

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DE
UMA CULTIVAR DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE À
SECA E SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO PROLONGADO**

Bruna Robiati Telles

Bióloga

2016

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DE
UMA CULTIVAR DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE À
SECA E SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO PROLONGADO**

Bruna Robiati Telles

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientadoras: Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho

Dra. Poliana Fernanda Giachetto

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

2016

T274c Telles, Bruna Robiati
Características fisiológicas e moleculares de uma cultivar de cana-de-açúcar tolerante à seca e submetida ao déficit hídrico prolongado / Bruna Robiati Telles. -- Jaboticabal, 2016
xi, 164 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro
Coorientadoras: Flávia Maria de Souza Carvalho, Poliana Fernanda Giachetto
Banca examinadora: Priscila Lupino Gratão, Paula Macedo Nobile
Bibliografia

1. *Saccharum spp.* 2. Déficit hídrico prolongado. 3. RNA-seq. 4. Montagem *de novo*. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 633.61:631.52

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DE UMA CULTIVAR DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE À SECA E SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO PROLONGADO


AUTORA: BRUNA ROBIATI TELLES

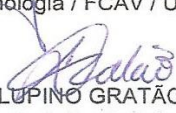
ORIENTADORA: MARIA INÊS TIRABOSCHI FERRO

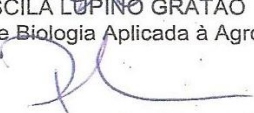
CO-ORIENTADORA: FLAVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO

CO-ORIENTADORA: POLIANA FERNANDA GIACHETTO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA (GENÉTICA E MELHORAMENTO DE PLANTAS), pela Comissão Examinadora:


Pós-doutoranda FLAVIA MARIA DE SOUZA CARVALHO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. PRISCILA LUPINO GRATÃO
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisadora Dra. PAULA MACEDO NOBILE
Instituto Agronômico de Campinas / Centro de Cana de Açúcar / Ribeirão Preto, SP

Jaboticabal, 26 de agosto de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Bruna Robiati Telles - nascida no município de Araraquara, Estado de São Paulo, em 26 de junho de 1992, filha de Luiz Carlos Telles e Cleonice Robiati Telles. Em 2007, ingressou na Escola Técnica Estadual Sylvio de Mattos Carvalho – Matão/SP, onde concluiu, em 2009, o Ensino Médio, ganhando o 1º lugar na VI Olimpíada Regional de Química (paralela) realizada pela USP de Ribeirão Preto e Menção Honrosa na Olimpíada Brasileira de Matemática das Escolas Públicas (OBMEP), neste período. Em 2010, ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, vindo a graduar-se em fevereiro de 2014, quando ganhou na colação de grau o “Prêmio Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal”, por ter obtido a maior média entre as disciplinas ministradas durante o curso de graduação em Ciências Biológicas. Durante a graduação, realizou duas iniciações científicas financiadas pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), uma no período de 2012 a 2013, e outra no período de 2013 a 2014. Ministrou aulas de gramática no cursinho pré-vestibular Ativo da UNESP de Jaboticabal no período de 2010 a 2012, além de participar de vários eventos da Universidade. Em novembro de 2014, ganhou Menção Honrosa com o trabalho intitulado: “Sequenciamento de genótipos de cana-de-açúcar submetidos ao estresse hídrico prolongado”, na segunda fase do XXVI Congresso de Iniciação Científica (CIC) da UNESP, o qual ficou em sétimo lugar dentre os dez melhores trabalhos da área de biológicas de todos os campus da UNESP. Em agosto de 2014, iniciou o curso de Formação Pedagógica de Docentes para a Educação Profissional em Nível Médio no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo (IFSP), Câmpus de Sertãozinho, obtendo em agosto de 2015 o certificado para atuar na educação básica na área de Ciências Biológicas. Iniciou também em agosto de 2014 o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Genética e Melhoramento de Plantas na FCAV - UNESP/ Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, o que resultou no presente trabalho.

“A persistência é o menor caminho para o êxito”.

