

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPARAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA  
DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTES E  
SENSÍVEIS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**Fabiana Aparecida Rodrigues**

Bióloga

**JABOTICABAL – SP - BRASIL  
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**COMPARAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA**  
**DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTES E**  
**SENSÍVEIS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA**

**Fabiana Aparecida Rodrigues**

**Orientadora: Profa. Dra. Sonia Marli Zingaretti**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas).

**JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL**  
Julho de 2008

## DADOS CURRICULARES DO AUTOR

**FABIANA APARECIDA RODRIGUES** – nascida em 15 de setembro de 1978, na cidade de Três Lagoas – MS, filha de Leônidas Rodrigues e Aparecida de Paiva Rodrigues. Formou-se bióloga pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – Campus de Três Lagoas, em maio de 2002. Durante o curso de graduação trabalhou na área de físico-químico-orgânico sob orientação da profa. Dra. Célia Maria. Em 2004 concluiu o Mestrado em Agronomia – área de Genética e Melhoramento de Plantas pela Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal - SP e, em seguida ingressou no curso de Doutorado da referida faculdade.

Já não sei mas quem sou...Não mais me pertenço.  
Sou parte de vocês ... e parte de vocês está em mim.  
Me confundo.  
A vontade de ser  
A necessidade de ter  
O desejo de estar  
De quem é?  
Das histórias que contamos, quem de nós viveu?  
Das coisas que não foram ditas, quem se calou?  
Meu caminhar é mesmo meu, ou sigo apenas os passos teus?  
- Diz que é meu, então de quem serei eu?  
Já não sei (mais) quem sou...  
Quem de nós (não) teve medo de se perder?  
Quem quebrou o silêncio?  
A verdade, quem disse?  
O medo do escuro, é mesmo meu?  
Aquela mania é minha ou é sua?  
Era meu ou seu o desejo de ser um balão?  
Essa cor é mesmo a minha?  
- Também é meu o desejo de que nossos sonhos não se percam...  
Já não sei quem sou  
Quem de nós chorou ao final do filme  
Aquele livro, quem leu?  
O poema, quem escreveu: fui eu ou você?  
As mãos na parede, são minhas ou suas?  
Seu lado lúdico, sou eu?  
Minha alma, você a tem?  
São meus os teus sonhos?  
- Acho que você ainda vai fazer dos nossos momentos uma canção...  
Já não sei quem sou.  
De quem era o aperto no peito?  
O pesadelo, quem o teve: eu ou você?  
Sua dor, sou eu quem carrega ou é você quem alivia o meu sofrer?  
E quando rimos, quem (sor)ri primeiro?  
E essa alegria é minha ou é sua?  
- Eu também queria ser um pouco de mim e um pouco de você.  
Já não sei quem sou.  
Quem primeiro atravessou o rio?  
Quem apagou o último cigarro?  
As flores, quem plantou?  
Sou eu ou é você quem gosta de enrolar os cachinhos do cabelo?  
Quem de nós gostaria de ser um garoto pra subir o morro?  
Quem de nós acha que é uma menina super poderosa?  
Quem de nós pensava ser como o Rambo?  
Os nossos dias serão pra sempre...  
Já não sei mais quem sou.  
Porque sou parte de vocês...e vocês tem o melhor de mim  
E quando estão comigo me sinto em paz.  
E sou feliz.

*À minha mãe Aparecida de Paiva Rodrigues, pelo amor incondicional,  
dedicação e incentivo! Mãe, você é um exemplo de mulher forte e corajosa que  
tenho em minha vida!!*

*Ofereço,*

*Ao meu irmão Sérgio, minhas irmãs Márcia e Solange, minha cunhada Luzia,  
meu cunhado Paulo, e meus sobrinhos, pelo carinho e apoio proporcionado  
Amada família, o bem mais valioso que possuo.*

*Com amor*

*Especialmente à meu pai, Leônidas Rodrigues, que foi um exemplo de luta e  
perseverança e me mostrou que nunca devemos desistir da vida, dos sonhos e dos  
obstáculos a serem vencidos!.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

A Profa Dra. Sonia Marli Zingaretti, pela orientação.

A Profa. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela amizade e serenidade de seus conselhos.

Aos professores, Dra. Janete Aparecida Desidério Senna, Dra. Eliana G. M. Lemos Dr. Júlio Cezar F. de Oliveira e Dr. Mozart A. Marins, pela participação de minha banca examinadora, que contribuiu para o enriquecimento de meu trabalho.

A. Dra. Janete A. Desidério pela participação no exame de qualificação e pela amizade. Sempre gentil com todos.

A Dra. Eliana G. M. Lemos, pelo uso do aparelho de PCR quantitativo e pelas sugestões para a tese.

Aos professores, Dra. Ana Lúcia Fachin, Dra. Poliana F. Giachetto, Dra. Janete A. Desiderio Sena, Dr. Manoel Victor F. Lemos, pela participação no exame de qualificação e sugestões para o artigo.

Ao Dr. Marcelo Luis de Laia, pela colaboração nas análises estatísticas e elaboração dos manuscritos.

Ao Prof. Dr. Antonio Galbiati, do departamento de Engenharia Rural, pela ajuda e orientação dispensada durante a condução do experimento.

A Profa. Maria Cristina Roque, do departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos – FMRP/USP, pela disponibilização do aparelho Phosphorimager Fla3000-G.

A todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A minha família pelo apoio incondicional.

Ao meu querido amigo Fabrício Delite, companheiro incondicional de todas as horas. Minha melhor “metade”.

A minha querida amiga Juliana Trannin, singular poetisa que homenageio na epígrafe de minha tese. Mesmo distante, estaremos sempre juntas.

A dois amigos especiais que foram muito importantes nesta etapa da minha vida: Marcelo Marchi e José Perez. Dois anjos que Deus colocou no meu caminho. Muito obrigada!

A minha querida amiga Karina Dabbas, sempre afetuosa e solícita.

A minha querida amiga Marilza Mota, pela amizade sincera e companheirismo no dia-a-dia da labuta.

Aos meus amigos, Dani, Flávia, Rê, Jú, Ângela, Gi, Thatá, Wander, Rachel, Valteir, Diego, Mariza, Tonhão, Léo, André. Sentirei saudades.

A meu amigo Fafá (Fabrício Edgar), pela amizade, generosidade e ajuda nos momentos “meu computador pirou”. Você é uma pessoa iluminada!

A minha amiga Aurora Cardozzo, minha professora de espanhol (e terapeuta!), sempre me incentivando nos momentos “adversos”. Obrigada por suas generosas palavras.

A todos os amigos do LBM e BCCCenter, sempre carinhosos.

Aos professores e colegas da pós-graduação, estagiários, técnicos e funcionários.

Ao MsC. René de Sordi (COPERSUCAR), pelas orientações e doação dos toletes de cana-de-açúcar.

A FAPESP, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS .....	xii
RESUMO.....	xiv
SUMMARY .....	xv
I. INTRODUÇÃO .....	1
II REVISÃO DE LITERATURA .....	4
2.1. A cana-de-açúcar.....	4
2.2. A deficiência hídrica.....	9
2.3. Os macroarranjos de DNA.....	14
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Cultivo das plantas e tratamento experimental .....	17
3.2. Confecção das membranas de alta densidade.....	18
3.3. Extração do RNA total .....	18
3.3.1. Análise do RNA total .....	19
3.4. Síntese da sonda de cDNA.....	19
3.5. Hibridização e lavagem das membranas de macroarranjos .....	20
3.6. Aquisição das imagens e análise estatística dos dados .....	21
3.7. Validação dos resultados por PCR quantitativo .....	22
IV. RESULTADOS.....	25
4.1. Status hídrico da planta .....	25
4.2. Identificação dos genes diferencialmente expressos nos cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível).....	26
4.3. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível) .....	45
4.4. Validação dos resultados através de análises de PCR quantitativo .....	47
V. DISCUSSÃO.....	51



5.1. Identificação de genes diferencialmente expressos.....	51
5.2. Classificação funcional dos genes identificados nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1368 (sensível).....	52
5.3. Perfil de expressão dos genes induzidos e reprimidos em resposta ao déficit hídrico.....	55
VI. CONCLUSÕES.....	62
VII. REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A.....	79
APÊNDICE B.....	80
APÊNDICE C.....	81
APÊNDICE D.....	82
APÊNDICE E.....	83
APÊNDICE F.....	88
APÊNDICE G.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS

	Página
ABA: Ácido abscísico -----	1
EST: “Expressed sequence tag” (etiqueta de seqüência expressa) -----	2
°C: Graus Celsius -----	17
µl: microlitro(s) -----	18
DMSO: “Dimethyl Sulfoxide” (dimetil sulfóxido) -----	18
g: grama(s) -----	18
M: Molar -----	18
mM: milimolar -----	19
v/v: volume (ml)/volume (ml) -----	19
m/v: massa (g)/volume (ml) -----	19
EDTA: “Ethylenediaminetetracetic acid” (ácido etilenodiamino tetra-acético) -----	19
U: unidade(s) de enzima(s) -----	19
µg: micrograma(s) -----	19
µM: micromolar -----	19
DTT: “dithiothreitol” -----	19
BSA: “Bovine Serum Albumin” -----	20
SDS: “Sodium Dodecyl Sulfate” -----	20
LTP: “lipid transfer protein” (proteína de transferência de lipídios) -----	23
SAMDC: “S-adenosilmetionina descarboxilase” -----	23
WIP: “wound-induced protein” (proteína induzida pelo ferimento) -----	23
HPS: “Heat shock protein” (proteínas de choque térmico) -----	33

**LISTA DE FIGURAS**

	Página
Figura 1. Conteúdo de umidade relativa do solo. -----	26
Figura 2. Perfil de expressão gênica das cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível). -----	28
Figura 3. Diagrama de Venn. O diagrama apresenta os números de genes diferencialmente expressos na cultivar SP90-1638 (sensível) que foram exclusivos e comuns entre diferentes condições analisadas. -----	29
Figura 4. Diagrama de Venn. O diagrama apresenta o conjunto de genes expressos em comum nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível) e os respectivos genes exclusivos para cada cultivar. -----	41
Figura 5. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível). -----	46
Figura 6. Validação dos resultados dos macroarranjos por PCR quantitativo. -----	49
Figura 7. Correlação linear dos experimentos de expressão gênica. -----	50
Figura 1B. Análise do RNA total em gel desnaturante de agarose 1,5%. -----	80
Figura 2B. A análise espectrofotométrica do RNA total. -----	80
Figura 1C: Imagem digitalizada de membranas de náilon (8,5 x 12,5 cm) contendo 3.575 ESTs, em duplicata, de folhas de cana-de-açúcar.-----	81

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1. Genes utilizados nos experimentos de PCR quantitativo. -----	23
Tabela 2. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob diferentes condições de déficit hídrico na cultivar SP90-1638 (sensível). -----	31
Tabela 3. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP83-5073 (tolerante) envolvidos no metabolismo de resposta ao estresse. -----	34
Tabela 4. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos com o metabolismo de proteínas. -----	35
Tabela 5. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos nos processos de bioenergética e metabolismo de fotossíntese. -----	37
Tabela 6. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos no metabolismo de lipídios. -----	38
Tabela 7. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos no metabolismo de resposta ao estresse. -----	40

Tabela 8. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo que apresentaram um padrão de expressão antagonístico entre as cultivares SP83-5073 (tolerante) SP90-1638 (sensível). -----	43
Tabela 1A: Solução de Hoagland utilizada na irrigação das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em casa de vegetação. -----	79
Tabela 1D. Seqüências dos óligos usados nas análises de PCR quantitativo. -----	82
Tabela 1E. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP83-5073 (tolerante). -----	83
Tabela 1F. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível). -----	88
Tabela 1G. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível). -----	101

## COMPARAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA DE PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTES E SENSÍVEIS À DEFICIÊNCIA HÍDRICA

**RESUMO.** A seca é o principal estresse abiótico que afeta a produtividade das plantas. Para detectar os genes expressos sob condições de deficiência hídrica foi desenvolvido um estudo de expressão gênica usando plantas de cana-de-açúcar tolerantes (cv. SP83-5073) e sensíveis (cv. SP90-1638) à seca. A metodologia de macroarranjos de DNA foi empregada para monitorar a expressão gênica de 3.575 clones de folhas de cana-de-açúcar e os resultados foram confirmados por PCR quantitativo. Na cultivar tolerante 165 genes foram identificados em resposta ao déficit hídrico severo, em contraste à cultivar sensível, na qual um maior número de genes (n = 432) foi diferencialmente expresso ao longo do tratamento de deficiência hídrica. A cultivar tolerante ativou um menor número de genes em função do déficit hídrico aplicado. No entanto, 94% destes genes foram induzidos, enquanto na cultivar sensível 45% dos genes diferencialmente expressos foram reprimidos sob condições de deficiência hídrica. Comparando os perfis de expressão identificados em cada planta verifica-se que aproximadamente 55% dos genes expressos na cultivar tolerante também foram comuns à cultivar sensível, a maioria exibindo um perfil de expressão muito similar entre os genes induzidos. A classificação funcional dos genes foi realizada com base no papel exercido pela proteína no metabolismo celular, e mostrou que importantes vias metabólicas relacionadas ao déficit hídrico foram reprimidas na resposta das plantas sensíveis à seca. Além disso, 50% dos transcritos identificados em cada cultivar representam novos genes, os quais não estão descritos nos bancos de dados ou cuja função ainda não foi caracterizada.

**Palavras-chave:** déficit hídrico, transcriptoma, macroarranjos de DNA.

## COMPARISON OF GENE EXPRESSION PATTERN FOR DROUGHT-TOLERANT AND DROUGHT-SENSITIVE SUGARCANE PLANTS

**SUMMARY.** Drought is a major abiotic stress that affects the plant productivity. To detect expressed genes under drought conditions, a gene expression study using tolerant (SP83-5073) and sensitive (SP90-1638) sugarcane plants was performed. Macroarray methodology was used to monitor the gene expression profile of the 3,575 cDNA clones from sugarcane leaves and the results were confirmed by real time PCR analysis. For the tolerant cultivar 165 genes were identified in response to severe water stress, contrasting with sensitive cultivar, in which a higher number of genes ( $n = 432$ ) were responsive to the stress-treatment. Tolerant cultivar expressed a few genes in stress conditions. However 94% of them were induced, while for sensitive cultivar 45% of the differentially expressed genes were down-regulated under water stress conditions. Comparing the gene expression profiles identified in each cultivar, it is possible to verify that 55% of the expressed genes in tolerant cultivar were also observed in sensitive cultivar, the majority showing a very similar gene expression pattern. Functional gene classification was performed according to roles in cellular metabolism, and showed that important drought-pathways were repressed in sensitive plants response. Besides, 50% of the identified transcripts in each cultivar represent novel genes, which were not described in databases or whose functions were not characterized yet.

**Keywords:** water deficit, transcriptome, macroarray.

## I. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) tem uma grande importância econômica devido a sua aplicação industrial, mas principalmente na produção de etanol, um biocombustível renovável que está sendo apontado como uma alternativa ao uso do petróleo, pois pode reduzir a emissão dos gases de efeito estufa, poluidores do ambiente, e conseqüentemente o aquecimento global (FULTON 2007). O potencial bioenergético desta cultura envolve a geração de biocombustíveis líquidos e energia elétrica a partir de um sistema de produção auto-suficiente (MENOSSI et al. 2008). Altamente produtiva nas áreas tropicais e subtropicais do mundo, esta cultura está sujeita a ação de condições ambientais adversas que afetam o seu crescimento e desenvolvimento (INMAN-BAMBER & SMITH 2005).

A deficiência hídrica é a condição ambiental mais limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas. As limitações que o déficit hídrico causa nas plantas têm sido investigadas em diferentes culturas, como arroz, milho, feijão e uva (RABBANI et al. 2003; ZHUANG et al. 2007; MICHELETTO et al. 2007; CRAMER et al. 2007). Plantas sob condições de déficit hídrico desenvolvem modificações morfológicas e fisiológicas como uma resposta imediata para a sua proteção contra a dessecação. A síntese de moléculas osmoprotetoras, proteínas de defesa, entre outras envolvidas no transporte de água também são características de um metabolismo celular cuja disponibilidade de água é limitada. As modificações bioquímicas e moleculares provenientes da deficiência hídrica resultam numa complexa rede de sinalização celular que envolve a indução e repressão de vários genes. Hormônios vegetais como o ácido abscísico (ABA) tem uma importante função na proteção das plantas contra o déficit hídrico, atuando no fechamento estomatal e no processo de sinalização e regulação gênica (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007). Os prejuízos que ocorrem com o baixo rendimento das culturas em secas prolongadas são bastante significativos. Perdas de até 85% na produtividade associadas com o estresse abiótico já foram observadas em culturas como milho, trigo, soja e aveia. Em cana-de-açúcar, os danos



causados pela deficiência hídrica são mais expressivos principalmente no estágio inicial do desenvolvimento da planta.

Os melhoristas de plantas buscam entender o processo de tolerância ao déficit hídrico para manipular a variabilidade genética no desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca. Assim, o uso de técnicas moleculares, como os macroarranjos de DNA, representa uma valiosa ferramenta para a identificação de genes envolvidos nas respostas das plantas ao déficit hídrico (CASU et al. 2005). A aplicação desta metodologia foi utilizada na comparação de genótipos de feijão com diferentes níveis de tolerância ao déficit hídrico para identificar novos mecanismos de aclimação à seca (MICHELETTO et al. 2007; RAMPINO et al. 2006), analisar o metabolismo de detoxificação (TÜRKAN et al. 2005) e na atividade de proteases envolvidas na resposta à seca (HIENG et al. 2004). O padrão de expressão gênica detectado nas raízes de feijão submetidas à seca foi consistente com as modificações morfológicas e fisiológicas observadas nas plantas tolerantes e sensíveis (MICHELETTO et al. 2007). As plantas tolerantes também exibiram um melhor mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo quando comparadas às plantas sensíveis, induzindo a atividade de enzimas do sistema antioxidante e acumulando osmoprotetantes (TÜRKAN et al. 2005).

Com o advento das coleções de Etiquetas de Seqüências Expressas (ESTs), os estudos de expressão gênica tornaram-se muito importantes na prospecção de genes que atuam diretamente na proteção contra o estresse, transdução de sinal e regulação da expressão gênica (SEKI et al. 2002). Devido a complexidade do genoma de cana-de-açúcar, as coleções de ESTs têm favorecido as pesquisas sobre esta cultura e possibilitado a identificação de genes e sua análise funcional (MENOSSI et al. 2008). Neste contexto, o projeto SUCEST (SUGARCANE TRANSCRIPTOME: A LANDMARK IN PLANT GENOMICS IN THE TROPICS, 2001) foi muito importante no estudo do transcriptoma da cana-de-açúcar sequenciando aproximadamente 238.000 clones de diferentes tecidos e cultivares (VETTORE et al. 2001) e viabilizando estudos de expressão gênica relacionados à tolerância a estresses bióticos e abióticos e de genes envolvidos na transcrição e transdução de sinal, e no metabolismo de sacarose.

As perspectivas para as condições climáticas têm potencializado a necessidade de culturas aclimatadas às condições ambientais adversas. Nesse contexto, o estudo do transcriptoma de cultivares de cana-de-açúcar que apresentam diferentes comportamentos em eventos de seca é muito importante para a prospecção de genes envolvidos no processo de tolerância à seca. Nosso grupo de pesquisa tem investigado as respostas de defesa das plantas de cana-de-açúcar ao déficit hídrico, utilizando cultivares com diferentes níveis de tolerância à seca (RODRIGUES, 2004). A comparação de genótipos tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico pode mostrar diferenças significativas no padrão de expressão de vários de genes, e assim auxiliar a compreensão dos mecanismos de tolerância à seca. Além disso, muitos genes que são identificados nestes estudos não estão representados nos bancos de dados, e conseqüentemente preservam informações ainda desconhecidas que podem ser importantes no estudo da interação entre a expressão gênica e os processos fisiológicos envolvidos na adaptação das plantas à seca. O presente estudo teve por objetivo identificar genes diferencialmente expressos em condições de deficiência hídrica em plantas de cana-de-açúcar consideradas tolerantes e sensíveis à seca. Para monitorar a expressão gênica do tecido foliar, os 3.575 ESTs das bibliotecas de folhas geradas pelo projeto SUCEST foram utilizados em experimentos de macroarranjos de DNA. Para analisar as diferenças e similaridades dos mecanismos de proteção ao déficit hídrico entre genótipos contrastantes, o perfil de expressão gênica diferencial obtido para cada cultivar foi comparado.

## II REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. A cana-de-açúcar

A história da cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) no mundo, segundo a tese da maioria dos historiadores, se origina possivelmente na Papua Nova Guiné. Embora não seja possível definir com exatidão sua origem geográfica, há um consenso entre os especialistas sobre o surgimento da planta no continente asiático. Posteriormente a planta foi introduzida na China, onde o açúcar cru já era produzido, e então foi disseminada para a Índia, Egito, Marrocos, sul da Espanha, até chegar na Ilha da Madeira, Ilhas Canárias, Cabo Verde e Açores. A partir da implementação da cana-de-açúcar na Índia o açúcar começou a ser comercializado. O produto era então considerado um artigo luxuoso, o que lhe agregava muito valor como moeda de troca entre os povos. Segundo relatos dos povos hindus, para a produção do 'açúcar' o colmo da planta era esmagado e fervido, o que resultava no melaço da cana-de-açúcar. A adoção do cultivo da planta pelos árabes possibilitou a grande expansão da comercialização do açúcar, entretanto, o preço exorbitante que eram imposto desencadeou um interesse imediato dos europeus pelo cultivo da planta. (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008a).

No Brasil, a cana-de-açúcar foi introduzida com sucesso pelos portugueses por volta de 1532, sendo considerada a primeira atividade agrícola do país, que logo se tornou o maior produtor de açúcar do mundo. À medida que o interesse pelo principal produto da cana-de-açúcar aumentava, técnicas de produção mais eficientes eram desenvolvidas. O domínio lusitano do mercado de açúcar influenciou os investimentos da Espanha na produção da cana-de-açúcar em Cuba, a qual passou a concorrer diretamente com o Brasil. Paralelamente, a Inglaterra também aplicava recursos para a produção da cultura na Jamaica, Antilhas e Barbados, cujas inovações tecnológicas, como o uso do bagaço como fonte comburente, foram essenciais para o sucesso da

produção e consolidaram a Inglaterra como um próspero concorrente no mercado mundial de açúcar (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008a).

Posteriormente, a produção de açúcar a partir de beterraba tornou-se prevacente na Europa em detrimento ao uso do açúcar de cana-de-açúcar, devido a questões políticas que dificultavam a importação do produto. Nesse contexto, Cuba assumiu a liderança do mercado, e o Brasil, que ainda utilizava técnicas de produção ultrapassadas, foi sobrepujado por outros países e perdeu sua colocação no mercado mundial como grande produtor de açúcar. Entretanto, a substituição do modelo de produção por tecnologias automatizadas, como a adoção do processo de centrifugação em usinas, possibilitou obter um maior rendimento com a produtividade da cultura. Em meados dos anos 70, impulsionados pela crise do abastecimento mundial de petróleo, o Brasil passa a investir na produção de álcool combustível (JORNAL DA CANA, 2008).

Atualmente esta cultura é muito importante para a economia de muitos países nos trópicos, principalmente para o Brasil, consolidado como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. O Brasil emprega uma área de sete milhões de hectares com o cultivo desta cultura, o qual equivale a aproximadamente 2% das áreas cultiváveis do país. Aproximadamente 86% da produção está concentrada na região centro-sul, sendo o principal produto do agronegócio do estado de São Paulo, a região mais produtora do país, e o restante da produção está distribuída na região norte-nordeste, o que permite manter dois períodos de safra. Na safra de 2007/08 foram colhidos 431,2 milhões de toneladas, com uma estimativa de 16% de aumento para a safra futura. Além da importância econômica, o caráter social também é muito significativo, pois o trato desta cultura emprega cerca de 1.000.000 empregos diretos e indiretos nas 350 indústrias de açúcar e álcool de todo o Brasil (BRASIL, 2007).

Sua atividade agrícola é potencialmente lucrativa principalmente pela aplicação na produção do álcool. O país foi pioneiro no desenvolvimento do etanol, um biocombustível renovável e menos poluente que o petróleo, com maior sustentabilidade de produção e mitigação das emissões de gases de efeito estufa. Na safra de 2007/08 cerca de 53% do total da matéria bruta foi destinada à produção de álcool, a qual atingiu os 24,3 bilhões de litros, destes 16,6 bilhões sendo o álcool hidratado, e o

restante da produção representando o álcool anidro. Estes são aplicados no abastecimento de combustíveis e ainda destinados à indústria química, alimentícia e farmacêutica, num sistema de produção energeticamente auto-suficiente, o que vem despertando o interesse de vários países. O Brasil é ainda o maior produtor e exportador de açúcar proveniente da cana-de-açúcar (cerca de 47% do total de cana crua colhida), obtendo uma produção de 26,2 milhões de toneladas a partir da última safra (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008b).

Além dos produtos principais como açúcar e álcool, o processamento da cana-de-açúcar também gera subprodutos como a garapa, o melado e a rapadura, utilizados na alimentação humana e o bagaço que pode ser aproveitado na fabricação de papel, ou ainda usado na produção de adubos, assim como o vinhoto ou vinhaça (THIAGO & VIEIRA 2002). O bagaço gerado após o processamento representa aproximadamente 30% da cana moída e pode ser utilizado como combustível nas caldeiras em substituição ao petróleo. A energia produzida permite que o processamento seja auto-suficiente e os excedentes podem ser exportáveis, o que mostra o grande potencial bioenergético da cultura. Nesse contexto, os investimentos em produção e logística, e no desenvolvimento de cultivares mais resistentes a pragas e doenças e adaptadas às adversidades do clima são fundamentais para manter a posição do país como maior produtor de cana-de-açúcar num mercado cada vez mais competitivo (CENBIO, 2008).

Esta gramínea da família Poaceae se desenvolve em touceiras de aproximadamente três metros de altura e apresenta o caule do tipo colmo, segmentado em nós, regiões meristemáticas onde pode ocorrer o enraizamento, e entrenós visíveis nos quais ocorre o armazenamento de sacarose. As folhas lanceoladas que partem dos nós são longas, simples, alternadas e possuem uma venação central e bordas serreadas por pêlos. A formação de flores não é usual no cultivo da cana-de-açúcar, para evitar a translocação dos compostos orgânicos, entretanto, durante a fase reprodutiva desta planta há a formação de uma panícula terminal constituída de flores completas, pequenas e hermafroditas que produzem cariopses com formato elíptico e alongado (CASAGRANDE 1991).

Durante o crescimento vegetativo é necessário uma condição climática quente, e a disponibilidade de água é fundamental para se obter o rendimento máximo do crescimento do vegetal. Seguidamente, durante o período de maturação uma condição seca e fria favorece o acúmulo de sacarose em detrimento ao crescimento vegetativo. Após a maturação, o teor de açúcar observado representa aproximadamente um terço da matéria seca dos colmos. Entretanto, uma situação de déficit hídrico durante a fase vegetativa destas plantas torna-se prejudicial ao seu crescimento, e, por conseguinte desfavorável ao acúmulo de açúcar no colmo (INMAN-BAMBER & SMITH 2005).

No Brasil, o projeto SUCEST foi o pioneiro no estudo do transcriptoma de cana-de-açúcar produzindo aproximadamente 238.000 clones com cDNAs provenientes de diferentes tecidos. A produção em larga escala dos ESTs provenientes de plantas crescidas em condições de campo, *in vitro* ou infectadas com diazotróficos endofíticos, possibilitou a identificação de genes envolvidos em diferentes processos celulares (VETTORE et al. 2001). Vários estudos foram realizados a partir dos resultados do projeto SUCEST e organizados numa edição especial da revista "Genetics and Molecular Biology" (SUGARCANE TRANSCRIPTOME: A LANDMARK IN PLANT GENOMICS IN THE TROPICS 2001). Outros trabalhos também relatam a produção de ESTs de cana-de-açúcar e descrevem grupos de genes expressos em tecidos e condições específicas do desenvolvimento da planta (CARSON & BOTHA 2000, 2002; CARSON et al. 2002; CASU et al. 2003) e também envolvidos com o acúmulo de sacarose (CARSON et al., 2002; CASU et al., 2003; Ma et al. 2004).

A pesquisa brasileira do transcriptoma da cana-de-açúcar possibilitou diferentes estudos funcionais que analisaram nesta cultura os tratamentos de estresse por frio (NOGUEIRA et al. 2003), estresse oxidativo (KURAMA et al. 2002) e aplicação exógena de etanol (CAMARGO et al. 2007). Genes regulados por metil-jasmonato foram identificados por DE ROSA et al. (2005), assim como genes relacionados a transdução de sinal (PAPINI-TERZI et al. 2005; ROCHA et al. 2007). O estresse biótico também foi objeto de estudo para a busca de genes de resistência a insetos (BARSALOBRES-CAVALARI et al. 2006), a *Xanthomonas albilineans*, causadora da escaaldadura da folha

(DABBAS et al. 2006), e a *Leifsonia xyli* subs. *xyli*, agente etiológico do raquitismo de soqueira (FERRO et al. 2007).

A identificação e caracterização dos genes envolvidos no processo de tolerância das plantas torna-se uma fonte de informação fundamental na compreensão dos efeitos do déficit hídrico na planta, dos mecanismos de percepção e respostas desencadeadas pela planta para sua proteção. Como a produção agrícola é diretamente influenciada pela seca, fato que tem sido agravado pelo aumento do aquecimento global, os programas de melhoramento genético buscam o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes, e para isso a biologia molecular tornou-se uma ferramenta importante na detecção de variabilidade genética (PASSIOURA 2007). O melhoramento convencional de uma cultura geralmente envolve anos até a liberação da cultivar melhorada, que ainda pode não conter todas as características de interesse. A aplicação das técnicas moleculares, como a transformação genética, pode minimizar consideravelmente o tempo dedicado ao melhoramento, assim como aumentar a eficiência do processo, modificando de forma direcionada apenas a característica de interesse (LISSON et al. 2005). O potencial biotecnológico para a cultura da cana-de-açúcar foi discutido por LAKSHMANAN et al. (2005) e GRESSEL (2008). Segundo estes autores, com as perspectivas para a demanda de fontes de energia limpa e renovável, o desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas será imperativo para aumentar a produtividade de culturas, que, assim como a cana-de-açúcar, são utilizadas na produção de biocombustíveis.

De acordo com os dados atuais de produtividade no país, o cultivo da cana-de-açúcar está em ampla expansão, com uma estimativa de aumento para a área plantada de 3 milhões de hectares e aproximadamente 250 milhões de toneladas de cana crua colhida no prazo de três anos. A infra-estrutura que possibilitará tal crescimento já está sendo implementada em regiões como no oeste do Estado de São Paulo, no sudoeste de Minas Gerais, além dos estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, utilizando novas áreas para o cultivo, ou áreas que subsistiam outras culturas (UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR, 2008b). Algumas destas regiões, como por exemplo no Mato Grosso do Sul, possuem um solo mais ácido, além do clima mais

quente e seco devido ao longo período de estiagem durante o ano. Como a seca é um fator ambiental inerente a todas as plantas, a produtividade da cultura pode ser significativamente comprometida, reforçando a necessidade do uso de cultivares adaptadas. Assim, a busca por cultivares mais tolerantes, que sejam capazes de suportar períodos prolongados de estiagem torna-se imprescindível à manutenção e ou expansão da atual produção de cana-de-açúcar, mantendo o crescimento da demanda e a competitividade do etanol como biocombustível.

## **2.2. A deficiência hídrica**

A plantas estão expostas a diferentes estímulos ambientais que podem ser danosos ao seu crescimento e desenvolvimento. Nesse contexto, a seca é o principal estresse que pode limitar a produtividade das plantas, pois a falta de água afeta diretamente o crescimento celular e conseqüentemente o rendimento econômico da cultura (INMAN-BAMBER & SMITH 2005). A terminologia 'estresse' pode ser definida como um desvio das condições adequadas para o crescimento e desenvolvimento da planta, e o 'estresse hídrico' é muito utilizado para designar uma condição abiótica desvantajosa (LARCHER 2004). Geralmente este termo está relacionado à escassez de água ou eventos naturais de seca à qual a planta está sujeita. Entretanto, este conceito também pode estar relacionado ao estresse por excesso de água, que desencadeia na planta uma deficiência de oxigênio. Assim, o termo 'déficit hídrico' torna-se mais adequado para uma referência ao estresse por falta de água (LOCY et al. 2006).

Longos períodos de seca podem ser suportados por determinadas plantas. A habilidade para manter o crescimento e desenvolvimento sob condições escassas de água é considerada como uma característica de resistência ou tolerância ao déficit hídrico. Entretanto, esta primeira terminologia está relacionada ao evento de adaptação ao estresse, o qual envolve mecanismos genéticos ao longo de anos de seleção natural (LOCY et al. 2006). Assim, tal termo não seria devidamente apropriado para conceituar plantas cuja aptidão para enfrentar condições ambientais adversas é devido à



exposição prévia ao estresse. Nesse contexto, as plantas sofrem um processo de aclimatação, no qual podem aumentar sua tolerância ao estresse à medida que são expostas ao mesmo (LARCHER 2004).

Além de limitar a produtividade vegetal, a seca também restringe as áreas agriculturáveis. Sob condições de deficiência hídrica determinadas plantas podem retardar os efeitos do estresse consumindo moderadamente a água disponível no solo (LISSON et al. 2005). O nível de tolerância à deficiência hídrica, exibido pela planta pode ser, a princípio, avaliado através de análises de crescimento da planta ou de produtividade da cultura em condições de seca. A tolerância à seca é um processo complexo que varia de acordo com a severidade do estresse, o estágio de desenvolvimento da planta e a eficiência do uso de água pela planta, além de envolver a ação de outros estresses que podem ocorrer simultaneamente no ambiente (CHINNUSAMY et al. 2004).

