFL1 = TERMINAL FLOWER 1; GI = GIGANTEA; CO = CONSTANS; FT = FLOWERING LOCUS T; TFL2 = TERMINAL FLOWER 2; GA1 = GIBERELINA 1; RGA = REPRESSOR DE GA1; FPF1 =

FLOWERING PROMOTING FACTOR 1; PHYB = PHYTOCHROME B; CRY2 = CRYPTOCHROME 2; PHYA = PHYTOCHROME A; SPY = SPINDLY.

1.2.1 Via fotoperiódica

No modelo de *Arabidopsis* foram identificados alguns genes requeridos para a resposta ao comprimento do dia. Tem sido verificado que alguns deles codificam proteínas regulatórias especificamente envolvidas na regulação da floração, enquanto outros codificam componentes das vias de transdução do sinal da luz ou estão envolvidos com o ritmo circadiano (MOURADOV *et al.*, 2002). Tem sido colocado que o gene chave para a resposta ao fotoperíodo é o *CONSTANS* (*CO*). Este gene codifica um ativador que induz a expressão do integrador floral *FLOWERING LOCUS T* (*FT*). A proteína FT produzida nas folhas é translocada para o SAM e lá interage com a proteína FD de modo a ativar os genes que promovem as mudanças associadas com o desenvolvimento floral, como o gene *APETALLA1* (*AP1*; revisado em GREENUP *et al.*, 2009).

Bernier e Périlleux (2005) descrevem que a luz seria percebida por fotorreceptores presentes nas folhas (como fitocromos, criptocromos e fototropina), e com isso sinais seriam translocados para o ápice meristemático caulinar onde estimulam a transição do ápice meristemático de vegetativo para floral. No modelo vegetal *A. thaliana* foi caracterizado, até o momento, pelo menos nove receptores fotosensíveis, que atuam na regulação de muitas de suas respostas a luz (SCHEPENS *et al.*, 2004).

1.2.2 Via de vernalização

Algumas plantas não iniciam a floração até que sejam expostas a períodos prolongados de frio, condição conhecida como vernalização (revisado em AMASINO, 2005). No modelo *Arabidopsis*, o requerimento à vernalização é conferido pelo gene *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), que é regulado pelo gene *FRIGIDA* (*FRI*). A proteína FRI age mantendo os níveis de transcrição do gene *FLC* suficientes para efetivamente reprimir a floração antes da vernalização. O mecanismo epigenético de repressão do gene *FLC* durante a vernalização tem sido bastante estudado e observa-se que a vernalização induz a expressão do gene *VERNALIZATION INSENSITIVE 3* (*VIN3*). Quando há quantidade suficiente de proteína VIN3, a vernalização é transduzida em modificações da

cromatina no locus do gene *FLC*. Também tem sido visto que o gene *VERNALIZATION 2 (VRN2)* é necessário para a manutenção do silenciamento encontrado de *FLC* pela vernalização (revisado em ALEXANDRE e HENNING, 2008). Durante o inverno, a cromatina passa de um estado ativo (eucromatina) para um estado de heterocromatina. Esta mudança na estrutura da cromatina está associada ao nível de modificações que ocorrem nas histonas, como redução na acetilação da histona H3, característica de cromatina ativa, e aumento da metilação da lisina 9 na histona 3, característica de cromatina inativa (SUNG e AMASINO, 2004). *A vernalização age juntamente com uma via autônoma, associação de genes com fatores internos atuando como promotores ou inibidores da indução floral.*

1.2.3 Via autônoma

A via autônoma foi identificada em um grupo de mutantes que apresentavam floração tardia independente do fotoperíodos que eram expostos, e eram altamente responsivos à vernalização (MARTINEZ-ZAPATER e SOMERVILLE, 1990; KOORNEEF *et al.*, 1991). SIMPSON e DEAN (2004) propõem que os componentes da via autônoma exibem um padrão geral de expressão que se destaca em locais de ativação proliferativa celular, e compondo tal via estão os genes *FCA* (QUESADA *et al.*, 2003), *FPA* (SCHOMBURG *et al.*, 2001), *FVE* (KIM *et al.*, 2004), *FLOWERING LOCUS D (FLD)* (HE *et al.*, 2003), *LUMINIDEPENDENS (LD)* (AUKERMAN *et al.*, 1999) e *FY* (HENDERSON *et al.*, 2005), que promovem a floração pela ativação de *FT*.

1.2.4 Via da giberelina

A via da giberelina também promove a floração e isso foi inicialmente mostrado por aplicações exógenas desse hormônio, além de mutações que interrompem a síntese de giberelina ou sua sinalização (WILSON *et al.*, 1992). RICHARDS *et al.* (2001) também confirmaram o papel da giberelina na transição floral, percebendo que o tempo de floração voltava ao normal após a aplicação desse hormônio vegetal em mutantes com floração tardia, entretanto até o momento não se conhece muito seus componentes. As giberelinas promovem a floração em *Arabidopsis* através da ativação dos genes *SOC1*, *LFY* e *FT* (revisado em MUTASA-GOTTGENS e HEDDEN, 2009)

1.3 Transições no ápice meristemático

As plantas se desenvolvem a partir de populações de células indiferenciadas, denominadas de células tronco, que dão origem a todos os órgãos da planta (revisado em MCSTEEN; LAUDENCIA-CHINGCUANCO e COLASSANTI, 2000). As células tronco vegetais são confinadas em determinadas regiões chamadas de meristemas, que persistem após o desenvolvimento embrionário. Este termo foi primeiramente usado por Carl Wilhelm von Nägeli, derivado do termo grego *merizein*, dividir. Nos meristemas vegetais dois processos opostos ocorrem; a auto-renovação das células tronco, essencial para manter sua população, e o recrutamento das células para a formação dos órgãos. Isso demonstra que a produção de novas células tronco e a perda delas devido à organogênese deve ser balanceada (revisado em DODSWORTH, 2009).

Existem dois meristemas apicais, o meristema apical de raiz (RAM – *root apical meristem*) e o meristema apical caulinar (SAM – *shoot apical meristem*), que são responsáveis por quase todo o crescimento pós-embrionário da planta. Pesquisas no modelo *Arabidopsis* têm permitido um maior entendimento de como os meristemas são formados e mantidos. O SAM em *Arabidopsis* apresenta-se anatomicamente dividido em camadas celulares e zonas (Figura 2). As três camadas (L1-L3) são: L1 é a camada mais externa e eventualmente origina a epiderme; L2 dá origem às células do mesófilo e L3 forma os tecidos centrais da folha e caule (revisado em DODSWORTH, 2009).

As três zonas histologicamente distintas são justapostas nas camadas celulares: a zona central (CZ) que contém as células pluripotentes, a multipotente periférica (PZ), onde a diferenciação em órgãos laterais começa e a medular (RZ), que mantêm as células multipotentes para o caule em diferenciação (Figura 3).

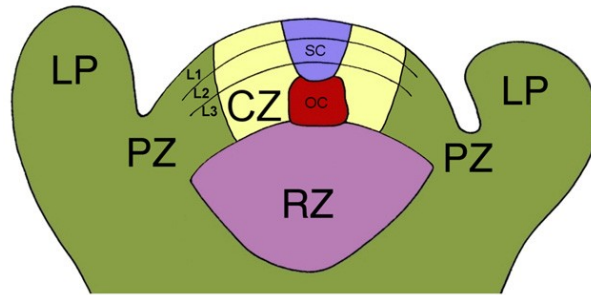


Figura 2: Arquitetura do ápice meristemático caulinar. Zona central (CZ), zona periférica (PZ), zona medular (RZ), células tronco (SC), centro de organização (OC), e primórdio foliar (LP) estão indicados. L1-3 são as camadas celulares. (retirado de DODSWORTH, 2009)

Em 1996, LAUX *et al.* demonstraram que o gene *WUSCHEL* (*WUS*) é essencial para a manutenção do SAM. Este gene é expresso na camada L3 e nas mais profundas, região conhecida como centro de organização. A regulação desse gene é realizada por uma série de genes, mas o mais notável é o *CLAVATA* (*CLV*). O sinal produzido pelas células expressando *WUS* no centro de organização estimula a expressão de *CLAVATA3* (*CLV3*). Este, por sua vez, atua reprimindo a expressão de *WUS*, funcionando então como um regulador negativo (revisado em DODSWORTH, 2009). Na figura 3 temos um diagrama da influência do gene *WUS* na via de organogênese floral. Juntamente com o *LEAFY* (*LFY*) o *WUS* ativa o *AG*, que juntamente com o *PI* (*PISTILATA*), *AP1/CAL* (*CAULIFLOWER*) E *AP3* (*APETALA3*) participam da organogênese floral. O gene *WUS* participa mantendo células meristemáticas para a produção das flores.

Figura 3: Diagrama das interações entre os reguladores de identidade floral, do desenvolvimento dos órgãos florais e determinação meristemática. Ativação é representada por seta e inibição por uma linha. A repressão que existe entre *AG* e *WUS* é indireta, por isso a linha é tracejada (modificado de SABLÓWSKI, 2007). FT = FLOWERING LOCUS T; TFL = TERMINAL FLOWER; AP1 = APETALLA1; CAL = CAULIFLOWER; LFY = LEAFY; AP3 = APETALA3; PI = PISTILLATA; AG = AGAMOUS; WUS = WUSCHEL.

1.4 Floração em cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar pertence a uma família de gramíneas (*Poaceae*) muito importante economicamente, pois fazem parte dela cereais como milho, arroz, trigo e sorgo (EWING *et al.*, 1998). As gramíneas pertencem à subclasse das monocotiledôneas onde as flores estão modificadas para serem polinizadas pelo vento. Como em outras flores de gramíneas, as flores de cana-de-açúcar formam espículas, onde cada uma é formada por um par de glumas (brácteas modificadas). Apesar da diferença na formação das estruturas florais, os estudos morfológicos têm mostrado que esta organização é similar à formação da flor das dicotiledôneas (Figura 4). As dicotiledôneas apresentam na flor quatro órgãos florais: sépalas, pétalas, estames e carpelos, enquanto as monocotiledôneas apresentam pálea, lodícula (estruturas análogas a sépalas e

pétalas, respectivamente), estames e carpelo (revisado em McSTEEN; LAUDENCIA-CHINGCUANCO e COLASSANTI, 2000).