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

À **Deus**, por esta vida maravilhosa e pelas coisas incríveis que providenciaste em minha vida;

Aos meus amados pais **Luiz Carlos Telles** e **Cleonice Robiati Telles**, por todo carinho, compreensão, educação, amor e incentivo que sempre me deram. Sem vocês eu não teria superado cada etapa da minha vida e todas as dificuldades pelas quais passei até chegar aqui. Vocês são minha confiança, minha felicidade, meus amores, meu tudo. Tudo o que eu sou eu devo a vocês. Amo vocês mais que tudo nesse mundo!

Às minhas irmãs **Mariana Robiati Telles** e **Letícia Robiati Telles**, por sempre me ouvirem, me compreenderem, me ajudarem nos momentos difíceis e por torcerem sempre por mim em todos os momentos da minha vida. Vocês são minhas melhores amigas e os melhores presentes que os nossos pais e Deus poderiam me dar. Amo vocês!

Ao meu namorado **Ayrton Antonio Batista Junior**, por todo apoio que sempre me deu, por sempre acreditar que eu seria capaz de atingir todos os meus objetivos. Agradeço pela compreensão e pelas infinitas ajudas, acrescentando muitas coisas para minha formação. Você é muito importante para mim, um presente de Deus muito especial. Te amo!

Dedico com amor incondicional

AGRADECIMENTOS

Infinitamente a **Deus**, por sempre guiar meus pensamentos e minhas condutas, me mostrando sempre os melhores caminhos a serem seguidos e me dando sempre muita força para lutar pelos meus objetivos. Obrigada senhor Deus por mais esta etapa concluída e por tudo que providenciaste em minha vida;

À **Prof. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro**, pela orientação, ensinamentos, correções, incentivos, conselhos nos momentos difíceis e por toda a sua experiência. Agradeço a Deus por ter colocado a senhora em meu caminho. Não tenho palavras para agradecer todo o carinho nesses anos, e por ser além de orientadora e professora, uma grande amiga. Obrigada por tudo e pela oportunidade de realizar este trabalho;

Ao **Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro**, pelos ensinamentos, experiências e pela disponibilidade do laboratório;

À pesquisadora **Dra. Poliana Fernanda Giachetto**, pela coorientação, ensinamentos, incentivos, paciência, carinho e pelas análises de bioinformática. Suas correções e sugestões foram de fundamental importância e contribuíram muito para a realização deste trabalho. Muito obrigada;

À **Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho**, pela coorientação, experiência, ensinamentos, correções, amizade, auxílio nas análises dos dados e valiosas contribuições para o desenvolvimento deste projeto. Muito obrigada;

Ao **Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro**, pelos ensinamentos, sugestões, auxílio e pelas análises de bioinformática;

Ao **Me. Giovanni Marques Castro**, pelos ensinamentos, parceria e análises de bioinformática. Agradeço muito a paciência, as sugestões e a disponibilidade em participar deste trabalho. Muito obrigada;

À **Dra. Juliana da Silva Vantini**, pela experiência, amizade maravilhosa, carinho, incentivo, correções e sugestões. Obrigada por ter sido a professora que despertou em mim a paixão pela biologia molecular e por ter me ensinado muitas coisas desde o meu estágio no laboratório, até o término do meu mestrado;

Ao **Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta**, à pesquisadora **Dra. Samira Domingues Carlin Cavallari** e a **Dra. Thais Ramos da Silva**, por todos os ensinamentos e auxílios. Tenho muito a agradecer a vocês por terem me dado a

oportunidade de participar desde o início dos experimentos deste projeto, como aluna de iniciação científica no Laboratório de Química e Bioquímica de Plantas, e por apoiarem a continuidade do trabalho;

Ao **Prof. Dr. Jairo Osvaldo Cazetta** e à pesquisadora **Dra. Samira Domingues Carlin Cavallari**, pelo auxílio nas análises de fisiologia e pelas discussões sempre muito valiosas;

Aos membros da banca de qualificação: **Profa. Dra. Poliana Fernanda Giachetto, Dra. Samira Domingues Carlin Cavallari** e **Dr. Michael dos Santos Brito**, pela disponibilidade, sugestões e correções;