A deficiência hídrica nas plantas desencadeia a perda de estabilidade das funções vitais, como a integridade das proteínas estruturais, a diminuição da fotossíntese, que reduz a produção dos fotoassimilados e conseqüentemente de energia e ainda pode susceptibilizá-la à ação de agentes patogênicos (LARCHER 2004). Dependendo do grau de severidade da deficiência hídrica os efeitos causados podem ser fisiologicamente medidos ou morfológicamente observados. A diminuição da turgescência é diretamente proporcional à diminuição do crescimento celular. A dinâmica dos processos celulares torna-se limitada e a degradação protéica pode ser relacionada com a redução do metabolismo de aminoácidos. Paralelamente ao fechamento dos estômatos, que permite à planta reduzir a perda de água pela transpiração, ocorre o aumento da síntese de ABA (RACHMILEVITCH et al. 2006). O aumento da concentração endógena deste regulador do crescimento vegetal está relacionado ao seu efeito protetor na célula vegetal durante eventos de deficiência hídrica, que também irá atuar na sinalização celular e ainda na regulação da expressão de determinados genes induzidos sob condições de déficit hídrico (NARUSAKA et al. 2003; RIERA et al. 2005; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007). O murchamento e enrolamento foliar são observados à medida que a severidade da

deficiência hídrica aumenta. De forma geral todos os processos vitais do organismo são afetados pela diminuição do conteúdo de água (ZHUANG et al. 2007).

As variações de temperatura influenciam a taxa de crescimento da cultura. Pequenas diferenças na temperatura ocasionaram significativas mudanças morfológicas e fisiológicas em *Arabidopsis* (SAMACH et al. 2005). Geralmente plantas sob condições limitadas de água também estão sujeitas à ação simultânea de outros fatores estressantes. Como a perda de calor através da evaporação diminui a temperatura foliar, o fechamento dos estômatos em função do déficit hídrico pode ocasionar o aumento da temperatura foliar e conseqüentemente o estresse térmico na planta, o qual também atua na inibição da fotossíntese, na perda de estabilidade de membrana e no aumento da respiração celular (BRAY et al. 2000; RIZHSKY et al. 2004). As proteínas de choque térmico protegem contra a desnaturação das enzimas e proteínas estruturais em células sob altas temperaturas, entretanto estas proteínas também podem ser induzidas em condições adversas como a deficiência hídrica (RIZHSKY et al. 2004; LOCY et al. 2006).

Todos os tecidos da planta são afetados pelo déficit hídrico, entretanto, a raiz é o primeiro órgão a detectar variações no conteúdo de água disponível no solo. Com a percepção da deficiência hídrica, as raízes podem sinalizar para o fechamento dos estômatos, cuja condutância estomática está diretamente relacionada com o status hídrico do solo (LOCY et al. 2006). Como resposta à deficiência hídrica, o crescimento da raiz primária é estimulado, possivelmente regulado pelo aumento do conteúdo de ABA, que também é relacionado na sinalização entre os tecidos (SHARP et al. 2004). A detecção precoce da deficiência hídrica e a transdução de sinal é uma etapa muito importante para a resposta da planta ao estímulo ambiental. Proteínas quinases, fosfatases e calmodulinas (GUO et al. 2002; YOSHIDA et al. 2006) estão diretamente envolvidas neste processo metabólico. Em resposta ao déficit hídrico, as plantas induzem modificações morfológicas, observadas na parte aérea da planta, e bioquímicas, para proteção contra a dessecação (RACHMILEVITCH et al. 2006). Assim, para a proteção contra os efeitos da deficiência hídrica, vários genes são induzidos: transcritos que codificam para proteínas osmoprotetoras, enzimas de detoxificação,

proteínas de transporte de água e proteínas de regulação, como os fatores de transcrição, proteínas quinases, fosfatases e fosfolipases, apresentaram sua expressão alterada, além de outros genes, cuja função celular ainda é desconhecida (GORANTLA et al. 2007; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007).

O monitoramento do perfil de expressão gênica em *Arabidopsis*, submetida a eventos simultâneos de seca, estresse por frio e alta salinidade foi descrito por SEKI et al. (2002), que identificaram grupos de genes expressos em todas as condições analisadas, evidenciando os mecanismos comuns de resposta a diferentes fatores de estresse que desencadeiam o mesmo efeito na planta. Estudos semelhantes realizados em trigo (ZHENG et al. 2006) e arroz (RABBANI et al. 2003) também identificaram novos genes envolvidos nas respostas das plantas aos estresses abióticos. Alguns genes, como por exemplo, aqueles que codificam as proteínas induzidas por seca (proteínas RD e ERD), foram expressos nas respostas destas plantas aos estresses por seca, alta salinidade e aplicação exógena de ABA. As modificações que o déficit hídrico e estresse salino causam na expressão dos genes foram comparadas em plantas de uva que se desenvolvem em regiões semi-áridas: a inibição do crescimento do caule, o número de transcritos com expressão alterada, os mecanismos de ajustamento osmótico, detoxificação e fotoinibição foram induzidos precocemente nas plantas submetidas ao déficit hídrico (CRAMER et al. 2007).

WAY et al. (2005) submeteram plantas de trigo a condições de déficit hídrico progressivo e observaram que genes relacionados ao metabolismo de fotossíntese foram reprimidos em função do tratamento aplicado. O perfil transcricional de plantas de cevada foi avaliado sob diferentes simulações de seca: usando o tratamento de 'choque de seca' (indução da deficiência hídrica em poucas horas), com a progressiva perda de água do solo e também após a re-hidratação. Os resultados mostraram que a maioria dos genes diferencialmente expressos foi afetada exclusivamente pelo tratamento de 'choque de seca', enquanto que uma menor parcela de genes se mostrou diferencialmente expresso em ambos tratamentos, sugerindo que diferentes respostas podem ser originadas pelas plantas de acordo com o grau de severidade que o estresse é imposto (TALAMÉ et al. 2007).

Os efeitos do déficit hídrico ainda foram avaliados em raízes (POROYKO et al. 2007) e tecidos reprodutivos de milho (ZHUANG et al. 2007). No estudo com raízes foi observado que as diferentes regiões de crescimento são influenciadas de diferentes maneiras pela seca, e que os genes expressos exercem funções distintas em cada região da raiz, como por exemplo, os genes do metabolismo de defesa prevalentes nas zonas de crescimento opostas ao ápice. De maneira semelhante, os mecanismos de resposta à deficiência hídrica foram diferentes em cada órgão reprodutivo analisado, apresentando apenas um pequeno conjunto de genes expressos em ambos tecidos, os quais estão envolvidos principalmente no metabolismo de açúcares, entre outros processos celulares.

A gramínea *Festuca mairei* pode servir como base de comparação para estudos de tolerância à deficiência hídrica em outras gramíneas devido sua adaptação xerofítica à seca. WANG & BUGHRARA (2007) monitoraram a expressão gênica desta planta em resposta ao déficit hídrico e verificaram que a maioria dos genes foi reprimida e relacionada à biogênese e metabolismo celular, enquanto os genes induzidos estão envolvidos com os processos de transcrição e defesa. Outros estudos compararam o nível de tolerância e sensibilidade ao déficit hídrico em culturas de feijão (HIENG et al. 2004; TÜRKAN et al. 2005; MICHELETTO et al. 2007) e genótipos contrastantes de trigo (RAMPINO *et al.*, 2006) e arroz (WANG et al. 2007). As plantas tolerantes de feijão apresentaram um mecanismo de defesa mais eficiente comparado às plantas sensíveis. Os genótipos tolerantes de trigo induziram transcritos para proteínas que estão envolvidas na retenção de água, as quais não foram observadas nas plantas sensíveis, e a análise dos cultivares de arroz mostrou que nas plantas tolerantes os genes fortemente induzidos foram relacionados ao processo de transcrição, detoxificação e manutenção do turgor celular, enquanto que nas sensíveis foram observados genes atuando na degradação dos componentes celulares. Em culturas de girassol genes diferencialmente expressos em condições de déficit hídrico também apresentaram um padrão de expressão antagônico nas plantas tolerantes e sensíveis, o qual parece estar mais associado às modificações qualitativas da expressão gênica (ROCHE et al. 2007).

Apesar da complexidade genética dessa planta poliplóide, a aplicação da transformação genética têm sido descrita no melhoramento agrônomo. Plantas de cana-de-açúcar foram geneticamente transformadas para o aumento da síntese de prolina e mostraram que o efeito deste osmoprotetor nas plantas transgênicas submetidas à seca foi mais significativo para o sistema de defesa antioxidante que sua atuação no ajustamento osmótico (MOLINARI et al. 2007). A expressão constitutiva de um gene envolvido no metabolismo de etileno em plantas de tabaco não ocasionou modificações fenotípicas, mas promoveu o aumento da tolerância à seca e ao estresse salino (TRUJILLO et al. 2008). A quantidade de sacarose acumulada aumentou significativamente em tecidos imaturos de cana-de-açúcar transgênica, que foram modificadas para a repressão de um gene negativamente relacionado ao metabolismo bioenergético (GROENEWALD & BOTHA 2008).

### **2.3. Os macroarranjos de DNA**

Os estudos de expressão gênica foram favorecidos com os avanços na área de genômica e sequenciamento de genes. Métodos de estudos que permitem avaliar a concentração relativa do transcrito de um determinado gene, como a técnica de “Northern blot” ou “Dot blot”, foram suplantados por outros métodos como os macroarranjos de DNA, que possibilitam uma análise prospectiva de milhares de genes simultaneamente. O padrão de expressão gênica pode ser caracterizado em diferentes tecidos, sob condições normais de crescimento e desenvolvimento ou submetidos aos tratamentos experimentais que simulam os estresses bióticos e abióticos. A aplicação desta metodologia tem sido observada desde os estudos de LENNON & LEHRACH (1991) que identificaram genes diferencialmente expressos em diferentes bibliotecas de cDNA. Outros estudos subseqüentes foram realizados para avaliar o perfil de expressão gênica em *Arabidopsis thaliana* (DESPREZ et al. 1998), em tecidos do cérebro (ZHAO et al. 1995) e em carcinomas de ovário (SCHUMMER et al. 1999).

A técnica de macroarranjos de DNA se baseia na imobilização do DNA a ser estudado em suportes sólidos para monitorar o nível de expressão gênica. Comparada a técnicas similares, esta metodologia pode ser considerada de fácil implementação, pois compreende procedimentos padrões de hibridização. As membranas de náilon, utilizadas como o suporte sólido, são carregadas positivamente, para promover a fixação do DNA. O material a ser depositado na membrana pode constituir uma seqüência parcial do gene alvo (MERCHAN et al. 2007), o DNA plasmidial recombinante (LIU et al. 2008) ou ainda as células bacterianas contendo o DNA plasmidial recombinante (BARSALOBRES-CAVALLARI et al. 2006).

A aplicação de uma seqüência isolada em membranas de náilon tem sido descrita em experimentos de macroarranjos (MERCHAN et al. 2007; NARAYANAN et al. 2007). Entretanto, o DNA plasmidial recombinante é empregado frequentemente nestes estudos de expressão, pois representa uma ótima relação custo e benefício (ARAÚJO et al. 2005; DABBAS et al. 2006; CAMARGO et al. 2007; FERRO et al. 2007; LIU et al. 2008). Uma alternativa às expensas de extração do DNA plasmidial pode ser a deposição direta das colônias de bactérias no suporte, como demonstrado em alguns estudos (CARSON et al. 2002; BARSALOBRES-CAVALLARI et al. 2006).

O DNA é arranjado ordenadamente no suporte sólido através de técnicas manuais ou automatizadas. A densidade de genes imobilizados por meio da técnica manual representa aproximadamente 20 genes por  $\text{cm}^2$ , entretanto o método de transferência automatizado permite confeccionar membranas com uma densidade de genes dez vezes maior (FELIX et al. 2002). A transferência do DNA requer ainda que a mesma amostra seja depositada quatro vezes para assegurar a homogeneidade da quantidade de material transferido entre as amostras, assim como a imobilização de cada gene em duplicata, para agregar mais confiabilidade aos dados (RODRIGUES 2004).

A detecção do nível de expressão gênica deve ser diretamente proporcional à quantidade de transcritos de um determinado gene. Assim, para os estudos de expressão torna-se imprescindível que a metodologia aplicada tenha sensibilidade para detectar genes que são pouco expressos. A capacidade dos macroarranjos de DNA de

detectar transcritos escassos foi observada por FELIX et al. (2002) cujos experimentos detectaram genes com a expressão muito reduzida. WATAKABE et al. (2001) aplicaram a metodologia para analisar a variação de expressão em diferentes tecidos humanos e também confirmaram a sensibilidade da técnica para a detecção dos transcritos expressos em baixo níveis.

Os macroarranjos de DNA já foram empregados para o estudo de câncer em humanos contribuindo no diagnóstico dos pacientes portadores de doenças, assim como na administração do tratamento terapêutico (DIOS et al. 2007; LOVISOLO et al. 2006; TAKATA et al. 2006). Outros trabalhos aplicaram a metodologia para a identificação de vias metabólicas envolvidas na resposta ao estresse salino em *Medicago truncatula* (MERCHAN et al. 2007), e de vias reguladas pelo fitohormônio jasmonato (SASAKI-SEKIMOTO et al. 2005). O efeito da deficiência hídrica em órgãos reprodutivos de cevada (MARASCHIN et al. 2006) também foi avaliado, assim como o estudo da influência do fotoperíodo em resposta ao déficit hídrico em *Arabidopsis thaliana* (BECKER et al. 2006).

O padrão de expressão de genes de cana-de-açúcar foi monitorado através dos macroarranjos de DNA para: analisar o efeito da aplicação exógena de jasmonato na regulação gênica (CAMARGO et al. 2007; BOWER et al. 2005); caracterizar a atividade transcricional dos elementos genéticos transponíveis (ARAÚJO et al. 2005); identificar genes de resistência ao raquitismo da soqueira causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (FERRO et al. 2007) e à escaldadura da folha desencadeada pela *Xanthomonas albilineans* (DABBAS et al. 2006); validar os resultados obtidos com a técnica de hibridização subtrativa (SSH) (DIOS et al. 2007) e avaliar o padrão de genes expressos sob altas concentrações de sais, frio e aplicação de ABA (ZHENG et al. 2006).

### III. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cultivo das plantas e tratamento experimental

Plântulas de cana-de-açúcar dos cultivares SP83-5073 e SP90-1638 foram classificadas respectivamente como tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico através de análises de produtividade em campo, realizadas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (COPERSUCAR 2002). As plântulas foram cultivadas em casa de vegetação, utilizando substrato arenoso estéril e mantidas a 26 °C com 56% de umidade relativa. Todas as plântulas foram irrigadas diariamente com base no método do Atmômetro de Livingstone, como descrito por BRONER et al. (1991) e SALASSIER et al. (2005), utilizando solução nutritiva de Hoagland a 25% (HOAGLAND & ARNON 1950) (Tabela 1A).

O delineamento experimental foi totalmente casualizado contendo três replicatas biológicas para cada planta controle e para cada planta submetida ao tratamento experimental, as quais foram amostradas em três pontos experimentais, totalizando 18 amostras para cada cultivar. Após dois meses de cultivo as plantas tratadas foram submetidas à deficiência hídrica progressiva, pela supressão da irrigação, e foram coletadas no 2°, 8° e 10° dias do tratamento experimental, os quais representam aproximadamente 80%, 40% e 20% de umidade do substrato, respectivamente, e foram designados como déficit hídrico leve, moderado e severo. As plantas controles foram mantidas sob irrigação diária. Todas as folhas foram coletadas, congeladas imediatamente em nitrogênio líquido e mantidas a -86 °C em ultrafreezer. Amostras de substrato foram coletadas para determinar o percentual de umidade em peso do substrato durante o tratamento experimental através do método gravimétrico, com base na variação da massa fresca e massa seca do substrato (SALASSIER et al. 2005).



### **3.2. Confeção das membranas de alta densidade**

Para a confeção das membranas de macroarranjos de DNA foram utilizados todos os 3.575 ESTs das bibliotecas de folhas de cana-de-açúcar do projeto SUCEST, (VETTORE et al. 2001) contendo fragmentos de aproximadamente 1.260 pares de bases. Os clones foram rearranjados em placas de 96 poços (Genetix, UK), o DNA plasmidial recombinante foi extraído através do método da lise alcalina (VETTORE et al. 2001), e todos os clones foram sequenciados para confirmação da identidade. Amostras do DNA plasmidial foram rearranjadas em placas de 384 poços (Genetix-UK), diluídas em 50% DMSO e depositado em membranas de náilon (8,5 x 12,5 cm) carregadas positivamente (Q Filters, Genetix-UK) em um processo totalmente automatizado (Q-Bot, Genetix-UK). Os clones foram imobilizados usando um arranjo 5 x 5, no qual cada clone foi depositado em duplicata. As membranas foram submetidas à uma solução de denaturação (1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH) e neutralização (1,5 M NaCl; 1M Tris pH 7,0), respectivamente durante dez e cinco minutos e o cDNA foi imobilizado por exposição à luz ultra-violeta ( $1.600 \text{ J m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , CL-1000 Ultraviolet Crosslinker, UVP).

### **3.3. Extração do RNA total**

Todo o material utilizado para as manipulações do RNA total foi devidamente esterilizado a 180 °C. O RNA total foi extraído a partir de 1,5 g das folhas de plantas tratadas e controles usando o reagente comercial Trizol (Invitrogen, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O material vegetal congelado foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em 8 ml de Trizol, substância de compostos fenólicos e isotiocianato de guanidina, que promove a separação das fases orgânicas. Ao composto homogeneizado foram adicionados 1,6 µl de clorofórmio, submetido à agitação mecânica vigorosa por 30 segundos e posteriormente à centrifugação de 12.000 x g durante 15 minutos a 4 °C. À fase superior recuperada foram acrescentados 540 µl de álcool isopropílico, e a reação foi incubada por dez minutos a temperatura

ambiente e submetida à centrifugação de 12,000 x g durante 10 minutos a 4 °C para a precipitação do RNA total. O precipitado obtido foi lavado duas vezes em 75% álcool etílico e dissolvido em 20 µl de água deionizada tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC, 0,01% v/v). A qualidade do RNA total extraído foi analisada e o material foi armazenado a -86 °C em ultrafreezer.

### **3.3.1. Análise do RNA total**

Para verificar a integridade e a quantidade do material extraído, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de agarose 1,5 % (m/v), (1,2 g de agarose; 8 ml de tampão de corrida 10X, composto de 20 mM Mops pH 7.0, 50 mM acetato de sódio e 5 mM EDTA; 65 ml de água deionizada tratada com DEPC; e 6,4 ml de formaldeído) a 77 volts durante 40 minutos (Tabela 1B). As amostras foram ainda analisadas em espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000, USA) para a avaliação quantitativa, além da presença de contaminantes, como proteínas e compostos fenólicos (Tabela 2B).

### **3.4. Síntese da sonda de cDNA**

Para a síntese das sondas de cDNAs foram adotados procedimentos com base no método descrito por SCHUMMER et al. (1999). As sondas de cDNA foram individualmente produzidas para cada uma das 18 amostras de RNA total extraídas de cada cultivar. A primeira fita do cDNA foi sintetizada a partir de 30 µg de RNA total, utilizando 3 µM oligo-dT<sub>18</sub> (Invitrogen) para selecionar as moléculas de mRNA. Foram adicionados à reação 5 µl do tampão de reação 5X First Strand Buffer (Invitrogen); 2,5 µl de 100 mM DTT (Invitrogen); 80 U RNaseOUT (Invitrogen); 10 mM dATP, dTTP e dGTP (cada), a qual foi incubada a 42°C por cinco minutos e seguidamente foram acrescentados 250 U Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen). Após 20 minutos foi acrescentado 3.000 Ci mmol<sup>-1</sup> [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP (30µCi) e a reação foi incubada a 42 °C durante 60 minutos. Para finalizar a reação foram adicionados 1,4 µl de 5 M

NaOH; 1,8 µl de 3,94 M HCl; 7 µl de 1 M Tris-HCl pH 7,5 e água deionizada tratada com DEPC para um volume final de 50 µl. As sondas foram purificadas em colunas Sephadex G-50 (Invitrogen) seguindo as instruções de SAMBROOK et al. (1989) e a incorporação radioativa foi contada em cintilador (Beckman LS6500) para assegurar o uso de sondas com padrões similares de incorporação radioativa.

### **3.5. Hibridização e lavagem das membranas de macroarranjos**

Para a primeira hibridização das membranas de náilon foram seguidas as recomendações do fabricante que indica a aplicação de solução 0,1% SDS fervendo durante cinco minutos, para diminuir a hibridização inespecífica de fundo (“background”). As membranas foram pré-hibridizadas a 58 °C por 4 horas em uma solução contendo 1% BSA (m/v) (Fraction V, Sigma), 1 mM EDTA, 7% SDS (99,9%) e 0,5 M fosfato de sódio (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Após a etapa de pré-hibridização, a sonda purificada e devidamente desnaturada (94 °C por três minutos) foi adicionada à solução para o processo de hibridização também realizado a 58 °C durante 18 horas. Após esse processo as membranas foram lavadas em 2X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos a 65 °C (duas lavagens); 1X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos a 65 °C; 0,1X SSC, 0,1% SDS por 15 minutos a 65 °C (duas lavagens) e 0,1X SSC por 5 minutos a temperatura ambiente. As membranas foram seladas em filme plástico e expostas a cassetes sensíveis à radioatividade (Imaging Plates, Fujifilm, Japan) durante 96 horas.

Para a reutilização das membranas a sonda foi removida usando lavagens de alta estrigência: a primeira solução (v/v) contendo 0,4N NaOH e 0,1% SDS foi aplicada por 15 minutos a 65 °C (duas lavagens); à segunda solução (v/v) contendo 0,2 N Tris-HCl pH 8,0, 0,1% SDS e 0,1X SSC foram submetidas durante 15 minutos a temperatura ambiente; e a última lavagem utilizou uma solução (v/v) de 0,1X SSC por cinco minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram seladas em filme plástico e expostas novamente durante 96 horas para confirmar a remoção da sonda. Após esse processo as membranas foram armazenadas a -20°C para reutilizações posteriores.

### 3.6. Aquisição das imagens e análise estatística dos dados

A emissão de radioatividade do material hibridizado na membrana produziu uma “imagem” no cassete, a qual foi digitalizada usando o aparelho Phosphorimager FLA3000-G (Fujifilm, Japan) (Figura 1C). A imagem digital dos sinais radioativos foi analisada através do programa ArrayVision (Imaging Research, St. Catherines, ON, Canadá, [www.imageresearch.com](http://www.imageresearch.com)), que permite identificar os clones e quantificar a intensidade do sinal emitido para cada “spot”, transformando-os em valores numéricos. Após a quantificação, os dados foram analisados com auxílio do programa estatístico R (R Development Core Team 2005) (IHAKA & GENTLEMAN 1996) e das aplicações desenvolvidas para a análise de arranjos de DNA (GENTLEMAN et al. 2004, <http://www.bioconductor.org/>), no qual a qualidade dos dados brutos foi avaliada pela análise visual dos gráficos “scatter plots”, “MA plots” e “box plots”.

Os dados brutos obtidos foram corrigidos para a hibridização inespecífica de fundo (“background”) e normalizados pelo método VSN (“Variance Stabilization and Normalization”) através do programa R (HUBER et al. 2002). Subsequentemente, um modelo linear foi usado para obter os genes diferencialmente expressos para cada período de interesse do programa Limma (SMYTH et al. 2005). Os genes foram classificados como sendo diferencialmente expressos em ordem decrescente do B-estatístico, considerando a taxa de falsa descoberta (False Discovery Rate - FDR) proposta por BENJAMINI & HOCHBERG (1995) e implementada no programa Limma. Os genes diferencialmente expressos foram obtidos usando um FDR igual a 5%, B-estatístico positivo ( $B > 0$ ) e p-value menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ).

### 3.7. Validação dos resultados por PCR quantitativo

O RNA total foi tratado com DNase (Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. Na síntese da primeira fita de cDNA foram utilizados 5 µg do RNA total tratado, 0,5 µg Óligo (dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen) e 1 µl 10 mM dNTP mix, que foram aquecidos a 65 °C por 5 minutos e seguidamente mantidos no gelo por dois minutos. Após uma breve centrifugação 4 µl do tampão de reação 5X First-Strand Buffer (Invitrogen), 2 µl 0.1 M DTT e 40 U RNaseOUT (Invitrogen) foram acrescentados à reação, a qual foi submetida a 42 °C por dois minutos. Foram adicionadas 200 U da enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) e a reação foi novamente incubada a 42 °C durante 50 minutos. A reação foi finalizada a 70 °C por 15 minutos. O produto da síntese foi tratado com 2 U da enzima RNase H (Invitrogen) durante 30 minutos a 37 °C e em seguida a reação foi finalizada a 70 °C por 10 minutos.

As reações do PCR quantitativo foram realizadas no termociclador ABI modelo 7500 System (Applied Biosystems) usando SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems). Com auxílio do programa “Primer Express 3.0 software” (Applied Biosystems) foram desenhados óligos para 12 genes diferencialmente expressos selecionados em diferentes pontos experimentais (Tabela 1). As seqüências dos óligos foram pesquisadas no banco de dados do SUCEST, usando a ferramenta Blast, para verificar a especificidade das seqüências desenhadas. Os valores de expressão, observados para os clones selecionados, e as respectivas seqüências desenhadas são detalhadas na Tabela 1D.

Para cada clone selecionado foram ensaiados, separadamente, três replicatas biológicas de plantas controle e plantas submetidas ao tratamento experimental utilizando as mesmas amostras de RNA total empregadas nos experimentos dos macroarranjos. Cada reação foi amplificada em duplicata usando 2 µl de uma diluição 1:10 das amostras de cDNA, óligos na concentração final de 400 nM, 12,5 µl of SYBR Green Master Mix e água deionizada para o volume final de 25 µl. Amostras de cDNA sintetizadas sem a enzima Superscript II Reverse Transcriptase foram incluídas como

controles negativos para confirmar a ausência de contaminantes. Os parâmetros das amplificações foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A expressão relativa dos genes foi normalizada usando o gene da  $\beta$ -tubulina (CA222437) como controle endógeno (ISKANDAR et al. 2004) e a razão da expressão diferencial (controle/tratado) foi determinada através do método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (LIVAK & SCHMITTGEN 2001).

Tabela 1. Genes utilizados nos experimentos de PCR quantitativo. Os dados de expressão gênica nos respectivos pontos experimentais em que foram selecionados são detalhados para cada cultivar.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Gene	<sup>b</sup> Expressão (M) SP83-5073		<sup>b</sup> Expressão (M) SP90-1638	
		Severo	Leve	Moderato	Severo
CA127376	SAMDC	2.03	—	—	—
CA120560	Protein ZmPIP2-1	1,08	—	—	—
CA128872	Protein ZmTIP4-2	—	1.06	—	—
CA127367	Protein WIP	0,92	—	—	1,21
CA119309	Protein LTP	1,12	—	-0.8	—
CA120417	Pyruvate kinase	3.51	—	2.27	3.34
CA116806	Histone	1.41	0.94	-1.7	—
CA300174	DNAJ	-1.22	—	—	1.49
CA293774	Ferredoxin I	—	2.27	-1.65	-1.7
CA116652	Photosystem I	—	1.46	-2.01	-1.99
CA122935	No match gene 1	1,89	-1,7	—	—
CA129393	No match gene 2	1.09	—	-1.23	1.49

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI <sup>b</sup>M representa a razão da expressão diferencial observada nas análises de macroarranjos ( $\log_2$ ) — nenhuma significância para o p-value. adotado .

A quantificação relativa dos genes alvos foi determinada usando o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , que calcula as mudanças na expressão de um determinado gene alvo, como descrito por LIVAK & SCHMITTGEN (2001). A expressão gênica detectada é considerada relativa, pois relaciona o sinal amplificado do gene alvo na condição

tratada, para o sinal obtido com o mesmo gene na condição controle, além da normalização com o controle endógeno. A expressão quantificada pode variar consideravelmente em função dos controles utilizados. Como a expressão do gene alvo é normalizada pela subtração da expressão do controle endógeno, é essencial a utilização de um gene que apresente uma expressão consistente nas amostras a serem estudadas. Os dados foram analisados com base na equação descrita abaixo:

$$[(C_{T, \text{Gene alvo}} - C_{T, \text{Gene endógeno}})_{\text{Tempo X}} - (C_{T, \text{Gene alvo}} - C_{T, \text{Gene endógeno}})_{\text{Tempo 0}}]$$

onde,

$C_{T, \text{Gene alvo}}$ : sinal da amplificação do gene alvo;

$C_{T, \text{Gene endógeno}}$ : sinal da amplificação do controle endógeno;

Tempo X: tempo ou condição sob tratamento experimental do gene alvo;

Tempo 0: tempo ou condição controle do gene alvo;

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Status hídrico da planta

Plantas de cana-de-açúcar das cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível) foram usadas para monitorar o nível de expressão de 3.575 ESTs de folhas de cana-de-açúcar (VETTORE et al. 2001) imobilizados em membranas de náilon, em resposta ao déficit hídrico. As plantas foram submetidas à deficiência hídrica de forma gradual pela supressão da irrigação e o percentual de umidade relativa em peso do substrato (%UR) foi medido para verificar o status hídrico do solo (Figura 1). As plantas foram coletadas no 2°, 8° e 10° dias do tratamento experimental quando a %UR do substrato correspondeu aproximadamente a 82,4%, 43,1% e 19% para a cultivar tolerante e 84,2%, 40,9% e 17,3% para a cultivar sensível. A perda de água foi progressiva e similar em ambas cultivares e os pontos experimentais amostrados foram designados como condições de déficit hídrico leve, moderado e severo.

De acordo com as informações disponíveis para as cultivares utilizadas neste experimento, as quais foram classificadas pelo Centro de Tecnologia Canavieira (Copersucar) como tolerantes e sensíveis à seca baseados em dados de produtividade em campo, nenhum estudo molecular descreveu níveis de tolerância ou sensibilidade à seca para estas plantas. Diferentes respostas morfológicas que confirmam esta classificação foram observadas entre as cultivares no decurso da deficiência hídrica. Durante o tratamento experimental (especialmente após 48 horas) as folhas do genótipo sensível mostraram sinais evidentes do estresse, como leve murchamento, evoluindo para o enrolamento total da folha no último dia do tratamento (condições severas de déficit hídrico). O genótipo tolerante, em comparação ao sensível, não apresentou sinais do estresse aplicado, o que pode indicar uma melhor performance destas plantas sob condições de deficiência hídrica. Todas as plantas usadas neste experimento estavam no estágio jovem do desenvolvimento e foram totalmente casualizadas em casa de vegetação para minimizar o efeito ambiental.



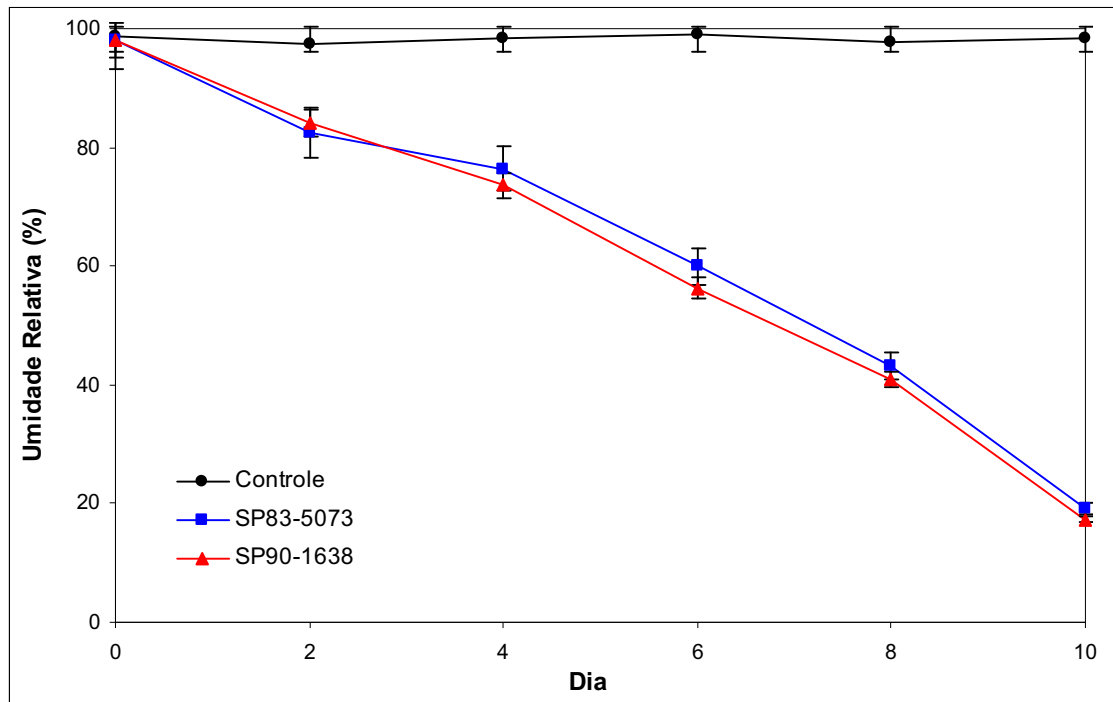


Figura 1. Conteúdo de umidade relativa do solo. As plantas tolerantes (SP83-5073) e sensíveis (SP90-1638) foram submetidas à supressão da irrigação e a perda de água do solo foi determinada pelo método gravimétrico. Plantas foram coletadas no 2°, 8° e 10° dias do tratamento experimental, os quais corresponderam para condições de déficit hídrico leve, moderado e severo, respectivamente. O desvio padrão de três replicatas biológicas é mostrado.