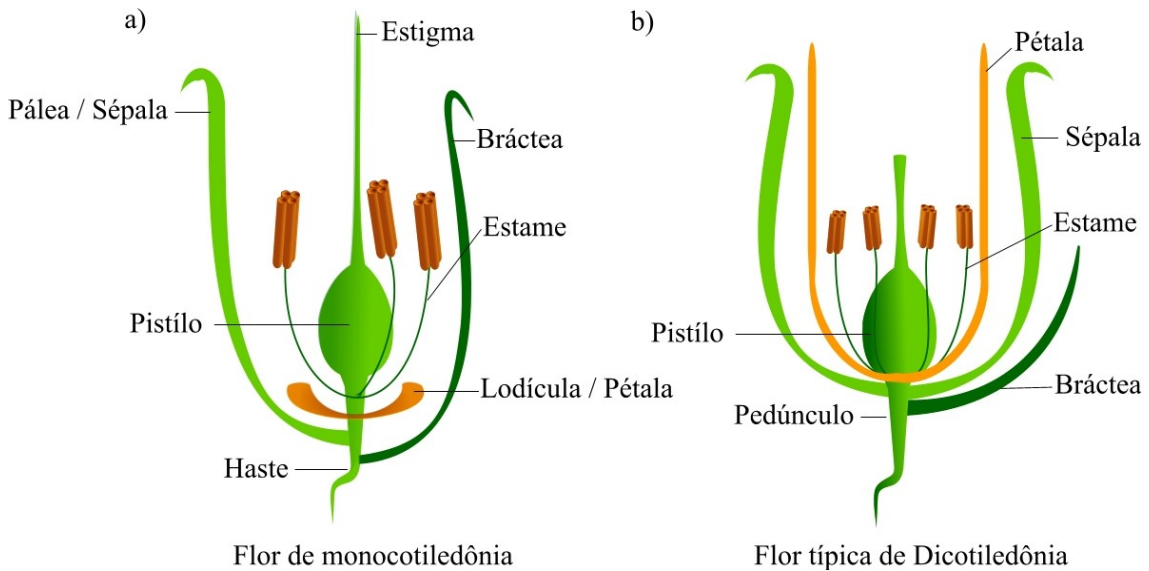


Figura 4: Desenho esquemático comparando os órgãos florais em monocotiledôneas e dicotiledôneas. (a) A flor é composta por bráctea, pálea, lodículas e órgãos reprodutivos, como estame e pistilo. (b) Uma típica flor de dicotiledônia é formada pelos quatro órgãos: pétala, sépala, estame e pistilo. Os órgãos de cada flor com cor similar indicam estruturas análogas. A pálea e a lodícula são equivalentes à sépala e pétala, respectivamente (modificado de McSTEEN; LAUDENCIA- CHINGCUANCO e COLASSANTI, 2000).

Em cana-de-açúcar, assim como no milho, para a conversão do meristema apical vegetativo para o floral, são necessários que ocorram a transição de meristema vegetativo para meristema da inflorescência (Figura 5), e em seguida suas células se diferenciam para formar os órgãos florais de cada flor dentro da inflorescência (McSTEEN; LAUDENCIA- CHINGCUANCO e COLASSANTI, 2000). Alguns genes descritos previamente em *A. thaliana* como responsáveis pelo florescimento, já foram identificados em cana-de-açúcar. Segundo DORNELAS e RODRIGUEZ (2001), no projeto SUCEST foram identificados cerca de 21 genes da família *MADS*. E tanto nas

dicotiledôneas como *A. thaliana*, como nas monocotiledôneas, este grupo se caracteriza por executar funções biológicas distintas, controlando as etapas da conversão do meristema vegetativo para o meristema floral (TEISSEN, 2001).

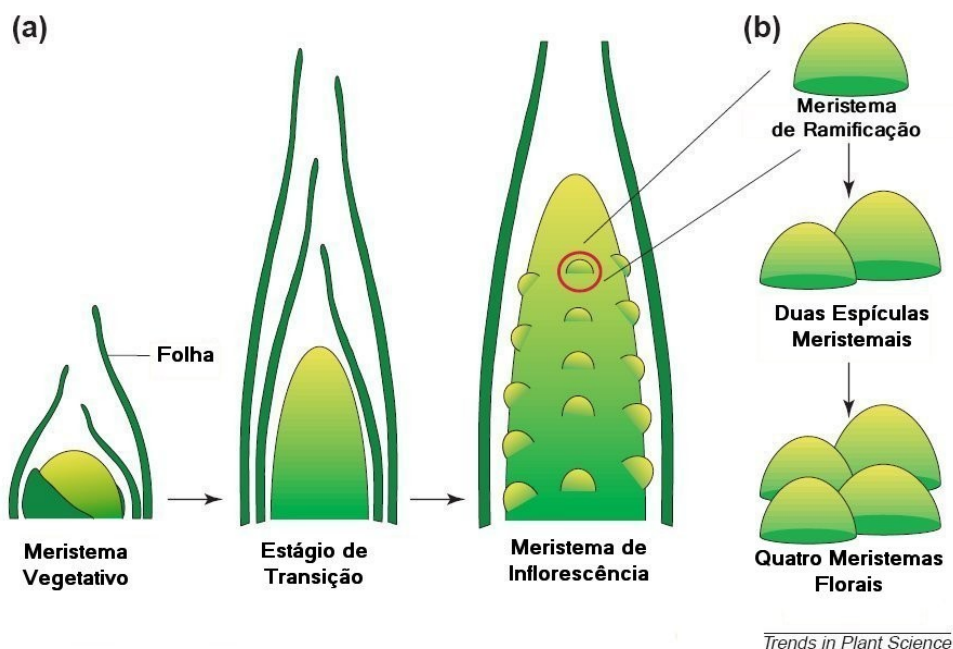


Figura 5: Transição do meristema vegetativo para o floral durante o desenvolvimento do milho. (a) Transição do meristema vegetativo para o meristema da inflorescência. (b) Produção de três tipos de meristema axial a partir da inflorescência. Cada meristema de ramificação produz duas espículas meristemais, que originam o meristema floral (modificado de McSTEEN; LAUDENCIA-CHINGCUANCO e COLASSANTI, 2000).

1.5 Produção de cana-de-açúcar

No estado do Rio Grande do Norte tem sido observado que pode ocorrer uma redução na produtividade de até cerca de 40% quando comparada com a obtida na região sudeste (Fonte: Conab, 2006). Entre as razões para esse fenômeno, temos o problema da redução do índice pluviométrico, que causa o estresse hídrico, e o conseqüente florescimento precoce que promove a isoporização dos colmos (Figura 6; Jadson Batista da Silva, técnico agrícola da Usina Estivas, Goianinha-RN, comunicação pessoal). O florescimento da planta é considerado o último estágio de desenvolvimento, com isso a planta entra num estágio de senescência, conseqüentemente, a sacarose que estava armazenada nos colmos é drenada para as flores e a isoporização, caracterizada pelo secamento do interior do colmo, está relacionada com este

fenômeno. A diminuição da produção do caldo da cana-de-açúcar é o principal fator que o florescimento interfere (revisado por Caputo *et al.*, 2007).



Figura 6: Fotografia de colmo isoporizado de cana-de-açúcar. Nota-se a diferença entre a parte do colmo que ainda não sofreu a isoporização (verde), com a mais clara, já isoporizada.

No projeto SUCEST foram realizadas o transcriptoma de apenas quatro bibliotecas relacionadas à floração e com plantas cultivadas na região Sudeste do Brasil. Provavelmente existem muitos genes a serem identificados na via de sinalização da indução floral para as variedades cultivadas nas regiões norte-nordeste. No trabalho realizado por FURTADO (2007) foram prospectados vários cDNAs que se encontraram diferencialmente expressos em bibliotecas subtrativas utilizando genótipos cultivados na região Nordeste e que apresentam floração precoce e que nunca florescem. Dentro dos cDNAs prospectados está a família gênica *CYP51*.

Apesar do florescimento precoce em cana-de-açúcar ser bastante marcante em alguns genótipos cultivados no Estado, este fenômeno também ocorre em genótipos cultivados em São Paulo. Apesar deste fenômeno não afetar a produtividade da cana-de-açúcar em SP de forma tão pronunciada como no RN, também se tornou interesse de pesquisadores investigar quais genes poderiam estar atuando nas vias de sinalização de floração durante este processo. Através de bibliotecas SAGE, vários cDNAs foram prospectados como possivelmente relacionados com o florescimento precoce nos genótipos cultivados em São Paulo. Entre eles está a *CYP51*. Como este cDNA foi prospectado tanto nas bibliotecas subtrativas quanto nas bibliotecas SAGE, ele foi escolhido para uma análise genética mais aprofundada, comparando sua

expressão em dois genótipos (de floração precoce e tardia) cultivados em São Paulo e no Rio Grande do Norte.

O gene *CYP51* faz parte de um dos clans pertencentes à superfamília dos citocromos P450, sendo um dos genes mais conservados entre bactérias, animais, vegetais e fungos (DEBELJAK *et al.*, 2003). Esta superfamília (CYP) consiste de mais de 2500 membros distribuídos em 281 famílias. As proteínas Citocromo P450 podem ser divididas em dois grupos de acordo com sua função, aquelas que metabolizam xenobióticos (drogas, poluentes) e aquelas que participam de vias de biosíntese como na biosíntese de esterol e vitamina D (revisado em LEPESHEVA e WATERMAN, 2004).

Também conhecido como esterol 14 α -demetilase, a proteína CYP51 cataliza a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil do lanosterol e 24-metileno-24,25-diidrolanosterol em leveduras e fungos, obtusifoliol em plantas e 24,25-diidrolanosterol em mamíferos. Essa etapa é considerada crucial para a síntese dos esteróides nesses organismos (LAMB, KELLY e KELLY, 1998). O'BRIEN *et al.* (2005), a partir de estudos com *Solanum chacoense*, observaram que a proteína CYP51 se acumula em tecidos de crescimento rápido e células meristemáticas. Isso pode ser um ponto de ligação entre o gene *CYP51* e a transição para a floração.

2. Objetivos:

2.1 Objetivo geral

Prospectar genes expressos no ápice meristemático de cana-de-açúcar dos genótipos precoce e tardio cultivados nos estados do RN e SP.

2.2 Objetivos específicos

Validar alguns clones da biblioteca de SAGE por qRT-PCR;

Aprofundar a caracterização do gene *CYP51* através das seguintes abordagens:

- ✓ Análise *in silico* das sequências;
- ✓ Análise da expressão em oito meses do desenvolvimento em dois genótipos contrastantes fenotipicamente.