Aos membros da comissão examinadora: **Dra. Flávia Maria de Souza Carvalho, Profa. Dra. Priscila Lupino Gratão** e **Dra. Paula Macedo Nobile**, pela disponibilidade, correções e contribuições;

Ao **Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, Ricardo** e **Camila Fernandes**, pelo sequenciamento das amostras;

Aos queridos amigos (as), companheiros (as) de trabalho do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular: Rafael Marini, Fernando, Flávia “mãe”, Tamiris, Julie, Ana, Dani, Larissa, Lucília, Jú Vantini, Aline Belesini, Flavinha, Claudênia, Helen, Aline Lopes, Thaísa, Angela, Janaína, Michelle, Amanda, Catarina e Jéssica, pela amizade, companheirismo, aprendizado, auxílios e contribuições no trabalho e por todos os momentos agradáveis que me proporcionaram, fazendo do LBM um lugar maravilhoso de se trabalhar. Muito obrigada por tudo;

Às queridas colegas do Centro de Recursos Biológicos e Genômicos (CREBIO): **Agda, Mariza** e **Renata**, agradeço pela amizade, colaboração e disponibilidade em ajudar sempre que possível;

À querida amiga e “irmã” **Aline Belesini**, por toda amizade, carinho, paciência, compreensão, conselhos, incentivos, ensinamentos e experiência. Muito obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e iluminada que você é, e pela ótima parceria na realização deste trabalho. Não tenho como expressar tamanha gratidão por toda ajuda. Este trabalho é nosso;

Às queridas amigas Henriette Gellert Moranza, Janaina Costa Peres, Fernanda Mendes de Oliveira e Dayane Andrade dos Reis, pela amizade, por todas

as conversas e pelo apoio durante esta jornada. É muito bom saber que nossa amizade sempre será a mesma. Obrigada;

Às gordinhas, Clau, Ana, Flavinha, Julie, Tamiris, Michelle, Aline Lopes e Aline Belesini pelos momentos maravilhosos que passamos juntas no laboratório e fora dele, pela amizade, carinho, conselhos, compreensão, “gordices”, e por toda ajuda. Vocês são muito especiais. Muito obrigada;

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/Jaboticabal), pela oportunidade de fazer o mestrado e pelos cursos e eventos oferecidos, proporcionando uma ótima formação;

À Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento da pesquisa;

À todos os alunos, funcionários e professores do Departamento de Tecnologia;

Aos meus queridos pais **Cleonice** e **Luiz Carlos**, por nunca medirem esforços para que eu tivesse uma ótima formação e por me apoiarem em todas as fases da minha vida. Não tenho palavras que possam agradecer tudo o que fizeram e fazem por mim. Eu serei eternamente grata a vocês por tornarem minha vida sempre muito mais feliz, meu amor por vocês é eterno. Muito obrigada;

Às minhas irmãs **Mariana** e **Letícia**, e ao meu cunhado **Lucas**, pela amizade, pelas longas conversas e conselhos, pelo auxílio, por todo carinho, apoio, torcida e por todos os momentos de alegria. Vocês são muito especiais, amo vocês;

À minha linda sobrinha e princesa **Ana Maria**, por alegrar todos os meus dias com sua existência. Te amo!

Ao meu namorado **Ayrton**, por ser a pessoa mais incrível que já conheci e por estar sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos importantes da minha vida. Obrigada por todo carinho e amor que sempre me deu, me ajudando muito a concluir esta etapa. Te amo!;