#### 4.2. Identificação dos genes diferencialmente expressos nos cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível)

Os genes foram identificados como diferencialmente expressos em resposta ao déficit hídrico usando o programa estatístico R (R Development Core Team 2005) (HUBER et al. 2002). Após a normalização e correção da hibridização inespecífica de fundo (“background”) foram obtidas as razões de expressão diferencial para cada gene,

apresentadas pela variável M. Os valores de M foram transformados para  $\log_2$ , assim cada unidade de M ( $M=1$ ) representa um aumento de expressão de duas vezes comparado à condição controle (SMYTH et al. 2003). As seqüência dos genes foram pesquisadas no banco de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), usando a ferramenta BlastX (ALTSCHUL et al. 1997), para a busca de proteínas similares. Para as enzimas identificadas foi adicionado o respectivo número de classificação (Enzyme Commission, BAIROCH 2000) (<http://ca.expasy.org/enzyme/>). Nas análises estatísticas, a identificação de genes diferencialmente expressos não considerou nenhum limite para a quantidade de vezes que um determinado gene foi induzido ou reprimido, mas parâmetros como o B-estatístico, test-t e o FDR foram usados como descrito nos materiais e métodos.

Entre os genes diferencialmente expressos na cultivar tolerante, 165 foram estatisticamente significativos, os quais foram induzidos ou reprimidos preferencialmente nas condições severas do déficit hídrico. Como mostrado na Figura 2, dois genes foram induzidos em condições de déficit hídrico leve, apenas um gene foi reprimido na condição moderada, e em condições mais severas, 154 genes foram induzidos com oito sendo reprimidos. Diferentemente da cultivar tolerante, uma análise global do transcriptoma das plantas sensíveis mostrou 432 genes diferencialmente expressos nas condições de deficiência hídrica leve, moderado e severo (Figura 2). Destes, verificou-se que muitos genes também foram induzidos em condições severas do déficit hídrico, assim como na cultivar tolerante. Porém, nas condições de déficit hídrico leve e moderado, ao contrário da cultivar tolerante, o conjunto de genes diferencialmente expressos foi consideravelmente maior, mostrando um perfil de expressão preferencialmente induzido e reprimido, respectivamente (Figura 2).

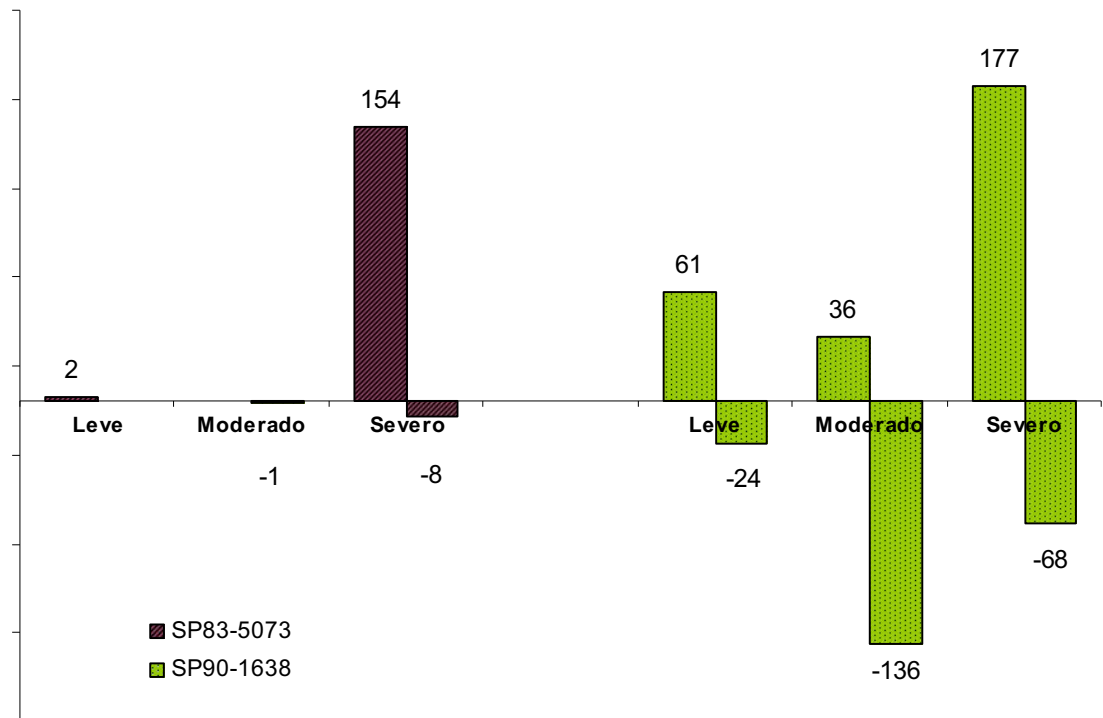


Figura 2. Perfil de expressão gênica das cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível). O número de genes diferencialmente expressos é mostrado para cada cultivar nas respectivas condições de déficit hídrico analisadas. Os genes induzidos estão dispostos ascendentemente em relação ao eixo X e mostram números positivos enquanto os genes reprimidos são representados pelas barras descendentes, as quais apresentam valores negativos. O número total de genes no cultivar SP83-5073 soma 165, pois nenhum gene diferencialmente expresso em uma condição está representado em outra condição. Em contraste para a cultivar SP90-1638 alguns genes diferencialmente expressos estão em mais de uma condição analisada.

Observando o perfil de expressão em cada ponto experimental foi possível visualizar que o número de genes aumentou com a severidade do estresse. Nenhum gene identificado em uma condição do estresse estudado foi verificado em outra condição analisada na cultivar tolerante. Entretanto, para a cultivar sensível é importante enfatizar que muitos transcritos identificados em uma condição experimental do déficit hídrico também foram observados em outras condições, mas cada gene foi contado como diferencialmente expressos (induzido ou reprimido) apenas uma vez. Seis genes foram diferencialmente expressos em todas as condições analisadas, mas

nenhum foi induzido durante todo o tratamento experimental. Entre o déficit hídrico leve e moderado, e também entre as condições leve e severa, dois grupos de 12 genes foram detectados (Figura 3). O número de genes expressos aumentou com a severidade do estresse, e possivelmente como uma consequência, um maior número de genes ( $n = 34$ ) compartilhados entre o déficit hídrico moderado e o severo foi observado, com um grande número ( $n = 22$ ) sendo induzidos em ambos períodos (Figura 3).

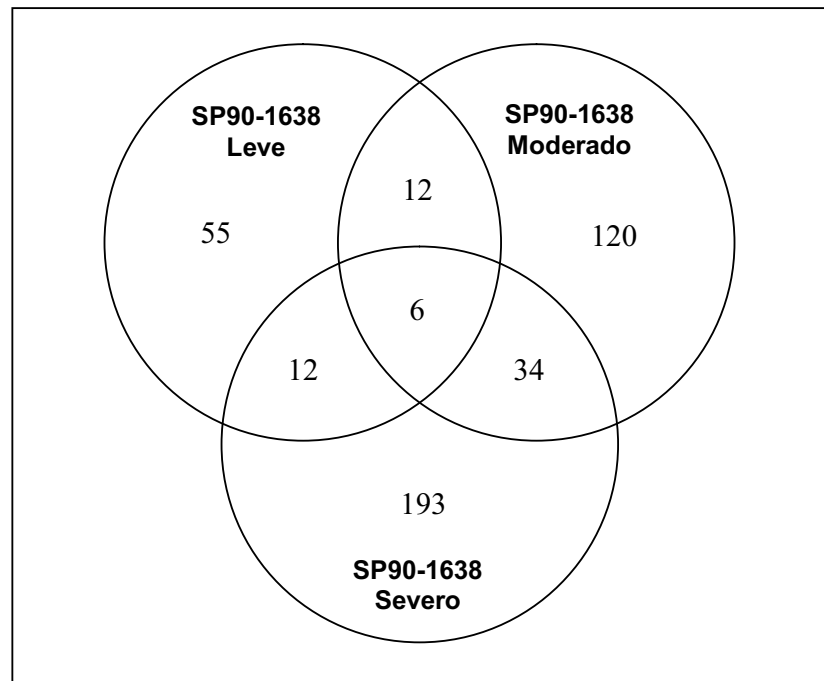


Figura 3. Diagrama de Venn. O diagrama apresenta os números de genes diferencialmente expressos na cultivar SP90-1638 (sensível) que foram exclusivos e comuns entre diferentes condições analisadas.

Entre os seis genes que foram identificados em todas as condições analisadas (Figura 3), verificamos um precursor de ferredoxina I (CA293774), um precursor da subunidade PsaN do fotossistema I (CA116652), uma fosforribosilantranilate transferase (CA123485), uma ubiquitina (CA125872), e duas proteínas desconhecidas (CA130078, CA117522), as quais foram induzidas na condição leve da deficiência hídrica e apresentaram a expressão reprimida sob condições moderadas e severas (Tabela 2). Um perfil similar também foi observado para os 12 genes comuns às condições leve e moderada. Em contraste, variados padrões de expressão foram observados no grupo de genes comuns às condições leve e severa do tratamento experimental (Tabela 2). Entre os 34 genes comuns aos pontos experimentais de déficit hídrico moderado e severo foram verificados dois diferentes padrões de expressão: um grupo de genes (n = 12) que foram reprimidos e induzidos sob condições moderadas e severas, respectivamente e outro grupo de genes (n = 22) induzidos em ambas condições, a maioria deles (n = 15) representando proteínas desconhecidas e genes sem similaridade (Tabela 2). Nenhum gene foi induzido ou reprimido durante todo o tempo de exposição à deficiência hídrica.

Tabela 2. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob diferentes condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível). As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA116652	photosystem I complex PsaN subunit precursor [Zea mays]	1,00E-42	1,46	-2,01	-1,99	0,01059	0,5
CA125872	ubiquitin [Zea mays]	2,00E-69	0,6	-1,33	0,65	0,00612	1,28
CA123485	phosphoribosylanthranilate transferase [EC 2.4.2.18] [Pisum sativum]	4,00E-51	0,64	-0,61	-0,59	0,00212	1,21
CA130078	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	8,00E-22	1,97	-1,81	-1,65	0,00054	4,19
CA117522	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-68	1,7	-1,48	-1,34	0	8,85
CA116652	carbonic anhydrase [EC 4.2.1.1] [Oryza sativa]	8,00E-92	1,8	-1,28	—	0,00004	7,61
CA125884	plastocyanin precursor [Hordeum vulgare]	1,00E-34	1,05	-1,69	—	0,00114	3,37
CA121073	putative actin-depolymerizing factor [Oryza sativa]	1,00E-74	2,24	-1,62	—	0,0001	6,35
CA125801	DNA-binding protein [Zea mays]	1,00E-44	0,68	-0,67	—	0,01311	0,15
CA116798	copper chaperone [Oryza sativa]	7,00E-29	1,15	-0,93	—	0,00007	6,75
CA116806	histone H3 (H3-1.1) [Oryza sativa]	1,00E-58	0,94	-1,7	—	0,00031	3,44
CA300423	Os01g0265100 [Oryza sativa]	7,00E-79	1,25	-1,35	—	0,00176	5,11
CA117711	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-31	0,85	-1,3	—	0,01099	0,47
CA126111	No match	—	0,81	-0,61	—	0,00024	5,39
CA116310	No match	—	0,68	-0,82	—	0,01206	0,35
CA294347	No match	—	1,71	-1,19	—	0,00261	0,96
CA116312	No match	—	-0,88	-1,02	—	0,00814	0,83
CA128973	ABA-responsive HVA22 family protein [Oryza sativa]	2,00E-64	-0,59	—	-0,61	0,01282	0,22
CA123180	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-19	-0,9	—	-0,98	0,013	0,14
CA127269	cinnamoyl CoA reductase [EC.1.2.1.44] [Oryza sativa]	6,00E-84	-0,9	—	1,24	0,00172	1,47
CA121097	dormancy-associated protein [Codonopsis lanceolata]	1,00E-17	-0,83	—	1,05	0,0075	0,89
CA121187	hypothetical protein Osl_020167 [Oryza sativa]	5,00E-08	-0,95	—	1	0,01287	0,15
CA130292	protein kinase [Sorghum bicolor]	4,00E-21	0,52	—	0,66	0,00002	6,27
CA118879	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein [Oryza sativa]	2,00E-11	0,87	—	0,69	0,00036	4,83
CA190110	LHY protein [Oryza sativa]	8,00E-55	1,92	—	-1,62	0,00001	9,61
CA293838	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-25	1,56	—	-1	0	10,68
CA129275	No match	—	1,63	—	-0,73	0	18,3
CA300185	No match	—	1,05	—	-0,98	0,00515	1,45
CA117143	No match	—	1,16	—	-1,39	0,00124	3,24
CA118684	serine carboxypeptidase [EC 3.4.16.1] [Oryza sativa]	4,00E-30	—	-0,86	0,99	0,00365	0,62

Tabela 2. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA126513	cytosolic factor-like protein [Oryza sativa]	5,00E-11	—	-0,95	0,89	0,0025	1,09
CA121120	DREPP2 protein [Oryza sativa]	8,00E-42	—	-0,66	0,67	0,00211	1,34
CA130347	histone H3.2 protein [Oryza sativa]	3,00E-42	—	-1,25	0,94	0	8,55
CA128654	histone H4 [Triticum aestivum]	5,00E-39	—	-1,03	0,92	0,00028	3,82
CA128234	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]	9,00E-17	—	-0,44	0,62	0,00013	4,37
CA190212	Os02g0122300 [Oryza sativa]	7,00E-12	—	-1,18	1,29	0,00411	0,47
CA129691	hypothetical protein [Oryza sativa]	5,00E-25	—	-1,22	1,52	0,00386	0,48
CA299850	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-67	—	-1,12	1,01	0,00051	3,08
CA129393	No match	—	—	-1,23	1,49	0,0047	0,23
CA126995	No match	—	—	-0,75	0,58	0,00054	3,04
CA164451	No match	—	—	-0,6	1	0,00207	1,27
CA120417	pyruvate kinase [Arabidopsis thaliana]	3,00E-66	—	2,27	3,34	0	38,54
CA300972	adenosine kinase isoform 2S [EC 2.7.1.20] [Nicotiana tabacum]	3,00E-21	—	1,5	1,48	0	10,11
CA118233	resistance protein LR10 [Oryza sativa]	2,00E-11	—	1,11	1,26	0,00172	1,49
CA127426	cell death-related protein SPL11 [Oryza sativa]	5,00E-99	—	1,63	1,34	0	11,62
CA295307	multidrug resistance protein [Oryza sativa]	2,00E-63	—	1,28	1,57	0,00001	7,84
CA119068	hypothetical protein OsJ_028659 [Oryza sativa]	2,00E-23	—	1,63	1,51	0	8,39
CA300995	hypothetical protein OsI_037633 [Oryza sativa]	1,00E-69	—	1,26	1,1	0,00002	6,33
CA282442	hypothetical protein OsI_034134 [Oryza sativa]	7,00E-52	—	1,8	1,92	0	17,38
CA295063	hypothetical protein OsJ_023677 [Oryza sativa]	3,00E-07	—	1,42	1,58	0	12,77
CA116281	hypothetical protein OsJ_013206 [Oryza sativa]	4,00E-15	—	0,77	0,82	0,00495	0,15
CA300323	hypothetical protein OsI_010090 [Oryza sativa]	9,00E-05	—	1,25	1,72	0,00324	0,75
CA129317	hypothetical protein OsI_004849 [Oryza sativa]	1,00E-27	—	1,27	1,45	0,00023	3,74
CA295315	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-17	—	1,17	1,39	0,0001	4,73
CA127303	No match	—	—	2,23	1,99	0	22,61
CA129806	No match	—	—	1,4	1,69	0	22,28
CA300464	No match	—	—	1,01	1,2	0	17,68
CA123149	No match	—	—	1,72	1,54	0	17,63
CA122762	No match	—	—	1,36	1,4	0	17,26
CA119091	No match	—	—	1,31	1,35	0	10,71
CA127028	No match	—	—	1,44	1,51	0,00001	7,71
CA118839	No match	—	—	1,53	1,51	0,0002	3,91
CA279843	No match	—	—	1,76	1,49	0,00002	6,43

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e negativos representam genes que foram reprimidos. Números positivos representam genes induzidos e os números negativos representam genes reprimidos. <sup>d</sup>p-value P≤0,05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

Na resposta das plantas tolerantes ao déficit hídrico 165 genes foram identificados (Tabela 1E). Alguns genes como proteínas de transdução de sinal (CA128186, CA128254, CA127352), peroxidase (CA129040), proteínas de choque térmico (HSPs) (CA119144, CA118620), e S-adenosilmetionina decarboxilase (SAMDC, CA127376) que é relacionada à síntese de poliaminas, foram detectados sob condições severas de déficit hídrico. Todos os transcritos com similaridade para proteínas de transferência de lipídios (LTPs) (CA121569, CA130297, CA123375, CA119309) detectados nas plantas tolerantes também foram induzidos em condições severas de deficiência hídrica (Tabela 1E).

Na condição do déficit hídrico leve dois genes podem ser verificados como diferencialmente expressos, os quais apresentaram similaridade para as proteínas “Bet v I allergen” (CA128069) e a proteína “germin-like protein” (CA127402), relacionadas ao metabolismo de resposta ao estresse. Peroxidase (CA129049), proteínas de choque térmico (HSPs) (CA119144, CA118620, CA120023) e proteínas de resistência a doenças (RPM1 e LR10) (CA128991, CA118233) foram detectadas somente no déficit hídrico severo (Tabela 3). As proteínas induzidas por fermento (WIP), representadas por cinco diferentes transcritos (CA124572, CA300505, CA127367, CA123153, CA124713), foram as mais frequentes entre os genes com similaridade a proteínas descritas nos bancos de dados, os quais foram induzidos durante o déficit hídrico severo.

Os transcritos mostraram a razão de expressão variando de 1,02 (CA128991) a 7,02 vezes (CA120417) para genes induzidos e para genes reprimidos de -1,14 (CA123485) a -2,84 (CA117522) (Tabela 1E). A proteína LN1 (CA295470) tem sido identificada em humanos e animais, mas foi classificada como proteína desconhecida devido a pouca informação sobre suas funções em plantas sob condições de déficit hídrico.



Tabela 3. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP83-5073 (tolerante) envolvidos no metabolismo de resposta ao estresse. Proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP83-5073 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Resposta a Estresse							
CA128069	Bet v I allergen [Zea mays]	5,00E-14	1,17	—	—	0,02945	2,18
CA127402	germin-like protein [Zea mays]	e-100	1,16	—	—	0,00087	5,18
CA128991	disease resistance protein RPM1 [Oryza sativa]	1,00E-21	—	—	0,51	0,00358	0,55
CA118233	resistance protein LR10 [Oryza sativa]	2,00E-11	—	—	0,91	0,00172	1,49
CA129040	peroxidase [Oryza sativa]	2,00E-23	—	—	1,36	0,00002	6,21
CA129365	type 2 ribosome-inactivating protein cinnamomin III precursor [Cinnamomum camphora]	6,00E-09	—	—	1,54	0,00125	1,83
CA119144	heat shock protein hsp70 [Zea mays]	3,00E-06	—	—	1,02	0,00172	1,5
CA118620	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	—	2,19	0	28,88
CA120023	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	—	2,19	0	11,18
CA125472	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	—	1,79	0	17,16
CA300505	wound induced protein [Lycopersicon esculentum]	3,00E-19	—	—	1,95	0	8,46
CA123153	wound induced protein [Lycopersicon esculentum]	3,00E-18	—	—	1,17	0	9,32
CA124713	wound induced protein [Lycopersicon esculentum]	5,00E-17	—	—	1,88	0	12,39
CA127367	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	—	0,92	0,00053	2,81
CA300174	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	-1,22	0,00231	1,14
CA120096	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	0,87	0,00012	4,43

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e negativos representam genes que foram reprimidos. Números positivos representam genes induzidos e os números negativos representam genes reprimidos. <sup>d</sup>p-value P ≤ 0.05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

Na cultivar sensível foi identificado um maior número de genes (n = 432) diferencialmente expressos ao longo do tratamento experimental (Tabela 1F). Entre os genes similares a proteínas descritas, 25 foram classificados no metabolismo de proteínas, como por exemplo nos processos de proteólise (CA300731, CA125872, CA300758), interação proteína-proteína (CA119092, CA127115), biossíntese de proteína (proteínas ribossomais, n = 10) e nas modificações pós-traducionais (CA117569) (Tabela 4).

Tabela 4. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos com o metabolismo de proteínas. As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Metabolismo de Proteína							
CA125872	ubiquitin [Zea mays]	2,00E-69	0,6	-1,33	0,65	0,00612	1,28
CA300758	polyubiquitin [Oryza sativa]	2,00E-92	—	0,93	—	0,0027	0,91
CA294435	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding [Arabidopsis thaliana]	2,00E-08	0,63	—	—	0,01311	0,06
CA129212	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	—	0,76	0,00066	2,59
CA120113	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	—	1,27	0,00094	2,21
CA124140	ring finger protein 5 [Oryza sativa]	8,00E-31	—	-0,8	—	0,00176	1,55
CA128249	prolyl 4-hydroxylase -like [Oryza sativa]	6,00E-61	0,65	—	—	0,007	1,05
CA118879	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein [Oryza sativa]	2,00E-11	0,87	—	0,69	0,00036	4,83
CA119092	F-box domain containing protein [Oryza sativa]	4,00E-35	—	-0,99	—	0,00083	2,49
CA127115	F-box protein [Oryza sativa]	1,00E-19	—	-1,44	—	0,00255	1
CA296046	POZ domain protein family-like [Oryza sativa]	4,00E-61	—	-1,03	—	0,00066	2,8
CA128234	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]	9,00E-17	—	-0,44	0,62	0,00013	4,37
CA119317	plastid ribosomal protein L19 precursor [Arabidopsis thaliana]	2,00E-45	—	-1,58	—	0	10,76
CA119317	50S ribosomal protein L10 [Oryza sativa]	5,00E-68	—	-0,77	—	0,0027	0,93
CA119363	ribosomal protein L38e [Medicago truncatula]	6,00E-27	—	-0,84	—	0,0027	0,89
CA122194	ribosomal protein L7 [Hyacinthus orientalis]	1,00E-47	—	—	1,22	0,00023	3,56
CA128696	ribosomal protein L26 [Oryza sativa]	2,00E-59	—	—	1,12	0,00002	6,53
CA300161	60S ribosomal protein L31 [Oryza sativa]	2,00E-50	—	—	0,81	0,00004	5,86
CA128712	60S ribosomal protein L37 [Oryza sativa]	3,00E-28	—	—	0,95	0,00106	1,69
CA127395	60S ribosomal protein L30 [Zea mays]	2,00E-55	—	—	-0,71	0,00345	0,17
CA128218	40S ribosomal protein S15 [Oryza sativa]	1,00E-32	—	—	0,97	0,00007	4,97
CA125393	40S ribosomal protein S11 [Oryza sativa]	2,00E-69	—	—	0,71	0,00256	0,59
CA128144	ribosomal protein S18 [Saccharum hybrid cultivar SP-80-3280]	3,00E-74	—	—	1,04	0,00327	0,69
CA127205	ribosomal protein L27a [Oryza sativa]	2,00E-63	—	—	1,46	0,00009	4,81
CA122916	ribosomal protein S12 [Oryza sativa]	6,00E-37	—	—	1,58	0,00046	3,01
CA122204	ribosomal protein L17 [Lycopersicon esculentum]	5,00E-13	—	—	1,06	0,00051	2,86
CA190334	S28 ribosomal protein [Triticum aestivum]	1,00E-20	—	—	1,29	0,00558	0,06
CA300731	cysteine-type peptidase [Arabidopsis thaliana]	2,00E-28	—	—	1,43	0,00039	2,93
CA117569	seryl-tRNA synthetase [EC 6.1.1.11] [Zea mays]	1,00E-68	—	—	0,98	0,00039	2,88
CA300155	carboxyl-terminal proteinase-like [Oryza sativa]	8,00E-66	—	—	1,27	0	20,23

Tabela 4. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA300757	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	-0,97	—	—	0,0008	2,39
CA300009	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	—	0,86	0	9,6
CA118369	kelch repeat-containing F-box family protein-like [Oryza sativa]	7,00E-21	—	—	1,23	0	8,12
CA121094	alpha 3 subunit of 20S proteasome [Oryza sativa]	2,00E-90	—	—	1,14	0,00124	1,89
CA299967	nucleic acid binding [Arabidopsis thaliana]	3,00E-89	—	—	1,04	0,00017	4,09
CA125669	farnesylated-proteins converting enzyme-2 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-54	—	—	0,96	0,00001	6,92
CA127858	translation initiation factor [Triticum aestivum]	3,00E-22	—	—	1,17	0,00001	7,93
CA127426	cell death-related protein SPL11 [Oryza sativa]	5,00E-99	—	1,63	1,34	0	11,62
CA300423	Os01g0265100 [Oryza sativa]	7,00E-79	1,25	-1,35	—	0,00176	5,11
CA121796	Os05g0507200 [Oryza sativa]	7,00E-31	—	-0,72	—	0,00248	1,12
CA190212	Os02g0122300 [Oryza sativa]	7,00E-12	—	-1,18	1,29	0,00411	0,47
CA119574	hypothetical protein OsJ_033821 [Oryza sativa]	3,00E-16	—	-0,87	—	0,00217	1,24
CA125617	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-26	—	—	1,95	0,00002	6,85

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes que foram reprimidos. <sup>d</sup>p-value P≤0.05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

Vários genes relacionados com o metabolismo de bioenergética e fotossíntese foram diferencialmente expressos sob condições de deficiência hídrica (por exemplo: fotossistema I, CA116652; tioredoxina M, CA300805; entre outros). Como pode ser observado na Tabela 5, alguns genes foram induzidos no déficit hídrico leve com um grande número de transcritos sendo reprimidos com o aumento da severidade do estresse. Algumas proteínas desconhecidas, apesar de não terem sido totalmente caracterizadas, foram classificadas em grupos funcionais de acordo com as informações descritas no banco de dados InterPro sobre sua hipotética função biológica. Baseado nisto, quatro proteínas desconhecidas foram incluídas na classe de bioenergética e fotossíntese, uma delas com uma possível função na absorção e transferência da energia absorvida entre os centros de reação dos fotossistemas

(CA300973), e outra similar a um suposto citocromo c oxidase, envolvido no transporte de elétrons (CA129721) (Tabela 5).

Tabela 5. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos nos processos de bioenergética e metabolismo de fotossíntese. As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Bioenergética e fotossíntese							
CA300081	C4-specific pyruvate orthophosphate dikinase [EC 2.7.9.1] [Zea mays]	3,00E-71	2,1	—	—	0,00005	7,16
CA294308	phosphoenolpyruvate carboxylase [EC 4.1.1.31] [Arabidopsis thaliana]	e-124	2,51	—	—	0,00005	7,03
CA118776	carbonic anhydrase [EC 4.2.1.1] [Oryza sativa]	5,00E-81	1,7	—	—	0,00034	4,92
CA116652	carbonic anhydrase [EC 4.2.1.1] [Oryza sativa]	8,00E-92	1,8	-1,28	—	0,00004	7,61
CA293774	ferredoxin I, chloroplast precursor (Fd I) [Zea mays]	1,00E-27	2,27	-1,65	-1,7	0,00003	7,97
CA116652	photosystem I complex PsaN subunit precursor [Zea mays]	1,00E-42	1,46	-2,01	-1,99	0,01059	0,5
CA121116	photosystem I assembly protein ycf3 [Zea mays]	4,00E-13	—	-1,17	—	0	9,27
CA122162	PSI type III chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]	9,00E-72	—	-1,1	—	0,00232	1,16
CA125884	plastocyanin precursor [Hordeum vulgare]	1,00E-34	1,05	-1,69	—	0,00114	3,37
CA300805	thioredoxin M-type, chloroplast precursor [Zea mays]	3,00E-69	—	-1,76	—	0,00001	7,61
CA119332	one helix protein [Deschampsia antarctica]	7,00E-29	—	-1,51	—	0	13,75
CA128335	RPT2-like protein [Sorghum bicolor]	6,00E-45	—	-0,59	—	0,00386	0,49
CA299938	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2) [Oryza sativa]	5,00E-61	—	-1,73	—	0,00147	1,69
CA299800	fructose-bisphosphate aldolase class-I [EC 4.1.2.13] [Oryza sativa]	4,00E-60	—	—	-1	0,00132	1,38
CA301008	vacuolar proton-ATPase [Oryza sativa]	1,00E-69	—	—	1	0,00256	0,54
CA120417	pyruvate kinase [Arabidopsis thaliana]	3,00E-66	—	2,27	3,34	0	38,54
CA127861	fructokinase 2 EC 2.7.1.4 [Zea mays]	4,00E-69	—	—	1,23	0,00007	5,09
CA129721	Os06g0142700 [Oryza sativa]	2,00E-57	—	-0,85	—	0,00424	0,4
CA300973	H0523F07.10 [Oryza sativa]	1,00E-33	—	-0,65	—	0,00588	0,01
CA130078	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	8,00E-22	1,97	-1,81	-1,65	0,00054	4,19
CA117255	chloroplast hypothetical protein [Zea mays]	4,00E-24	—	-1,67	—	0	12,26

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes que foram reprimidos. <sup>d</sup>p-value P≤0,05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

Genes de transdução de sinal, normalmente envolvidos na percepção do déficit hídrico, como receptor do tipo proteíno-quinase (CA189862) e uma proteína com repetições ricas em leucina (CA296051) foram induzidos nas condições de déficit hídrico leve. Outras proteínas quinases (CA120254, CA118376, CA293877 e CA126498), fosfatase-2C (CA122068) e ainda uma proteína DREPP2 (CA121120) mostraram um aumento na expressão apenas nas condições moderadas ou severas do déficit hídrico. Alguns genes detectados em condições de déficit hídrico moderado e severo foram reprimidos e funcionalmente relacionados ao metabolismo de lipídios (Tabela 6).

Tabela 6. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos no metabolismo de lipídios. As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Metabolismo de Lipídios							
CA119547	very-long-chain fatty acid condensing enzyme CUT1 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-67	—	-0,77	—	0,00057	2,96
CA296068	chloroplast phytoene synthase 1 [EC 2.5.1.32] [Zea mays]	7,00E-95	—	-0,69	—	0,00138	1,82
CA294072	phospholipase D [EC 3.1.4.4] [Oryza sativa]	3,00E-61	—	-0,71	—	0,00255	1
CA129774	phospholipid/glycerol acyltransferase [EC 2.3.1.158] [Oryza sativa]	3,00E-73	—	—	-0,87	0,00097	1,81
CA295451	esterase/lipase/thioesterase [EC 3.1.1.3] [Hyacinthus orientalis]	9,00E-17	—	-1,42	—	0	8,74
CA300331	acyl-CoA oxidase [EC 1.3.3.6] [Oryza sativa]	e-105	—	—	-0,79	0,00258	0,53
CA294101	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-36	—	-0,9	—	0,00122	1,96

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes que foram reprimidos. <sup>d</sup>p-value P≤0.05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

Transcritos similares a uma proteína de resistência (CA300629), proteína universal de estresse (USP1) (CA120093), e uma proteína induzida por alumínio (CA126486) responderam ao déficit hídrico leve apresentando um padrão de expressão induzido. Outros genes que correspondem a uma proteína de resistência (LR10, CA118233) e proteínas induzidas por seca (ERD4, CA118685, CA296014) foram induzidos apenas em condições severas de déficit hídrico (Tabela 7). Transcritos com similaridade para proteínas reguladas por ABA foram reprimidos em condições de déficit hídrico leve (CA128973) e severo (CA128973, CA295235), assim como e a enzima zeaxantina epoxidase, envolvida na biosíntese do ABA endógeno, que também foi reprimida em condições de déficit hídrico moderado (Tabela 7). Uma proteína desconhecida (CA294654) que apresentou determinada similaridade para metalotioneína, uma proteína queladora de metais, foi inserida na categoria de resposta ao estresse, induzida no déficit hídrico severo, como pode ser observado na Tabela 7.

O padrão de expressão detectado nas plantas sensíveis variou de 1,04 (CA130292, CA296051) a 6,68 vezes (CA120417) para os genes induzidos e uma variação de -0,88 (CA128234) a -4,62 vezes (CA122692) foi verificada para os genes reprimidos (Tabela 1F).