3. Materiais e métodos:

3.1 Abordagem experimental

Para o melhor entendimento das etapas necessárias para a execução deste trabalho, apresenta-se na figura 8 o fluxograma com as etapas para a realização dos experimentos de qRT-PCR. Na figura 9, apresenta-se o fluxograma com as etapas realizadas para a análise *in silico*.

3.1.1 Análise da expressão gênica

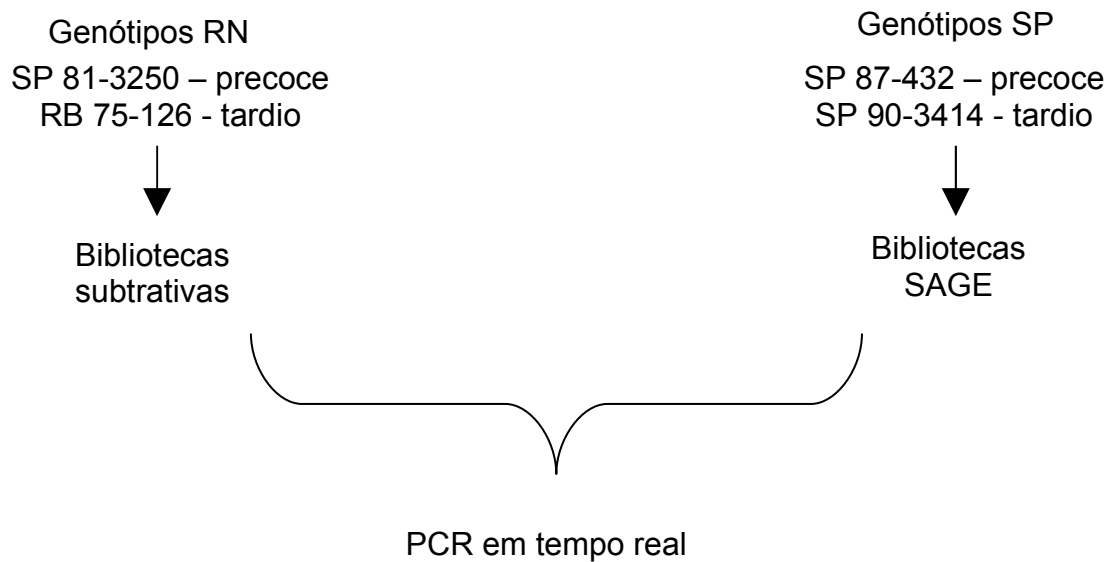


Figura 8: Fluxograma com os genótipos utilizados nos experimentos de PCR em tempo real

3.1.2 Análise *in silico*



Figura 9: Fluxograma com etapas executadas na análise *in silico*.

3.2 Coleta do material vegetal

Palmitos das plantas de cana-de-açúcar das variedades com floração precoce e tardia foram coletados durante o período de julho de 2008 a fevereiro de 2009 nos campos da Usina Estivas no estado do Rio Grande do Norte. Os ápices meristemáticos caulinares foram isolados em laboratório e, imediatamente, congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C para posterior extração de RNA total.

3.3 Reagentes e equipamentos

Os reagentes utilizados no preparo de meios de cultura e soluções foram provenientes da Synth, USB e Sigma, com exceção do Circle-Grow da MP Biomedicals. As endonucleases de restrição utilizadas foram da Fermentas, Neb Biolabs e Promega. Os primers utilizados nas reações de PCR foram adquiridos da IDT.

Foram empregados também a ribonuclease A da Fisher; ET mix, para reação de extensão para sequenciamento, da GE; vetor pGEM-TEasy da Promega; DNA ligase da Neb Biolabs; X-gal da Calbiochem; Turbo DNase da Ambion; DEPC da Amresco; TRI Reagent da Ambion; kit para síntese de cDNA e Syber Green PCR Master Mix da Applied Biosystems.

Os seguintes equipamentos foram utilizados neste trabalho: agitador de tubos Vortex-Genie 2 da Scientific Industries; agitador para incubação a 37 °C TE-421 e agitador para incubação a 30 °C TE-420 da Tecnal; centrífuga eppendorff 5804 R e termociclador Mastercycler pro S da Eppendorf; centrífuga para microtubos de 1,5 mL Z 233 MK-2 da Hermle; freezer -80 °C da Revco; espectrofotômetro Libra S12 da Biochrom; eletroporador Cellject Uno da Hybaid, sistema de fotodocumentação L-Pix Chemi da Loccus Biotenologia e NanoVue Plus da GE.

Os materiais de consumo utilizados foram dos seguintes fabricantes: microtubos de 200 µL e ponteiras da Sarstedt; tubos cônicos da TPP; microtubos de 1,5 mL e ponteiras com filtro da Axygen, placas para PCR em tempo real, filmes adesivos para estas placas e StepOne Real-Time PCR System da Applied Biosystems; filtro para produção de água ultrapura da Millipore; membrana para Southern blot Hybond XL da Amersham e placas com filtro Millipore da Sartorius – Minisart.

3.4 Bactéria utilizada

A cepa de *Escherichia coli* DH10B – genótipo F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80d lacZ Δ MIS Δ lacX74 endA1recA1 deoR Δ (ara,leu) 7697 araD139 galU galK nupG rpsL - foi utilizada nos experimentos de transformação genética para produzir os plasmídeos recombinantes. Os meios utilizados para cultivo da *E.coli* foram: meio LB sólido e líquido (Luria-Bertani; Sambrook e Russel, 2001) e meio Circle-Grow.

3.5 Obtenção de bactérias competentes

Para obtenção de bactérias competentes, que foram posteriormente utilizadas nos experimentos de transformação genética, inicialmente foi feito um pré-inóculo de uma colônia de DH10B em 5 mL de meio LB líquido, que foi mantido a 37 °C em agitação durante 18 horas em 180 rpm. Posteriormente, essa cultura foi transferida para um *erlenmeyer* de dois litros contendo 250 mL de meio LB e mantida sob as mesmas condições, por 2 horas. Após este tempo, foi medida a densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,8 em espectrofotômetro. A cultura foi distribuída em 5 tubos cônicos de 50 mL previamente gelados, cada um contendo o volume de 45 mL da cultura. Os tubos foram mantidos em gelo por 15 minutos e, posteriormente, centrifugados. Todas as centrifugações deste protocolo ocorreram na seguinte condição: 5.500 g, 4°C e 15 min. A água utilizada para ressuspender as células sedimentadas durante a centrifugação era ultrapura estéril gelada.

Depois da primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células bacterianas foram ressuspensas em 45 mL de água para cada tubo e os tubos foram novamente centrifugados. Em seguida, as células foram ressuspensas em 25 mL de água. Depois de mais uma centrifugação dos tubos, as células foram ressuspensas em 1 mL de glicerol 10% gelado para cada tubo. Após a última centrifugação este tubo foi ressuspensado em 750 μ L de glicerol 10% gelado. Em seguida este volume foi alíquotado 55 μ L em microtubos de 1,5 mL previamente gelados. Essas bactérias competentes permaneceram armazenadas em freezer -80°C até o momento do uso.

3.6 Extração do RNA:

Para realizar a síntese de cDNA que foi utilizado nos experimentos de clonagem e qRT-PCR, fez-se necessário a extração de RNA total dos meristemas apicais caulinares dos genótipos utilizados. Para isso, as amostras foram maceradas em nitrogênio líquido. O tecido triturado foi transferido para um tubo cônico de 15 mL e imediatamente foi adicionado 1 mL de TRI reagente para cada 100-150 mg de amostra. Após a homogeneização, o material foi novamente congelado em nitrogênio líquido, descongelado e mantido a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi adicionado em cada tubo 200 µL de clorofórmio para cada 1 mL de TRI reagente adicionado e estes tubos foram agitados por 15 segundos em um agitador de tubos. O material foi mantido em temperatura ambiente por 10 minutos. Após este período, os tubos foram centrifugados por 15 min a 5.500 g e 4°C. Logo após, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foram acrescentados 500 µL de isopropanol para cada 1 mL de TRI reagente e mantidos por 18 horas a -20 °C. O material foi então centrifugado a 5.500 g, 15 min a 4 °C. O precipitado formado foi lavado com 200 µL de etanol 70% por duas vezes, seco em temperatura ambiente e depois ressuspendido com 100 µL de água ultrapura tratada com 0,1% DEPC. Este material foi armazenado em freezer -80 °C.

A qualidade do RNA total extraído foi verificada por meio de uma eletroforese em gel de agarose e também através de quantificação por espectrofotometria no aparelho NanoVue.

3.7 Síntese do cDNA

Com o RNA total extraído das amostras dos genótipos estudados, foi realizado o tratamento com DNase seguindo as recomendações do fabricante e foi adicionado RNaseInhibitor (Invitrogen). Este material tratado foi testado quanto a contaminação existente de DNA no aparelho de PCR em tempo real. Após ter sido confirmado a não contaminação de DNA nas amostras, o cDNA foi sintetizado utilizando 3 µg de RNA total, referente a cada amostra, utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, de acordo com instruções do fabricante. Depois de sintetizado, foi adicionado 180µl de água tratada com DEPC 0,1%.

A eficiência da síntese do cDNA foi avaliada através de ampliações em PCR em tempo real com o gene constitutivo EF1α: EF1αT1 (forward e reverse)

para amplificar a porção 5' do transcrito e EF1 α T2 para amplificar a porção 3' do fragmento (Tabela 1). Com isso se tem acesso à amplificação nas duas regiões do cDNA e a qualidade da síntese de cDNA pode ser avaliada. Apenas nos cDNAs cujos valores de Δ Ct foram ≤ 3 foram usados, pois este valor indica uma boa transcrição reversa (CZECHOWSKI *et al.*, 2004).

3.8 Condições de PCR

3.8.1 Clonagem em vetor

Para clonagem de sequências específicas para sequenciamento, as amplificações através da metodologia de PCR ocorreram nas seguintes condições: *mix* com tampão de reação de PCR 1X; 2,5 mM de MgCl₂; 0,4 mM de dNTPs; 5U Taq Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura estéril até o volume de 50 μ L. Em seguida, foi adicionado a cada reação 20 pmol de primer, e 50 ng de cDNA. O perfil de termociclagem consistiu em 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos subdivididos em 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 53°C, 2 minutos a 72°C e uma extensão final de 1 ciclo de 5 minutos a 72°C.