À minha sogra **Rosi**, ao meu sogro **Airton** e aos meus cunhados **Luis Fylype** e **Laura**, por todo apoio e incentivo que sempre me deram.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar: origem, morfologia, fisiologia e adaptação.....	4
2.2 Importância econômica da cana-de-açúcar	6
2.3 Cultivares de cana-de-açúcar.....	9
2.4 Deficiência hídrica	10
2.5 Transcriptoma	14
2.6 RNA-seq.....	16
2.7 Montagem <i>de novo</i>	21
2.8 Estudos sobre transcriptoma de cana-de-açúcar sob déficit hídrico	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
3.1 Material vegetal e delineamento experimental	29
3.2 Análises fisiológicas	33
3.2.1 Número de perfilhos e área foliar.....	33
3.2.2 Potencial hídrico foliar	34
3.2.3 Índice de cor verde da folha (via SPAD).....	34
3.2.4 Fotossíntese e concentração interna de CO ₂	34
3.2.5 Análise estatística.....	35
3.3 Análises moleculares	35
3.3.1 Coleta das folhas de cana-de-açúcar	35
3.3.2 Extração de RNA total das plantas	36
3.3.3 Quantificação e análise da integridade do RNA total.....	39
3.3.4 Construção das bibliotecas de cDNA	40
3.3.5 Clusterização e sequenciamento.....	42

3.4	Análise dos dados do sequenciamento.....	42
3.4.1	Processamento das leituras e filtragem dos dados (trimagem)	42
3.4.2	Montagem <i>De Novo</i> do transcriptoma de cana-de-açúcar	43
3.4.3	Montagem de uma montagem referência	43
3.4.4	Estimativa de abundância dos transcritos e normalização	44
3.4.5	Anotação dos transcritos	44
3.4.6	Identificação dos genes diferencialmente expressos.....	45
3.4.7	Identificação dos genes exclusivos da cultivar tolerante	46
3.4.8	Agrupamento de perfis de genes exclusivos em 30, 60 e 90 DAT, sob os diferentes tratamentos.....	46
3.4.9	Categorização e anotação dos transcritos de cada grupo (“cluster”).....	46
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4.1	Análises fisiológicas	48
4.1.1	Análise de variância e teste de médias	48
4.1.2	Número de perfilhos	51
4.1.3	Área foliar	54
4.1.4	Potencial hídrico foliar	57
4.1.5	Índice de cor verde da folha.....	60
4.1.6	Fotossíntese	63
4.1.7	Concentração interna de CO ₂	65
4.1.8	Caracterização das cultivares através das variáveis fisiológicas.....	67
4.2	Análises moleculares	67
4.2.1	Análise da qualidade do RNA.....	67
4.2.2	Processamento das leituras e filtragem dos dados (trimagem)	74
4.2.3	Montagem <i>de novo</i>	77
4.2.4	Identificação dos genes diferencialmente expressos.....	80
4.2.5	Análise dos “clusters” contendo genes exclusivos da cultivar tolerante em 30, 60 e 90 DAT sob os diferentes tratamentos	80
4.2.6	Anotação dos transcritos exclusivos da cultivar tolerante.....	84
4.2.7	Genes exclusivos da cultivar SP81-3250 envolvidos na tolerância à seca prolongada	88

4.2.8	Relação dos genes exclusivos da cultivar tolerante na resposta ao déficit hídrico prolongado.....	118
4.2.9	Genes órfãos envolvidos na resposta ao déficit hídrico prolongado....	129
5.	Conclusão	131
6.	Referências.	132

CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS E MOLECULARES DE UMA CULTIVAR DE CANA-DE-AÇÚCAR TOLERANTE À SECA E SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO PROLONGADO