Tabela 7. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível) envolvidos no metabolismo de resposta ao estresse. As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Resposta a Estresse							
CA300629	resistance protein [Oryza sativa]	3,00E-22	1,41	—	—	0,00001	8,93
CA118233	resistance protein LR10 [Oryza sativa]	2,00E-11	—	1,11	1,26	0,00172	1,49
CA120093	universal stress protein USP1-like protein [Oryza sativa]	1,00E-14	1,42	—	—	0,00313	2,09
CA126486	aluminium-induced protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-40	0,86	—	—	0,00313	2,11
CA299859	aluminium-induced protein [Oryza sativa]	3,00E-34	—	—	-1,98	0,00087	1,9
CA128973	ABA-responsive HVA22 family protein [Oryza sativa]	2,00E-64	-0,59	—	-0,61	0,01282	0,22
CA295235	ABA-inducible gene protein [Zea mays]	3,00E-22	—	—	-1,37	0	8,6
CA117419	zeaxanthin epoxidase [EC 1.14.13.90] [Oryza sativa]	e-108	—	-1,18	—	0,00099	2,3
CA121481	acc oxidase [EC 1.14.17.4] [Zea mays]	4,00E-56	—	-1,18	—	0,0027	0,93
CA125124	heat shock protein HSP101 [Zea mays]	2,00E-35	—	-0,96	—	0,00415	0,39
CA120023	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	—	1,35	0	11,18
CA130162	wound-inducible basic protein [Zea mays]	1,00E-14	—	-0,75	—	0,00219	1,23
CA127367	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	—	1,21	0,00053	2,81
CA118685	early drought induced protein [Oryza sativa]	3,00E-22	—	—	1,47	0	20,19
CA296014	early-responsive to dehydration stress protein, ERD4 [Arabidopsis thaliana]	2,00E-65	—	—	1,69	0,00001	7,02
CA300174	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	1,49	0,00231	1,14
CA120096	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	1,35	0,00012	4,43
CA300326	DnaJ-like protein [Oryza sativa]	7,00E-33	—	-1,2	—	0,00044	3,24
CA294654	Os12g0568200 [Oryza sativa]	4,00E-14	—	—	1,31	0	10,81

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes reprimidos. <sup>d</sup>p-value P≤0.05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

A comparação do conjunto de genes expressos em cada cultivar mostrou aqueles que foram comuns a ambas e aqueles que foram expressos somente nas plantas tolerantes ou nas sensíveis (Figura 4). Excluindo os genes que também responderam ao déficit hídrico na cultivar sensível, podem ser verificados que 74 genes

foram expressos exclusivamente na cultivar tolerante. Os genes expressos exclusivamente na cultivar sensível somaram 341, entre induzidos e reprimidos. Analisando os genes da cultivar tolerante que também foram detectados na cultivar sensível, verificamos que 91 genes (85 induzidos e 6 reprimidos) foram comuns a ambas cultivares (Figura 4, Tabela 1G). Nas plantas sensíveis os mesmos 91 genes comuns apresentaram diferentes padrões de expressão (Tabela 1G). Dentre estes 91 genes comuns, 18 estão envolvidos no processo metabólico e mostraram um perfil semelhante, com alguns genes induzidos somente nas condições severas do déficit hídrico.

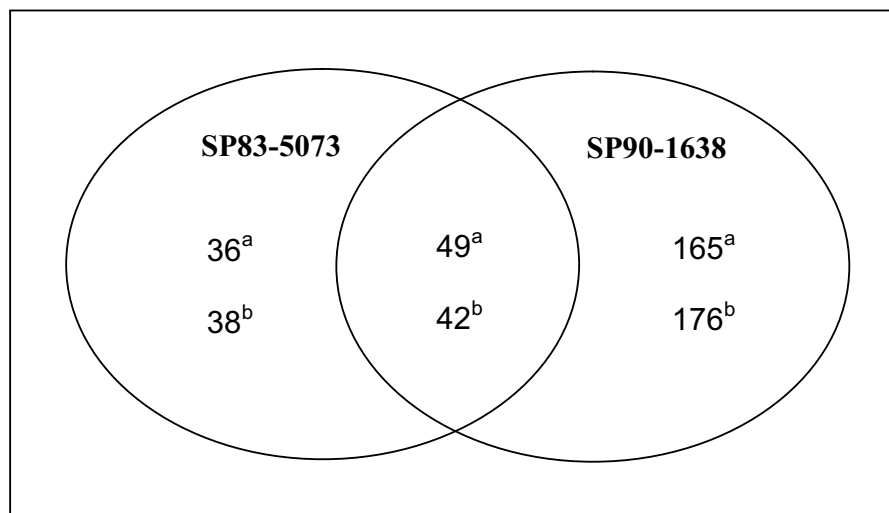


Figura 4. Diagrama de Venn. O diagrama apresenta o conjunto de genes expressos em comum nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível) e os respectivos genes exclusivos para cada cultivar. Os genes foram organizados em: <sup>(a)</sup> genes com similaridade a proteínas conhecidas e <sup>(b)</sup> genes desconhecidos, os quais incluem os genes com similaridade a proteínas desconhecidas (hipotéticas) e genes sem similaridade nos bancos de dados.



Um antagonístico padrão de expressão foi verificado para alguns genes (CA116806, CA300757, CA119309, CA120864, CA122935), que foram induzidos na cultivar tolerante e apareceram reprimidos na sensível, ou inversamente para outros genes (CA300174, CA120112). Um transcrito que codifica para uma proteína de transferência de lipídios (LTPs) (CA119309) foi induzido na cultivar tolerante e reprimido na cultivar sensível. Todos os transcritos com similaridade para esta proteína que foram expressos nas plantas tolerantes (CA121569, CA130297, CA123375, CA119309) mostraram um aumento de expressão, enquanto que aqueles identificados nas plantas sensíveis (CA120642, CA119309) foram reprimidos. Transcritos com similaridade para uma proteína cinamoil coA redutase (CA127269), uma proteína PPR (proteína com motivos PPR) (CA128234) e um transcrito sem similaridade (CA129393) foram induzidos na cultivar SP83-5073 (tolerante) mas na SP90-1638 (sensível) foram primeiramente reprimidos e somente sob condições de déficit hídrico severo mostraram-se induzidos. Em contraste, uma fosforribosilantranilate transferase” (CA123485), uma proteína desconhecida (CA117522) e um gene sem similaridade (CA294347) foram reprimidos nas plantas tolerantes, mas induzidos nas sensíveis na condição leve do déficit hídrico, seguido posteriormente por uma diminuição na expressão sob condições moderadas ou severas do déficit hídrico. Similaridades entre as cultivares também foram observadas no perfil de expressão de vários genes que foram induzidos, principalmente sob condições severas de déficit hídrico (Tabela 8).

Tabela 8. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo que apresentaram um padrão de expressão antagonístico entre as cultivares SP83-5073 (tolerante) SP90-1638 (sensível). As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> Expressão (valor de M)						<sup>d</sup> P. Value	<sup>e</sup> B
			SP83-5073		SP90-1638		Leve	Moderado		
			Moderado	Severo	Moderado	Severo				
CA116806	histone H3 (H3-1.1) [Oryza sativa]	1,00E-58	—	1,41	0,94	-1,7	—	—	0,00031	3,44
CA300757	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	0,77	-0,97	—	—	—	0,0008	2,39
CA119309	lipid transfer protein [Setaria italica]	2,00E-37	—	1,12	—	-0,83	—	—	0,00221	1,16
CA120864	hypothetical protein Os_000887 [Oryza sativa]	1,00E-06	—	0,67	—	-0,79	—	—	0,00279	0,89
CA122935	No match	—	—	1,89	-1,72	—	—	—	0,00107	2,06
CA300174	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	-1,22	—	—	—	1,49	0,00231	1,14
CA120112	transporter associated domain containing protein [Oryza sativa]	3,00E-83	—	-0,8	—	—	—	1,4	0,00464	0,3
CA127269	cinnamoyl CoA reductase [EC.1.2.1.44] [Oryza sativa]	6,00E-84	—	1	-0,9	—	—	1,24	0,00172	1,47
CA128234	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]	9,00E-17	—	0,57	—	-0,44	—	0,62	0,00013	4,37
CA129393	No match	—	—	1,09	—	-1,23	—	1,49	0,0047	0,23
CA123485	phosphoribosylanthranilate transferase [EC 2.4.2.18] [Pisum sativum]	4,00E-51	—	-0,57	0,64	-0,61	—	-0,59	0,00212	1,21
CA117522	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-68	—	-1,42	1,7	-1,48	—	-1,34	0	8,85
CA294347	No match	—	—	-1,24	1,71	-1,19	—	—	0,00261	0,96

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão ( $\log_2$ ); números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes reprimidos. <sup>d</sup>p-value  $P \leq 0,05$  <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

As seqüências dos genes diferencialmente expressos foram submetidas ao banco de dados internacional NCBI para a busca por similaridade. Os transcritos que não apresentaram similaridade foram então submetidos ao banco de dados InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) para pesquisas por seqüências de motivos e domínios de proteínas (limiar de corte usado:  $e\text{-value} \leq 10^{-5}$ ). No grupo dos 74 genes expressos exclusivamente na cultivar tolerante, 38 são apresentados como transcritos desconhecidos, dos quais 16 foram similares com proteínas desconhecidas enquanto outros ( $n = 22$ ) não foram similares às seqüências depositadas nos bancos de dados (Figura 4). Entre os genes exclusivos, expressos nas plantas sensíveis, aqueles que mostraram similaridade para proteínas desconhecidas ( $n = 70$ ) ou não apresentaram similaridade somaram 176 genes e foram reportados na Figura 4 como genes desconhecidos, devido a pouca informação sobre sua funcionalidade no metabolismo das plantas. Entre os genes comuns, 42 transcritos desconhecidos (17 proteínas desconhecidas e 25 genes sem similaridade) foram verificados com aumento de expressão em resposta ao déficit hídrico, na maioria (Figura 4).

Na cultivar tolerante, aproximadamente 46% ( $n = 76$ ) dos 165 genes identificados foram similares a seqüências de arroz, 4,2% ( $n = 7$ ) a *Arabidopsis* e 10,3% ( $n = 17$ ) a milho. Alguns transcritos também foram similares a outras plantas, como *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* entre outras (Tabela 1E). Entre as proteínas desconhecidas, a maioria dos genes foi similar a seqüências de arroz. Do mesmo modo para a cultivar sensível, dos 432 genes identificados, 48,3% ( $n = 209$ ) das seqüências foram similares com arroz, um grande número desses genes ( $n = 73$ ) representando transcritos de proteínas desconhecidas. Além disso, 14,8% dos genes diferencialmente expressos durante o déficit hídrico nas plantas sensíveis foram similares a *Arabidopsis* ( $n = 32$ ) e milho ( $n = 32$ ) (Tabela 1F).

### **4.3. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível)**

Todos os genes diferencialmente expressos foram submetidos ao banco de dados ProSite (<http://ca.expasy.org/prosite/>) para a classificação funcional, a qual pode prever as funções das proteínas no metabolismo celular. Genes foram organizados nas categorias de aminoácidos, metabolismo celular, de lipídios, de DNA, de RNA e de proteínas, bioenergética e fotossíntese, transdução de sinal, elementos genéticos móveis, crescimento vegetal, resposta ao estresse, transporte, proteínas desconhecidas e genes não classificados (sem similaridade). A classificação funcional para os genes diferencialmente expressos pela seca em cada cultivar é mostrada na Figura 5.

Os genes não classificados (sem similaridade nos bancos de dados) representam a maior categoria para ambas cultivares, envolvendo 131 genes (30,4%) na cultivar sensível e 47 (28,5%) na tolerante, seguida pela classe de proteínas desconhecidas, a qual contém 87 (20,1%) e 33 genes (20%), respectivamente. O déficit hídrico também afetou um grande número de genes no metabolismo de proteínas para as cultivares tolerante ( $n = 24$ ) e sensível ( $n = 43$ ), das quais 95% e 72% foram induzidos, respectivamente.

Uma grande diferença no percentual de transcritos entre as cultivares ocorreu na categoria de resposta ao estresse, na qual foram encontrados 9,7% ( $n = 16$ ) dos genes identificados na cultivar SP83-5073 (tolerante), com 93% ( $n = 15$ ) deles sendo induzidos durante o déficit hídrico severo. Em contraste, apenas 4,5% ( $n = 19$ ) dos genes diferencialmente expressos na cultivar SP90-1638 (sensível) foram regulados em resposta à deficiência hídrica, e 31% destes genes foram reprimidos. A categoria de metabolismo celular compreendeu 6% dos transcritos na cultivar sensível ( $n = 26$ ), dos quais 47% foram induzidos e 53% reprimidos ( $n = 14$ ) e somente 3% dos genes ( $n = 5$ ) mostraram um aumento de expressão na cultivar tolerante.

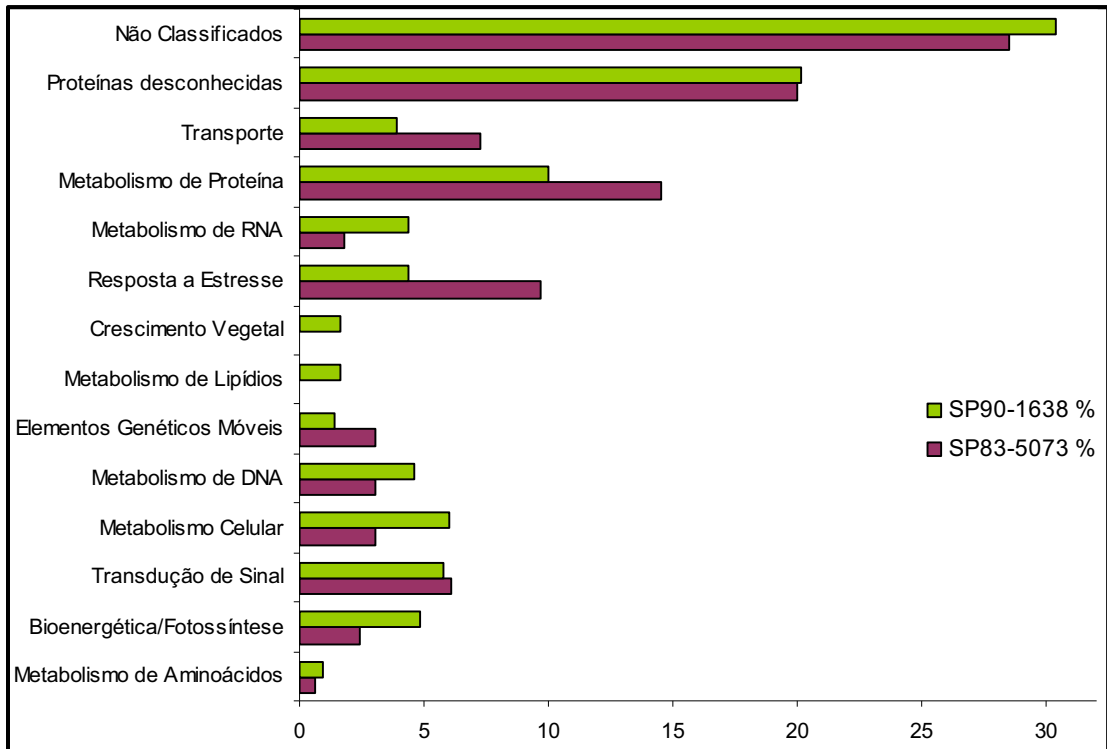


Figura 5. Classificação funcional dos genes diferencialmente expressos nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível). Genes foram organizados em 14 categorias e representados pelo percentual de cada classe no total de genes diferencialmente expressos em cada cultivar.

O metabolismo de aminoácidos foi a classe funcional menos afetada pelo déficit hídrico em ambos genótipos sensível e tolerante. A proporção de genes foi similar nas categorias bioenergética e fotossíntese, de metabolismo de DNA e de RNA, na cultivar sensível, com aproximadamente 55%, 47% e 62% dos genes sendo reprimidos, respectivamente. A proporção de genes na cultivar tolerante relacionados com estas categorias também foi baixa, mas todos os genes foram induzidos. Nenhum gene foi identificado para a categoria de crescimento vegetal e metabolismo de lipídios na cultivar tolerante, enquanto nas plantas sensíveis 1,6% dos genes diferencialmente expressos foram relacionados a estes processos.

#### 4.4. Validação dos resultados através de análises de PCR quantitativo

Para validar os resultados dos macroarranjos, 12 genes diferencialmente expressos foram analisados por PCR quantitativo (Tabela 1). A especificidade das amplificações foi avaliada pelas curvas de dissociação geradas a partir das reações de amplificação e controles negativos foram usados para confirmar a ausência de contaminação. O gene da  $\beta$ -tubulina (CA222437) foi usado como controle endógeno para normalizar a expressão relativa dos genes selecionados (ISKANDAR et al. 2004). Sua expressão nas amostras de folhas de cana-de-açúcar foi considerada estável de acordo com as curvas de amplificação (sinal emitido x número de ciclos) obtidas nos ensaios de amplificação.

Os genes selecionados são relacionados ao transporte de água (CA120560, CA128872) transporte de lipídios (CA119309), metabolismo de bioenergética (CA120417) e fotossíntese (CA293774, CA116652), indução por ferimento (CA127367), resposta a estresse (CA127376, CA300174), além de genes sem função conhecida (CA122935, CA129393). A expressão relativa dos genes foi determinada para cada réplica biológica e a média de três plantas foi utilizada. As amplificações foram realizadas para os pontos experimentais em que os genes foram considerados diferencialmente expressos. Como o método aplica uma função exponencial do sinal de amplificação detectado, os dados brutos da expressão relativa dos genes foram transformados para  $\log_2$  e são apresentados na Figura 6.

Como pode ser observado, os genes com similaridade para a proteína DNAJ (CA300174), para uma proteína de transferência de lipídios (LTP) (CA119309) e sem similaridade com proteínas (CA122935), apresentaram um perfil de expressão diferencial antagônico nas duas cultivares. O padrão de expressão dos transcritos para a proteína SAMDC, (CA127376), ZmPIP2-1 (CA120560), na cultivar tolerante, e a proteína LTP, na cultivar sensível, mostrou diferença na relação quantitativa entre as técnicas, embora confirme o perfil qualitativo destes genes. Entretanto, a expressão relativa detectada, para a maioria dos genes amplificados, corrobora os resultados dos macroarranjos, o que retrata a robustez das amplificações do PCR quantitativo.

A expressão do gene que codifica a proteína ZmPIP2-1 e do gene sem similaridade (CA122935) expresso na cultivar sensível, apresentaram a maior variação observada entre as replicatas biológicas. Os princípios adotados para cada metodologia são diferentes, e devem ser levados em consideração, assim como a variação pertinente a cada réplica biológica, a qual possivelmente pode ser minimizada com o uso da média de todas as replicatas. Assim, a utilização das replicatas biológicas para quantificar a expressão relativa dos transcritos foi significativa para a correlação dos resultados obtidos.

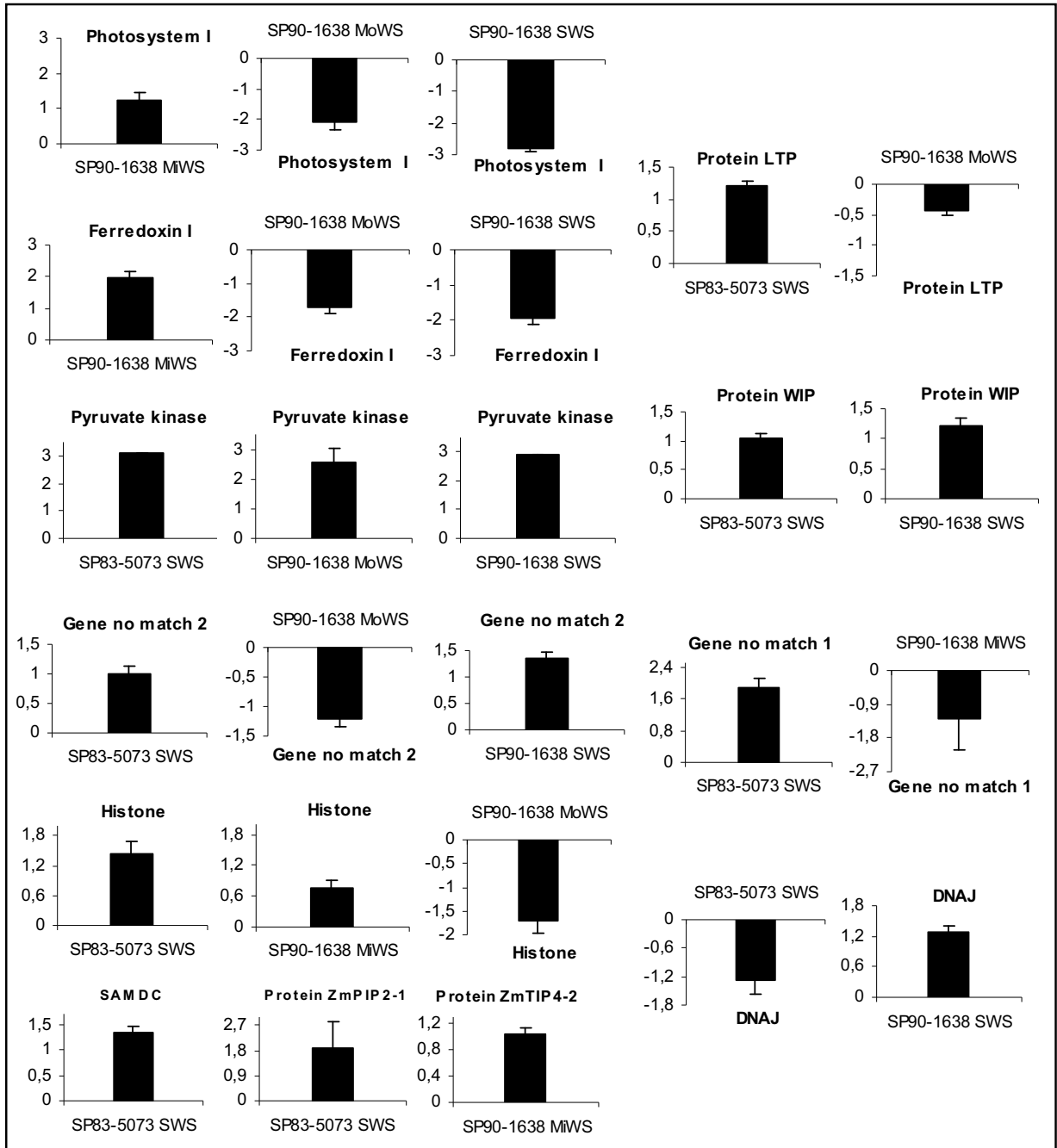


Figura 6. Validação dos resultados dos macroarranjos por PCR quantitativo. Os valores da expressão relativa ( $\log_2$ ) são mostrados nos respectivos pontos experimentais em que cada gene foi diferencialmente expresso. A quantificação relativa foi obtida através do método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  usando o gene da  $\beta$ -tubulina como controle endógeno. Os dados representam a média de três replicatas biológicas (controles e tratadas) e as barras indicam o desvio padrão. (MiWS) déficit hídrico leve; (MoWS) déficit hídrico moderado; (SWS) déficit hídrico severo.



Os dados da expressão relativa, transformados para  $\log_2$ , foram comparados aos resultados dos macroarranjos (Figura 7). Os resultados mostraram uma boa correlação entre os dois experimentos e confirmaram a expressão diferencial dos genes de cana-de-açúcar sob condições de deficiência hídrica. Nos resultados apresentados vários genes diferencialmente expressos em condições de seca foram identificados e 12 destes genes foram utilizados para confirmar os resultados obtidos pelos macroarranjos de DNA. A correlação entre os resultados obtidos para cada experimento pode inferir na qualidade das análises dos macroarranjos de DNA empregados neste trabalho para a identificação de genes envolvidos nos mecanismos de respostas da plantas para a deficiência hídrica.

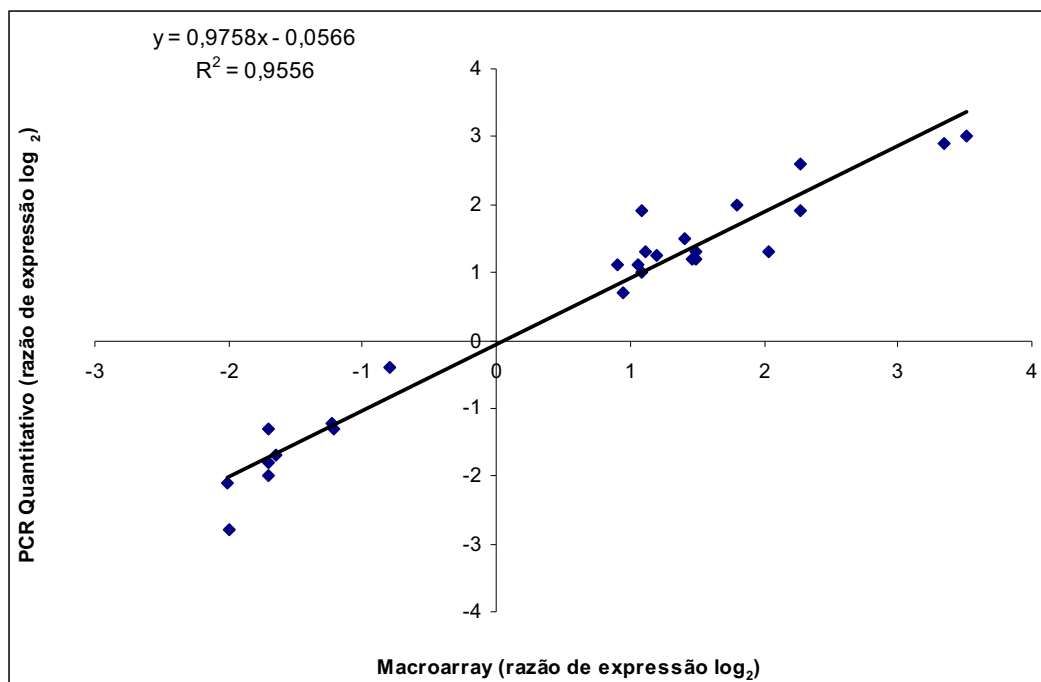


Figura 7. Correlação linear dos experimentos de expressão gênica. Os dados da razão de expressão diferencial (plantas controles/plantas submetidas ao tratamento experimental) obtidos nos experimentos de macroarranjos e PCR quantitativo foram comparados e a regressão linear dos resultados mostra a correlação entre os experimentos.

## V. DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação de genes diferencialmente expressos

Os níveis de tolerância e sensibilidade são influenciados pelo estágio de desenvolvimento da planta, órgão ou tecido, eventos prévios de exposição ao estresse e, principalmente, pela variabilidade genética (BRAY 2002). O tempo de exposição e severidade do estresse também é importante para a sobrevivência da planta sob condições de seca (PASSIOURA 2007). Genes diferencialmente expressos foram identificados em condições de déficit hídrico em plantas de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis usando a técnica de macroarranjos de DNA, a qual tem sido usada com sucesso na identificação de genes induzidos por estresse em aveia (MARASCHIN et al. 2006), para caracterizar uma família multigênica de peroxidase em *Arabidopsis* (VALÉRIO et al. 2004) e elementos genéticos transponíveis em cana-de-açúcar (ARAÚJO et al. 2005), para avaliar vias metabólicas reguladas por jasmonato (SASAKI-SEKIMOTO et al. 2005) e vias regulatórias para a tolerância ao estresse salino em *Medicago truncatula* (MERCHAN et al. 2007). A avaliação do perfil transcricional de diferentes cultivares de feijão submetidos ao déficit hídrico usando os macroarranjos, também foi relatado por MICHELETTO et al. (2007). A comparação dos dados de expressão gênica dos macroarranjos e PCR quantitativo mostrou que os resultados foram correlacionados, indicando que para a proposta deste estudo, o método dos macroarranjos de DNA foi uma eficiente ferramenta na identificação de genes expressos em folhas de cana-de-açúcar sob condições de déficit hídrico.

Neste estudo 3.575 clones de cDNA foram monitorados, mas apenas 4,62% dos genes (n = 165) foram diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico na cultivar tolerante contra 12,09% dos genes (n = 432) na sensível (Figura 2). Os genes que responderam ao estresse na cultivar tolerante foram, na maioria (98%), expressos exclusivamente sob condições de deficiência hídrica severa, a qual correspondeu para 19% da %UR no substrato (Figura 1). A percepção da deficiência hídrica pelas raízes

ocorre precocemente, e seus subseqüentes efeitos desencadeiam modificações nas folhas para a proteção da planta (LOCY et al. 2002). O déficit hídrico leve e moderado, que foi imposto às plantas tolerantes, não desencadeou alterações significativas na expressão gênica do tecido foliar. Diferentemente, para as plantas sensíveis, é possível observar um aumento no número de genes expressos ao longo de todo o tempo de exposição ao déficit hídrico (Figura 2). O conteúdo de água do substrato foi similar para as duas cultivares durante o curso do tratamento experimental, mas os resultados indicam que o déficit hídrico leve foi suficiente para ativar mudanças metabólicas nas plantas sensíveis. O enrolamento foliar pode ser associado como uma característica de tolerância ao déficit hídrico porque reduz a área foliar (INMAM-BAMBER & SMYTH 2005), entretanto, no presente trabalho este sinal morfológico foi observado primeiramente nas plantas sensíveis que nas tolerantes.

## **5.2. Classificação funcional dos genes identificados nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1368 (sensível)**

Funções biológicas foram inferidas para os genes identificados como diferencialmente expressos após submeter as seqüências aos bancos de dados para a busca por proteínas com similaridade (Figura 5). Os genes não classificados foram a maior classe funcional das 14 categorias propostas para a classificação dos genes, representando 28,5% e 30,3% dos genes identificados respectivamente nas cultivares tolerante e sensível. A segunda maior categoria foi a de proteínas desconhecidas representando 20% dos genes expressos em ambas cultivares. Neste estudo foi verificado que aproximadamente 48,5% (n = 80) e 50% (n = 218) dos genes identificados nas cultivares tolerante e sensível, respectivamente, são proteínas desconhecidas e genes não classificados (sem similaridade).

A análise funcional de genes diferencialmente expressos em função do déficit hídrico tem sido o objetivo de vários estudos para compreender as respostas das plantas e auxiliar no melhoramento de importantes culturas (CRAMER et al. 2007; ZHUANG et al. 2007; MICHELETTO et al. 2007; TÜRKAN et al. 2005; POROYKO et al.

2007). Estas pesquisas descrevem o perfil de expressão e regulação de muitos genes, mas muitos genes identificados ainda representam proteínas desconhecidas e genes sem similaridade nos bancos de dados. Em relação aos genes desconhecidos e não classificados, os resultados observados foram semelhantes aos obtidos para o perfil transcricional de milho, no qual aproximadamente 50% dos 1.715 transcritos foram genes desconhecidos (ZHUANG et al. 2007). Análises comparativas do transcriptoma de duas espécies de feijão mostraram que 27% e 14% dos 488 e 64 genes diferencialmente expressos, respectivamente para cada espécie, foram similares a genes desconhecidos e sem similaridade (MICHELETTO et al. 2007). Em *Festuca mairei*, 38% dos 163 genes diferencialmente expressos em condições de seca não mostraram similaridade significativa nos bancos de dados (WANG & BUGHRARA 2007). Este estudo, em especial, relata um resultado muito interessante porque, de acordo com os autores, a base genética desta planta parece estar associada com a adaptação xerofítica e esta monocotiledônea pode servir como referência para outras espécies relacionadas como a cana-de-açúcar. A caracterização de genes ainda não descritos nos bancos de dados deve ser considerada, porque pode adicionar novas informações na complexa rede de respostas das plantas à seca.

O déficit hídrico pode desencadear modificações nas plantas como a indução das moléculas de comunicação celular, importantes mensageiros no processo de regulação da expressão gênica (SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007). Uma cascata de transdução de sinal ineficiente, provavelmente resultará em uma expressão gênica inapropriada em resposta ao estresse. Os resultados mostraram que aproximadamente 6% dos genes diferencialmente expressos estão associados à transdução de sinal em ambas cultivares (Figura 5), mas é importante ressaltar que há uma diferença associada ao tempo de expressão (plantas sensíveis apresentaram a expressão gênica ativada precocemente) (Tabela 1E e Tabela 1F).

Considerando a categoria de metabolismo de proteínas, verificamos vários genes para a síntese de proteínas. Estes genes têm sido associados à reestruturação do metabolismo celular (ZHENG et al. 2006), regulação transcricional, dinâmica do citoesqueleto e interação do RNA na biogênese de organelas (LURIN et al. 2004;

NAKAMURA et al. 2004). Todos estes processos podem ser relacionados à célula sob condições de déficit hídrico. Dentre os genes classificados na categoria de transporte, um transportador ABC (CA300311) e uma proteína de resistência (CA295307) tiveram níveis de expressão similares em plantas tolerantes e sensíveis (Tabela 1G). Um transcrito comum para uma LTP (CA119309) foi induzido na cultivar tolerante e reprimido na sensível (Tabela 8) enquanto outros transcritos para LTPs foram induzidos nas plantas tolerantes (CA121569, CA130297, CA123375, Tabela 1E) e reprimidos nas sensíveis (CA120642, Tabela 1F). Estas proteínas parecem ter habilidade para ligar e transportar moléculas hidrofóbicas e, provavelmente, executar importantes papéis nos processos celulares, como um aumento na extensão da parede celular em tabaco (NIEUWLAND et al. 2005; CARVALHO & GOMES 2007). Suas funções foram correlacionadas com a transferência de lipídios através da matriz extracelular, e um aumento no acúmulo de cera cuticular foi observado em resposta a eventos de seca em folhas de tabaco (CAMERON et al. 2006).

A menor categoria foi a de metabolismo de aminoácidos, a qual teve um gene associado a SAMDC (CA127376) detectado na cultivar tolerante (Tabela 1E). O transcrito foi 4 vezes induzido e sua ação como uma enzima chave na síntese de poliaminas, está implicada em muitos processos biológicos, como a proteção ao déficit hídrico (ALCÁZAR et al. 2006). Resultados similares foram obtidos por TALAMÈ et al. (2007), nos quais transcritos para SAMDC responderam para o tratamento de deficiência hídrica (usando o tratamento de 'choque de seca') em plantas de aveia. Nas plantas sensíveis, o déficit hídrico leve também induziu um aumento na expressão de um transcrito para glutamato sintase (NADH-dependente) (CA296079, Tabela 1F). O efeito do estresse salino no ajustamento osmótico também induziu um aumento na atividade da glutamato sintase (NADH-dependente) em cultivares de arroz sensíveis ao sal (LUTTS et al. 1999).

### 5.3. Perfil de expressão dos genes induzidos e reprimidos em resposta ao déficit hídrico

Entre os genes induzidos apenas na cultivar tolerante (Tabela 3), foram notados transcritos para as HSPs, proteínas de choque térmico que atuam na proteção de outras proteínas contra a denaturação induzida pelo calor. Pequenas HSPs têm sido associadas à resposta ao estresse por calor em cana-de-açúcar, devido sua atividade chaperona (TIROLI & RAMOS 2007). A presença dessas proteínas sob condições de déficit hídrico poderia ser associada à transpiração reduzida devido o fechamento estomatal, o qual dificulta o resfriamento pela evaporação (LOCY et al. 2002; RIERA et al. 2005). A interação entre seca e alta temperatura avaliada em trigo mostrou que os efeitos foram consideravelmente mais fortes sob condições de estresses combinados que sob apenas um estresse (SAH & PAULSEN 2003).