3.8.2 Seqüenciamento automático

Na amplificação realizada para posterior sequenciamento, foi montada uma reação de PCR em placas de 96 poços utilizando 200-300 ng de DNA plasmidial, 4 μ L de E.T mix, 3,2 μ M do *primer* T7 ou SP6 e água ultrapura para completar o volume final de 10 μ L. As reações de PCR utilizaram o seguinte perfil de termociclagem: 1 ciclo de 95 °C durante 2 segundos, seguido de 30 ciclos subdivididos em 95 °C por 20 segundos, 45 °C por 15 segundos e 60 °C durante 1 minuto.

3.9 Clonagem e transformação de bactérias competentes

Para clonagem dos amplicons que foram utilizadas no sequenciamento, os produtos da amplificação por PCR foram ligados ao vetor plasmidial pGEM T-easy. Para a reação de ligação foram utilizados 50-100 ng do cDNA amplificado, 20 U unidades de ligase, 1 X tampão de ligação, 12,5 ng do vetor e água ultrapura estéril para completar um volume final de 20 μ L. As ligações foram incubadas em 16°C por cerca de 16 horas.

O produto da ligação foi precipitado com 2 μL de glicogênio (20 mg/mL), 1/10 v de NaOAc (3 M pH 5,2) e 2 v de etanol 100 %, ficando incubado por uma hora a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Logo após, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 18.900 g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 100 μL de etanol 70 %, centrifugado por 5 minutos, seco a temperatura ambiente e ressuspendido em 12 μL de água ultrapura.

Após a precipitação, 2 μL da reação de ligação foram utilizadas na transformação de 55 μL de bactérias competentes de *E. coli* por eletroporação. O eletroporador foi ajustado a 200 Ω e 1,8 kv. Logo após a corrente elétrica ser acionada, a cubeta foi removida e as bactérias, imediatamente, ressuspendidas em 1 mL de meio LB e incubadas por 1 hora a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de Petri de 15 cm contendo meio LB sólido suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina e 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de solução de X-gal. As placas foram incubadas a 37°C por cerca de 16 horas. As colônias brancas foram selecionadas para realização de extração de DNA plasmidial e digestão enzimática com o intuito de verificar a obtenção de clones positivos.

3.10 Eletroforese em gel de agarose

Para separação de fragmentos provenientes de digestões enzimáticas ou verificação da qualidade de amostras de DNA e RNA, foi realizado eletroforese em gel de agarose. As amostras foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 0,7% e 1%, para DNA e RNA, respectivamente, em tampão TAE (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) e 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídeo. Os géis foram visualizados sob luz ultravioleta e documentados.

3.11 Extração do DNA plasmidial em pequena escala (minipreparação de plasmídeos)

Para isolamento de plasmídeos e seleção de clones positivos, foi utilizado um protocolo clássico de lise alcalina (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Nesse protocolo utilizam-se três soluções: a solução I é composta por Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0 e RNase 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; a solução II é composta por NaOH 200 mM e SDS 1%; a solução III é composta por acetato de potássio 5 M pH 5,5. Os seguintes procedimentos foram realizados: uma colônia de

bactérias foi inoculada em tubos cônicos de 15 mL contendo 5 mL de meio LB líquido com antibiótico correspondente e incubada por 16 horas sob agitação a 37 °C. O conteúdo foi transferido para microtubos de 1,5 mL e centrifugados por 5 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e esta operação foi repetida até que todo o volume do inóculo fosse centrifugado. As células que se sedimentaram no tubo foram ressuspensas em 150 µL da solução I. Em seguida foi adicionado 150 µL da solução II e os tubos foram incubados por 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 150 µL da solução III e os tubos foram centrifugados por 15 minutos, 19.500 g a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para outro microtubo, foi adicionado 400 µL de isopropanol e centrifugado durante 10 minutos, 19.500 g a temperatura ambiente (centrifuga mini-spin eppendorf). O precipitado foi lavado com 100 µL de etanol 70% por 5 minutos, seco a temperatura ambiente e ressuspensado em 50 µL de água destilada estéril.

3.12 Análise *in silico*

Para identificação de seqüências similares às utilizadas na caracterização genética deste trabalho (14-3-3 e *CYP51*), foram realizadas buscas em alguns bancos de dados de seqüências nucleotídicas, para posterior construção de uma árvore filogenética que mostrará a relação filogenética entre essas seqüências.

A identidade das seqüências obtidas nas bibliotecas foi confirmada por BLAST (NCBI; ALTSCHUL *et al.*, 1997). Essas análises *in silico* foram realizadas por meio de comparações contra diferentes bancos de dados de diferentes organismos utilizando o BLASTn. Foram pesquisados o banco do genoma de *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/Blast>), e os bancos de dados de arroz disponível no Rice Genome Annotation Database (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) e de sorgo, milho, cana e trigo disponível no índice de genes DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/>). As seqüências encontradas a partir das buscas foram convertidas em seqüências peptídicas pelo programa ORF FINDER (Open Reading Frame Finder; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) e os domínios funcionais para cada seqüência foram pesquisados utilizando o banco de dados Conserved Domain Database (CDD: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Com a

verificação da presença do domínio funcional nas sequências, elas foram analisadas por alinhamentos múltiplos, com o programa ClustalW (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html; THOMPSON; HIGGINS e GIBSON, 1994).

Para a análise filogenética, as seqüências nucleotídicas resultantes dos alinhamentos múltiplos foram convertidas para o formato PIR e NEXUS utilizando a ferramenta Readseq do Baylor College of Medicine Search Launcher (BCM Search Launcher; <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) para então serem utilizadas nas construções filogenéticas. Foi utilizado o programa PAUP 4.0 (Swofford, 1999) para as análises filogenéticas utilizando o método probabilístico de máxima verossimilhança. Foi realizada análise de bootstrap com 1000 replicatas. As árvores filogenéticas geradas foram visualizadas utilizando o programa TreeView.

3.13 Análise da expressão dos genes através da metodologia de PCR em tempo real

Para a avaliação do perfil de expressão gênica, foi utilizada a metodologia de PCR em tempo real, realizada a quantificação com fluorescência através de SyBR Green e análise quantitativa relativa através do modelo matemático desenvolvido por PFAFFL (2001). Para a reação de PCR em tempo real foi utilizado 12 µl de SyBR Green Master Mix, 1 pmol de primers (F+R), 7,5 ng de cDNA e água ultrapura até o volume de 20 µL. A seqüência de todos os primers que foram utilizados estão na tabela 1. Os dois primers EF1α foram utilizados para verificação da qualidade da síntese do cDNA e 25S é o controle endógeno utilizado em todos os experimentos de qPCR deste trabalho.

Foi utilizado o seguinte perfil de termociclagem: 50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 80°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguido de curva de melting. O desenho experimental envolveu 3 replicatas biológicas (RNA derivado de plantas diferentes) e quatro replicatas técnicas. Os dados obtidos com as amostras oriundas de SP foram analisados com o uso do programa Rest 2009 (Qiagen). As eficiências das PCRs foram calculadas utilizando o programa LinRegPCR (RAMARKERS *et al.*, 2003) e os Cts foram normalizados de acordo com PANT *et al.* (2008).

3.14 Digestão enzimática

Para confirmação dos clones positivos para sequenciamento, foi realizada digestão enzimática de 500-800 ng de DNA com 1 U de *EcoRI*, 1X tampão específico da enzima de restrição. A reação foi incubada por 2 horas a 37 °C e a análise do fragmento foi realizada através de eletroforese em gel de agarose 0,7%.