RESUMO - A cana-de-açúcar é uma cultura fortemente influenciada pela seca, o que é um fator limitante para a produção sucroenergética. No Brasil, esta cultura está se expandindo para regiões com deficiência hídrica bastante acentuada, e uma das formas de contornar este problema é utilizar cultivares que sejam mais adaptadas a este tipo de estresse. Por isso, o objetivo deste trabalho foi analisar o comportamento fisiológico e molecular de plantas de cana-de-açúcar submetidas a distintos períodos de deficiência hídrica, a fim de contribuir com novos conhecimentos na área e auxiliar no desenvolvimento e cultivo de plantas mais bem adaptadas a essa condição. Neste trabalho, foram utilizadas duas cultivares de cana-de-açúcar contrastantes à seca (SP81-3250 e RB855453), tolerante e sensível, respectivamente. As plantas foram cultivadas em casa de vegetação e submetidas a três controlados potenciais hídricos do solo (controle, déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo) a partir de 60 dias após o plantio. Essas plantas foram avaliadas molecular e fisiologicamente em três épocas distintas: 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos tratamentos, sendo este um dos poucos trabalhos disponíveis até o momento sobre a resposta de plantas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico prolongado. A tecnologia de RNA-Seq foi utilizada para obtenção dos transcriptomas de folhas dos dois genótipos de cana. A montagem *de novo* desses transcriptomas foi realizada, o que permitiu identificar os genes exclusivos de ambas as cultivares e analisar os exclusivos da cultivar tolerante envolvidos na resposta de defesa ao déficit hídrico prolongado. Os parâmetros fisiológicos avaliados mostraram alterações significativas em resposta ao déficit hídrico. A montagem *de novo* resultou em 161.295 isoformas, sendo 86.087 genes distintos. Para anotação, os transcritos foram alinhados contra sequências de *Sorghum bicolor*, *Arabidopsis thaliana*, bem como sequências de cana-de-açúcar disponíveis em bancos de dados públicos. Através da análise de genes diferencialmente expressos, foram identificados 5.236 genes exclusivos. Destes, 2.635 genes são da cultivar SP81-3250 e 2.601 genes da cultivar RB855453. Entre os genes exclusivos da cultivar tolerante, alguns foram anotados como proteases, fatores de transcrição, enzimas antioxidantes, proteínas da via de sinalização do etileno e proteínas da via de sinalização do ácido salicílico, todos envolvidos na resposta de defesa ao déficit hídrico, o que permitiu levantar novas hipóteses sobre o mecanismo de tolerância à seca prolongada.

Palavras-chave: Déficit hídrico prolongado, expressão gênica, genes de tolerância, montagem *de novo*, RNA-seq, *Saccharum spp.*

PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERISTICS OF A SUGARCANE CULTIVAR DROUGHT TOLERANT SUBMITTED TO A PROLONGED WATER DEFICIT

ABSTRACT - The sugarcane culture is strongly influenced by drought, which is a limiting factor for sugar and energy production. In Brazil, this culture is expanding to regions with very severe water stress and one way to workaroud this issue is to use cultivars that are more adapted to this form of stress. Therefore, the objective of this study has been to analyze the physiological and molecular behavior of sugarcane plants submitted to different periods of water stress in order to contribute to new knowledge in the area and assist in the development and cultivation of better-adapted plants to this condition. In this study, we have employed two cultivars of sugarcane that are contrasting to drought (SP81-3250 and RB855453), tolerant and sensitive, respectively. Plants have been cultivated in a greenhouse and submitted to three controlled potential soil hydric (control, moderate drought and severe water deficit) from 60 days after planting. These plants have been evaluated molecular and physiologically in three different periods: 30, 60 and 90 days after treatment application, which is one of the few studies available to date on the response of sugarcane plants under prolonged drought. RNA-Seq technology has been used to obtain the transcriptomes leaves of the two genotypes of sugarcane. The *de novo* assembly has been performed which has allowed identifying exclusive genes of both cultivars and analyzing the exclusive tolerant cultivar involved in defense response to prolonged drought. The physiological parameters evaluated have shown significant changes in response to water stress. The *de novo* assembly resulted in 161,295 isoforms, with 86,087 different genes. To record, the transcripts have been were aligned against sequences of *Sorghum bicolor*, *Arabidopsis thaliana*, and sugarcane sequences available in public databases. Through the analysis of differentially expressed genes have been identified 5,236 exclusive genes. Out of those, 2,635 genes come from cultivar SP81-3250 and 2,601 genes come from cultivar RB855453. Among exclusive genes of tolerant cultivar, some have been listed as the proteases, transcription factors, antioxidant enzymes, proteins of the ethylene signaling pathway and proteins of salicylic acid signaling pathway, all involved in the defense response to drought, which have allowed to raise new hypotheses about the mechanism of tolerance the prolonged drought.