Quatro proteínas induzidas por ferimento (WIP) (CA125472, CA300505, CA123153, CA124713, Tabela 3) foram mais que duas vezes induzidos pelo déficit hídrico nas plantas tolerantes. Estudos descreveram estas proteínas exercendo um papel na composição da parede celular após o ferimento mecânico em plantas de *Mesembryanthemum crystallinum*, utilizadas como modelo no estudo do estresse salino e osmótico (YEN et al. 2001). A avaliação da expressão gênica diferencial em resposta ao ferimento mecânico em *Arabidopsis* mostrou que o déficit hídrico contribuiu para a regulação de uma grande fração dos genes envolvidos na resposta ao ferimento (REYMOND et al. 2000). A proteína de resistência a doença RPM1 (CA128991, Tabela 3) e uma peroxidase (CA129040, Tabela 3) têm sido relatadas na defesa contra patógenos e metabolismo de detoxificação, respectivamente. Os metais pesados e a alta concentração de íons possuem um efeito tóxico sobre as enzimas. Assim, o processo de detoxificação torna-se muito importante para as plantas, principalmente em eventos de seca, devido as espécies reativas de oxigênio produzidas nesta condição adversa, como o peróxido de hidrogênio que é removido pela peroxidase (TÜRKAN et al. 2005).

Apenas dois genes foram induzidos em condições de déficit hídrico leve, um deles representando a proteína “bet v I allergen” (CA128069, Tabela 3), membro de uma superfamília de proteínas de resistência (PR-10). A performance destas proteínas tem sido desencadeada por ferimentos, estresse por frio e salino (RADAUER & BREITENEDER 2007), e ainda foram observadas em estudos de patogenicidade (LIU et al. 2006; SIEMENS et al. 2006). Estudos moleculares sobre a relação da proteína “bet v I allergen” nas respostas das plantas para a proteção ao déficit hídrico são desconhecidos, subsequentemente a função destas proteínas nas respostas das plantas tolerantes permanece indeterminada. O outro gene que respondeu à deficiência hídrica leve foi similar a uma “germin-like protein” (CA127402, Tabela 3), a qual pertence a uma grande família de proteínas consideradas ubíquas, que parecem ter uma função no desenvolvimento das plantas e nas respostas a várias condições de estresse (VALLELIAN-BINDSCHEDLER et al. 1998; NAKATA et al. 2002; KUKAVICA et al. 2005). A atuação celular destas proteínas foi relacionada com a função enzimática de oxalato oxidase e superóxido dismutase, função estrutural e ainda exercendo a função de receptor (BERNIER & BERNA 2001; GUCCIARDO et al. 2007).

A partir de recentes estudos de expressão gênica está se tornando mais claro que as plantas devem ter um mecanismo comum para responder a diferentes condições adversas como frio, calor, seca e doenças. Isto pode ser explicado pelo número de genes comuns associados a diferentes estresses. Outros transcritos para uma proteína de resistência (CA300629, Tabela 7), proteína universal de estresse (USP1) (CA120093, Tabela 7) e uma proteína induzida por alumínio (CA126486, Tabela 7) responderam exclusivamente ao déficit hídrico leve na cultivar sensível. Dois transcritos que codificam para proteínas induzidas por seca (CA118685, CA296014, Tabela 7) foram induzidos no déficit hídrico severo, assim como um gene de uma proteína desconhecida (CA294654, Tabela 7) a qual parece ser muito similar a uma metalotionina da classe II, de acordo com as anotações do banco de dados InterPro. Este metabolismo de resposta ao estresse nas plantas sensíveis foi mais reprimido em contraste àqueles observados nas plantas tolerantes.

Em resposta à diminuição do conteúdo de água, o ABA endógeno, presente em quantidades relativamente baixas, é redistribuído nos tecidos desidratados para proteger a planta contra a deficiência hídrica, como no fechamento estomatal. Conseqüentemente ocorre o aumento do conteúdo endógeno de ABA durante eventos de seca (REN et al. 2007). Os efeitos do ABA na fisiologia do estresse podem ativar as vias metabólicas dependentes de ABA em resposta ao déficit hídrico (RIERA et al. 2005; SHINOZAKI & YAMAGUCHI-SHINOZAKI 2007). Alguns genes regulados por ABA foram diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico (RABBANI et al. 2003; ZHENG et al. 2006; ROCHA et al. 2007). Entretanto, uma proteína regulada por ABA (HVA22) (CA128973, Tabela 7) e um gene induzido por ABA (CA295235, Tabela 7) foram reprimidos na cultivar sensível, assim como a enzima zeaxantina epoxidase (CA117419, Tabela 7), que participa na biosíntese de ABA, possivelmente importante no fechamento estomatal (CHRISTMANN et al. 2007). Para reduzir a transpiração ocorre o enrolamento foliar como uma resposta precoce ao déficit hídrico (LOCY et al. 2002). Isto pode ser correlacionado com os sinais morfológicos observados nas plantas sensíveis e nos respectivos dados de expressão gênica verificados na categoria de resposta ao estresse. Nenhum gene envolvendo a regulação por ABA foi verificado como diferencialmente expressos na cultivar tolerante.

Outra significativa via bioquímica reprimida na cultivar sensível foi a de metabolismo de lipídios. Proteínas como: a “very-long chain fatty acid condensing enzyme CUT1” (CA119547, Tabela 6), fitoene sintase 1 (CA296068, Tabela 6), acil-CoA oxidase (CA300331, Tabela 6), esterase/lipase/tioesterase, (CA295451, Tabela 6), fosfolipase D (CA294072, Tabela 6), fosfolípido/glicerol aciltransferase (CA129774, Tabela 6) e uma proteína desconhecida (CA294101, Tabela 6) foram identificados neste metabolismo. As enzimas fosfolipases D são relacionadas para a conversão do fosfatidilcolina em ácido fosfatídico, uma suposta molécula de transdução de sinal. Ademais, vias propostas mostram o envolvimento das fosfolipases D na biosíntese de glicina betaína, um osmoprotetor acumulado em plantas sob estresse osmótico (BRAY et al. 2002). Esta enzima tem sido relatada em vários estresses bióticos e abióticos e suas funções hipotéticas no metabolismo celular correspondem para a degradação de



membrana, transporte intracelular e transdução de sinal (ZHANG et al. 2005; BARGMANN & MUNIK 2006). A identificação e caracterização da fosfolipase D em amendoim mostraram que o gene foi mais induzido nas plantas tolerantes que nas sensíveis, mas que a indução de uma rápida perda de água nas folhas (tratamento de 'choque de seca') pode desencadear um aumento na expressão do gene nas plantas sensíveis (GUO et al. 2006). Todos os genes do metabolismo de lipídios identificados nas plantas sensíveis foram reprimidos sob condições moderadas e severas de déficit hídrico (Tabela 6).

Ao primeiro sinal de deficiência hídrica, as plantas fecham os estômatos para evitar a perda excessiva de água pela transpiração (RACKMILEVITCH et al. 2006). Como uma consequência, sob condições de déficit hídrico moderado a fotossíntese começa a ser afetada e com o aumento da severidade do estresse o processo fotossintético é inibido (LOCY et al. 2002). Vários genes expressos exclusivamente na cultivar sensível foram identificados na classe funcional de bioenergética e fotossíntese (Tabela 5): fotossistema I (CA121116, CA 122162), tioredoxina M (CA300805) e outros (CA119332, CA128335, CA299938, CA129721, CA300973) foram reprimidos na condição moderada. Além disso, transcritos similares a duas proteínas desconhecidas (CA300973, CA129721), supostamente envolvidas na absorção e transferência de energia entre os fotossistemas e no processo de transporte de elétrons, também foram reprimidos nas mesmas condições. O efeito do déficit hídrico no fotossistema II avaliado em trigo mostrou que a atividade do aparato fotoquímico foi notavelmente reduzida em algumas plantas devido a perda progressiva de água, e em outras plantas, onde a perda do conteúdo relativo de água foi menor, a atividade fotoquímica foi menos afetada pelo estresse, suportando o conceito de que a produtividade das plantas diminui sob condições de seca (LIU et al. 2006).

O impacto do suprimento de água na fotossíntese foi estudado em beterraba mostrando que a taxa fotossintética diminuiu com o aumento da severidade da seca (BLOCH et al. 2006). As relações hídricas em cana-de-açúcar e suas respostas para o déficit hídrico também foram consideradas por INMAN-BAMBER & SMITH (2005). De acordo com os autores a rede fotossintética e a consequente produtividade também

depende dos processos metabólicos da célula durante o estresse, porque somente sob condições severas de deficiência hídrica a atividade da piruvato ortofosfato di-quinase (CA300081) e os níveis de piruvato começam a diminuir. Em nossos resultados esta enzima (CA300081, Tabela 5), assim como a fosfoenolpiruvato carboxilase (CA294308, Tabela 5) e uma anidrase carbônica (CA118776, Tabela 5), não foram observadas nas condições moderadas ou severas do déficit hídrico, mas foram induzidas sob o déficit hídrico leve, condição em que possivelmente ainda não foram afetadas pela deficiência hídrica de forma significativa. Outro transcrito para anidrase carbônica (CA116652, Tabela 5), para precursor de plastocianina (CA125884, Tabela 5), precursor de ferredoxina I (CA116652, Tabela 5) e precursor da subunidade PsaN do fotosistema I (CA293774, Tabela 5) foram induzidos no déficit hídrico leve e subsequentemente reprimidos em condições de deficiência moderada e severa, indicando que nesta cultivar o déficit hídrico imposto foi limitante para o processo fotossintético.

Entretanto, entre os genes comuns, dois transcritos envolvidos na categoria de bioenergética com funções no metabolismo de carboidratos foram observados: uma frutoquinase 2 (CA127861) e uma piruvato quinase (CA120417), induzidos mais que 6 vezes em ambas cultivares (Tabela 1G). A piruvate quinase participa da glicólise e é muito importante para a regulação dessa via. Uma invertase (CA120362, Tabela 1E), relatada para o processo de bioenergética, também foi induzida no déficit hídrico severo nas plantas tolerantes. A enzima, envolvida no metabolismo de carboidrato, atua em uma via alternativa de degradação de sacarose, realizando uma reação irreversível que libera muita energia (BRAY et al. 2002). A performance desta enzima tem sido observada em eventos de déficit hídrico: em milho, uma invertase vacuolar foi induzida em órgãos específicos durante o déficit hídrico leve, e mudanças precoces no metabolismo de sacarose foram verificadas (KIM et al. 2000); e uma invertase citosólica foi identificada na inibição do crescimento lateral das raízes entre outras diferentes funções no desenvolvimento de *Arabidopsis* (QI et al. 2007). Sob condições de estresse a planta necessita de mais energia para manter as funções primárias e induzir seus mecanismos de proteção. Genes envolvidos no metabolismo de açúcar foram envolvidos na resposta à deficiência hídrica no tecido reprodutivo de milho, e, entre

eles, duas invertases foram relacionadas na proteção do desenvolvimento normal do pólen (ZHUANG et al. 2007). A indução de uma invertase pode indicar um possível processo de degradação de carboidrato alternativo à sacarose, via invertase, na cultivar tolerante sob condições de déficit hídrico severo. Apesar desta enzima ter sido identificada em diferentes estudos de estresse abiótico, sua função nestas condições ainda não é totalmente compreendida.

Vários estudos de expressão gênica têm mostrado resultados similares: o monitoramento de genes expressos em *Festuca mairei* mostrou proteínas DNAJ e proteínas do tonoplasto induzidas em resposta à seca, assim como identificou muitos genes reprimidos relacionados com a fotossíntese, também refletindo que a fotossíntese foi inibida pelo déficit hídrico (WANG & BUGHRARA 2007); mudança na expressão gênica foram verificadas para uma “germin-like protein” nas repostas de culturas de uva ao estresses hídrico e salino (CRAMER et al. 2007); alguns transcritos encontrados em nossos resultados como ubiquitinas, peroxidase, proteínas de choque térmico, proteínas de transporte de lipídios, transportador ABC, proteína quinase e receptor do tipo proteíno-quinase, fosfatase tipo-2C, calmodulinas, proteína de resistência a doenças, zeaxantina epoxidase, invertase, histonas, “DNA binding protein”, fotossistema I, proteínas ribossomais, SAMDC e proteína DREPP2 foram diferencialmente expressos em *Arabidopsis* sob condições de seca, frio ou alta salinidade (SEKI et al. 2002), e também foram identificados em bibliotecas de arroz submetido à seca (GOTANTLA et al. 2007) e no perfil transcricional de aveia submetida à seca através da aplicação gradual e brusca da deficiência hídrica (TALAMÉ et al. 2007).

A seca é uma condição ambiental a que todas as plantas estão sujeitas e as perspectivas futuras para a escassez de água impulsionam o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes ao déficit hídrico. Nesse contexto, a prospecção de genes envolvidos no processo de tolerância compreende a primeira etapa em um programa de melhoramento genético dirigido. Neste trabalho, vários genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico foram identificados em plantas de cana-de-açúcar. Muitos genes envolvidos nas respostas da plantas tolerantes à deficiência

hídrica não foram observados entre os genes expressos nas plantas sensíveis. Entretanto, a função metabólica de determinados genes no processo de tolerância à deficiência hídrica não está devidamente compreendida. As proteínas “Bet v I allergen” e “germin-like protein” estão relacionadas à resposta ao estresse, mas informações sobre o papel destas proteínas na proteção das plantas contra o déficit hídrico ainda é incipiente. As proteínas induzidas por ferimento (WIP) foram representadas por cinco diferentes transcritos entre aqueles que foram expressos na cultivar tolerante. A proteína LN1 não foi funcionalmente classificada devido o pouco conhecimento sobre sua atuação no metabolismo celular de plantas sob condições de seca. A superexpressão destes genes em sistemas vegetais poderá fornecer uma melhor compreensão sobre o papel destas proteínas nas respostas das plantas ao estresse. Alguns genes que apresentaram um padrão de expressão distinto em cada cultivar, como os transcritos com similaridade para uma proteína de transferência de lipídios, uma proteína hipotética, ou genes sem similaridade, também representam candidatos com potencial para aplicação em estudos de transformação de plantas. A partir destes estudos será possível obter mais informações sobre a atuação destes genes nas plantas submetidas à deficiência hídrica, e, se a inserção destes transcritos poderá atribuir à planta geneticamente modificada mais tolerância ao déficit hídrico.

## VI. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos pode-se ressaltar que:

- Os cultivares de cana-de-açúcar SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível), embora submetidos ao mesmo regime hídrico, diferiram nos níveis de tolerância à seca e sua habilidade em responder ao déficit hídrico mostrou uma variedade de genes induzidos ou reprimidos sob diferentes condições de déficit hídrico.
- As taxas de déficit hídrico leve e moderado que foram impostas às plantas não promoveram alterações significativas na expressão gênica das folhas das plantas tolerantes durante o déficit hídrico leve e moderado, mas ativaram a expressão e repressão de vários genes nas plantas sensíveis em todas as condições de deficiência hídrica analisadas.
- Na cultivar tolerante, os genes foram induzidos com o aumento da severidade, e embora ativando um menor número de genes, estas plantas suportaram o período de deficiência hídrica de maneira mais eficiente que as plantas sensíveis.
- A cultivar sensível exibiu um maior número de genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico, dos quais 45% destes genes foram reprimidos. Em contraste, na cultivar tolerante um menor número de genes foi ativado em resposta ao estresse, mas 94% destes genes foram induzidos.
- Entre os genes reprimidos na cultivar sensível, alguns foram relacionados com o metabolismo de fotossíntese, cujo perfil de expressão corrobora com as informações descritas na literatura, indicando que na cultivar sensível o processo fotossintético foi negativamente afetado pelo déficit hídrico aplicado nestas plantas.
- O perfil de expressão exibido pelas plantas sensíveis mostrou que o déficit hídrico foi percebido rapidamente, modificações morfológicas foram observadas e a expressão de vários genes foi alterada, entretanto a sensibilidade da cultivar SP90-1638 poderia ser

melhorada com a regulação positiva de alguns genes que foram reprimidos nestas plantas mas que apresentaram um padrão antagonístico nas plantas tolerantes.

- A comparação dos padrões de expressão gênica entre os genótipos contrastantes mostrou que aproximadamente 55% dos genes expressos na cultivar tolerante também foram observados na cultivar sensível, a maioria exibindo um perfil de expressão muito similar, sugerindo que alguns ajustamentos no metabolismo das plantas podem ser independentes do nível de tolerância ao estresse.
- Para cada cultivar analisada, aproximadamente 50% dos genes diferencialmente expressos representam novos genes envolvidos nas respostas das plantas ao déficit hídrico, que ainda não foram caracterizados e poderão ser utilizados em estudos para o melhoramento genético da cultura.
- Os genes de resposta ao estresse “Bet v I allergen” e “germin-like protein”, detectados em condições de déficit hídrico leve nas plantas tolerantes, podem ser aplicados em outros estudos para investigar a função destas proteínas nas plantas sob situações de deficiência hídrica.
- Os genes que apresentaram um padrão de expressão contrastante entre as cultivares, como os genes com similaridade para uma proteína de transferência de lipídios (CA119309), uma proteína desconhecida (CA120864) ou sem similaridade (CA122935, CA294347), induzidos nas plantas tolerantes e reprimidos nas sensíveis, também podem ser destacados como candidatos para a transformação genética de plantas.
- De acordo com os resultados obtidos nos experimentos de análise da expressão gênica, a metodologia dos macroarranjos de DNA, utilizada neste trabalho, foi considerada uma eficiente ferramenta para identificar genes expressos em folhas de cana-de-açúcar sob condições de deficiência hídrica.

## VII. REFERÊNCIAS

- ALCÁZAR, R.; CUEVAS, J. C.; PATRON, M.; ALTABELLA, T.; TIBURCIO, A. F. Abscisic acid modulates polyamine metabolism under water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Physiologia Plantarum**, Copenhague, v. 128, p. 448-455, 2006.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ARAÚJO, P. G.; ROSSI, M.; JESUS, E. M.; SACCAROJR, N.; KAJIHARA, D.; MASSA, R.; FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; FALCO, M. C.; CHABREGAS, S. M.; ULIAN, E. C.; MENOSSI, M.; VANSLUYS, M. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **The Plant Journal**, v. 44, p. 707-717, 2005.
- SUGARCANE TRANSCRIPTOME: A LANDMARK IN PLANT GENOMICS IN THE TROPICS. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, n. 1-4, p. 1-296, 2001. Edição especial.
- BAIROCH, A. The enzyme database in 2000. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 304-305, 2000.
- BARGMANN, B. O.; MUNNIK, T. The role of phospholipase D in plant stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 515-522, 2006.
- BARSALOBRES-CAVALARI, C.; DE ROSA, V.; NOGUEIRA, F.; FERRO, J.; DI MAURO, S.; MENOSSI, M.; ULIAN, E.; SILVA-FILHO, M. A novel system for large-scale gene expression analysis: bacterial colonies array. **Appl Microbiology Biotechnology**, v. 71, p. 963-969, 2006.
- BECKER, B.; HOLTGREFE, S.; JUNG, S.; WUNRAU, C.; KANDBINDER, A.; BAIER, M.; DIETZ, K.; BACKHAUSEN, J. E.; SCHEIBE, R. Influence of the photoperiod on redox regulation and stress responses in *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh) plants under long- and short day conditions. **Planta**, v. 224, p. 380-393, 2006.

- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J. R. Statist. Soc. B**, v. 57, p. 289-300, 1995.
- BERNIER, F.; BERNA, A. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly? **Plant Physiology Biochem.**, v. 39, p. 545-554, 2001.
- BLOCH, D.; HOFFMANN, C. M.; MÄRLÄNDER, B. Impact of water supply on photosynthesis, water use and carbon isotope discrimination of sugar beet genotypes. **Europ. Journal Agronomy**, v. 24, p. 218-225, 2006.
- BOWER, N. I.; CASU, R. E.; MACLEAN, D. J.; REVERTER, A.; CHAPMAN, S. C.; MANNERS, J. M. Transcriptional response of sugarcane roots to methyl jasmonate. **Plant Science**, v. 168, p. 761-722, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Balanço Nacional da Cana-de-açúcar e Agroenergia. **Balanço nacional da cana-de-açúcar e agroenergia**. Brasília, 2007. 139 p. Disponível em <[http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU\\_LATERAL/AGRICULTURA\\_PECUARIA/CANA\\_DE\\_ACUCAR\\_AGROENERGIA/SR\\_ESTATISTICAS/PDF%20-%20BALAN%20NACIONAL\\_0.PDF](http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/MENU_LATERAL/AGRICULTURA_PECUARIA/CANA_DE_ACUCAR_AGROENERGIA/SR_ESTATISTICAS/PDF%20-%20BALAN%20NACIONAL_0.PDF)>. Acesso em: 24 abril. 2008.
- BRAY, E. A. Abscisic acid regulation of gene expression during water deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 153-161, 2002.
- BRONER, I.; LAW, R. A. P. Evaluation of a modified atmometer for estimating reference ET. **Irrigation Science**, New York, v. 12, p. 21-26, 1991.
- CAMARGO, S. R.; CANÇADO, G. M. A.; ULIAN, E. C.; MENOSSI, M. Identification of genes responsive to the application of ethanol on sugarcane leaves. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 2119-2128, 2007.
- CAMERON, K. D.; TEECE, M. A.; SMART, L. B. Increased accumulation cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events of tree tobacco. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 140, p. 176-183, 2006.
- CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Preliminary analysis of sequence tags for sugarcane. **Crop Science**, Madison, v. 40, p. 1769-1779, 2000.



- CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Genes expressed in sugarcane maturing internodal tissue. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1075-1081, 2002.
- CARSON, D. L.; HUCKETT, B. I.; BOTHA, F. C. Sugarcane ESTs differentially expressed in immature and maturing internodal tissue. **Plant Science**, v. 162, p. 289-300, 2002.
- CARVALHO, A. O.; GOMES, V. M. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology –A concise review. **Peptides**, v. 28, p. 114-1153, 2007.
- CASAGRANDE, A. A. **Tópicos de morfologia e fisiologia da cana-de-açúcar**. Jaboticabal: Funep, 1991. 175 p.
- CASU, R. E.; GROF, C. P. L.; RAE, A. L.; MCINTYRE, C. L.; DIMMOCK, C. M.; MANNERS, J. M. Identification of a novel sugar transporter homologue strongly expressed in maturing stem vascular tissues of sugarcane by expressed sequence tag and microarray analysis. **Plant Molecular Biology**, v. 52, p. 371-386, 2003.
- CASU, R. E.; MANNERS, J. M.; BONNETT, G. D.; JACKSON, P. A.; MCINTYRE, C. L.; DUNNE, R.; CHAPMAN, S. C.; RAE, A. L.; GROF, C. P. L. Genomics approaches for the identification of genes determining important traits in sugarcane. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 137-147, 2005.
- CENBIO. Centro Nacional de Referência em Biomassa. **Biocombustível para o desenvolvimento**. São Paulo, 2008. 53 p. Disponível em: <<http://www.cenbio.org.br/pt/downloads/jornal/RBB2.pdf>>. Acesso em: 12 fev. 2008.
- CENBIO. Centro Nacional de Referência em Biomassa. Biomassa, uma arma para diminuir o efeito estufa. **Revista Brasileira de Bioenergia**, São Paulo, n. 2, p. 29=30, 2007.
- CHINNUSAMY, V.; SCHUMAKER, K.; ZHU, J. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signaling in plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 395, 225-236, 2004.
- CHRISTMANN, A.; WEILER, E. W.; STEUDLE, E.; GRILL, E. A hydraulic signal in root to shoot of water shortage. **The Plant Journal**, v. 52, p. 167-174, 2007.

- COPERSUCAR, Cooperativa de produtores de cana-de-açúcar, açúcar e álcool do Estado de São Paulo. **Relatório Técnico Interno-RTB**. Campinas: Centro de Tecnologia Canavieira, 2002. 3p. (Boletim Técnico).
- CRAMER, G. R.; ERGÜL, A.; GRIMPLET, J.; TILLET, R. L.; TATTERSALL, E. A. R.; BOHLMAN, M. C.; VICENT, D.; SONDEREGGER, J.; EVANS, J.; OSBORNE, C.; QUILICI, D.; SCHLAUCH, K. A.; SHOOLEY, D. A.; CUSHMAN, J. C. Waters and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolites profiles. **Functional Integrative Genomics**, v. 7, p. 111-134, 2007.
- DABBAS, K. M.; FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M.; GIACHETTO, P. F.; MORAES, V. A.; FERRO, J. A. Genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar inoculada com *Xanthomonas albilineans*, o agente causal da escaldadura da folha. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 32, p. 328-338, 2006.
- DE ROSA, V. E.; NOGUEIRA, F. T. S.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. Identification of methyl jasmonate-responsive genes in sugarcane using cDNA arrays. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campinas, v. 17, p. 173-180, 2005.
- DESPREZ, T.; AMSELEM, J.; CABOCHE, M.; HÖFTE, H. Differential gene expression in Arabidopsis monitored using cDNA arrays. **The Plant Journal**, v. 14, n.5, p. 643-652, 1998.
- DIOS, S.; POISA-BEIRO, L.; FIGUERAS, A.; NOVOAS, B. Suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarrays techniques reveal differential gene expression profiles in brain of sea bream infected with nodavirus. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 2195-2204, 2007.
- FELIX, J. M. **Perfil da expressão gênica em raízes de milho expostas ao alumínio utilizando macroarrays**. 2002. 137 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.
- FERRO, M. I. T.; BARROS, N. M.; DABBAS, K. M.; LAIA, M. L.; KUPPER, K. C.; MORAES, V. A.; OLIVEIRA, J. C. F.; FERRO, J. A.; ZINGARETTI, S. M. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, p. 157-166, 2007.

- FULTON, L. Some perspectives on liquid biofuels. **Revista Brasileira de Bioenergia**, São Paulo, n. 1, p. 49-52, 2007.
- GALMÉS, J.; POU, A.; ALSINA, M. M.; TOMÀS, M.; MEDRANO, H.; FLEXAS, J. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp): relationships with ecophysiological status. **Planta**, v. 226, p. 671-681, 2007.
- GENTLEMAN, R. C.; CAREY, V. J.; BATES, D. M.; BOLSTAD, B.; DETTLING, M.; DUDOIT, S.; ELLIS, B.; GAUTIER, L.; GE, Y.; GENTRY, J.; HORNIK, K.; HOTHORN, T.; HUBER, W.; IACUS, S.; IRIZARRY, R.; LEISCH, F.; LI, C.; MAECHLER, M.; ROSSINI, A. J.; SAWITZKI, G.; SMITH, C.; SMYTH, G.; TIERNEY, L.; YANG, J. Y. H.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, p. R80-R80.16, 2004.
- GORANTLA, M.; BABU, P. R.; REDDY LACHAGARI, V. B.; REDDY, A. M. M.; WUSIRIKA, R.; BENNETZEN, J. L.; REDDY, A. R. Identification of stress-responsive genes in an indica rice (*Oryza sativa* L.) using ESTs generated from drought-stressed seedlings. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 253-265, 2007.
- GRESSEL, J. Transgenics are imperative for biofuel crops. **Plant Science**, v. 174, p. 246-263, 2008.
- GROENEWALD, J.; BOTHA, F. C. Down-regulation of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase (PFP) activity in sugarcane enhances sucrose accumulation in immature internodes. **Transgenic Research**, v. 17, p. 85-92, 2008.
- GUCCIARDO, S.; WISNIEWSKI, J.; BREWIN, N. J.; BORNEMANN, S. A germin-like protein with a superoxide dismutase activity in pea nodules with high protein sequence identity to a putative rhicadhesin receptor. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 1161-1171, 2007.
- GUO, B. Z.; XU, G.; CAO, Y. G.; Holbrook, C. C. R.E. Lynch, Identification and characterization of phospholipase D and its association with drought susceptibilities in peanut (*Arachis hypogaea*). **Planta**, v. 223, p. 512-520, 2006.

- HIENG, B.; UGRINOVIC, K.; SUSTAR-VOZLIC, J.; KIDRIC, M. Different classes of proteases are involved in the response to drought of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars differing in sensitivity. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 161, p. 519-530, 2004.
- HOAGLAND, D. R.; ARNON, D. I. The water-culture method for growing for plants without soil. **Agricultural Experiment Station Circular**, v. 347, p. 1-32, 1950.
- HUBER, W.; HEYDEBRECK, A.; SÜLTMANN, H.; POUSTKA, A.; VINGRON, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. **Bioinformatics**, v. 18 (Suppl 1), p. S96-S104, 2002.
- IHAKA, R.; GENTLEMAN, R. R. A language for data analysis and graphics. **Journal of Computational and Graphical Statistics**, v. 5, p. 229-314, 1996.
- INMAN-BAMBER, N. G.; SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to waters deficits. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 92, p. 185-202, 2005.
- ISKANDAR, H. M.; 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**, v. 22, p. 325-337, 2004.
- JORNAL DA CANA. **A história da cana-de-açúcar**. 2008. Disponível em: <<http://www.jornalcana.com.br/Conteudo/HistoriadoSetor.asp>>. Acesso em: 18 abril. 2008.
- KIM, J.; MAHÉ, A.; BRANGEON, J.; PRIOUL, J. A maize vacuolar invertase, *IVR2*, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 124, p. 71-84, 2000.
- KUKAVICA, B.; VUČINIĆ, Ž.; VULETIĆ, M. Superoxido dismutase, peroxidase and germin-like protein activity in plasma membranes and apoplast of maize roots. **Protoplasma**, v. 226, p. 191-197, 2005.
- KURAMA, E. E.; FENILLE, R. C.; DE ROSA, V. E.; ROSA, D. D.; ULIAN, E. C. Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, p. 251-259, 2002.

- LAKSHMANAN, P.; GEIJSKES, R. J.; AITKEN, GROF, C. L. P.; BONNETT, G. D.; SMITH, G. R. Sugarcane biotechnology: the challenges and opportunities. ***In Vitro Cellular and Development Biology*** – Plant, v. 41, n.4; p. 345-363, 2005.
- LARCHER, W. A planta sob estresse. In: LARCHER, W. ***Ecofisiologia Vegetal***. São Carlos: RiMa, 2004. p. 341-478.
- LENNON, G. G.; LEHRACH, H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. ***Trends in Genetics***, London, v. 7, p. 314-317, 1991.
- LISSON, S. N.; INMAN-BAMBER, N. G.; ROBERTSON, M. J.; KEATING, B. A. The historical and future contribution of crop physiology and modeling research to sugarcane production systems. ***Field Crops Research***, Amsterdam, v. 92, p. 321-335, 2005.
- LIU, W. -J.; YUAN, S.; ZHANG, N. -H.; LEY, T.; DUAN, H. -G.; LIANG, H. -G.; LIN, H. -H.; Effect of water stress on photosystem 2 in two wheat cultivars. ***Biologia Plantarum***, The Hague, v. 50, p. 597-602, 2006.
- LIU, L.; ZHOU, Y.; ZHOU, G.; YE, R.; ZHAO, L. ; LI, X.; LIN, Y. Identification of early senescence associated genes in rice flag leaves. ***Plant Molecular Biology***, v. 67, p. 37-55, 2008.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  methods. ***Methods***, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOCY, R. D.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. Stress Physiology. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E. ***Plant Physiology***, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002. p. 2438-2442.
- LOVISOLO, J. A. J.; CASATI, B.; CLERICI, L.; MARAFANTE, E.; BONO, A. V.; CELATO, N.; SALVADORE, M. Gene expression profiling of renal cell carcinoma: a macroarray analysis. ***Journal Compilation***, v. 98, p. 205-216, 2006.
- LURIN, C.; ANDRÉS, C.; AUBOURG, S.; BELLAOUI, M.; BITTON, F.; BRUYE, C.; CABOCHE, M.; DEBAST, C.; GUALBERTO, J.; HOFFMANN, B.; LECHAMY, A.; LE RET, M.; MAGNIETTE, M.; MIREAU, H.; PEETERS, N.; RENOU, J.; SZUREK, B.; TACONNAT, L.; SMALL, I. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential roles in organelle biogenesis. ***The Plant Cell***, Rockville, v. 16, p. 2089-2103, 2004.

- LUTTS, S.; MAJERUS, V.; KINET, J. M. NaCl effects on proline metabolism in rice (*Oryza sativa*) seedlings. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 105, p. 450-458, 1999.
- MA, H.; SCHULZE, S.; LEE, S.; YANG, M.; MIRKOV, E.; IRVINE, J.; MOORE, P.; PATERSON, A. An EST survey of the sugarcane transcriptome. **Theor Appl Genet.**, v.108, p. 851-863, 2004.
- MARASCHIN, S. F.; CASPERS, M.; POTOKINA, E.; WÜLFERT, F.; GRANER, A.; SPAINK, H.P.; WANG, M. cDNA array analysis of stress-induced gene expression in barley androgenesis. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 127, p. 535-550, 2006.
- MENOSSE, M.; SIVA-FILHO, M. C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M-A.; SOUZA, G. M. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. **International Journal of Plant Genomics** v. 2008, p. 1-11, 2008.
- MERCHAN, F.; LORENZO, L.; RIZZO, S. G.; NIEBEL, A.; MANYANI, H.; FRUGIER, F.; SOUSA, C.; CRESPI, M. Identification of regulatory pathways involved in reacquisition of root growth after salt stress in *Medicago truncatula*. **The Plant Journal**, v. 51, p. 1-17, 2007.
- MIAO, Y.; LV, D.; WANG, P.; WANG, X.; CHEN, J.; MIAO, C.; SONG, C. An *Arabidopsis* glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress response. **The Plant Cell**, Rockville, v. 18, p. 2749-2766, 2006.
- MICHELETTO, S.; RODRIGUEZ-URIBE, L.; HERNANDEZ, R.; RICHINS, R. D.; CURRY, J.; O'CONNELL, M. A. Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. **Plant Science**, v. 173, p. 510-520, 2007.
- MOLINARI, H. B. C.; MAURUR, C. J.; DARO, E.; CAMPOS, M. K. F.; CARVALHO, J. F. R. P.; FILHO, J. C. B.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 130, p. 218-229, 2007.