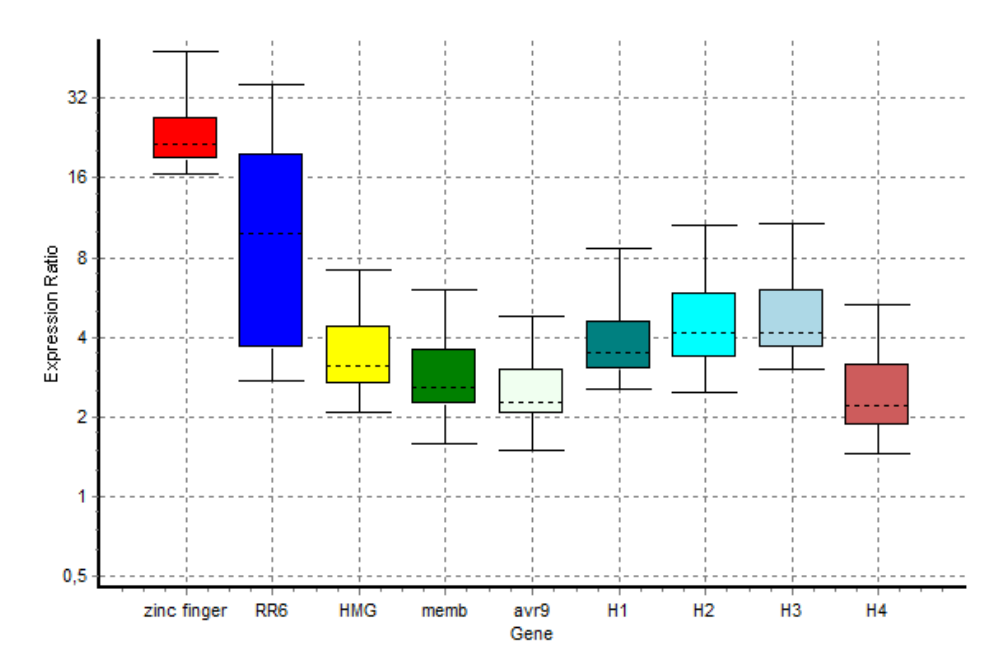
4. Resultados

4.1. Análise de expressão dos cDNAs identificados nas bibliotecas de SAGE

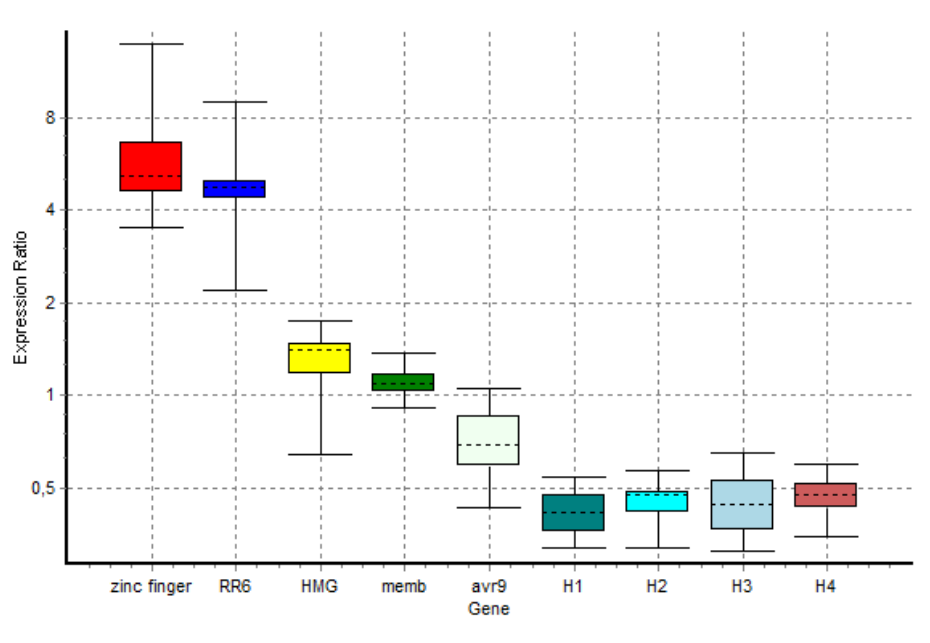
Dos cDNAs identificados nas bibliotecas SAGE, foram selecionados sete para uma análise de expressão por qRT-PCR: *ZINC FINGER*, *RR6*, *High Mobility Group (HMG)*, *membrane integrity*, *AVR9*, *H1*, *H2*, *H3* e *H4*. Estas seqüências estão envolvidas com fatores de transcrição, organização da cromatina e proteínas de membrana. Foram utilizados os dois genótipos contrastantes para a análise de expressão (figura 12), que foi calculada pelo programa REST2009 (Qiagen). Este programa comparada a expressão do genótipo tardio com o genótipo precoce, apresentando um gráfico boxplot com retângulos que refletem a expressão das amostras consideradas tratadas, neste caso, os genótipos precoces.

A expressão do cDNA que obteve similaridade com proteína ZINC FINGER foi observada em fevereiro um regulação positiva por um fator de 23,9 e em abril foi observado um regulação negativa por um fator de 5,9 .

A)



B)



C)

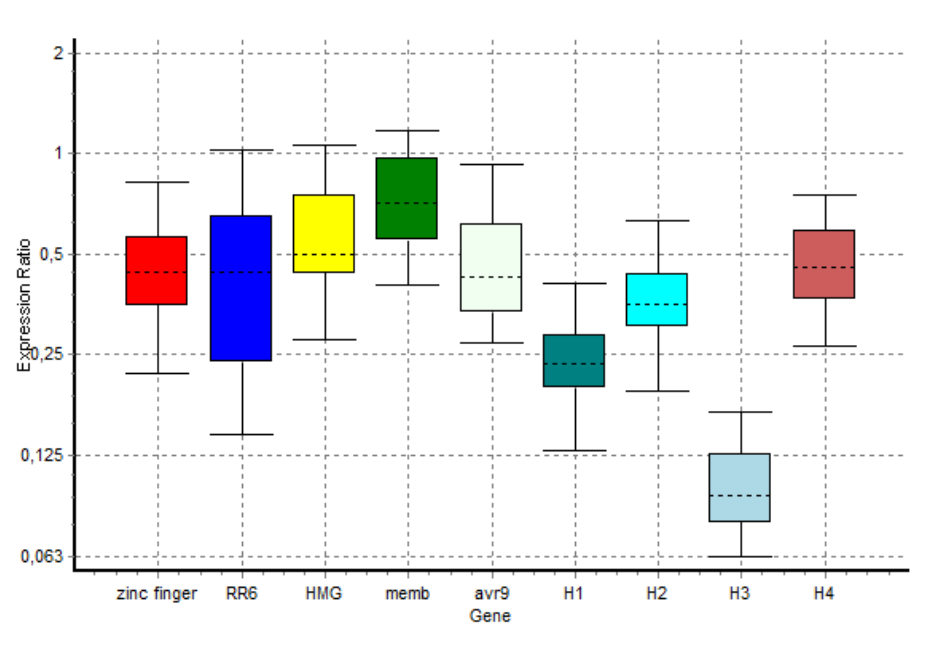
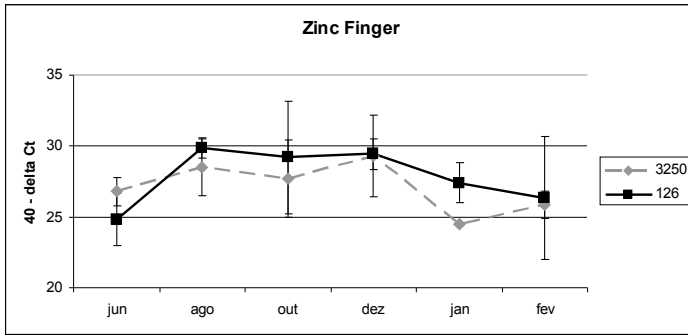


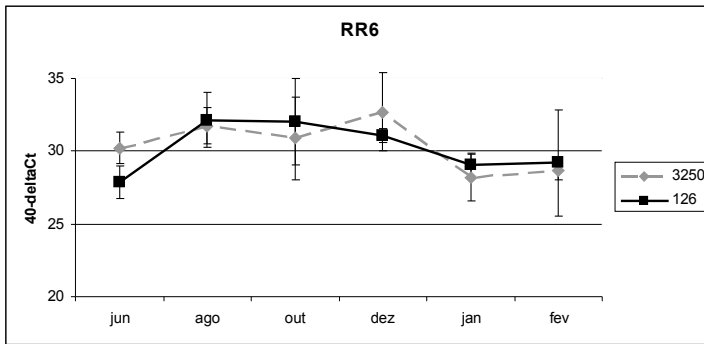
Figura 10: Expressão gênica do genótipo precoce cultivado em SP. Os cDNAs analisados foram ZINC FINGER, RR6, High Mobility Group (HMG), membrane integrity, AVR9, H1, H2, H3 e H4. (A) Mês de fevereiro. (B) Mês de março. (C) Mês de abril.

A mesma regulação foi observada para o cDNA que obteve similaridade com o gene *Response Regulator 6 (RR6)*, que foi regulado positivamente em fevereiro e negativamente em março, por fatores de 8,6 e 4,6, respectivamente. O cDNA que obteve similaridade com o Grupo de Alta Mobilidade (*High Mobility Group – HMG*) apresentou uma regulação positiva foi observada no mês de fevereiro por um fator de 3,4; em abril a expressão foi regulada negativamente por um fator de 0,5. O mesmo resultado foi obtido para os cDNAs com similaridade a *INTEGRAL MEMBRANE* e *AVIRULENT9 (AVR9 RESPONSE ELICITOR)* que apresentaram regulação positiva por fatores de 2,8 e 2,4, no mês de fevereiro, respectivamente, e *avr9* apresentou regulação negativa em abril por um fator de 0,4. As análises realizadas com as histonas H1, H2, H3 e H4 não demonstraram nenhuma diferença na expressão. Esses dados de expressão gênica sugerem uma influência dos cDNAs *ZINC FINGER*, *RR6*, *HMG*, *INTEGRAL MEMBRANE* e *AVR9* no fenótipo de floração precoce dos genótipos cultivados em São Paulo.

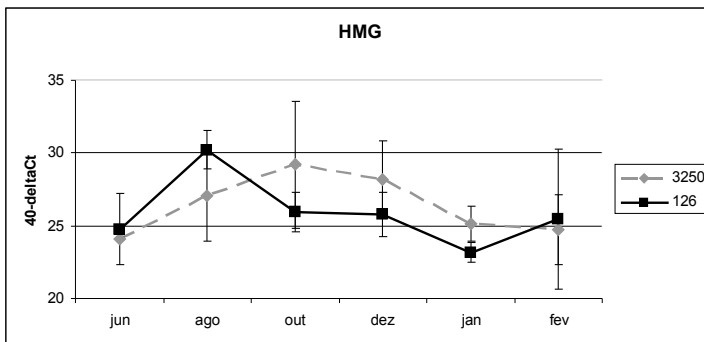
A expressão para estes cDNAs foi analisada também nos genótipos cultivados no estado do Rio Grande do Norte (Figura 13). Nestes gráficos, pode ser observado a expressão desses genes durante 9 meses no desenvolvimento (junho 2008 -fevereiro 2009). Os meses de julho-agosto correspondem à fase juvenil da planta. No mês de outubro a planta atinge a fase adulta, e o período de dezembro-fevereiro o ápice meristemático está recebendo a sinalização e pode ou não florescer. Os gráficos apresentados na figura 13 mostram que para os genótipos cultivados no Rio Grande do Norte, não foram observados mudanças significativas no padrão de expressão, sugerindo que estes cDNAs possam ser específicos para as condições ambientais da região de São Paulo.



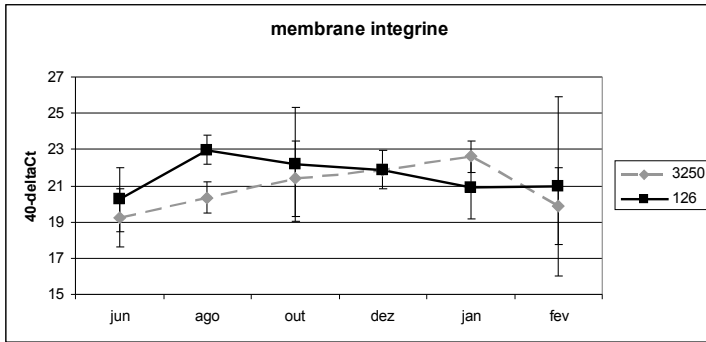
A



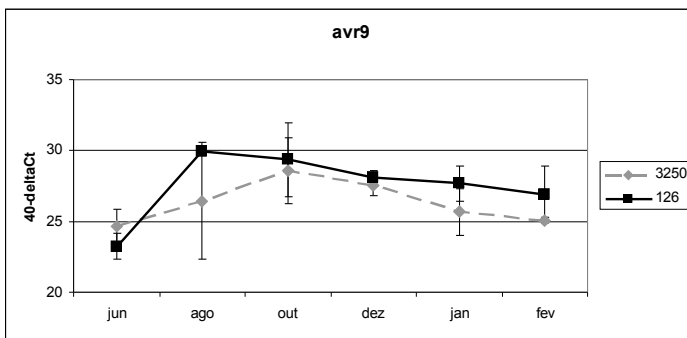
B



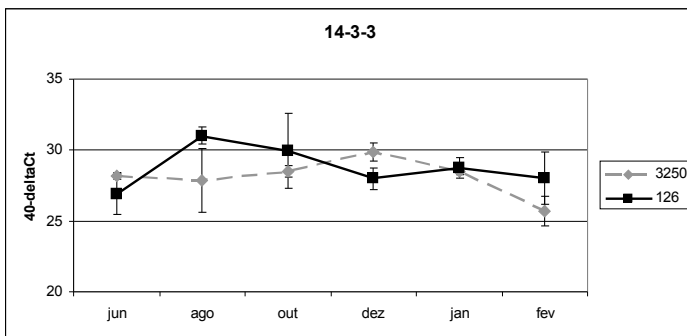
C



D



E



F

Figura 11: Padrão de expressão dos genótipos cultivados no Rio Grande do Norte. Expressão dos genes (A) ZINC FINGER, (B) RR6, (C) High Mobility Group (HMG), (D) integral membrane, (E) AVR9 e (F) 14-3-3.