Keywords: Prolonged water deficit, gene expression, tolerance genes, *de novo* assembly, RNA-seq, *Saccharum spp.*

LISTA DE ABREVIATURAS

- T:** Tensão superficial do solo
- DAP:** Dias após o plantio
- DAT:** Dias após a aplicação dos tratamentos
- MPa:** Megapascal
- F:** Teste estatístico F
- S:** cultivar sensível
- T:** cultivar tolerante
- N:** não estressada
- M:** déficit hídrico moderado
- S:** déficit hídrico severo
- SM:** cultivar sensível, déficit hídrico moderado
- SS:** cultivar sensível, déficit hídrico severo
- SN:** cultivar sensível, não estressada
- TM:** cultivar tolerante, déficit hídrico moderado
- TS:** cultivar tolerante, déficit hídrico severo
- TN:** cultivar tolerante, não estressada
- SS:** *Saccharum spp.*
- RIN:** número de integridade do RNA

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Amostras de RNA total extraídos da cultivar de cana-de-açúcar SP81-3250, tolerante ao déficit hídrico prolongado (30, 60 e 90 DAT), sob três níveis de disponibilidade hídrica no solo: não estressada (controle), déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo.....	37
Tabela 2. Amostras de RNA total extraídos da cultivar de cana-de-açúcar RB855453, sensível ao déficit hídrico prolongado (30, 60 e 90 DAT), sob três níveis de disponibilidade hídrica no solo: não estressada (controle), déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo.....	37
Tabela 3. Análise de variância pelo teste F das variáveis fisiológicas avaliadas aos 30 DAT.....	47
Tabela 4. Análise de variância pelo teste F das variáveis fisiológicas avaliadas aos 60 DAT.....	48
Tabela 5. Análise de variância pelo teste F das variáveis fisiológicas avaliadas aos 90 DAT.....	48
Tabela 6. Valores de qualidade, quantidade e integridade das amostras de RNA total nos equipamentos NanoDrop, Qubit e Bioanalyzer, respectivamente.....	68
Tabela 7. Resultado do número de sequências pré e pós-processadas após o sequenciamento.....	73
Tabela 8. Estatística descritiva da montagem do transcriptoma da cana-de-açúcar, utilizando o programa Trinity.....	77
Tabela 9. Resultados da anotação do transcriptoma da cana-de-açúcar contra os diferentes bancos de dados.....	78
Tabela 10. Anotação pelo Blastx dos genes exclusivos selecionados de cada “cluster” da cultivar SP81-3250 (tolerante à seca).....	85
Tabela 11. Genes órfãos exclusivos da cultivar tolerante diferencialmente expressos em relação ao controle.....	128

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. Fonte: GASCHO; SHIH,1983.....	5
Figura 2. Mapa das áreas de plantações de cana-de-açúcar e das unidades produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil. Fonte: UNICA, 2016.....	8
Figura 3. Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina. Adaptado de ILLUMINA, 2007 e CARVALHO; SILVA, 2010.....	18
Figura 4. Análise de dados de RNA-seq. Após o sequenciamento, as leituras são pré-processadas para remover as de baixa qualidade e os artefatos, tais como sequências de adaptadores (azul), DNA contaminante (verde) e duplicatas de PCR (estágios 1 e 2). Em seguida, os erros de sequências (cruzes vermelhas) são opcionalmente removidos (estágio 3) para melhorar a qualidade das leituras. As leituras pré-processadas são então montadas em transcritos (laranja, estágio 4) e submetidas a processos de pós-montagem para remover erros de montagem (cruzes azuis). Os transcritos são então pós-processados (estágio 5) e o nível de expressão de cada um é então estimado pela contagem do número de leituras que se alinham para cada transcrito (estágio 6). Fonte: MARTIN; WANG, 2011.....	21
Figura 5. Correção e adubação do solo para experimentos em vasos.....	29
Figura 6. Procedimentos para instalação do experimento.....	30
Figura 7. Unidade experimental com os dois tensiômetros de punção (de 10 e 30 cm) e o tubo de PVC instalados.....	31
Figura 8. Condução do experimento em casa de vegetação após aplicação das três distintas tensões hídricas em MPa (T1 - sem restrição hídrica; T2 - restrição hídrica moderada, T3 - restrição hídrica severa).....	32
Figura 9. Coleta e armazenamento das folhas de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca.....	35
Figura 10. Equipamentos utilizados para determinar a qualidade, a quantidade e a integridade do RNA total, respectivamente.....	39
Figura 11. Número de perfilhos por vaso das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo.....	50
Figura 12. Área foliar das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo.....	53

