

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar
relacionada ao metabolismo da sacarose**

Luis Felipe Boaretto

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2012**

Luis Felipe Boaretto
Engenheiro Agrônomo

Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

**Tese apresentada para obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Fisiologia e Bioquímica de Plantas**

**Piracicaba
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - ESALQ/USP**

Boaretto, Luis Felipe

Análise do transcrito e proteoma do colmo de cana-de-açúcar relacionada ao metabolismo da sacarose / Luis Felipe Boaretto. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2011.

177 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2011.

1. Açúcares solúveis 2. Cana-de-açúcar 3. Espectrometria de massas 4. Reação em cadeia por polimerase 5. Sacarose I. Título

CDD 633.61
B662a

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

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus pelos momentos felizes e adversos impostos durante este trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Labate antes de tudo pela sua amizade construída ao longo de 10 anos de convivência. Por confiar em meu trabalho, pela oportunidade e orientação.

A CAPES pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-graduação em Fisiologia e Bioquímica de Plantas.

Ao Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) representado na figura da Dra. Sabrina M. Chabregas por fornecer gentilmente as mudas utilizadas como objeto de estudo deste trabalho.

A Dra. Mônica T. V. Labate pela sua amizade e conselhos na confecção deste trabalho.

Ao Dr. David Moon pelos conselhos e auxílio na finalização do trabalho.

Ao Dr. Juliano Bragatto (Corintiano “Loco”) antes de tudo pela sua amizade e camaradagem – Valeu Cara!!!. Pelo auxílio nas análises de carboidratos realizadas

Ao doutorando Thiago Falda Leite, meu estimado amigo FALDA, pelos bate-papos, auxílios, ideias, risadas e desabafos durante esse tempo.

A doutoranda Ilara Gabriela Frasson Budzinski, minha amiga BUD’S. Muito obrigado pela sua amizade verdadeira. Nossos constantes bate-papos irão fazer falta.

A amiga Livia Franceschini pelas constantes ajudas na parte de informática e bioinformática.

A doutoranda Maria Juliana C. Rodrigues aos longos anos de amizade e convivência harmônica desde a IC até o Doutorado.

Ao grande mestre Pedro Barreto, pelas valiosas conversas, ensinamentos e conselhos. Pedro você é um profissional que me espelharei, sua humildade é referência para todos nos!

Ao pessoal do “Grupo da Cana”; Danielle Izilda, Simone Guidetti, Larissa Prado, Camila Ribeiro.

As meninas da IC; Julinha, Carol, Gabi e Hana, pelas ajudas durante o trabalho.

Aos novos amigos Leonardo Ferreira, Janaina Borges, Jaime Barros (Jaiminho), Carolzinha (μ-cuim), Felipe Marques (Felipinho) e Ivan Mozol.

A todos que um dia fizeram parte desta equipe!

Meu muito OBRIGADO.

***“Decepar a cana
Recolher a garapa da cana
Roubar da cana a doçura do mel
Se lambuzar de mel”***

(Milton Nascimento e Chico Buarque, 1976)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	21
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 A cultura da cana-de-açúcar.....	27
2.2 Açúcares solúveis do colmo da cana-de-açúcar.....	29
2.3 Rota física do descarregamento do floema no parênquima do colmo de cana-de-açúcar.....	31
2.4 O armazenamento da sacarose no colmo da cana-de-açúcar.....	33
2.5 Enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose.....	35
2.5.1 Sacarose fosfato sintase (SPS) (EC 2.4.1.14).....	35
2.5.2 Sacarose sintase (SUSY) (EC 2.4.1.13).....	36
2.5.3 Invertases (IN) (EC 3.2.1.26).....	37
2.5.4 Hexoquinase (HK) (EC 2.7.1.1).....	40
2.5.5 Frutoquinase (FRK) (EC 2.7.1.4).....	41
2.6 Desenvolvimento de ferramentas para a elucidação dos principais pontos de controle da acumulação da sacarose em colmo de cana-de-açúcar.....	42
2.7 Biologia molecular aplicada à cana-de-açúcar.....	44
2.7.1 A cana-de-açúcar e o projeto SUCEST.....	44
2.7.2 Regulação da expressão gênica em colmo de cana-de-açúcar.....	45
2.8 Proteômica.....	47
3 OBJETIVOS.....	51
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	53
4.1 Instalação do experimento em casa de vegetação.....	53

4.2 Períodos definidos para as coletas.....	53
4.2.1 Acompanhamento do acúmulo de açúcares no colmo de plantas de cana-de-açúcar.....	54
4.3 Coleta dos colmos de cana-de-açúcar para a avaliação do proteoma e transcrito.....	55
4.4 Coleta dos colmos de cana-de-açúcar para a quantificação dos açúcares solúveis.....	55
4.5 Extração das proteínas totais dos internós 5 e 9 de cana-de-açúcar.....	55
4.5.1 Solubilização das proteínas totais.....	56
4.5.2 Quantificação das proteínas totais.....	56
4.6 Eletroforese em gel desnaturante (SDS-PAGE).....	57
4.7 Eletroforese bi-dimensional.....	57
4.7.1 Focalização isoeletrica (IEF) – primeira dimensão.....	57
4.7.2 Eletroforese da segunda dimensão (2D-PAGE).....	58
4.8 Análise e tratamento das imagens digitalizadas do gel.....	59
4.9 Digestão de proteínas separadas por 2D-PAGE.....	59
4.10 LC-MS/MS.....	60
4.11 Análise dos espectros de massas e identificação das proteínas.....	61
4.12 Seleção dos genes e síntese dos <i>primers</i>	61
4.13 Extração do RNA total.....	63
4.13.1 Quantificação do RNA total extraído.....	64
4.14 Isolamento do RNA mensageiro e Síntese do cDNA.....	64
4.15 PCR quantitativo (qPCR).....	65
4.16 Seleção dos genes de referência.....	65
4.17 Extração dos açúcares solúveis do espaço apoplástico dos colmos de cana-de-açúcar.....	66
4.18 Extração dos açúcares solúveis do simplasto dos colmos de cana-de-açúcar.....	66
4.19 Determinação dos açúcares do colmo de cana-de-açúcar.....	67

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1 Análise do conteúdo de açúcares solúveis do colmo de cana-de-açúcar.....	69
5.2 Análise do transcrito da cana-de-açúcar.....	73
5.2.1 PCR quantitativo (qPCR).....	73
5.2.2 Escolha do gene de referência.....	74
5.2.3 qPCR dos genes das enzimas envolvidas no metabolismo da sacarose nos internós de cana-de-açúcar.....	75
5.2.4 Comparação da expressão dos transcritos das enzimas dos internós maduros de colmo de cana-de-açúcar.....	90
5.3 Proteoma comparativo entre os internós maduros de colmos de cana-de-açúcar com 7 e 10 meses de idade.....	100
5.3.1 Extração das proteínas.....	101
5.3.2 Géis bi-dimensionais de poliacrilamida (2D-PAGE) dos internós maduros (I9) de 7 e 10 meses de idade.....	102
5.3.3 Análise das imagens dos géis 2D-PAGE.....	103
5.3.4 Busca das proteínas nos banco de dados.....	105
5.3.5 Categorias funcionais das proteínas identificadas dos internós maduros (I9) de colmo de cana-de-açúcar.....	106
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
REFERÊNCIAS.....	139
ANEXOS.....	155

Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