4.2 Análise *in silico*:

Com o intuito de compreender as relações filogenéticas para a proteína CYP51 encontrada em cana-de-açúcar com outras seqüências de plantas (monocotiledôneas e dicotiledôneas), foi construída uma árvore filogenética com a seqüência da CYP51 de cana-de-açúcar, além de sorgo, arroz e *Arabidopsis* (Figura 19). As seqüências encontram-se agrupadas em três ramos distintos. Na tabela 3, temos a identidade das proteínas codificadas pelas seqüências utilizadas na árvore filogenética, comparando-as com a seqüência de CYP51 de cana-de-açúcar.

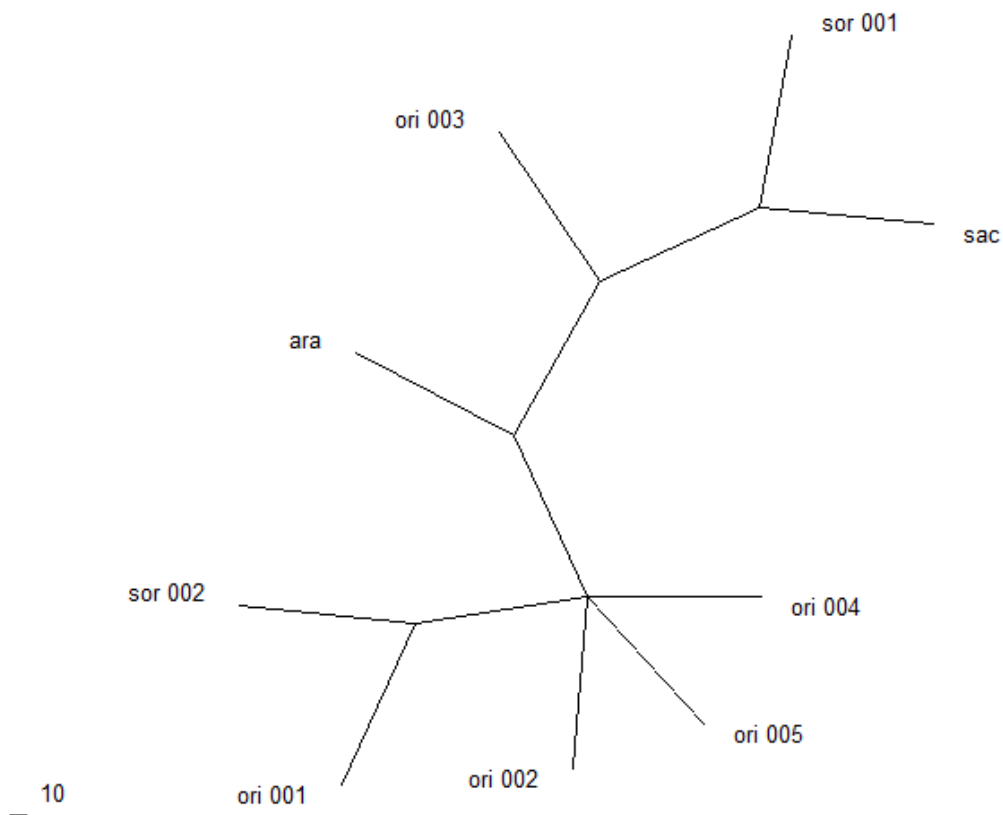


Figura 12: Árvore gênica da CYP51. As seqüências foram analisadas pelo método de máxima verossimilhança. O número nos nodos representa a porcentagem de bootstraps baseados em 1000 replicatas. sac = cana-de-açúcar; sor = sorgo; ori = arroz; ara = *Arabidopsis*. ori 001 (LOC_Os02g21810), ori 002 (LOC_Os05g12040), ori 003 (LOC_Os11g32240), ori 004 (LOC_Os07g28160), ori 005 (LOC_Os07g37970), ara ([AT1G11680.1](#)), sac (TC73046), sor 001 (TC111358) e sor 002 (XM_002455972.1)

Tabela 1: Similaridade das proteínas codificadas pelas sequências utilizadas na árvore filogenética.

Sugarcane CYP51 (TC113053)	
Arabidopsis AT1G11680.1	78 %
Sorghum TC111358	97 %
Rice 13102.m02445	50 %
Rice 13105.m01305	56 %
Rice 13111.m03136	92 %
Rice 13107.m02815	50 %
Rice 13107.m03917	51 %

Em todas as sequências utilizadas na construção da árvore também se observou a presença do domínio funcional característico da família da CYP, com pequenas diferenças como podemos observar para os domínios encontrados nas seqüência de arroz e *Arabidopsis* (Figura 20).

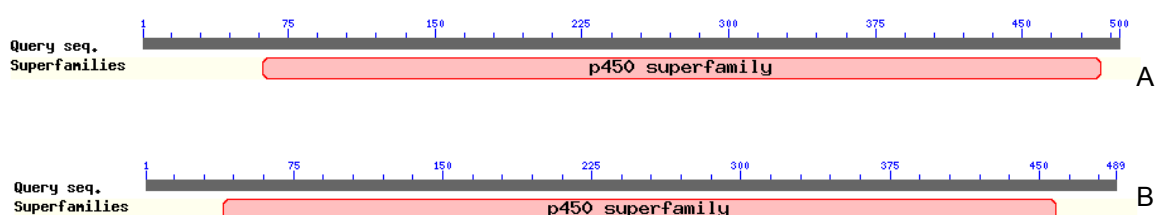


Figura 13: Domínio funcional característico da proteína cyp51. (A) Arroz (ori 003). (B) *Arabidopsis* (ara). Barras indicam: em grafite, seqüência peptídica; em rosa, domínio da superfamília.

4.3 Análise da expressão gênica

Para analisar o perfil de expressão do gene *CYP51* nos genótipos tardio e precoce de cana-de-açúcar cultivadas em condições diferentes, foi feito PCR em tempo real desses genótipos cultivados nos estados do Rio Grande do Norte (Figura 14) e São Paulo (Figura 15).

A expressão do gene *CYP51* encontra-se menor no genótipo precoce no mês de outubro, mas esse valor aumenta a partir de janeiro. O genótipo tardio apresenta um pico de expressão em outubro, mas essa expressão cai e entre janeiro e fevereiro fica menor que a do genótipo precoce, sugerindo que este gene possa ter um papel indutor para as modificações necessárias para o florescimento. Na tabela 5 temos a tabela gerada pelo programa REST2009,

com a análise dos dados referentes ao gráfico 24. O genótipo precoce apresenta uma menor expressão para o gene *CYP51* no mês de fevereiro, cerca de 0,5 vezes.

Figura 14: Expressão gênica de *CYP51* nos genótipos de cana-de-açúcar cultivadas no nordeste nos meses de julho, agosto, setembro, outubro, janeiro e fevereiro.

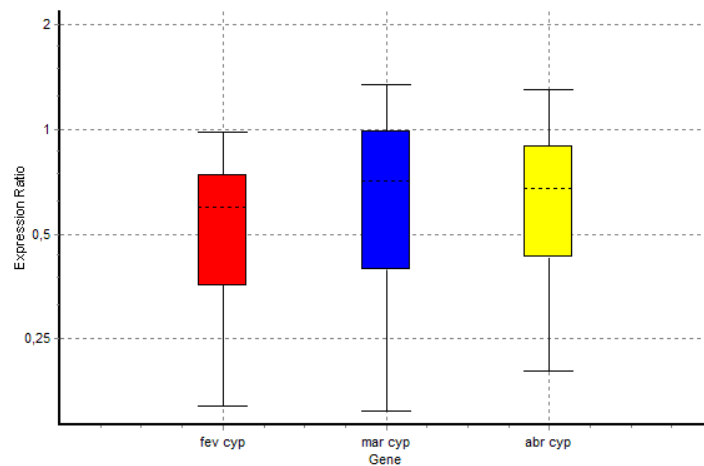


Figura 15: Gráfico da expressão gênica de *cyp* no genótipo precoce de cana-de-açúcar para floração cultivada (amarelo).

Tabela 2: Resultados gerados pelo programa Rest para expressão do gene CYP51.

Gene	Type	Reaction Efficiency	Expression	Std. Error	95% C.I.	P(H1)	Result
25S mar 43	REF	0,9989	1,000				
fev cyp	TRG	0,99	0,507	0,319 - 0,817	0,202 - 0,946	0,007	DOWN
mar cyp	TRG	0,99	0,606	0,352 - 1,064	0,212 - 1,335	0,226	
abr cyp	TRG	0,99	0,622	0,370 - 1,049	0,262 - 1,235	0,175	

5. Discussão

A técnica de bibliotecas SAGE é um dos métodos nos quais é permitido identificar mRNAs diferencialmente expressos. Com o objetivo de identificar os genes que estivessem associados ao processo de florescimento na região sudeste foi realizado esta metodologia que identificou alguns cDNAs possivelmente diferencialmente expressos no ápice meristemático caulinar dos genótipos tardio e precoce cultivados em São Paulo. Esse método identificou os genes: *integral de membrana*, *zinc fingers*, *avr9*, *cytochrome P450*, *auxin repressed*, *histonas* e *14-3-3*. Os dados de PCR em tempo real demonstraram que *ZINC FINGER*, *RR6*, *HMG*, *AVR9* e *integral membrana* estavam regulados positivamente no genótipo precoce, em especial no mês de fevereiro, início provável da indução floral no estado de São Paulo. Nos outros dois meses analisados, foi observada a diminuição na expressão desses genes.