- NAKAMURA, T.; SCHUSTER, G.; SUGIURA, M.; SUGITA, M. Chloroplast and RNA-binding and pentatricopeptide repeat proteins. **Biochemical Society Transactions**, v. 32, p. 571-574, 2004.
- NAKATA, M.; SHIONO, T.; WATANABE, Y.; SATOH, T. Salt stress-induced dissociation from cells of a germin-like protein with Mn-SOD activity and an increase in its mRNA in a moss *Barbula unguiculata*. **Plant Cell Physiology**, v. 43, p. 1568-1574, 2002.
- NARAYANAN, N. N.; VASCONCELOS, M. W.; GRUSAK, M. A. Expression profiling of *Oryza sativa* metal homeostasis genes in different rice cultivars using a cDNA macroarray. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 45, p. 277-286, 2007.
- NARUSAKA, Y.; NAKASHIMA, K.; SHINWARI, Z.; SAKUMA, Y.; FURIHATA, T.; ABE, H.; NARUSAKA, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Interactions between two *cis*-acting elements, ABRE, and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis thaliana rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stress. **The Plant Journal**, v. 34, p. 137-148, 2003.
- NIEUWLAND, J.; FERON, R.; HUISMAN, B. A. H.; FASOLINO, A.; HILBERS, C. W.; DERKSEN, J.; MARIANI, C. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 17, p. 2009-2019, 2005.
- NOGUEIRA, F. T. S.; DE ROSA, V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane responses to low temperature. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 132, p. 1-14, 2003.
- PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VÊNIO, R. Z. N.; OLIVEIRA, K. C.; FELIX, J. M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C. S.; SIMÕES, MA. C. Q.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; SILVA, A. M.; PEREIRA, C. A. B.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, v. 12, p. 27-38, 2005.
- PASSIOURA, J. The drought environment: physical, biological and agricultural perspectives. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 113-117, 2007.
- POROYKO, V.; SPOLLEN, W. G.; HEJIEK, L. G.; HERNANDEZ, A. G.; LENOBLE, M. E.; DAVIES, G.; NGUYEN, H. T.; SPRINGER, G. K.; SHARP, R. E.; BOHNERT, H. J. Comparing regional transcript profiles from maize primary roots under well-watered and

- low water potential conditions. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 279-289, 2007.
- QI, X.; WU, Z.; LI, J.; MO, X.; WU, S.; CHU, J.; WU, P. AtCYT-INV1, a neutral invertase, is involved in osmotic stress-induced inhibition on lateral root growth in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 64, p. 575-587, 2007.
- RABBANI, M. A.; MARUYAMA, K.; ABE, H.; KHAN, M. A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought and high salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA gel-blot analyses. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 133, p. 1755-1767, 2003.
- RACHMILEVITCH, S.; DA COSTA, M.; HUANG, B. Physiological and biochemical indicator for stress tolerance, In: HUANG, B. **Plant environment interactions** New York: CRC Press, 2006. p. 322-338.
- RADAUER, C.; BREITENEDER, H. Evolutionary biology of food plant allergens. **J. Allergy Clin Immunology**, v. 120, p. 518-525, 2007.
- RAMPINO, P.; PATALEO, S.; GERARDI, C.; MITA, G.; PERROTTA, C. Drought stress response in wheat: physiological and molecular analysis of resistant and sensitive genotypes. **Plant Cell and Environment**, Oxford, v. 29, p. 2143-2152, 2006.
- REN, H.; GAO, Z.; CHEIN, L.; WEI, K.; LIU, J.; FAN, Y.; DAVIES, W.J.; JIA, W.; ZHANG, J. Dynamic analysis of ABA accumulation in relation to the rate of ABA catabolism in maize tissues under water stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 211-219, 2007.
- REYMOND, P.; WEBER, H.; DAMOND, M.; FARMER, E. E. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Rockville, v. 12, p. 707-719, 2000.
- RIERA, M.; VALON, C.; FENZI, F.; GIRAUDAT, J.; LEUNG, J. The genetics of adaptive responses to drought stress: abscisic acid-dependent and abscisic acid-independent signaling components. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 123, p. 111-119, 2005.



- RIZHSKY, L.; LIANG, H.; SHUMAN, J.; SHULAEV, V.; DAVLETOVA, S.; MITTLER, R. When Defense Pathways Collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress [w]. **Plant Physiology**, Bethesda, v. 134, p. 1683-1696, 2004
- ROCHA, F. R.; PAPINI-TERZI, F. S.; NISHIYAMA, M. Y.; VÊNIO, R. Z. N.; VICENTINI, R.; DUARTE, R. D. C.; ROSA, V. E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A. H.; RODRIGUES, F. A.; ULIAN, E. C.; ZINGARETTI, S. M.; GALBIATTI, J. A.; ALMEIDA, R. S.; FIGUEIRA, A. V. O.; HERMELY, A. S.; SILVA-FILHO, M. C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. S. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, v. 8, p. 71-92, 2007.
- ROCHE, J.; HEWEZI, T.; BOUNIOLS, A.; GENTZBITTEL, L. Transcriptional profiles of primary metabolism and signal transduction-related genes in response to water stress in field-grown sunflower genotypes using a thematic cDNA microarray. **Planta**, v. 226, p. 601-617, 2007.
- RODRIGUES, F. A. **Expressão gênica diferencial em folhas de cana-de-açúcar sob estresse hídrico**. 2004. 67 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia – Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.
- SALASSIER, B.; SOARES, A. A.; MANTOVANI, E. C. **Manual de Irrigação**, 3. ed. Viçosa: Editora UFV, 2005. 235 p.
- SAMACH, A.; WIGGE, P. A. Ambient temperature perception in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, p. 483-486, 2005.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SASAKI-SEKIMOTO, H.; TAKI, N.; OBAYASHI, T.; AONO, M.; MATSUMOTO, F.; SAKURAI, N.; SUZUKI, H.; HIRAI, M. Y.; NOJI, M.; SAITO, K.; MASUDA, T.; TAKAMIYA, K.; SHIBATA, D.; OTHA, H. Coordinated activation of metabolic pathways for antioxidants and defence compounds by jasmonates and their roles in stress tolerance in *Arabidopsis*. **The Plant Journal**, v. 44, p. 653-668, 2005.
- SCHUMMER, M.; WAILAP, V. N. G.; BUMGARNER, R. E.; NELSON, P. S.; SCHUMMER, B.; BERDNASKI, D. W.; HASSEL, L.; BALDWIN, R. L.; KARLAN, B. Y.;

HOOD, L. Comparative hybridization of an array of 21500 ovarian cDNAs for the discovery of genes over expressed in ovarian carcinomas. **Gene**, Amsterdam, v. 238, p. 375-385, 1999.

SEKI, M.; NARUSAKA, M.; ISHIDA, J.; NANJO, T.; FUJITA, M.; OONO, Y.; KAMIYA, A.; NAKAJIMA, M.; ENJU, A.; SAKURAI, T.; SATOU, M.; AKIYAMA, K.; TAJI, T.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; CARNICINI, P.; KAWAI, J.; HAYASHIZAKI, Y.; SHINOZAKI, K. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length microarray. **The Plant Journal**, v. 31, p. 279-292, 2002.

SHAH, N. H.; PAULSEN, G. M. Interaction of drought and high temperature on photosynthesis and grain-filling of wheat. **Plant and Soil**, Netherlands, v. 257, p. 219-223, 2003.

SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G.; SPOLLEN, W. G.; SPRINGER, G. K.; BOHNERT, H. J.; NGUYEN, H. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. In: INTERNATIONAL CROP SCIENCE CONGRESS, 2004, Austrália, p. 1-11. Disponível em: <[www.cropscience.org.au](http://www.cropscience.org.au)>. Acesso em: 18 out. 2007.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 221-227, 2007.

SIEMENS, J.; SÉLLER, I.; SARX, J.; KUNS, S.; SCHULLER, A.; NAGEL, W.; SCHMÜLLING, T.; PARNISKE, M.; LUDIW-MÜLLER, J. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 19, p. 480-494, 2006.

SINGH, K. B.; FOLEY, R. C.; OÑATE-SÁNCHEZ, L. Transcription factors in plant defense and stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v.5, p. 430-436, 2002.

SMYTH, G. K.; YANG, Y. H.; SPEED, T. P. Statistical issues in microarray data analysis. In: BROWNSTEIN, M. J.; KHODURSKY, A. B. **Functional genomics: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2003. p 111-136.

- SMYTH, G. K. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. **Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology**, v. 3, 2005 Article 3. Disponível em: <<http://www.bepress.com/sagmb/vol3/iss1/art3>>.
- TAKATA, O.; KAWAMURA, Y. J.; KONISHI, F.; SASAKI, J.; KAI, T.; MIYAKURA, Y.; NAGAI, H.; TSUKAMOTO, T. cDNA Array analysis for prediction of hepatic metastasis of colorectal carcinoma. **Surg. Today**, v. 36, p.608-614, 2006.
- TALAMÉ, V.; OZTURK, N. Z.; BOHNERT, H. J.; TUBEROSA, R. Barley transcript profiles under dehydration shock and drought stress treatments: a comparative analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 229-240, 2007.
- TARDIF, G.; KAME, N. A.; ADAM, H.; LABRIE, L.; MAJOR, G.; GULICK, P.; SARHAN, F.; LALIBERTÉ, J. Interaction of network of proteins associated with abiotic stress and development in wheat. **Plant Molecular Biology**, v.63, p. 703-718, 2007.
- TIAGO, L. R. L. S.; VIEIRA, J. M.; **Cana-de-açúcar: uma alternativa de alimento para a seca**. Campo Grande: Embrapa - Gado de corte, 2002. (Comunicado Técnico, 73).
- TIROLI, A. O.; RAMOS, C. H. I. Biochemical and biophysical characterization of small heat shock proteins from sugarcane. Involvement of a specific region located at the N-terminus with substrate specificity. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 818-831, 2007.
- TRUJILLO, L. E.; SOTOLONGO, M.; MENÉNDEZ, C.; OCHOGAVIA, M. E.; COLL, Y.; HERNANDEZ, I.; BORRÁS-HIDALGO, O.; THOMMA, B. P. H. J.; VERA, P.; HERNÁNDEZ, L. SodERF3, a novel sugarcane ethylene responsive factor (ERF), enhances salt and drought tolerance when overexpressed in tobacco plants. **Plant Cell Physiology**, v. 49, n.4, p.512-525, 2008.
- TÜRKAN, I.; BOR, M.; ÖZDEMİR, F.; KOCA, H. Differential responses of lipid peroxidation and antioxidants in the leaves of drought-tolerant *P. acutifolius* Gray and drought-sensitive *P. vulgaris* subjected to polyethylene glycol mediated water stress. **Plant Science**, v. 168, p. 223-231, 2005.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **A história da cana-de-açúcar no mundo**. São Paulo, 2008a. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/memorias/cana/historia>>. Acesso em: 24 abr. 2008.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Produção e uso do etanol combustível no Brasil**. São Paulo, 2008b. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/>>. Acesso em: 24 abril. 2008.

VALÉRIO, L.; DE MEYER, M.; PENEL, C.; DUNAND, C. Expression analysis of the *Arabidopsis* peroxidase multigenic family. **Phytochemistry**, v. 65, p. 1331-1342, 2004.

VALLELIAN-BINDSCHEDLER, L.; MÖSSINGER, E.; MÉTRAUX, J.; SCHUWEIZER, P. Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley, that is insolubilized in stressed leaves. **Plant Molecular Biology**, v. 37, p. 297-308, 1998.

VETTORE, A. L.; SILVA F. R.; KEMPER, E.; ARRUDA, P. The libraries that made SUCEST. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 24, p. 1-7, 2001.

WANG, J. P.; BUGHRARA, S. S. Monitoring of gene expression profiles and identification of candidate genes involved in drought responses in *Festuca mairei*. **Molecular Genetics. Genomics**, v. 277, p. 551-587, 2007.

WANG, H.; ZHANG, H.; GAO, F.; LI, J.; LI, Z. Comparison of gene expression between upland and lowland rice cultivars under water stress using cDNA microarray. **Theor Appl Genet.**, v. 115, p. 1109-1126, 2007.

WATAKABE, A.; SUGAI, T.; NAKAYA, N.; WAKABAYASHI, K.; TAKAHASHI, H.; YAMAMORI, T.; NAWA, H. Similarity and variation in gene expression among human cerebral cortical subregions revealed by DNA macroarrays: technical consideration of RNA expression profiling from postmortem samples. **Molecular Brain Research**, Amsterdam, v. 88, p. 74-82, 2001.

WAY, H.; CHAPMAN, S.; McINTYRE, L.; CASU, R.; XUE, G. P.; MANNERS, J.; SHORTER, R. Identification of differentially expressed genes in wheat undergoing gradual water deficit stress using a subtractive hybridization approach. **Plant Science**, v. 168, p. 661-670, 2005.

XIONG, L.; SCHUMACKER, K. S.; ZHU, J. Cell signaling during cold, drought and salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, Suppl. S165-S183, 2002.

- YEN, S. K.; CHUNG, M. C.; CHEN, P. C.; YEN, H. E. Environmental and developmental regulation of the wound-induced cell wall protein WI12 in the halophyte ice plant. **Plant Physiology**, Bethesda , v. 127, p. 517-528, 2001.
- YOSHIDA, R.; UMEZAWA, T.; MIZOGUCHI, T.; TAKAHASHI, S.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K. The regulatory domain of SRK2E/OST1/SnRK2.6 interacts with ABI1 and integrates abscisic acid (ABA) and osmotic stress signals controlling stomatal closure in *Arabidopsis*. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 5310-5318, 2006.
- ZHANG, W.; YU, L.; ZHANG, Y.; WANG, X. Phospholipase D in the signaling of plant response to abscisic acid and reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1736, p. 1-9, 2005.
- ZHAO, N.; HASHIDA, H.; TAKAHASHI, N.; MISUMY, Y.; SASAKI, Y. High-density cDNA filters analysis – a novel-approach for large scale, quantitative analysis of gene expression. **Gene**, Amsterdam, v. 156, p. 207-213, 1995.
- ZHENG, J.; ZHAO, J.; ZHANG, J.; FU, J.; GOU, M.; DONG, Z.; HOU, W.; HUANG, Q.; HUANG, G. Comparative expression profiles of maize genes from a water stress-specific cDNA macroarray in response to high-salinity, cold or abscisic acid. **Plant Science**, v. 170, p. 1125-1132, 2006.
- ZHUANG, Y.; REN, G.; YUE, G.; LI, Z.; QU, X.; HOU, G.; ZHU, Y.; ZHANG, J. Effects of water-deficit stress on the transcriptomes of developing immature ear and tassel in maize. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 2137-2147, 2007.
- ZHU, J. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review Plant Biology**, Palo Alto, v. 53, p. 247-273, 2002.

## APÊNDICE A

Tabela 1A: Solução de Hoagland utilizada na irrigação das plantas de cana-de-açúcar cultivadas em casa de vegetação. A composição descrita é referente à solução na diluição de 25%. A solução de Hoagland é composta pelos macronutrientes e 1 ml da solução de micronutrientes.

Macronutrientes	Concentração (g/l)	Quantidade (ml)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,1	1
de KNO <sub>3</sub>	101,1	5
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .5 H <sub>2</sub> O	2,36	5
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	246,5	2
Fe.EDTA	1,67	1

Solução de Micronutrientes		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86	1
MnCl <sub>2</sub> .4 H <sub>2</sub> O	1,81	
ZnCl <sub>2</sub>	0,10	
CuCl <sub>2</sub>	0,04	
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .4 H <sub>2</sub> O	0,02	

## APÊNDICE B

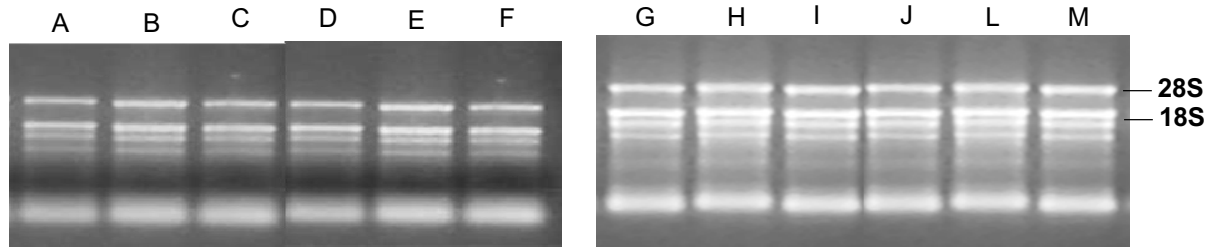


Figura 1B. Análise do RNA total em gel desnaturante de agarose 1,5%. São apresentadas amostras das plantas SP83-5073 (tolerante) controles (A, B, C) e sob déficit hídrico leve moderado e severo (D, E, F); plantas SP90-1638 (sensível) controles, (G, H, I) e sob déficit hídrico leve moderado e severo (J, L, M), respectivamente.

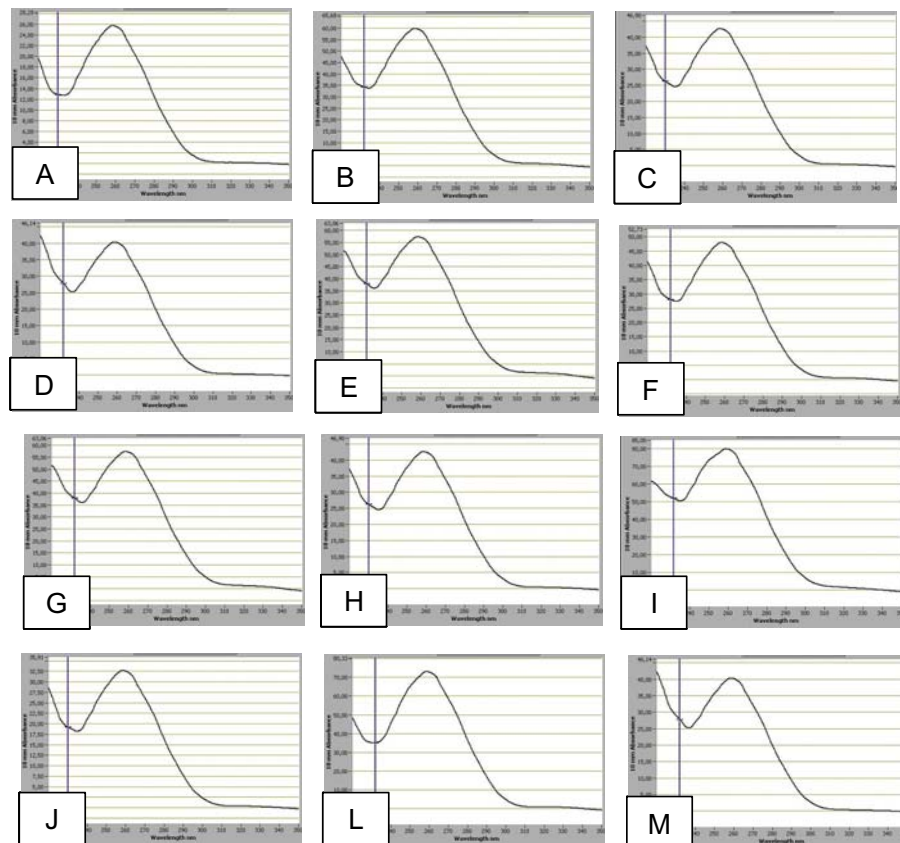


Figura 2B. A análise espectrofotométrica do RNA total. Os gráficos mostram a qualidade das amostras sem a presença de contaminantes. Amostras apresentadas na figura anterior.

## APÊNDICE C

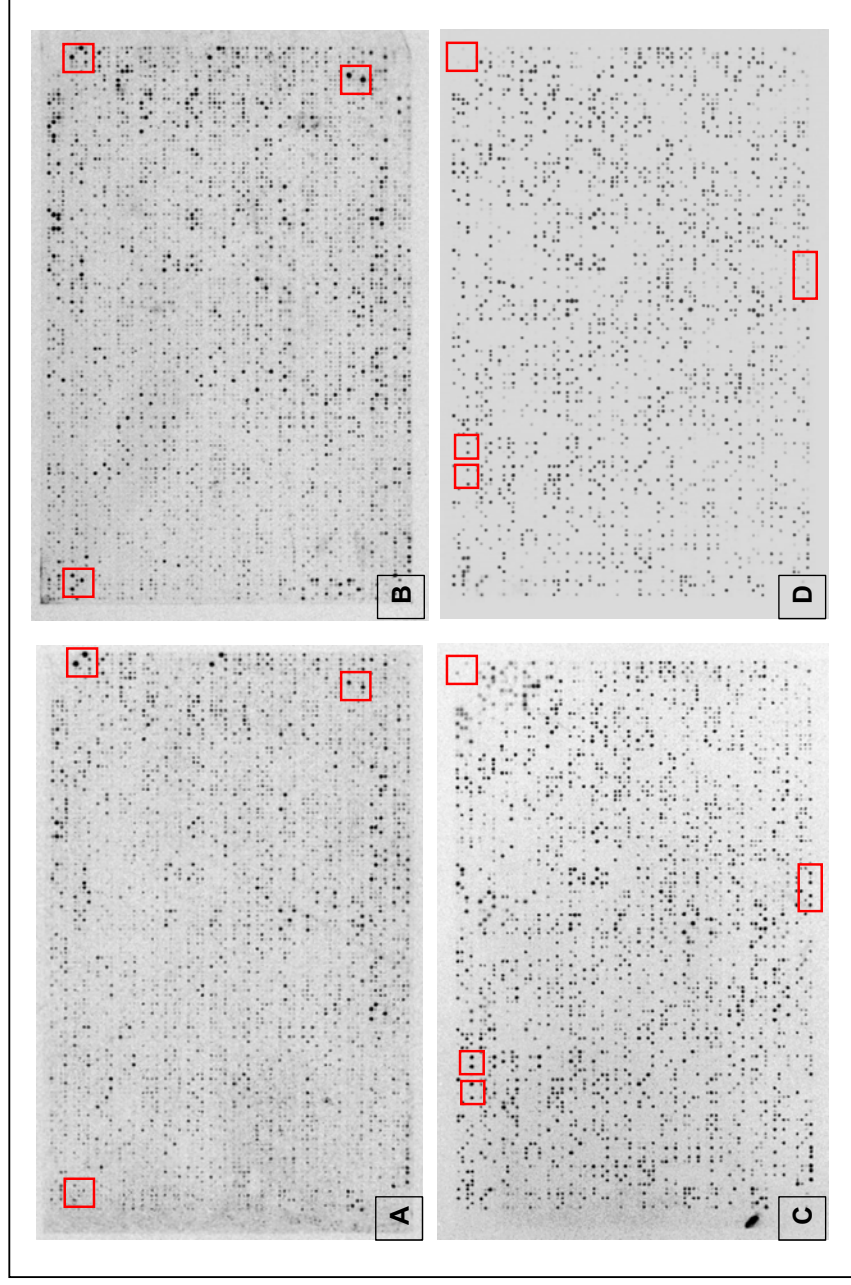


Figura 1C: Imagem digitalizada de membranas de náilon (8,5 x 12,5 cm) contendo 3.575 ESTs, em duplicata, de folhas de cana-de-açúcar. As membranas foram hibridizadas com sonda de cDNA sintetizadas a partir de amostras do RNA total de: (A) SP83-5073 (tolerante) déficit hídrico severo – planta controle; (B) SP83-5073 déficit hídrico severo – planta tratada; (C) SP90-1638 (sensível) déficit hídrico severo – planta controle; (D) SP90-1638 déficit hídrico severo – planta tratada. A diferença no sinal emitido é destacada para alguns clones.



## APÊNDICE D

Tabela 1D. Seqüências dos óligos usados nas análises de PCR quantitativo. As seqüência dos óligos foram desenhados usando o programa *Primer Express 3.0* (Applied Biosystems)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Gene	Seqüências dos óligos	
		Forward 5'– 3'	Reverse 5'– 3'
CA222437	$\beta$ -tubulina	GGAGGAGTACCCTGACAGAATGA	CAGTATCGGAAACCTTTGGTGAT
CA127376	SAMDC	TGCTGCTGAAGACGCTGTTG	TCGCCTCAAAGCAGTGTAGAAC
CA120560	Proteína ZmPIP2-1	TCGCGACGCTGCTGTTG	TCGTGTCCGTCTGGTGCTT
CA128872	Proteína ZmTIP4-2	GGCGAAGCTCGTGAACAAG	CGACGTCCGGCGTAGTGT
CA127367	Proteína WIP	CGGTTGCTCACTACTCTAACTTGCT	TGATTCATCCGCCATAAAG
CA119309	Proteína LTP	CGTTAGTACCAGTGCACGTGATG	GCTCCTCCTGTTACCACAATTTATTT
CA120417	Piruvato quinase	CATGGCTGTCCAAGGATGTTG	CAGATACTGCAGCGTACTCTCCAA
CA116806	Histone	CGCACACGCACACTGAAAG	CGGTGGCCATGATCAAAAA
CA300174	DNAJ	CCTCGGCACCTGCAGTTG	TTTTTGGTGCCAGGAATCTTG
CA293774	Ferredoxin I	CGGCGCCTAATCATGCTT	CGTACGCGGTTATCAAGAA
CA116652	Fotossistema I	CCTCGCCAAGCAGAAGAAAG	TTCCCCTCGCACTCAATCTC
CA122935	No match gene 1	GCCTTCATCTTCGGGACTTTC	CGCATTGTTCTCGAGGGATT
CA129393	No match gene 2	TCCGGTCGAGCTCCAATC	TCCTCACCCAATGCAAACCTG

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI

## APÊNDICE E

Tabela 1E. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP83-5073 (tolerante). Proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP83-5073 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Metabolismo de Aminoácidos							
CA127376	S-adenosylmethionine decarboxylase [EC.4.1.1.50] [Zea mays]	2,00E-44	—	—	2,03	0,00001	7,41
Bioenergética e fotossíntese							
CA127956	glycine-rich protein-like [Oryza sativa]	5,00E-67	—	—	1,86	0,00045	3,05
CA120362	soluble acid invertase [EC.3.2.1.26] [Saccharum officinarum]	3,00E-67	—	—	1,5	0,00001	8,05
CA120417	pyruvate kinase [Arabidopsis thaliana]	3,00E-66	—	—	3,51	0	38,54
CA127861	fructokinase 2 [EC 2.7.1.4] [Zea mays]	4,00E-69	—	—	1,17	0,00007	5,09
Transdução de sinal							
CA128186	calmodulin [Oryza sativa]	5,00E-59	—	—	1,07	0,00031	3,43
CA128254	calmodulin [Oryza sativa]	1,00E-78	—	—	0,73	0,00108	2,01
CA127352	SHR5-receptor-like kinase [Saccharum hybrid cultivar]	2,00E-26	—	—	1,53	0,00372	0,52
CA120135	actin depolymerizing factor [Zea mays]	2,00E-71	—	—	1,4	0,00354	0,59
CA118131	receptor-mediated endocytosis 1 isoform I [Oryza sativa]	4,00E-23	—	—	1,77	0	9,63
CA130180	calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	5,00E-19	—	—	1,17	0,00279	0,87
CA120154	MFP1 attachment factor 1 [Zea mays]	6,00E-15	—	—	1,2	0	8,37
CA122068	protein phosphatase type-2C [Oryza sativa]	4,00E-62	—	—	1,62	0,00003	5,91
CA130292	protein kinase [Sorghum bicolor]	4,00E-21	—	—	0,74	0,00002	6,27
CA128389	serine/threonine kinase-like protein [Oryza sativa]	2,00E-12	—	—	1,32	0,00002	6,43
Metabolismo Celular							
CA300104	glutamate decarboxylase [EC 4.1.1.15] [Oryza sativa]	3,00E-92	—	—	1,37	0	12,39
CA300972	adenosine kinase isoform 2S [EC 2.7.1.20] [Nicotiana tabacum]	3,00E-21	—	—	1,61	0	10,11
CA123485	phosphoribosylanthranilate transferase [EC 2.4.2.18] [Pisum sativum]	4,00E-51	—	—	-0,57	0,00212	1,21
CA120189	GTP-binding protein [Oryza sativa]	1,00E-04	—	—	1,6	0,00002	6,76
CA127269	cinnamoyl CoA reductase [EC.1.2.1.44] [Oryza sativa]	6,00E-84	—	—	1	0,00172	1,47
Metabolismo de DNA							
CA119306	1-acyl-glycerol-3-phosphate acyltransferase [EC 2.3.1.15] [Zea mays]	2,00E-99	—	—	1,09	0,00048	2,95
CA295768	histone H1 [Oryza sativa]	1,00E-25	—	—	0,94	0,00075	2,46
CA116806	histone H3 (H3-1.1) [Oryza sativa]	1,00E-58	—	—	1,41	0,00031	3,44
CA118893	RAD23 protein homolog [Oryza sativa]	2,00E-28	—	—	1,08	0,00003	5,98
CA282428	RAD23 protein homolog [Oryza sativa]	2,00E-28	—	—	1,81	0	13,07
Elementos Genéticos Móveis							
CA127411	retroelement [Oryza sativa]	7,00E-72	—	—	1,1	0,00165	1,65
CA126118	IS1 transposase [Zea mays]	3,00E-25	—	—	1,58	0	10,65
CA129348	transposable element Tip100 protein [Oryza sativa]	7,00E-96	—	—	1,15	0,00302	0,81
CA127195	transposable element Tip100 protein [Oryza sativa]	7,00E-96	—	—	0,89	0,00012	4,41
CA129317	hypothetical protein Os _004849 [Oryza sativa]	1,00E-27	—	—	1,21	0,00023	3,74

Tabela 1E. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP83-5073 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Resposta a Estresse							
CA128069	Bet v I allergen [Zea mays]	5,00E-14	1,17	—	—	0,02945	2,18
CA127402	germin-like protein [Zea mays]	e-100	1,16	—	—	0,00087	5,18
CA128991	disease resistance protein RPM1 [Oryza sativa]	1,00E-21	—	—	0,51	0,00358	0,55
CA118233	resistance protein LR10 [Oryza sativa]	2,00E-11	—	—	0,91	0,00172	1,49
CA129040	peroxidase [Oryza sativa]	2,00E-23	—	—	1,36	0,00002	6,21
CA129365	type 2 ribosome-inactivating protein cinnamomin III precursor [Cinnamomum camphora]	6,00E-09	—	—	1,54	0,00125	1,83
CA119144	heat shock protein hsp70 [Zea mays]	3,00E-06	—	—	1,02	0,00172	1,5
CA118620	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	—	2,19	0	28,88
CA120023	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	—	2,19	0	11,18
CA125472	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	—	1,79	0	17,16
CA300505	wound induced protein [Lycopersicon esculentum]	3,00E-19	—	—	1,95	0	8,46
CA123153	wound induced protein [Lycopersicon esculentum]	3,00E-18	—	—	1,17	0	9,32
CA124713	wound induced protein [Lycopersicon esculentum]	5,00E-17	—	—	1,88	0	12,39
CA127367	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	—	0,92	0,00053	2,81
CA300174	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	-1,22	0,00231	1,14
CA120096	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	0,87	0,00012	4,43
Metabolismo de RNA							
CA300958	AP2-domain DNA-binding protein [Oryza sativa]	2,00E-48	—	—	1,21	0,00012	4,52
CA120355	transcription factor E2Fe [Oryza sativa]	7,00E-49	—	—	1,09	0,0005	4,701
CA118103	spliceosomal protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	1,06	0	8,25
Metabolismo de Proteína							
CA123573	POZ domain protein family-like [Oryza sativa]	6,00E-76	—	—	1,06	0,00015	4,18
CA124655	protein binding [Arabidopsis thaliana]	2,00E-25	—	—	0,85	0,00122	1,87
CA116243	chaperonin 60 beta precursor [Oryza sativa]	1,00E-44	—	—	1,05	0,00219	1,16
CA120224	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like protein [Oryza sativa]	7,00E-24	—	—	0,87	0,00002	6,5
CA118903	apetala2 domain-containing CBF1-like protein [Oryza sativa]	3,00E-09	—	—	0,98	0,00304	0,78
CA128144	ribosomal protein S18 [Saccharum hybrid cultivar SP-80-3280]	3,00E-74	—	—	0,94	0,00327	0,69
CA127205	ribosomal protein L27a [Oryza sativa]	2,00E-63	—	—	1,23	0,00009	4,81
CA122916	ribosomal protein S12 [Oryza sativa]	6,00E-37	—	—	0,84	0,00046	3,01
CA122204	ribosomal protein L17 [Lycopersicon esculentum]	5,00E-13	—	—	0,98	0,00051	2,86
CA190334	S28 ribosomal protein [Triticum aestivum]	1,00E-20	—	—	0,92	0,00558	0,06
CA121411	ribosomal protein S3a, cytosolic [Oryza sativa]	1,00E-78	—	—	0,87	0,00137	1,77
CA128234	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]	9,00E-17	—	—	0,57	0,00013	4,37
CA300155	carboxyl-terminal proteinase-like [Oryza sativa]	8,00E-66	—	—	2,1	0	20,23
CA300009	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	—	1,59	0	9,6
CA300757	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	—	0,77	0,0008	2,39
CA118369	kelch repeat-containing F-box family protein-like [Oryza sativa]	7,00E-21	—	—	1,35	0	8,12
CA121094	alpha 3 subunit of 20S proteasome [Oryza sativa]	2,00E-90	—	—	1,36	0,00124	1,89
CA299967	nucleic acid binding [Arabidopsis thaliana]	3,00E-89	—	—	1,29	0,00017	4,09