- Figura 13.** Potencial hídrico foliar das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo.....56
- Figura 14.** Índice de cor verde da folha das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo.....59
- Figura 15.** Fotossíntese das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo.....62
- Figura 16.** Concentração interna de CO₂ das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo.....64
- Figura 17.** Eletroferogramas gerados pelo Bioanalyzer (“Agilent 2100 Bioanalyzer”) mostrando os valores de RIN das amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 30 dias de déficit hídrico.....70
- Figura 18.** Eletroferogramas gerados pelo Bioanalyzer (“Agilent 2100 Bioanalyzer”) mostrando os valores de RIN das amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 60 dias de déficit hídrico.....71
- Figura 19.** Eletroferogramas gerados pelo Bioanalyzer (“Agilent 2100 Bioanalyzer”) mostrando os valores de RIN das amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 90 dias de déficit hídrico.....72
- Figura 20a.** “Clusters” 1 a 4, representando diferentes padrões de expressão dos transcritos exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250), submetida a três tratamentos (controle (N), déficit hídrico moderado (M) e déficit hídrico severo (S)) em três épocas amostrais (30, 60 e 90 DAT). Os valores de expressão entre as bibliotecas foram normalizados por TMM (“Trimmed Mean of M-values”) para cálculo dos genes diferencialmente expressos e posterior identificação dos genes exclusivos. A figura evidencia que os genes presentes em cada “cluster” não são expressos na cultivar sensível (S) RB855453 em nenhum tratamento e em nenhuma época amostral. Os três pontos de uma mesma cor representam a mediana dos valores de expressão dos transcritos para cada repetição biológica (total de três repetições), e a linha traçada representa a mediana das três repetições.....80
- Figura 20b.** “Clusters” 5 a 8, representando diferentes padrões de expressão dos transcritos exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250), submetida a três tratamentos (controle (N), déficit hídrico moderado (M) e déficit hídrico severo (S)) em três épocas amostrais (30, 60 e 90 DAT). Os valores de expressão entre as bibliotecas foram normalizados por TMM (“Trimmed Mean of M-values”) para cálculo dos genes diferencialmente expressos e posterior identificação dos genes exclusivos. A figura evidencia que os genes presentes em cada “cluster” não são expressos na cultivar sensível (S) RB855453 em nenhum tratamento e em nenhuma época amostral. Os três pontos de uma mesma cor representam a mediana dos valores de expressão dos transcritos para cada repetição biológica (total de três repetições), e a linha traçada representa a mediana das três repetições.....81

Figura 21. Modelo hipotético para o possível mecanismo de tolerância ao estresse por helicase. O eIF4A é um membro da família de RNA helicase DEAD-box. Estresses podem aumentar a formação de estruturas secundárias inibitórias na região 5' UTR do RNAm de muitos genes essenciais. O eIF4 é responsável por remover a estrutura secundária do RNAm. O eIF4A e eIF4B, ligam-se a 5' UTR e desenrolam juntos a estrutura secundária inibitória de um modo dependente de ATP, o que facilita a ligação do ribossomo. Depois disso, essa organela verifica o códon de iniciação (AUG) e a síntese de proteínas começa normalmente, a qual foi inibida anteriormente em função do impacto negativo do estresse. Adaptado de TUJETA; GILL; TUJETA, 2012.....88

Figura 22. (A) via ubiquitina proteassoma; (B) estrutura do complexo SCF. Fonte: YU et al., 2007.....96