As proteínas ZINC FINGER estão envolvidas em muitos processos, como regulação transcricional, ligação a RNA e DNA e interações proteína-proteína (TAKATSUJI, 1998). Outra sequência observada como regulada positivamente em fevereiro foi a proteína HMG. Essa proteína faz parte de um grupo de proteínas que mediam a ligação do DNA a proteínas específicas. Esse grupo de proteínas também está relacionado com estresse abiótico (STROS; LAUNHOLT; GRASSER, 2007). Quando os mesmos *primers* foram utilizados com genótipos crescidos em condições diferentes (região nordeste), não houve a observação de nenhuma expressão diferencial, indicando que os mRNAs identificados pelo SAGE foram específicos para os genótipos cultivados em São Paulo. KOMEDA (2004) propõe que a transição para a floração consiste em um balanço de fatores promotores e inibidores, e esses fatores, tais como luz, temperatura e disponibilidade de água, podem mudar de acordo com o genótipo. Esses fatores poderiam atuar na sinalização do ápice meristemático, modificando a via de transdução na direção de inibir ou ativar.

Comparando-se as duas metodologias de expressão diferencial SAGE e bibliotecas subtrativas, o cDNA *CYP51* foi encontrado em ambas metodologias. A maioria dos organismos apresenta apenas uma cópia deste gene, apesar de ocorrer pelo menos uma exceção nas plantas, pois o arroz apresenta vários possíveis genes para *CYP51* (KIM *et al.*, 2005).

Com os dados observados na figura 23, observa-se que há o decréscimo contínuo na expressão a partir de outubro no genótipo tardio e o aumento na expressão do genótipo precoce a partir de janeiro. Isso demonstra que no provável período de indução floral a expressão desse gene no genótipo precoce tende a aumentar. Em São Paulo, temos um ligeiro aumento da expressão no genótipo precoce com o decorrer da indução floral, apontando para o *CYP51* como um possível indutor floral.

A regulação da transcrição do gene *CYP51* tem sido estudada extensivamente em animais. Este é um gene de expressão constitutiva em todas as células que expressem colesterol, sendo superexpresso nas células do fígado, principal sítio de síntese de colesterol (STROMSTEDT; ROZMAN; WATERMAN, 1996). Em organismos complexos como plantas e animais, a proteína *CYP51* não participa apenas da síntese de esteróis como também da síntese de intermediários como FF-MAS, que apresenta função de ligante em receptores nucleares. Como outros membros da família P450, as formas eucarióticas da proteína *CYP51* são ligados à membrana e as formas procarióticas são solúveis (SHEN; LEARY; KASPER, 2002).

Poucos estudos apresentam a influência desse gene no desenvolvimento vegetal. Em um trabalho com *Arabidopsis* (KIM *et al.*, 2005), foi observado que mutantes para este gene apresentam falhas no desenvolvimento, inclusive com falhas na integridade da membrana plasmática, o que levou também à falha na sinalização dos brassinosteróides, pois o receptor de membrana (BRI – BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1) é um ponto chave na sinalização. Também foi visto no trabalho realizado por DOMALSKA *et al.*, (2007), um ponto de conexão entre a sinalização por brassinosteróides e a floração, pois foi demonstrado que estes hormônios regulam a expressão do gene *FLC*. Neste trabalho também foi mostrado que os mutantes *bri1* aumentavam a expressão de *FRI* levando ao aumento de transcritos de *FLC* e que os mutantes deficientes em brassinosteróides apresentavam floração tardia.

Já foi visto que a proteína *CYP51* se expressa no SAM (O'BRIEN *et al.*, 2005) e a transição do crescimento vegetativo para o reprodutivo ocorre nesse tipo de tecido, mas não há na literatura estudos que façam correlação direta desse gene com a floração. O SAM é formado por três camadas; zona central (CZ), formada por células pluripotentes, zona periférica (PZ), formada por

células multipotentes e zona medular (RZ) formada por células multipotentes (DODSWORTH 2009). A zona periférica é capaz de se diferenciar em folhas e flores, dependendo do balanço de sinais recebidos (SABLOWSKI 2009). Foi observado em *Arabidopsis* e arroz que algumas dessas vias são conservadas, mas vias distintas são observadas especialmente em monocotiledôneas (COLASANTI e CONEVA, 2009). Dessa forma, é importante estudar esse aspecto em plantas monocotiledôneas, como a cana-de-açúcar, para entender melhor o mecanismo molecular dessas vias. Considerando a complexidade do genoma da cana-de-açúcar e o fato de que vários genótipos são utilizados na cultura em diferentes regiões do país, é importante saber quais moléculas estão envolvidas no processo de floração nas diferentes condições de cultivo, com o objetivo de melhorar a produção, através do desenvolvimento de transgênicos e marcadores moleculares.

6. Conclusões

Os resultados encontrados neste trabalho correspondem aos primeiros passos na identificação de genes que estão envolvidos na sinalização para a floração no ápice meristemático. Neste trabalho, foi demonstrado que a regulação de alguns genes expressos no ápice meristemático de cana de açúcar pode variar dependendo da região de cultivo. Foi visto também um possível papel ativador de floração para o gene *CYP51*, além de variação no padrão molecular dos genótipos precoce e tardio, para a floração, cultivados no RN.

7. Referências Bibliográficas

ABE, M., YASUSHI, K., SUMIKO, Y., YASUFUMI, D., AYAKO, Y., YOKO, I., HARUTA, I., MICHITAKA, N., KOJI, G., TAKASHI, A. (2005) Pathway Integrator FT at the Shoot Apex FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral. **Science** 309: 1052 -1056

AITKEN, A. (2006) 14-3-3 proteins: A historic overview. **Seminars in Cancer Biology** 16: 162–172

ALEXANDRE, C.M., e HENNING, L. (2008) FLC or not FLC: the other side of vernalization. **Journal of Experimental Botany**. 59(6): 1127–1135

AMASINO, R.M. (2005) Vernalization and flowering time. **Current Opinion in Biotechnology** 16:154–158

ALEXANDER, R. D.; MORRIS, P.C. (2006) A proteomic analysis of 14-3-3 binding proteins from developing barley grains. **Proteomics** 6: 1886–1896.

ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHAFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, N., LIPMAN, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acid Res.** 23: 3389-3402

AUKERMAN, M.J.; LEE, I.; WEIGEL, D.; AMASINO, R.M. (1999) The Arabidopsis flowering-time gene LUMINIDEPENDENS is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates LEAFY expression. **Plant Journal** 18: 195-203.

BERNIER, G. e PÉRILLEUX, C. (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. **Plant Biotechnology Journal**. 3: 3-16

BLÁZQUEZ, M.A. (2000) Flower development pathways. **Journal Cell Science** 113: 3547-3548.

BLÁZQUEZ, M.A.; FERRÁNDIZ, C.; MADUENÓ, F.; PARCY, F. (2006) How floral meristems are built. **Plant Molecular Biology** 60: 855-870.

CAPUTO, M.M., SILVA, M.A., BEAUCLAIR, E.G.F., e GAVA, G.J.C. (2007) ACÚMULO DE SACAROSE, PRODUTIVIDADE E FLORESCIMENTO DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB REGULADORES VEGETAIS. **Interciência**. 32: 834-840

CLOUSE, S.D. (2008) The molecular intersection of brassinosteroid-regulated growth and flowering in *Arabidopsis*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 105: 7345-7346

COLASANTI, J., CONEVA, V. (2009) Mechanisms of floral induction in grasses: something borrowed something new. **Plant Phys** 149:56-62

COLASANTI, J.; SUNDARESAN, V. (1996) Control of the transition to flowering. **Current Opinion in Biotechnology**. 7: 145-149.

Conselho Nacional de Abastecimento - Conab. Disponível em <http://conab.gov.br/>. Acesso em março de 2010.

CONTESOTTO, M.G.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; MARIANI, P.D.S.C.; COUTINHO, L.L. (2001) A new member of the chalcone synthase (CHS) family in sugarcane. **Genetics & Molecular Biology** 24:257-261

CZECHOWSKI, T., BARI, R.P., STITT, M., SCHEIBLE, W.-R., e UDVARDI, M.K. (2004) Real Time RT-PCR profiling of over 1400 *Arabidopsis* transcription factors: unprecedented sensitivity reveals novel root- and shoot-specific genes. **The Plant Journal** 38: 366-379

DEBELJAK, N., FINK, M., ROZMAN, D. (2003) Many facets of mammalian lanosterol 14 α -demethylase from the evolutionary conserved cytochrome P450 family CYP51. **Arch Biochem Biophys** 409: 159–171

DELILE, J.M., SEHNKE, P.C. and FERL, R.J. (2001) The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiol*. 126: 35–38.

DODSWORTH, S. (2009) A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. **Developmental Biology** 336: 1–9

D'HONT, A., GRIVET, L., FELDMAN, P., RAO, S., BERDING, N., e GLASZMAN, J.C.

(1996). Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Mol. Gen. Genet.** 250: 405–413.

DORNELAS, M.C. e RODRIGUEZ, A.P.M. (2001) A genomic approach to elucidating grass flower development. **Genetics and Molecular Biology.** 24: 69-76

Furtado, C. (2007) Prospecção de genes associados ao processo de floração em cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado em genética e biologia molecular

EWING, B., HILLIER, L., WENDI, M.C., e GREEN, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using phred.I. Accuracy assessment. *Genome Res.* 8:175–185.

GREENUP, A., PEACOCK, W.J., DENNIS, E.S., e TREVASKIS, B. (2009). The molecular biology of seasonal flowering-responses in *Arabidopsis* and the cereals. **Annals of Botany** 103: 1165–1172

GENDRON, J.M. and WANG, Z.Y. (2007) Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. **Curr. Opin. Plant Biol.** 10: 436–441.

Guia da Cana de Açúcar. Publicação do Conselho de Informações sobre Biotecnologia – CIB. Disponível em: http://www.cib.org.br/pdf/guia_cana.pdf. Acesso em março de 2010.

HE, Y.; MICHAELS, S.D.; AMASINO, R.M. (2003) Regulation of flowering time by histone acetylation in *Arabidopsis*. **Science** 302: 1751-1754.

HENDERSON, I.R.; LIU, F.; DREA, S.; SIMPSON, G.G.; DEAN, C. (2005) An allelic series reveals essential roles for FY in plant development in addition to flowering-time control. **Development** 132: 3597-3607

HEUSDEN, G.P.H. (2009) 14-3-3 proteins: Insights from genome-wide studies in yeast **Genomics** 94: 287–293

HUA, W., ZHANG, L., LIANG, S., JONES, R.L., LU, Y. T. (2004) A tobacco calcium-calmodulin-binding protein kinase functions as a negative regulator of flowering. **J Biol Chemistry** 279: 31483-31494.