Tabela 1E. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP83-5073 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA129212	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	—	1,13	0,00066	2,59
CA120113	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	—	0,91	0,00094	2,21
CA125669	farnesylated-proteins converting enzyme-2 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-54	—	—	1,34	0,00001	6,92
CA127858	translation initiation factor [Triticum aestivum]	3,00E-22	—	—	1,16	0,00001	7,93
CA127426	cell death-related protein SPL11 [Oryza sativa]	5,00E-99	—	—	1,59	0	11,62
CA300423	Os01g0265100 [Oryza sativa]	7,00E-79	—	-1,11	—	0,00176	5,11
	Transporte			—			
CA123725	transporter associated domain containing protein [Oryza sativa]	3,00E-83	—	—	1,88	0	20,76
CA120112	transporter associated domain containing protein [Oryza sativa]	3,00E-83	—	—	-0,8	0,00464	0,3
CA121569	phospholipid transfer protein 1 [Zea mays subsp. parviglumis]	4,00E-38	—	—	1,12	0,00197	1,29
CA130297	nonspecific lipid-transfer protein precursor [Zea mays]	4,00E-07	—	—	1,28	0	13,42
CA123375	lipid transfer protein [Setaria italica]	2,00E-37	—	—	0,72	0,00012	4,37
CA119309	lipid transfer protein [Setaria italica]	2,00E-37	—	—	1,12	0,00221	1,16
CA123744	ABC transporter [Oryza sativa]	3,00E-84	—	—	1,31	0	8,62
CA300311	ABC transporter [Oryza sativa]	3,00E-84	—	—	1,09	0,00007	5,11
CA295307	multidrug resistance protein [Oryza sativa]	2,00E-63	—	—	1,31	0,00001	7,84
CA117679	cation transporter [Arabidopsis thaliana]	2,00E-45	—	—	1,1	0,00455	0,32
CA120560	plasma membrane integral protein ZmPIP2-1 [Zea mays]	3,00E-80	—	—	1,31	0,00004	5,81
CA294808	P-type ATPase [Hordeum vulgare]	4,00E-75	—	—	0,79	0,00008	4,97
	Proteínas desconhecidas						
CA295470	LN1 protein [Oryza sativa]	9,00E-97	—	—	0,86	0,00319	0,72
CA116676	Os05g0148300 [Oryza sativa]	3,00E-25	—	—	0,77	0,0006	2,69
CA122669	Os01g0732000 [Oryza sativa]	4,00E-10	—	—	1,45	0	14,22
CA123166	Os12g0143100 [Oryza sativa]	9,00E-37	—	—	1,48	0,00021	3,84
CA128888	Os11g0167200 [Oryza sativa]	2,00E-70	—	—	1,46	0,00002	6,5
CA299792	OSJNBb0032K15.9 [Oryza sativa]	4,00E-19	—	—	1,17	0,0016	1,61
CA124165	Os06g0194400 [Oryza sativa]	5,00E-15	—	—	-0,94	0,00327	0,67
CA122937	OSJNBa0013K16.11 [Oryza sativa]	3,00E-18	—	—	0,78	0,00475	0,26
CA120304	Os02g0508100 [Oryza sativa]	3,00E-31	—	—	1,41	0	11,35
CA123283	Os04g0658600 [Oryza sativa]	3,00E-12	—	—	1,73	0	10,27
CA125784	OSJNBa0072D21.10 [Oryza sativa]	3,00E-77	—	—	0,84	0,00109	2,01
CA120022	OSJNBa0073L13.12 [Oryza sativa]	4,00E-27	—	—	1,17	0,00314	0,8
CA123095	P0423B08.18 [Oryza sativa]	1,00E-21	—	—	1,05	0,00455	0,32
CA130159	chloroplast hypothetical protein [Zea mays]	4,00E-26	—	—	1,88	0,00373	0,52

Tabela 1E. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP83-5073 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA300995	hypothetical protein OsI_037633 [Oryza sativa]	1,00E-69	—	—	1,21	0,00002	6,33
CA122757	hypothetical protein OsJ_009336 [Oryza sativa]	1,00E-15	—	—	1,42	0,00082	2,33
CA120864	hypothetical protein OsI_000887 [Oryza sativa]	1,00E-06	—	—	0,67	0,00279	0,89
CA189739	hypothetical protein OsJ_005962 [Oryza sativa]	1,00E-05	—	—	0,8	0,00372	0,5
CA300728	hypothetical protein OsJ_026805 [Oryza sativa]	1,00E-08	—	—	0,87	0,00517	0,15
CA119272	hypothetical protein OsJ_015015 [Oryza sativa]	1,00E-07	—	—	0,74	0,00568	0,05
CA119068	hypothetical protein OsJ_028659 [Oryza sativa]	2,00E-23	—	—	1,4	0	8,39
CA125508	hypothetical protein OsJ_015268 [Oryza sativa]	2,00E-16	—	—	1,36	0	17,16
CA282442	hypothetical protein OsI_034134 [Oryza sativa]	7,00E-52	—	—	1,99	0	17,38
CA295063	hypothetical protein OsJ_023677 [Oryza sativa]	3,00E-07	—	—	1,4	0	12,77
CA128538	hypothetical protein OsI_012184 [Oryza sativa]	3,00E-05	—	—	1,13	0,00009	4,82
CA122099	hypothetical protein [Oryza sativa]	3,00E-07	—	—	2,09	0	12,29
CA124721	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-25	—	—	1,42	0,0009	2,23
CA124242	unknown protein [Oryza sativa]	3,00E-24	—	—	0,9	0,00172	1,45
CA301013	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-25	—	—	1,17	0,00182	1,42
CA120014	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-46	—	—	1,09	0,00004	5,78
CA295315	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-17	—	—	1,15	0,0001	4,73
CA295123	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-14	—	—	1,14	0,00327	0,67
CA117522	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-68	—	—	-1,42	0	8,85
	Não Classificados		—				
CA122642	No match	—	—	—	1,83	0	12,76
CA125651	No match	—	—	—	2,38	0	11,67
CA128775	No match	—	—	—	1,27	0	8,83
CA127303	No match	—	—	—	2,1	0	22,61
CA129806	No match	—	—	—	2,34	0	22,28
CA127335	No match	—	—	—	1,71	0	19,09
CA300464	No match	—	—	—	1,96	0	17,68
CA123149	No match	—	—	—	1,83	0	17,63
CA122762	No match	—	—	—	1,86	0	17,26
CA129801	No match	—	—	—	1,17	0	12,52
CA119091	No match	—	—	—	1,42	0	10,71
CA127316	No match	—	—	—	1,56	0	8,28
CA127109	No match	—	—	—	1,16	0,00002	6,72
CA130123	No match	—	—	—	1,47	0,00007	5,16
CA125284	No match	—	—	—	0,81	0,0005	2,9
CA120279	No match	—	—	—	1,23	0,0005	2,89
CA118325	No match	—	—	—	1,03	0,00073	2,5
CA128082	No match	—	—	—	0,85	0,00082	2,37
CA120092	No match	—	—	—	1,38	0,00109	2,02

Tabela 1E. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP83-5073 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA117204	No match	—	—	—	-1,12	0,00008	4,92
CA127028	No match	—	—	—	1,77	0,00001	7,71
CA122904	No match	—	—	—	2,02	0,00001	7,7
CA129980	No match	—	—	—	0,97	0,00001	7,68
CA279843	No match	—	—	—	1,57	0,00002	6,43
CA118423	No match	—	—	—	1,18	0,00002	6,36
CA300053	No match	—	—	—	1,03	0,00012	4,49
CA118839	No match	—	—	—	1,59	0,0002	3,91
CA295116	No match	—	—	—	1,08	0,00036	3,26
CA122935	No match	—	—	—	1,89	0,00107	2,06
CA120115	No match	—	—	—	0,88	0,00192	1,35
CA129181	No match	—	—	—	0,6	0,00199	1,3
CA119070	No match	—	—	—	0,89	0,00199	1,27
CA300923	No match	—	—	—	1,08	0,00247	1,06
CA120106	No match	—	—	—	1,3	0,00302	0,81
CA129393	No match	—	—	—	1,09	0,0047	0,23
CA294347	No match	—	—	—	-1,24	0,00261	0,96
CA117222	No match	—	—	—	-0,87	0,00304	0,77
CA122017	No match	—	—	—	0,92	0,00231	1,13
CA127809	No match	—	—	—	0,74	0,00265	0,93
CA120210	No match	—	—	—	0,98	0,00309	0,75
CA127480	No match	—	—	—	1,16	0,00313	0,74
CA295749	No match	—	—	—	0,96	0,00388	0,51
CA295749	No match	—	—	—	0,92	0,00413	0,42
CA123810	No match	—	—	—	0,89	0,00482	0,25
CA295842	No match	—	—	—	0,93	0,00219	1,21
CA121376	No match	—	—	—	1,18	0,00161	1,57
CA118644	No match	—	—	—	1,15	0,0011	2,02

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão (log<sub>2</sub>): números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes que foram reprimidos. <sup>d</sup>p-value P≤0.05 <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

## APÊNDICE F

Tabela 1F. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo na cultivar SP90-1638 (sensível). As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são mostrados para cada gene. As funções metabólicas foram propostas de acordo com a atividade executada pela proteína.

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Metabolismo de aminoácidos							
CA296079	NADH dependent glutamate synthase [EC 1.4.1.14] [Oryza sativa]	3,00E-85	0,87	—	—	0,00203	2,59
CA125494	plastidic cysteine synthase 1 [EC 2.5.1.47] [Oryza sativa]	2,00E-91	—	-1,3	—	0,00001	7,54
CA117148	anthranilate synthase alpha subunit [EC 4.1.3.27] [Zea mays]	5,00E-105	—	-0,52	—	0,00171	1,56
CA116640	2-oxoglutarate-dependent oxygenase EC 1.2.1.52 [Oryza sativa]	2,00E-78	—	—	0,86	0,00005	5,39
Bioenergética e fotossíntese							
CA300081	C4-specific pyruvate orthophosphate dikinase [EC 2.7.9.1] [Zea mays]	3,00E-71	2,1	—	—	0,00005	7,16
CA294308	phosphoenolpyruvate carboxylase [EC 4.1.1.31] [Arabidopsis thaliana]	e-124	2,51	—	—	0,00005	7,03
CA118776	carbonic anhydrase [EC 4.2.1.1] [Oryza sativa]	5,00E-81	1,7	—	—	0,00034	4,92
CA116652	carbonic anhydrase [EC 4.2.1.1] [Oryza sativa]	8,00E-92	1,8	-1,28	—	0,00004	7,61
CA293774	ferredoxin I, chloroplast precursor (Fd I) [Zea mays]	1,00E-27	2,27	-1,65	-1,7	0,00003	7,97
CA116652	photosystem I complex PsaN subunit precursor [Zea mays]	1,00E-42	1,46	-2,01	-1,99	0,01059	0,5
CA121116	photosystem I assembly protein ycf3 [Zea mays]	4,00E-13	—	-1,17	—	0	9,27
CA122162	PSI type III chlorophyll a/b-binding protein [Arabidopsis thaliana]	9,00E-72	—	-1,1	—	0,00232	1,16
CA125884	plastocyanin precursor [Hordeum vulgare]	1,00E-34	1,05	-1,69	—	0,00114	3,37
CA300805	thioredoxin M-type, chloroplast precursor [Zea mays]	3,00E-69	—	-1,76	—	0,00001	7,61
CA119332	one helix protein [Deschampsia antarctica]	7,00E-29	—	-1,51	—	0	13,75
CA128335	RPT2-like protein [Sorghum bicolor]	6,00E-45	—	-0,59	—	0,00386	0,49
CA299938	oxygen-evolving enhancer protein 2, chloroplast precursor (OEE2) [Oryza sativa]	5,00E-61	—	-1,73	—	0,00147	1,69
CA299800	fructose-bisphosphate aldolase class-I [EC 4.1.2.13] [Oryza sativa]	4,00E-60	—	—	-1	0,00132	1,38
CA301008	vacuolar proton-ATPase [Oryza sativa]	1,00E-69	—	—	1	0,00256	0,54
CA120417	pyruvate kinase [Arabidopsis thaliana]	3,00E-66	—	2,27	3,34	0	38,54
CA127861	fructokinase 2 EC 2.7.1.4 [Zea mays]	4,00E-69	—	—	1,23	0,00007	5,09
CA129721	Os06g0142700 [Oryza sativa]	2,00E-57	—	-0,85	—	0,00424	0,4
CA300973	H0523F07.10 [Oryza sativa]	1,00E-33	—	-0,65	—	0,00588	0,01
CA130078	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	8,00E-22	1,97	-1,81	-1,65	0,00054	4,19
CA117255	chloroplast hypothetical protein [Zea mays]	4,00E-24	—	-1,67	—	0	12,26
Transdução de sinal							
CA125623	protein kinase [Oryza sativa]	3,00E-34	—	—	-0,83	0,00132	1,38
CA129510	protein kinase [Oryza sativa]	9,00E-15	—	-1,17	—	0,00005	5,7

Tabela 1F: (continua)

<sup>a</sup> Accesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA118376	protein kinase [Oryza sativa]	2,00E-38	—	—	1,14	0,00001	7,42
CA130292	protein kinase [Sorghum bicolor]	4,00E-21	0,52	—	0,66	0,00002	6,27
CA189862	receptor protein kinase PERK1-like protein [Oryza sativa]	2,00E-13	1,18	—	—	0,0132	0,06
CA293750	S-receptor kinase-like [Oryza sativa]	1,00E-71	—	—	-0,63	0,00238	0,7
CA118684	serine carboxypeptidase [EC 3.4.16.1] [Oryza sativa]	4,00E-30	—	-0,86	0,99	0,00365	0,62
CA293877	protein serine/threonine kinase [Oryza sativa]	2,00E-43	—	—	0,88	0,00016	3,97
CA126498	serine/threonine protein kinase [Triticum aestivum]	1,00E-52	—	—	1,89	0	15,97
CA128389	serine/threonine kinase-like protein [Oryza sativa]	2,00E-12	—	—	0,89	0,00002	6,43
CA116285	CIPK-like protein [Oryza sativa]	1,00E-20	-0,98	—	—	0,00253	2,33
CA120254	wall-associated kinase 4 [Oryza sativa]	1,00E-47	—	0,97	—	0,00079	2,5
CA296051	leucine-rich repeat protein [Oryza sativa]	2,00E-17	0,52	—	—	0,01206	0,31
CA295182	leucine rich repeat [Oryza sativa]	4,00E-61	—	-1,19	—	0,0025	1,03
CA122068	protein phosphatase type-2C [Oryza sativa]	4,00E-62	—	—	1,14	0,00003	5,91
CA121120	DREPP2 protein [Oryza sativa]	8,00E-42	—	-0,66	0,67	0,00211	1,34
CA118946	ring-box protein [Oryza sativa]	3,00E-47	—	—	0,85	0,00029	3,29
CA119308	MTN3-like [Oryza sativa]	1,00E-45	—	—	-0,8	0,00222	0,8
CA130180	calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	5,00E-19	—	—	1,81	0,00279	0,87
CA120154	MFP1 attachment factor 1 [Zea mays]	6,00E-15	—	—	1,52	0	8,37
CA116111	OSJNBa0042L16.3 [Oryza sativa]	2,00E-78	—	—	-0,96	0,00034	3,12
CA117252	hypothetical protein OsI_000887 [Oryza sativa]	1,00E-06	—	-0,91	—	0,00137	1,92
CA126854	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-19	—	-1,09	—	0,00003	6,42
CA190269	unknown protein [Oryza sativa]	3,00E-84	—	—	-1,12	0,00044	2,77
Metabolismo Celular							
CA121073	putative actin-depolymerizing factor [Oryza sativa]	1,00E-74	2,24	-1,62	—	0,0001	6,35
CA121135	ankyrin [Oryza sativa]	6,00E-75	0,92	—	—	0,00392	1,83
CA122109	S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase [EC 1.3.1.76] [Arabidopsis thaliana]	3,00E-36	—	-1,24	—	0,0004	3,4
CA126513	cytosolic factor-like protein [Oryza sativa]	5,00E-11	—	-0,95	0,89	0,0025	1,09
CA300104	glutamate decarboxylase [EC 4.1.1.15] [Oryza sativa]	3,00E-92	—	—	1,18	0	12,39
CA300972	adenosine kinase isoform 2S [EC 2.7.1.20] [Nicotiana tabacum]	3,00E-21	—	1,5	1,48	0	10,11
CA123485	phosphoribosylanthranilate transferase [EC 2.4.2.18] [Pisum sativum]	4,00E-51	0,64	-0,61	-0,59	0,00212	1,21
CA120189	GTP-binding protein [Oryza sativa]	1,00E-04	—	—	1,33	0,00002	6,76
CA127269	cinnamoyl CoA reductase [EC.1.2.1.44] [Oryza sativa]	6,00E-84	-0,9	—	1,24	0,00172	1,47
CA122055	translationally controlled tumor protein-like protein [Zea mays]	3,00E-79	—	-0,94	—	0,00055	3,04
CA117573	nucleoside diphosphate kinase I [EC.2.7.4.6] [Oryza sativa]	6,00E-72	—	-1,27	—	0,0002	4,27
CA279748	phototropic response protein family [Oryza sativa]	9,00E-70	—	—	1,29	0,00002	6,3
CA123273	NLI interacting factor (NIF) family protein-like [Oryza sativa]	1,00E-29	—	—	1,19	0,00027	3,35



Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA129729	microtubial binding protein [Oryza sativa]	3,00E-20	—	—	-0,79	0,00209	0,86
CA119785	oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family protein [EC 1.14.11] [Arabidopsis thaliana]	4,00E-48	—	—	0,68	0,0031	0,32
CA116984	phox (PX) domain-containing protein-like [Oryza sativa]	2,00E-62	—	—	-0,95	0,00322	0,29
CA295964	anthocyanin 5-O-glucosyltransferase [EC 2.4.1.116] [Oryza sativa]	5,00E-15	—	—	-0,75	0,00335	0,25
CA124564	beta-expansin 8 [Zea mays]	2,00E-28	—	—	-0,9	0,00126	1,48
CA121565	dihydropterin pyrophosphokinase [EC 2.5.1.15] [Oryza sativa]	1,00E-76	—	—	-0,85	0,00066	2,26
CA127400	light-inducible protein ATLS1 [Arabidopsis thaliana]	7,00E-46	—	-1,05	—	0,00101	2,25
CA299956	TAF5 [Oryza sativa]	2,00E-96	—	—	0,77	0,00163	1,15
CA118406	expressed protein [Oryza sativa]	2,00E-18	-0,63	—	—	0,01099	0,43
CA123718	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	4,00E-30	—	—	1,16	0,00068	2,23
CA117051	hypothetical protein OsJ_015015 [Oryza sativa]	1,00E-26	—	—	-1,16	0,00165	1,13
CA121404	hypothetical protein [Sorghum bicolor]	9,00E-22	—	-1,23	—	0,00244	1,1
CA300042	unknown protein [Oryza sativa]	e-103	—	-1,03	—	0,00002	7,02
Metabolismo de DNA							
CA125801	DNA-binding protein [Zea mays]	1,00E-44	0,68	-0,67	—	0,01311	0,15
CA125958	DNA-binding protein [Zea mays]	9,00E-24	—	—	0,98	0,00027	3,37
CA293745	DNA-binding protein family-like protein [Oryza sativa]	1,00E-62	0,54	—	—	0,00704	1,01
CA124643	DNA binding [Arabidopsis thaliana]	6,00E-36	—	—	0,85	0,00159	1,2
CA130347	histone H3.2 protein [Oryza sativa]	3,00E-42	—	-1,25	0,94	0	8,55
CA125283	histone H3.2 protein [Oryza sativa]	1,00E-42	—	-1,31	—	0,00003	6,29
CA128233	histone H2A [Oryza sativa]	8,00E-27	—	-1,66	—	0	12,62
CA128654	histone H4 [Triticum aestivum]	5,00E-39	—	-1,03	0,92	0,00028	3,82
CA118922	histone H1 [Zea mays]	2,00E-20	—	—	0,86	0,00319	0,26
CA127892	histone H2B.2. [Zea mays]	5,00E-36	—	-0,78	—	0,00145	1,85
CA119378	histone H2B.2. [Zea mays]	6,00E-09	—	—	-0,6	0,00068	2,23
CA129817	histone H4 [Hyacinthus orientalis]	2,00E-36	—	-0,94	—	0,00179	1,53
CA295768	histone H1 [Oryza sativa]	1,00E-25	—	—	1,96	0,00075	2,46
CA116806	histone H3 (H3-1.1) [Oryza sativa]	1,00E-58	0,94	-1,7	—	0,00031	3,44
CA118893	RAD23 protein homolog [Oryza sativa]	2,00E-28	—	—	1,94	0,00003	5,98
CA282428	RAD23 protein homolog [Oryza sativa]	2,00E-28	—	—	1,04	0	13,07
CA121462	helicase-like protein [Oryza sativa]	9,00E-80	—	-1,37	—	0,00005	5,77
CA294827	bifunctional nuclease [EC 3.1.30.1] [Oryza sativa]	6,00E-72	—	—	1,38	0,00001	7,85
CA120346	exonuclease [EC 3.1.4.1] [Arabidopsis thaliana]	2,00E-22	—	—	-1,06	0,00098	1,74
CA121643	replication licensing factor MCM7 homologue [Zea mays]	4,00E-39	—	—	-0,71	0,00352	0,14
Elementos Genéticos Móveis							
CA117595	polyprotein [Sorghum bicolor]	3,00E-95	—	—	-0,96	0,00044	2,73

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA294310	transposase [Oryza sativa]	8,00E-17	1,7	—	—	0	10,86
CA123277	transposon [Oryza sativa]	3,00E-17	—	—	1,7	0,00004	5,63
CA129348	transposable element Tip100 protein [Oryza sativa]	7,00E-96	—	—	1,07	0,00302	0,81
CA127195	transposable element Tip100 protein [Oryza sativa]	7,00E-96	—	—	1,06	0,00012	4,41
CA129317	hypothetical protein OsI_004849 [Oryza sativa]	1,00E-27	—	1,27	1,45	0,00023	3,74
Metabolismo de Lipídios							
CA119547	very-long-chain fatty acid condensing enzyme CUT1 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-67	—	-0,77	—	0,00057	2,96
CA296068	chloroplast phytoene synthase 1 [EC 2.5.1.32] [Zea mays]	7,00E-95	—	-0,69	—	0,00138	1,82
CA294072	phospholipase D [EC 3.1.4.4] [Oryza sativa]	3,00E-61	—	-0,71	—	0,00255	1
CA129774	phospholipid/glycerol acyltransferase [EC 2.3.1.158] [Oryza sativa]	3,00E-73	—	—	-0,87	0,00097	1,81
CA295451	esterase/lipase/thioesterase [EC 3.1.1.3] [Hyacinthus orientalis]	9,00E-17	—	-1,42	—	0	8,74
CA300331	acyl-CoA oxidase [EC 1.3.3.6] [Oryza sativa]	e-105	—	—	-0,79	0,00258	0,53
CA294101	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-36	—	-0,9	—	0,00122	1,96
Crescimento Vegetal							
CA121097	dormancy-associated protein [Codonopsis lanceolata]	1,00E-17	-0,83	—	1,05	0,0075	0,89
CA294567	ripening-related protein-like [Oryza sativa]	3,00E-56	0,73	—	—	0,01287	0,17
CA296123	auxin-regulated protein-like [Oryza sativa]	3,00E-30	1,35	—	—	0	16,06
CA127036	auxin response factor 10 [Oryza sativa]	5,00E-32	—	—	-0,82	0,00075	2,1
CA300988	dormancy-associated protein [Codonopsis lanceolata]	3,00E-20	—	—	1,39	0,00005	5,36
CA120594	nodulin-like protein [Oryza sativa]	1,00E-89	—	—	0,95	0,00148	1,24
CA279774	unknown protein [Oryza sativa]	5,00E-33	—	—	-0,84	0,00138	1,35
Resposta a Estresse							
CA300629	resistance protein [Oryza sativa]	3,00E-22	1,41	—	—	0,00001	8,93
CA118233	resistance protein LR10 [Oryza sativa]	2,00E-11	—	1,11	1,26	0,00172	1,49
CA120093	universal stress protein USP1-like protein [Oryza sativa]	1,00E-14	1,42	—	—	0,00313	2,09
CA126486	aluminium-induced protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-40	0,86	—	—	0,00313	2,11
CA299859	aluminium-induced protein [Oryza sativa]	3,00E-34	—	—	-1,98	0,00087	1,9
CA128973	ABA-responsive HVA22 family protein [Oryza sativa]	2,00E-64	-0,59	—	-0,61	0,01282	0,22
CA295235	ABA-inducible gene protein [Zea mays]	3,00E-22	—	—	-1,37	0	8,6
CA117419	zeaxanthin epoxidase [EC 1.14.13.90] [Oryza sativa]	e-108	—	-1,18	—	0,00099	2,3
CA121481	acc oxidase [EC 1.14.17.4] [Zea mays]	4,00E-56	—	-1,18	—	0,0027	0,93
CA125124	heat shock protein HSP101 [Zea mays]	2,00E-35	—	-0,96	—	0,00415	0,39
CA120023	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	—	1,35	0	11,18
CA130162	wound-inducible basic protein [Zea mays]	1,00E-14	—	-0,75	—	0,00219	1,23
CA127367	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	—	1,21	0,00053	2,81
CA118685	early drought induced protein [Oryza sativa]	3,00E-22	—	—	1,47	0	20,19

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA296014	early-responsive to dehydration stress protein, ERD4 [Arabidopsis thaliana]	2,00E-65	—	—	1,69	0,00001	7,02
CA300174	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	1,49	0,00231	1,14
CA120096	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	1,35	0,00012	4,43
CA300326	DnaJ-like protein [Oryza sativa]	7,00E-33	—	-1,2	—	0,00044	3,24
CA294654	Os12g0568200 [Oryza sativa]	4,00E-14	—	—	1,31	0	10,81
Metabolismo de RNA							
CA123596	Myb51 protein [Oryza sativa]	1,00E-32	-0,95	—	—	0,01206	0,32
CA118551	Myb transcription factor MYB-IF25 [Zea mays]	8,00E-28	—	—	0,65	0,00098	1,77
CA120062	Myb transcription factor-like [Oryza sativa]	5,00E-43	—	—	1,26	0,00004	5,54
CA125544	Myb transcription factor [Oryza sativa]	2,00E-30	—	—	-1,03	0,00342	0,18
CA120627	transcriptional factor B3-like [Oryza sativa]	2,00E-22	—	—	0,96	0,00047	2,64
CA119558	transcription factor [Oryza sativa]	3,00E-53	—	-0,77	—	0,00101	2,21
CA120355	transcription factor E2Fe [Oryza sativa]	7,00E-49	—	—	1,12	0,0005	4,701
CA190110	LHY protein [Oryza sativa]	8,00E-55	1,92	—	-1,62	0,00001	9,61
CA126404	bicoid-interacting protein 3-like [Oryza sativa]	3,00E-52	—	-0,79	—	0,00001	7,94
CA117466	zinc finger, C2H2-type [Medicago truncatula]	2,00E-52	—	-0,82	—	0,00072	2,63
CA301112	nuclear matrix protein 1 [Zea mays]	9,00E-08	—	-1,89	—	0,00001	7,52
CA122692	RNA pol II accessory factor [Arabidopsis thaliana]	1,00E-49	—	-2,31	—	0	14,29
CA293475	glutamyl-tRNA reductase [Oryza sativa]	9,00E-71	—	-0,97	—	0,00219	1,22
CA300785	TCP-domain protein [Oryza sativa]	4,00E-13	—	—	1,16	0,00169	1,11
CA294831	ribonuclease PH [EC 2.7.7.56] [Oryza sativa]	8,00E-12	—	—	0,83	0,00355	0,11
CA295475	glycine-rich RNA-binding protein [Sorghum bicolor]	3,00E-41	—	—	1,37	0,00204	0,92
CA300958	AP2-domain DNA-binding protein [Oryza sativa]	2,00E-48	—	—	1,98	0,00012	4,52
CA118103	spliceosomal protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	—	0,77	0	8,25
CA128781	hypothetical protein OsI_012845 [Oryza sativa]	3,00E-15	—	-1,34	—	0,00002	6,84
Metabolismo de Proteína							
CA125872	ubiquitin [Zea mays]	2,00E-69	0,6	-1,33	0,65	0,00612	1,28
CA300758	polyubiquitin [Oryza sativa]	2,00E-92	—	0,93	—	0,0027	0,91
CA294435	protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion binding [Arabidopsis thaliana]	2,00E-08	0,63	—	—	0,01311	0,06
CA129212	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	—	0,76	0,00066	2,59
CA120113	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	—	1,27	0,00094	2,21
CA124140	ring finger protein 5 [Oryza sativa]	8,00E-31	—	-0,8	—	0,00176	1,55
CA128249	prolyl 4-hydroxylase -like [Oryza sativa]	6,00E-61	0,65	—	—	0,007	1,05
CA118879	Ulp1 protease family, C-terminal catalytic domain containing protein [Oryza sativa]	2,00E-11	0,87	—	0,69	0,00036	4,83

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA119092	F-box domain containing protein [Oryza sativa]	4,00E-35	—	-0,99	—	0,00083	2,49
CA127115	F-box protein [Oryza sativa]	1,00E-19	—	-1,44	—	0,00255	1
CA296046	POZ domain protein family-like [Oryza sativa]	4,00E-61	—	-1,03	—	0,00066	2,8
CA128234	pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]	9,00E-17	—	-0,44	0,62	0,00013	4,37
CA119317	plastid ribosomal protein L19 precursor [Arabidopsis thaliana]	2,00E-45	—	-1,58	—	0	10,76
CA119317	50S ribosomal protein L10 [Oryza sativa]	5,00E-68	—	-0,77	—	0,0027	0,93
CA119363	ribosomal protein L38e [Medicago truncatula]	6,00E-27	—	-0,84	—	0,0027	0,89
CA122194	ribosomal protein L7 [Hyacinthus orientalis]	1,00E-47	—	—	1,22	0,00023	3,56
CA128696	ribosomal protein L26 [Oryza sativa]	2,00E-59	—	—	1,12	0,00002	6,53
CA300161	60S ribosomal protein L31 [Oryza sativa]	2,00E-50	—	—	0,81	0,00004	5,86
CA128712	60S ribosomal protein L37 [Oryza sativa]	3,00E-28	—	—	0,95	0,00106	1,69
CA127395	60S ribosomal protein L30 [Zea mays]	2,00E-55	—	—	-0,71	0,00345	0,17
CA128218	40S ribosomal protein S15 [Oryza sativa]	1,00E-32	—	—	0,97	0,00007	4,97
CA125393	40S ribosomal protein S11 [Oryza sativa]	2,00E-69	—	—	0,71	0,00256	0,59
CA128144	ribosomal protein S18 [Saccharum hybrid cultivar SP-80-3280]	3,00E-74	—	—	1,04	0,00327	0,69
CA127205	ribosomal protein L27a [Oryza sativa]	2,00E-63	—	—	1,46	0,00009	4,81
CA122916	ribosomal protein S12 [Oryza sativa]	6,00E-37	—	—	1,58	0,00046	3,01
CA122204	ribosomal protein L17 [Lycopersicon esculentum]	5,00E-13	—	—	1,06	0,00051	2,86
CA190334	S28 ribosomal protein [Triticum aestivum]	1,00E-20	—	—	1,29	0,00558	0,06
CA300731	cysteine-type peptidase [Arabidopsis thaliana]	2,00E-28	—	—	1,43	0,00039	2,93
CA117569	seryl-tRNA synthetase [EC 6.1.1.11] [Zea mays]	1,00E-68	—	—	0,98	0,00039	2,88
CA300155	carboxyl-terminal proteinase-like [Oryza sativa]	8,00E-66	—	—	1,27	0	20,23
CA300009	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	—	0,86	0	9,6
CA300757	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	-0,97	—	—	0,0008	2,39
CA118369	kelch repeat-containing F-box family protein-like [Oryza sativa]	7,00E-21	—	—	1,23	0	8,12
CA121094	alpha 3 subunit of 20S proteasome [Oryza sativa]	2,00E-90	—	—	1,14	0,00124	1,89
CA299967	nucleic acid binding [Arabidopsis thaliana]	3,00E-89	—	—	1,04	0,00017	4,09
CA125669	farnesylated-proteins converting enzyme-2 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-54	—	—	0,96	0,00001	6,92
CA127858	translation initiation factor [Triticum aestivum]	3,00E-22	—	—	1,17	0,00001	7,93
CA127426	cell death-related protein SPL11 [Oryza sativa]	5,00E-99	—	1,63	1,34	0	11,62
CA300423	Os01g0265100 [Oryza sativa]	7,00E-79	1,25	-1,35	—	0,00176	5,11
CA121796	Os05g0507200 [Oryza sativa]	7,00E-31	—	-0,72	—	0,00248	1,12
CA190212	Os02g0122300 [Oryza sativa]	7,00E-12	—	-1,18	1,29	0,00411	0,47
CA119574	hypothetical protein OsJ_033821 [Oryza sativa]	3,00E-16	—	-0,87	—	0,00217	1,24
CA125617	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-26	—	—	1,95	0,00002	6,85

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
Transporte							
CA116798	copper chaperone [Oryza sativa]	7,00E-29	1,15	-0,93	—	0,00007	6,75
CA117781	sorbitol transporter [Oryza sativa]	1,00E-51	0,65	—	—	0,00252	2,39
CA125546	iron inhibited ABC transporter 2 [Oryza sativa]	2,00E-72	—	—	0,88	0,003	0,32
CA126961	zinc transporter [Oryza sativa]	4,00E-56	—	-1,21	—	0	10,7
CA300577	zinc transporter [Arabidopsis thaliana]	3,00E-54	—	-0,92	—	0,00019	4,3
CA120112	transporter associated domain containing protein [Oryza sativa]	3,00E-83	—	—	1,4	0,00464	0,3
CA128872	tonoplast membrane integral protein ZmTIP4-2 [Zea mays]	2,00E-30	1,06	—	—	0,00655	1,18
CA300311	ABC transporter [Oryza sativa]	3,00E-84	—	—	1,32	0,00007	5,11
CA123942	peroxisomal Ca-dependent solute carrier [Oryza sativa]	6,00E-65	—	-0,79	—	0,00021	4,14
CA294400	cytochrome f [Saccharum hybrid cultivar SP-80-3280]	5,00E-95	—	-0,86	—	0,00138	1,86
CA120642	lipid transfer protein [Oryza sativa]	3,00E-31	—	-0,76	—	0,00073	2,62
CA119309	lipid transfer protein [Setaria italica]	2,00E-37	—	-0,83	—	0,00221	1,16
CA164444	protease inhibitor/seed storage [Arabidopsis thaliana]	6,00E-12	—	—	1,28	0,0002	3,72
CA295307	multidrug resistance protein [Oryza sativa]	2,00E-63	—	1,28	1,57	0,00001	7,84
CA118811	P0697C12.13 [Oryza sativa]	2,00E-17	—	—	0,92	0,00066	2,27
CA121801	hypothetical protein OsJ_021207 [Oryza sativa]	6,00E-59	—	0,63	—	0,0036	0,55
CA118847	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-56	—	—	1,09	0,00048	2,61
Proteína desconhecida							
CA299786	Os04g0685700 [Oryza sativa]	4,00E-12	—	—	1,12	0,00002	6,66
CA189900	Os03g0125600 [Oryza sativa]	6,00E-21	—	—	1,02	0,00046	2,69
CA120909	Os09g0383400 [Oryza sativa]	1,00E-07	—	—	-0,87	0,00291	0,41
CA119287	Os01g0756300 [Oryza sativa]	8,00E-09	—	—	-0,98	0,00164	1,15
CA299731	Os04g0298600 [Oryza sativa]	3,00E-37	—	-0,76	—	0,00386	0,46
CA118639	Os03g0281000 [Oryza sativa]	1,00E-23	—	-1,7	—	0	11,14
CA120909	OSJNBb0032D24.14 [Oryza sativa]	e-100	—	—	-1,06	0,00087	1,94
CA121449	OSIGBa0101C23.9 [Oryza sativa]	1,00E-09	—	-0,84	—	0,00025	3,94
CA123569	P0031D02.33 [Oryza sativa]	2,00E-55	—	-0,9	—	0,00482	0,25
CA121788	B1131B07.26 [Oryza sativa]	3,00E-68	—	—	-0,95	0,00217	0,81
CA120304	Os02g0508100 [Oryza sativa]	3,00E-31	—	—	0,94	0	11,35
CA123283	Os04g0658600 [Oryza sativa]	3,00E-12	—	—	1,19	0	10,27
CA125784	OSJNBa0072D21.10 [Oryza sativa]	3,00E-77	—	—	0,79	0,00109	2,01
CA120022	OSJNBa0073L13.12 [Oryza sativa]	4,00E-27	—	—	1,13	0,00314	0,8
CA123095	P0423B08.18 [Oryza sativa]	1,00E-21	—	1,06	—	0,00455	0,32
CA294417	EMB1417 [Arabidopsis thaliana]	6,00E-49	—	—	0,67	0,00227	0,78
CA124687	expressed protein [Oryza sativa]	1,00E-14	—	—	1,05	0,00256	0,61
CA300395	expressed protein [Oryza sativa]	2,00E-14	—	—	0,82	0,00094	1,81

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA295070	expressed protein [Oryza sativa]	2,00E-26	—	—	0,91	0,00095	1,78
CA129149	expressed protein [Arabidopsis thaliana]	5,00E-57	—	-1,17	—	0,00024	4
CA129841	putative protein [Arabidopsis thaliana]	4,00E-12	-1	—	—	0,00036	4,74
CA126450	unnamed protein product [Arabidopsis thaliana]	1,00E-53	—	-1,53	—	0	12,05
CA119068	hypothetical protein OsJ_028659 [Oryza sativa]	2,00E-23	—	1,63	1,51	0	8,39
CA125508	hypothetical protein OsJ_015268 [Oryza sativa]	2,00E-16	—	—	0,83	0	17,16
CA300995	hypothetical protein OsI_037633 [Oryza sativa]	1,00E-69	—	1,26	1,1	0,00002	6,33
CA122757	hypothetical protein OsJ_009336 [Oryza sativa]	1,00E-15	—	—	1,63	0,00082	2,33
CA282442	hypothetical protein OsI_034134 [Oryza sativa]	7,00E-52	—	1,8	1,92	0	17,38
CA295063	hypothetical protein OsJ_023677 [Oryza sativa]	3,00E-07	—	1,42	1,58	0	12,77
CA120864	hypothetical protein OsI_000887 [Oryza sativa]	1,00E-06	—	-0,79	—	0,00279	0,89
CA125366	hypothetical protein OsI_030532 [Oryza sativa]	1,00E-06	1,72	—	—	0,00026	5,24
CA121187	hypothetical protein OsI_020167 [Oryza sativa]	5,00E-08	-0,95	—	1	0,01287	0,15
CA116281	hypothetical protein OsJ_013206 [Oryza sativa]	4,00E-15	—	0,77	0,82	0,00495	0,15
CA300323	hypothetical protein OsI_010090 [Oryza sativa]	9,00E-05	—	1,25	1,72	0,00324	0,75
CA119909	hypothetical protein OsI_008671 [Oryza sativa]	3,00E-08	—	0,89	—	0,00382	0,51
CA295478	hypothetical protein OsI_020457 [Oryza sativa]	8,00E-90	—	-0,69	—	0,00232	1,13
CA126596	hypothetical protein OsI_025804 [Oryza sativa]	1,00E-09	—	-1,44	—	0,00002	7,09
CA118319	hypothetical protein OsI_006997 [Oryza sativa]	3,00E-09	—	-1,03	—	0,00075	2,62
CA116714	hypothetical protein OsI_014301 [Oryza sativa]	2,00E-16	—	-0,97	—	0,0017	1,57
CA293749	hypothetical protein OsI_008098 [Oryza sativa]	3,00E-37	—	-1,03	—	0,00256	0,95
CA295239	hypothetical protein OsJ_026674 [Oryza sativa]	3,00E-15	—	-0,84	—	0,00307	0,74
CA127733	hypothetical protein OsJ_021069 [Oryza sativa]	5,00E-11	—	-0,92	—	0,0047	0,27
CA126381	hypothetical protein OsJ_016371 [Oryza sativa]	1,00E-12	—	-0,9	—	0,00563	0,11
CA125888	hypothetical protein OsI_011595 [Oryza sativa]	1,00E-05	—	—	0,64	0,00073	2,2
CA124030	hypothetical protein OsJ_025711 [Oryza sativa]	1,00E-18	—	—	-1,03	0,00354	0,09
CA119932	hypothetical protein OsJ_005480 [Oryza sativa]	2,00E-10	—	—	-1,02	0,00001	6,96
CA282415	hypothetical protein OsI_025549 [Oryza sativa]	2,00E-09	—	—	-1,03	0,00004	5,82
CA118743	hypothetical protein OSJNBa0070J19.13 [Oryza sativa]	2,00E-22	—	—	0,95	0,00256	0,57
CA125392	hypothetical protein LOC_Os12g32180 [Oryza sativa]	1,00E-51	—	—	0,64	0,00154	1,22
CA294442	hypothetical protein MtrDRAFT_AC151668g16v1 [Medicago truncatula]	2,00E-07	—	-1,14	—	0,00008	5,23
CA128027	chloroplast hypothetical protein [Zea mays]	1,00E-26	—	-1,31	—	0,00008	5,19
CA116494	hypothetical protein [Oryza sativa]	1,00E-19	—	-1,83	—	0	15,23
CA129691	hypothetical protein [Oryza sativa]	5,00E-25	—	-1,22	1,52	0,00386	0,48
CA190144	hypothetical protein [Oryza sativa]	6,00E-37	—	—	-1,05	0,00087	1,95
CA126826	hypothetical protein [Oryza sativa]	3,00E-84	—	—	1,38	0,00075	2,11

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA118858	hypothetical protein [Oryza sativa]	1,00E-16	—	-1,65	—	0,00043	3,32
CA125291	hypothetical protein [Oryza sativa]	1,00E-18	—	-1,03	—	0,0013	1,93
CA293838	hypothetical protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-25	1,56	—	-1	0	10,68
CA124721	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-25	—	—	1,89	0,0009	2,23
CA120014	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-46	—	—	0,88	0,00004	5,78
CA295315	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-17	—	1,17	1,39	0,0001	4,73
CA295123	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-14	—	—	1,5	0,00327	0,67
CA117522	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-68	1,7	-1,48	-1,34	0	8,85
CA299850	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-67	—	-1,12	1,01	0,00051	3,08
CA123180	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-19	-0,9	—	-0,98	0,013	0,14
CA124917	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-24	1,29	—	—	0,00037	4,66
CA129581	unknown protein [Oryza sativa]	6,00E-12	0,78	—	—	0,00437	1,67
CA128974	unknown protein [Oryza sativa]	6,00E-19	0,57	—	—	0,00475	1,56
CA128975	unknown protein [Oryza sativa]	4,00E-37	—	1,06	—	0,0019	1,43
CA118738	unknown protein [Oryza sativa]	3,00E-14	—	-1,57	—	0	9,26
CA295904	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-19	—	-0,96	—	0,00002	6,85
CA127169	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-17	—	-1,76	—	0,00013	4,69
CA122727	unknown protein [Oryza sativa]	3,00E-48	—	-1,86	—	0,0002	4,18
CA122775	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-72	—	-0,87	—	0,00033	3,62
CA300833	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-21	—	—	1,49	0,00001	7,15
CA212841	unknown protein [Oryza sativa]	7,00E-22	—	—	0,82	0,00092	1,89
CA116716	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-24	—	—	0,93	0,00115	1,55
CA126712	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-31	—	—	-0,7	0,00345	0,21
CA189721	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-92	—	—	-1,17	0,00003	6,06
CA125982	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-53	—	—	-0,72	0,00259	0,54
CA119901	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-45	—	—	-0,79	0,00163	1,14
CA117510	unknown protein [Oryza sativa]	3,00E-67	—	—	-0,9	0,00189	1,02
CA119235	unknown protein [Sorghum bicolor]	4,00E-21	—	—	1,48	0,00015	4,15
CA128935	unknown protein [Sorghum bicolor]	1,00E-44	—	—	-1,2	0,00048	2,63
CA125652	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	8,00E-13	—	—	1,11	0,00085	1,93
CA119929	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-32	0,82	—	—	0,00011	6,15
CA117711	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-31	0,85	-1,3	—	0,01099	0,47
CA279824	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	7,00E-34	—	—	1,02	0,00002	6,55
Não Classificados							
CA126111	No match	—	0,81	-0,61	—	0,00024	5,39
CA116310	No match	—	0,68	-0,82	—	0,01206	0,35
CA116312	No match	—	-0,88	-1,02	—	0,00814	0,83

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA126995	No match	—	—	-0,75	0,58	0,00054	3,04
CA164451	No match	—	—	-0,6	1	0,00207	1,27
CA129275	No match	—	1,63	—	-0,73	0	18,3
CA300185	No match	—	1,05	—	-0,98	0,00515	1,45
CA117143	No match	—	1,16	—	-1,39	0,00124	3,24
CA126421	No match	—	0,69	—	—	0,00036	4,78
CA296164	No match	—	0,95	—	—	0,00065	3,99
CA293455	No match	—	1,15	—	—	0,00088	3,65
CA128679	No match	—	1,43	—	—	0,00088	3,64
CA121306	No match	—	1,56	—	—	0,00132	3,14
CA116799	No match	—	0,71	—	—	0,00321	2,06
CA299998	No match	—	0,82	—	—	0,0042	1,72
CA296176	No match	—	0,84	—	—	0,00612	1,28
CA128875	No match	—	0,81	—	—	0,00725	0,94
CA125891	No match	—	0,69	—	—	0,0075	0,93
CA293735	No match	—	0,74	—	—	0,01206	0,29
CA296004	No match	—	0,79	—	—	0,01187	0,36
CA126412	No match	—	1,17	—	—	0,01072	0,49
CA130022	No match	—	-1,1	—	—	0,00044	4,42
CA293767	No match	—	-0,95	—	—	0,00157	2,94
CA118566	No match	—	-1,09	—	—	0,00164	2,87
CA294800	No match	—	-0,88	—	—	0,00167	2,83
CA128514	No match	—	0,74	—	—	0,00395	1,81
CA122478	No match	—	-0,7	—	—	0,0042	1,73
CA120571	No match	—	-0,64	—	—	0,00645	1,19
CA123565	No match	—	-0,77	—	—	0,00702	1,02
CA124688	No match	—	-0,77	—	—	0,01072	0,48
CA117793	No match	—	-0,75	—	—	0,011	0,42
CA122885	No match	—	-1,3	—	—	0,01287	0,16
CA128328	No match	—	—	—	1,89	0	10,85
CA121993	No match	—	—	—	-0,99	0,00121	1,52
CA124728	No match	—	—	—	-0,93	0,00154	1,22
CA117330	No match	—	—	—	-0,8	0,00159	1,19
CA123928	No match	—	—	—	-1,16	0,00084	1,96
CA296192	No match	—	—	—	-0,99	0,00091	1,92
CA119039	No match	—	—	—	-1,26	0,00256	0,61



Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA125142	No match	—	-0,92	—	—	0,01311	0,07
CA127086	No match	—	-0,67	—	—	0,01353	0,01
CA300773	No match	—	—	1	—	0,00144	1,82
CA300844	No match	—	—	1,09	—	0,00084	2,44
CA120485	No match	—	—	0,66	—	0,00547	0,11
CA119098	No match	—	—	0,61	—	0,00487	0,28
CA125363	No match	—	—	0,66	—	0,00406	0,42
CA123896	No match	—	—	0,94	—	0,00072	2,68
CA300640	No match	—	—	-2,24	—	0	15,01
CA119555	No match	—	—	-1,53	—	0,00001	7,84
CA119170	No match	—	—	-1,39	—	0,00006	5,61
CA118229	No match	—	—	-1,79	—	0,00006	5,51
CA130158	No match	—	—	-1,37	—	0,00002	7,14
CA127256	No match	—	—	-1,08	—	0,00006	5,48
CA129836	No match	—	—	-1,08	—	0,00008	5,21
CA116831	No match	—	—	-1,16	—	0,00012	4,83
CA293753	No match	—	—	-1,52	—	0,0002	4,17
CA123874	No match	—	—	-0,99	—	0,00035	3,56
CA119251	No match	—	—	-1,06	—	0,00066	2,79
CA121819	No match	—	—	-1,24	—	0,00074	2,62
CA116539	No match	—	—	-0,97	—	0,00084	2,42
CA121251	No match	—	—	-1,31	—	0,00109	2,13
CA279823	No match	—	—	-1,14	—	0,00139	1,85
CA120779	No match	—	—	-1,22	—	0,00081	2,47
CA125579	No match	—	—	-1,42	—	0,00229	1,19
CA122044	No match	—	—	-1,04	—	0,00235	1,15
CA127386	No match	—	—	-1,12	—	0,00235	1,12
CA295837	No match	—	—	-1,04	—	0,00255	0,99
CA295954	No match	—	—	-0,73	—	0,00255	0,98
CA127581	No match	—	—	-0,84	—	0,00376	0,51
CA124315	No match	—	—	-1,04	—	0,00527	0,15
CA118210	No match	—	—	0,87	—	0,00551	0,09
CA300207	No match	—	—	—	1,23	0,00177	1,05
CA124261	No match	—	—	—	1,82	0	13,74
CA121673	No match	—	—	—	1,05	0	11,5
CA128315	No match	—	—	—	1,59	0	11,49

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA295902	No match	—	—	—	1,29	0	10,06
CA124178	No match	—	—	—	1,34	0	8,21
CA127303	No match	—	—	2,23	1,99	0	22,61
CA129806	No match	—	—	1,4	1,69	0	22,28
CA127335	No match	—	—	—	1,74	0	19,09
CA300464	No match	—	—	1,01	1,2	0	17,68
CA123149	No match	—	—	1,72	1,54	0	17,63
CA122762	No match	—	—	1,36	1,4	0	17,26
CA129801	No match	—	—	—	0,78	0	12,52
CA119091	No match	—	—	1,31	1,35	0	10,71
CA127316	No match	—	—	—	1,9	0	8,28
CA127028	No match	—	—	1,44	1,51	0,00001	7,71
CA122904	No match	—	—	—	1,35	0,00001	7,7
CA129980	No match	—	—	—	0,78	0,00001	7,68
CA279843	No match	—	—	1,76	1,49	0,00002	6,43
CA118423	No match	—	—	—	1,04	0,00002	6,36
CA300053	No match	—	—	—	1,62	0,00012	4,49
CA118839	No match	—	—	1,53	1,51	0,0002	3,91
CA295116	No match	—	—	—	2,11	0,00036	3,26
CA122935	No match	—	-1,72	—	—	0,00107	2,06
CA120115	No match	—	—	—	1,02	0,00192	1,35
CA129181	No match	—	—	—	0,66	0,00199	1,3
CA119070	No match	—	—	—	1,05	0,00199	1,27
CA300923	No match	—	—	1,12	—	0,00247	1,06
CA120106	No match	—	—	—	1,23	0,00302	0,81
CA129393	No match	—	—	-1,23	1,49	0,0047	0,23
CA294347	No match	—	1,71	-1,19	—	0,00261	0,96
CA126480	No match	—	—	—	1,06	0,00007	5,03
CA300887	No match	—	—	—	1,31	0,00007	4,98
CA120206	No match	—	—	—	1,22	0,00012	4,39
CA118596	No match	—	—	—	2,13	0,00018	3,81
CA116443	No match	—	—	—	0,7	0,0006	2,45
CA190005	No match	—	—	—	1,22	0,00065	2,33
CA128320	No match	—	—	—	0,93	0,00067	2,29
CA128397	No match	—	—	—	1,42	0,00073	2,15
CA294160	No match	—	—	—	0,96	0,001	1,73

Tabela 1F. (continua)

<sup>a</sup> Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	<sup>b</sup> e-value	<sup>c</sup> SP90-1638 Expressão (M)			<sup>d</sup> P.Value	<sup>e</sup> B
			Leve	Moderado	Severo		
CA128555	No match	—	—	—	0,88	0,00106	1,66
CA120818	No match	—	—	—	0,64	0,00207	0,87
CA279871	No match	—	—	—	0,95	0,0029	0,42
CA125878	No match	—	—	—	0,84	0,00291	0,41
CA118756	No match	—	—	—	0,97	0,00298	0,37
CA118673	No match	—	—	—	0,92	0,00309	0,32
CA121071	No match	—	—	—	0,78	0,0025	0,61
CA128683	No match	—	—	—	-0,95	0,00309	0,33
CA116492	No match	—	—	—	-0,96	0,00012	4,43
CA117043	No match	—	—	—	-1,11	0,00379	0,03
CA122463	No match	—	—	—	-1,41	0,00011	4,49
CA128045	No match	—	—	—	-0,98	0,00033	3,12
CA125476	No match	—	—	—	-0,85	0,00037	3,03
CA121497	No match	—	—	—	0,68	0,00298	0,38
CA116902	No match	—	—	—	-0,8	0,00256	0,56
CA128050	No match	—	—	—	-0,68	0,0027	0,54
CA123495	No match	—	—	—	-0,81	0,00232	0,74
CA124584	No match	—	—	—	-0,64	0,00238	0,7
CA118542	No match	—	—	—	-1,03	0,00238	0,69
CA119147	No match	—	—	—	-0,7	0,00249	0,66

<sup>a</sup>Número de acesso ao banco de dados NCBI. <sup>b</sup>e-value da análise BlastX. <sup>c</sup>M representa a razão da expressão ( $\log_2$ ): números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes que foram reprimidos. <sup>d</sup>p-value  $P \leq 0.05$  <sup>e</sup>B representa a avaliação da expressão diferencial. — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

## APÊNDICE G

Tabela 1G. Descrição dos genes diferencialmente expressos sob condições de déficit hídrico leve, moderado e severo nas cultivares SP83-5073 (tolerante) e SP90-1638 (sensível). As proteínas similares e o nível de expressão gênica (M) são detalhados para cada gene. As funções hipotéticas foram propostas de acordo com a atividade metabólica realizada pela proteína.

a Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	b e-value	c Expressão (M)						d P.Value	e B
			SP83-5073		SP90-1638		Severo			
			Moderado	Severo	Leve	Moderado				
CA120417	pyruvate kinase [Arabidopsis thaliana]	3,00E-66	—	3,51	—	2,27	3,34	0	38,54	
CA127861	fructokinase 2 EC 2.7.1.4 [Zea mays]	4,00E-69	—	1,17	—	—	1,23	0,00007	5,09	
CA130180	calcium ion binding [Arabidopsis thaliana]	5,00E-19	—	1,17	—	—	1,81	0,00279	0,87	
CA120154	MFP1 attachment factor 1 [Zea mays]	6,00E-15	—	1,2	—	—	1,52	0	8,37	
CA122068	protein phosphatase type-2C [Oryza sativa]	4,00E-62	—	1,62	—	—	1,14	0,00003	5,91	
CA130292	protein kinase [Sorghum bicolor]	4,00E-21	—	0,74	0,52	—	0,66	0,00002	6,27	
CA128389	serine/threonine kinase-like protein [Oryza sativa]	2,00E-12	—	1,32	—	—	0,89	0,00002	6,43	
CA300104	glutamate decarboxylase [EC 4.1.1.15] [Oryza sativa]	3,00E-92	—	1,37	—	—	1,18	0	12,39	
CA300972	adenosine kinase isoform 2S [EC 2.7.1.20] [Nicotiana tabacum]	3,00E-21	—	1,61	—	1,5	1,48	0	10,11	
CA123485	phosphoribosylanthranilate transferase [EC 2.4.2.18] [Pisum sativum]	4,00E-51	—	-0,57	0,64	-0,61	-0,59	0,00212	1,21	
CA120189	GTP-binding protein [Oryza sativa]	1,00E-04	—	1,6	—	—	1,33	0,00002	6,76	
CA127269	cinnamoyl CoA reductase [EC.1.2.1.44] [Oryza sativa]	6,00E-84	—	1	-0,9	—	1,24	0,00172	1,47	
CA295768	histone H1 [Oryza sativa]	1,00E-25	—	0,94	—	—	1,96	0,00075	2,46	
CA116806	histone H3 (H3-1.1) [Oryza sativa]	1,00E-58	—	1,41	0,94	-1,7	—	0,00031	3,44	
CA118893	RAD23 protein homolog [Oryza sativa]	2,00E-28	—	1,08	—	—	1,94	0,00003	5,98	
CA282428	RAD23 protein homolog [Oryza sativa]	2,00E-28	—	1,81	—	—	1,04	0	13,07	
CA129348	transposable element Tip100 protein [Oryza sativa]	7,00E-96	—	1,15	—	—	1,07	0,00302	0,81	
CA127195	transposable element Tip100 protein [Oryza sativa]	7,00E-96	—	0,89	—	—	1,06	0,00012	4,41	

Tabela 1G. (continua)

a Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	b e-value	c Expressão (valor de M)							d P.Value	e B
			SP83-5073		SP90-1638			Severo			
			Moderado	Severo	Leve	Moderado	Severo				
CA129317	hypothetical protein Osl_004849 [Oryza sativa] Resposta a Estresse	1,00E-27	—	1,21	—	1,27	1,45	—	0,00023	3,74	
CA118233	resistance protein LR10 [Oryza sativa]	2,00E-11	—	0,91	—	1,11	1,26	—	0,00172	1,49	
CA120023	heat shock protein 17.2 [Zea mays]	3,00E-56	—	2,19	—	—	1,35	—	0	11,18	
CA127367	wound-induced protein [Medicago sativa subsp. x varia]	4,00E-06	—	0,92	—	—	1,21	—	0,00053	2,81	
CA300174	DnaJ protein [Oryza sativa]	4,00E-77	—	-1,22	—	—	1,49	—	0,00231	1,14	
CA120096	DnaJ protein [Oryza sativa] Metabolismo de RNA	4,00E-77	—	0,87	—	—	1,35	—	0,00012	4,43	
CA300958	AP2-domain DNA-binding protein [Oryza sativa]	2,00E-48	—	1,21	—	—	1,98	—	0,00012	4,52	
CA120355	transcription factor E2Fe [Oryza sativa]	7,00E-49	—	1,09	—	—	1,12	—	0,0005	4,701	
CA118103	spliceosomal protein [Oryza sativa] Metabolismo de Proteína	4,00E-77	—	1,06	—	—	0,77	—	0	8,25	
CA128144	ribosomal protein S18 [Saccharum hybrid cultivar SP-80-3280]	3,00E-74	—	0,94	—	—	1,04	—	0,00327	0,69	
CA127205	ribosomal protein L27a [Oryza sativa]	2,00E-63	—	1,23	—	—	1,46	—	0,00009	4,81	
CA122916	ribosomal protein S12 [Oryza sativa]	6,00E-37	—	0,84	—	—	1,58	—	0,00046	3,01	
CA122204	ribosomal protein L17 [Lycopersicon esculentum]	5,00E-13	—	0,98	—	—	1,06	—	0,00051	2,86	
CA190334	S28 ribosomal protein [Triticum aestivum]	1,00E-20	—	0,92	—	—	1,29	—	0,00558	0,06	
CA128234	Pentatricopeptide (PPR) repeat-containing protein-like [Oryza sativa]	9,00E-17	—	0,57	—	-0,44	0,62	—	0,00013	4,37	
CA300155	carboxyl-terminal proteinase-like [Oryza sativa]	8,00E-66	—	2,1	—	—	1,27	—	0	20,23	
CA300009	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	1,59	—	—	0,86	—	0	9,6	
CA300757	26S proteasome regulatory particle triple-A ATPase [Oryza sativa]	5,00E-38	—	0,77	-0,97	—	—	—	0,0008	2,39	
CA118369	kelch repeat-containing F-box family protein-like [Oryza sativa]	7,00E-21	—	1,35	—	—	1,23	—	0	8,12	
CA121094	alpha 3 subunit of 20S proteasome [Oryza sativa]	2,00E-90	—	1,36	—	—	1,14	—	0,00124	1,89	
CA299967	nucleic acid binding [Arabidopsis thaliana]	3,00E-89	—	1,29	—	—	1,04	—	0,00017	4,09	
CA129212	protein binding/ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	1,13	—	—	0,76	—	0,00066	2,59	

Tabela 1G. (continua)

a Acesso ao GenBank	Descrição da proteína	b e-value	c Expressão (valor de M)						d P.Value	e B
			SP83-5073		SP90-1638		Severo			
			Moderado	Severo	Leve	Moderado		Severo		
CA120113	protein binding /ubiquitin-protein ligase/zinc ion binding [Zea mays]	5,00E-18	—	0,91	—	—	—	1,27	0,00094	2,21
CA125669	farnesylated-proteins converting enzyme-2 [Arabidopsis thaliana]	1,00E-54	—	1,34	—	—	—	0,96	0,00001	6,92
CA127858	translation initiation factor [Triticum aestivum]	3,00E-22	—	1,16	—	—	—	1,17	0,00001	7,93
CA127426	cell death-related protein SPL11 [Oryza sativa]	5,00E-99	—	1,59	—	1,63	—	1,34	0	11,62
CA300423	Os01g0265100 [Oryza sativa]	7,00E-79	-1,11	—	1,25	-1,35	—	—	0,00176	5,11
Transporte										
CA120112	transporter associated domain containing protein [Oryza sativa]	3,00E-83	—	-0,8	—	—	—	1,4	0,00464	0,3
CA119309	lipid transfer protein [Setaria italica]	2,00E-37	—	1,12	—	-0,83	—	—	0,00221	1,16
CA300311	ABC transporter [Oryza sativa]	3,00E-84	—	1,09	—	—	—	1,32	0,00007	5,11
CA295307	multidrug resistance protein [Oryza sativa]	2,00E-63	—	1,31	—	1,28	—	1,57	0,00001	7,84
Proteínas desconhecidas										
CA120304	Os02g0508100 [Oryza sativa]	3,00E-31	—	1,41	—	—	—	0,94	0	11,35
CA123283	Os04g0658600 [Oryza sativa]	3,00E-12	—	1,73	—	—	—	1,19	0	10,27
CA125784	OSJNBa0072D21.10 [Oryza sativa]	3,00E-77	—	0,84	—	—	—	0,79	0,00109	2,01
CA120022	OSJNBa0073L13.12 [Oryza sativa]	4,00E-27	—	1,17	—	—	—	1,13	0,00314	0,8
CA123095	P0423B08.18 [Oryza sativa]	1,00E-21	—	1,05	—	1,06	—	—	0,00455	0,32
CA119068	hypothetical protein OsJ_028659 [Oryza sativa]	2,00E-23	—	1,4	—	1,63	—	1,51	0	8,39
CA125508	hypothetical protein OsJ_015268 [Oryza sativa]	2,00E-16	—	1,36	—	—	—	0,83	0	17,16
CA300995	hypothetical protein Osl_037633 [Oryza sativa]	1,00E-69	—	1,21	—	1,26	—	1,1	0,00002	6,33
CA122757	hypothetical protein OsJ_009336 [Oryza sativa]	1,00E-15	—	1,42	—	—	—	1,63	0,00082	2,33
CA282442	hypothetical protein Osl_034134 [Oryza sativa]	7,00E-52	—	1,99	—	1,8	—	1,92	0	17,38
CA295063	hypothetical protein OsJ_023677 [Oryza sativa]	3,00E-07	—	1,4	—	1,42	—	1,58	0	12,77
CA120864	hypothetical protein Osl_000887 [Oryza sativa]	1,00E-06	—	0,67	—	-0,79	—	—	0,00279	0,89
CA124721	unknown protein [Arabidopsis thaliana]	2,00E-25	—	1,42	—	—	—	1,89	0,0009	2,23
CA120014	unknown protein [Oryza sativa]	1,00E-46	—	1,09	—	—	—	0,88	0,00004	5,78
CA295315	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-17	—	1,15	—	1,17	—	1,39	0,0001	4,73

Tabela 1G. (continua)

ªAcesso ao GenBank	Descrição da proteína	ªb e-value	ªExpressão (valor de M)						ªP.Value	ªB
			SP83-5073		SP90-1638		Severo			
			Moderado	Severo	Leve	Moderado				
CA295123	unknown protein [Oryza sativa]	8,00E-14	—	1,14	—	—	—	1,5	0,00327	0,67
CA117522	unknown protein [Oryza sativa]	2,00E-68	—	-1,42	1,7	-1,48	—	-1,34	0	8,85
	Não Classificados									
CA127303	No match	—	—	2,1	—	2,23	—	1,99	0	22,61
CA129806	No match	—	—	2,34	—	1,4	—	1,69	0	22,28
CA127335	No match	—	—	1,71	—	—	—	1,74	0	19,09
CA300464	No match	—	—	1,96	—	1,01	—	1,2	0	17,68
CA123149	No match	—	—	1,83	—	1,72	—	1,54	0	17,63
CA122762	No match	—	—	1,86	—	1,36	—	1,4	0	17,26
CA129801	No match	—	—	1,17	—	—	—	0,78	0	12,52
CA119091	No match	—	—	1,42	—	1,31	—	1,35	0	10,71
CA127316	No match	—	—	1,56	—	—	—	1,9	0	8,28
CA127028	No match	—	—	1,77	—	1,44	—	1,51	0,00001	7,71
CA122904	No match	—	—	2,02	—	—	—	1,35	0,00001	7,7
CA129980	No match	—	—	0,97	—	—	—	0,78	0,00001	7,68
CA279843	No match	—	—	1,57	—	1,76	—	1,49	0,00002	6,43
CA118423	No match	—	—	1,18	—	—	—	1,04	0,00002	6,36
CA300053	No match	—	—	1,03	—	—	—	1,62	0,00012	4,49
CA118839	No match	—	—	1,59	—	1,53	—	1,51	0,0002	3,91
CA295116	No match	—	—	1,08	—	—	—	2,11	0,00036	3,26
CA122935	No match	—	—	1,89	-1,72	—	—	—	0,00107	2,06
CA120115	No match	—	—	0,88	—	—	—	1,02	0,00192	1,35
CA129181	No match	—	—	0,6	—	—	—	0,66	0,00199	1,3
CA119070	No match	—	—	0,89	—	—	—	1,05	0,00199	1,27
CA300923	No match	—	—	1,08	—	1,12	—	—	0,00247	1,06
CA120106	No match	—	—	1,3	—	—	—	1,23	0,00302	0,81
CA129393	No match	—	—	1,09	—	-1,23	—	1,49	0,0047	0,23
CA294347	No match	—	—	-1,24	1,71	-1,19	—	—	0,00261	0,96

ªNúmero de acesso ao banco de dados NCBI. ªb e-value da análise BlastX. ªM representa a razão de expressão (log<sub>2</sub>); números positivos representam genes induzidos e os negativos representam genes que foram reprimidos. ªc p-value P 0.05 ªdP representa a avaliação da expressão diferencial — nenhuma significância para o p-value adotado. Genes foram organizados pela classificação funcional.