IAZUMI, T. e KAY, S.A. (2006) Photoperiodic control of flowering: not only by coincidence. **Trends in plant science.** 11: 550-558

IRISH, V.F. (2010) The flowering of Arabidopsis flower development. **The Plant Journal**. 61:1014–1028

LAMB, D.C., KELLY, D.E., e KELLY, S.L. (1998) Molecular diversity of sterol 14K-demethylase substrates in plants, fungi and humans. **FEBS Letters** 425: 263-265

LAUX, T., MAYER, K.F.X., BERGER, J., JURGENS, G., 1996. The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. **Development** 122: 87–96.

LEPESHA, G.I., e WATERMAN, M.R. (2004) CYP51—the omnipotent P450. **Molecular and Cellular Endocrinology** 215:165–170

LIU, C., THONG, Z., e YU, H. (2009) Coming into bloom: the specification of floral meristems. **Development** 136: 3379-3391

KIM, H.B., SCHALLER, H., GOH, C.-H., KWON, M., CHOE, S., AN, C.S., DURST, F., FELDMAN, K.A., e FEYERSKEN, R. (2005) Arabidopsis cyp51 Mutant Shows Postembryonic Seedling Lethality Associated with Lack of Membrane Integrity. **Plant Physiology**. 138: 2033–2047

KIM, H.J.; HYUN, Y.; PARK, J.Y.; PARK, M.J.; PARK, M.K.; KIM, M.D.; LEE, M.H.; MOON, J.; LEE, I.; KIM, J. (2004) A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in Arabidopsis thaliana. **Nature Genetic** 36: 167-171.

KIM, M.C., CHUNG, W.S., YUN, D., CHO, M.J. (2009) Calcium and Calmodulin-mediated regulation of gene expression in plants. **Molecular Plant** 2:13-21.

KLIMECKA, M. e MUSZYNSKA, G. (2007) Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. **Acta Biochim Pol.** 54: 219-233.

KOMEDA, Y. (2004) Genetic Regulation of time to flower in Arabidopsis thaliana. **Annual Review Plant Biology** 55:521–535

MAYFIELD, J.D., FOLTA, K.M., PAUL, A.-L., e FERL, R.J. (2007) The 14-3-3 Proteins μ and γ Influence Transition to Flowering and Early Phytochrome Response1 **Plant Physiology**.145:1692–1702

McSTEEN, P., LAUDENCIA-CHINGCUANCO, D., e COLASANTI, J. (2000) A floret by any other name: control of meristem identity in maize. **Trends in Plant Science**. 5(2): 61-66

MENOSSE, M., SILVA-FILHO, M.C., VINCENTZ, M., VAN-SLUYS, M.-A. e SOUZA, G.M. (2007) Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development. **International Journal of Plant Genomics**. 2008: 1-11.

MOON, J.; LEE, H.; KIM, M.; LEE, I. (2005) Analysis of Flowering Pathway Integrators in Arabidopsis. **Plant Cell Physiol**. 46(2): 292-299.

MOURADOV, A.; CREMER, F.; COUPLAND, G. (2002) Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. **The Plant Cell**. S111-S130

MUTASA-GOTTGENS, E. e HEDDEN, P. (2009) Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. **Journal of Experimental Botany**. 60: 1979–1989

O'BRIEN, M., CHANTA,S.C., RAHIER, A. e MATTON. D.P. (2005) Lipid Signaling in Plants. Cloning and Expression Analysis of the Obtusifoliol 14 α -Demethylase from *Solanum chacoense* Bitt., a Pollination- and Fertilization-Induced Gene with Both Obtusifoliol and Lanosterol Demethylase Activity1. **Plant Physiology** 139:734–749

PANT, B.D., BUHTZ, A., KEHR, J. e SCHEIBLE, W.R. (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. **The Plant Journal** 53: 731–738

PAUL, A.-L., FOLTA, K.M., e FERL, R.J.(2008) 14-3-3 proteins, red light and photoperiodic flowering A point of connection? **Plant Signaling & Behavior** 3: 511-515

PFAFFL, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **NAR** 29: e45.

PURWESTRI, Y.A., OGAKI, Y., TAMAKI, S., TSUJI, H. e SHIMAMOTO, K. (2009) The 14-3-3 Protein GF14c Acts as a Negative Regulator of Flowering in Rice by Interacting with the Florigen Hd3a. **Plant Cell Physiol.** 50(3): 429–438

RAMARKERS, C., RUJITER, J.M., DEPREZ, R.H., MOORMAN, A.F. (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neurosci Lett** 339:62-66

QUESADA, V.; MACKNIGHT, R.; DEAN, C.; SIMPSON, G.G. Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time. **The EMBO Journal.** 22:3142-3152.

RICHARDS, D.E.; KING, K.E.; AIT-ALI, T.; HARBER, N.P. (2001) How gibberellin regulates plant growth and development: a molecular genetic analysis of gibberellin signaling. **Annual Review of Plant Phys. and Plant Mol. Biology** 52: 67-88.

ROSENQUIST, M., SEHNKE, P., FERL, R.J., SOMMARIN, M. e LARSSON, C. (2000) Evolution of the 14-3-3 protein family: does the large number of isoforms in multicellular organisms reflect functional specificity? **J. Mol. Evol.** 51: 446–458.

SABLOWSKI, R. (2007) Flowering and determinancy in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany.* 58: 899-907

SABLOWSKI, R. (2009). Cytokinin and WUSCHEL tie the knot around plant stem cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 106:16016-16017

Schepens, I.; Duek, P.; Fankhauser, C. (2004) Phytochrome-mediated light signaling in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology.** 7: 564-569.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (2001) *Molecular Cloning: a laboratory manual.* New York: Cold Spring Harbor, v.1-3.

SHEN, A.L., O'LEARY, K.A., KASPER, C.B. (2002) Association of multiple developmental defects and embryonic lethality with loss of microsomal NADPH-cytochrome P450 oxido-reductase, **J. Biol. Chem.** 277: 6536–6541.

SCHOMBURG, F.M., AMASINO, R.M., VIERSTRA, R.D., NAGY, F., DAVIS, S. J. (2007) Attenuation of brassinosteroid signaling enhances FLC expression and delays flowering. **Development.** 134: 2841-50

SHOMBURG, F.M.; PATTON, D.A.; MEINKE, D.W.; AMASINO, R.M. (2001) FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs. **Plant Cell** 13: 1427-1436.

STROMSTEDT, M., ROZMAN, D., WATERMAN, M.R. (1996) The ubiquitously expressed human CYP51 encodes lanosterol 14a-demethylase, a cytochrome P450 whose expression is regulated by oxysterols. **Arch. Biochem. Biophys.** 329: 73–81.

SIMPSON, G.G. (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of Arabidopsis flowering time. **Current Opinion in Plant Biology.** 7: 570–574

SEHNKE PC, DELILE JM, FERL RJ (2002) Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. **Plant Cell (Suppl)** 14: S339–S354

Sindicato da Indústria de Fabricação do Alcool no Estado de Minas Gerais (Siamig). Disponível em: <http://www.siamig1.com.br/> Acesso em março de 2010.

STROSS M, LAUNHOLT D, GRASSER KD. (2007) The HMG-box: a versatile protein domain occurring in a wide variety of DNA-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 64:2590-2606.

Waclwoysky AJ, Sato PM, Lembke CG, Moore PH, Souza GM (2010) Sugarcane for bioenergy production: an assessment of yield and regulation of sucrose content. **Plant Biotechnol. J.** 8:263-276

SUNG, S.; AMASINO, R.M. (2004) Vernalization in Arabidopsis thaliana is mediated by the PHD finger protein VIN3. **Nature** 427:159–164

TAKATSUJI, H. (1998) Zinc-finger transcription factors in plants. **Cell Mol Life Sci.** 54:582-596.

TELLES, G.P.; BRAGA, M.D.V.; DIAS, Z.; LIN, T.; QUIYZAU, J.A.A.; da SILVA, F.R.; Meidanis, J. (2001) Bioinformatics of the sugarcane EST project. **Genet. Mol. Biol.** 24: 9-15

THEISSEN, G. (2001) Development of floral organ identity: stories from the MADS house. **Current Opinion in Plant Biology** 4:75–85

THOMPSON, J.D., HIBBINS, D.G., GIBSON, T.J. (1994) ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Res.** 22: 4673-80.

VETTORE, A.L.; da SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; ARRUDA, P. (2001) The libraries that made SUCEST. **Genet Mol Biol** 24: 1-7

[VETTORE, A.L.; da SILVA, F.R.; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; da SILVA, A.M.; FERRO, M.I.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E.A.; LEMOS, M.V.; COUTINHO, L.L.; NOBREGA, M.P.; CARRER, H.; FRANCA, S.C.; BACCI JUNIOR, M.; GOLDMAN, M.H.; GOMES, S.L.; NUNES, L.R.; CAMARGO, L.E.; SIQUEIRA, W.J.; VAN SLUYS, M.A.; THIEMANN, O.H.; KURAMAE, E.E.; SANTELLI, R.V.; MARINO, C.L.; TARGON, M.L.; FERRO, J.A.; SSILVEIRA, H.C.; MARINI, D.C.; LEMOS, E.G.; MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; TAMBOR, J.H.; CARRARO, D.M.; ROBERTO, P.G.; MARTINS, V.G.; GOLDMAN, G.H.; de OLIVEIRA, R.C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C.A.; ROSSI, M.; de ARAUJO, P.G.; SCULACCIO, S.A.; ANGELLA, A.; LIMA, M.M.; de ROSA JUNIOR, V.E.; SIVIEIRO, F.; COSCRATO, V.E.; MACHADO, M.A.; GRIVET, L.; Di MAURO, S.M.; NOBREGA, F.G.; MENCK, C.F.; BRAGA, M.D.; TELLES, G.P.; CARA, F.A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P.](#) (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Res** 13: 2725-2735.

YAFFE, M. B. (2002). How do 14-3-3 proteins work? Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. **FEBS Lett.** 513: 53-57.

WIGGE, P.A., KIM, M. C., JARGER, K.E., BUSH, W., SCHIMID, M., LOHMMAN, J.U., WEIGEL, D. (2005) Integration of Spatial and Temporal Information During Floral Induction in Arabidopsis. **Science** 309: 1056-1059

WILSON, R.N.; HECKMAN, J.W.; SOMERVILLE, C.R. (1992). Gibberellin is required for flowering in *Arabidopsis thaliana* under short days. **Plant Physiol.** 100: 403–408.

ZEEVART, J.A.D. (2006) Florigen Coming of Age after 70 Years. **The Plant Cell.** 18: 1783–1789

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)