Figura 23. Principais categorias de genes envolvidos na resposta de angiospermas a estresses abióticos como a seca e a salinidade. O grupo A inclui fatores envolvidos na regulação e transdução de sinais (proteínas reguladoras) reconhecidamente ativadas após o estresse. Tais proteínas induzem cascatas de sinais envolvendo algumas proteínas do grupo B, consideradas funcionais e estruturais, envolvidas nos mecanismos de tolerância aos estresses citados. Fonte: BENKO-ISEPPON et al., 2011.....119

Figura 24. Modelo de sinalização do etileno proposto por Ji e Guo (2013). Na presença do etileno, a ligação do hormônio conduz a inativação dos receptores de etileno, localizados na membrana do retículo endoplasmático, e de CTR1, resultando na desfosforilação de EIN2, e assim, na sua clivagem. Tendo uma NLS (sequência de localização nuclear) funcional, o fragmento C-terminal clivado de EIN2 é então transportado para o núcleo e participa na estabilização de EIN3 e ativação de genes downstream (como os fatores da transcrição da família AP2/EREBP).....121

Figura 25. Modelo de sinalização do etileno. Nesse modelo são mostrados outros mecanismos de sinalização do etileno mediados por EIN2, por meio do qual essa proteína impõe a repressão traducional do RNAm EBF1 e EBF2. Nesse esquema, EIN2 é clivada e transportada para o núcleo. No entanto, essa clivagem e transporte podem representar parte da ação de EIN2 como uma localização nuclear induzida de CEND (C-terminal de EIN2) para ativar apenas parcialmente a sinalização do etileno. A função citoplasmática de EIN2 é fundamental para desligar rapidamente a síntese proteica de EBF1/2, o que leva à rápida depleção de proteínas EBF1/2 devido à sua degradação proteossômica. Enquanto isso, um subconjunto de CEND é translocado para dentro do núcleo para estabilizar ainda mais e/ou ativar EIN3/EIL1 direta ou indiretamente.....122

Figura 26. Modelo proposto para o funcionamento da via de sinalização do etileno em cana-de-açúcar sob déficit hídrico prolongado. A concentração interna de CO₂ aumentou em 60 dias de déficit hídrico, e se manteve relativamente alta em 90 dias, enquanto a expressão de EIN2 diminuiu nesses dois períodos. O gene que codifica uma serina treonina quinase, possivelmente o CTR1, aumentou a expressão ao longo das épocas de déficit hídrico. O gene que codifica a família de fatores de

transcrição AP2/EREBP responsiva ao etileno, aumentou a expressão em 90 dias de déficit hídrico, o que demonstra que a via de sinalização do etileno estava ativada..... 124

Figura 27. Modelo proposto para o funcionamento da via de sinalização do ácido salicílico em cana-de-açúcar sob déficit hídrico prolongado.....127

Figura 28: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 1, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....156

Figura 29: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 2, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....157

Figura 30: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 3, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....158

Figura 31: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 4, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....159

Figura 32: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 5, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....160

Figura 33: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 6, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....161

Figura 34: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico e função molecular dos transcritos do “cluster” 7, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....162

Figura 35: Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 8, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).....163

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma cultura importante para a produção de etanol e açúcar, sendo considerada também uma das melhores opções para bioenergia, em virtude da sua elevada capacidade de produção de matéria seca (SILVA et al., 2007). Além disso, a sua capacidade de armazenar sacarose como fonte de energia primária, em vez de compostos mais complexos como amido, proteínas e lipídios, faz com que o seu uso na produção de energia seja facilitado (VARGAS et al., 2014).

A crescente demanda por esses produtos no país e no mundo tem favorecido a expansão da canavicultura no Brasil nos últimos anos para as regiões de cerrado, como o oeste e noroeste do estado de São Paulo, o triângulo mineiro, o leste do Mato Grosso do Sul, Goiás, Tocantins, Maranhão e oeste da Bahia. Estas regiões apresentam deficiência hídrica bastante acentuada, quando comparadas às regiões tradicionalmente ocupadas pela cultura da cana-de-açúcar, o que é um fator limitante para a produção. Uma das formas de contornar esse problema é plantar nessas regiões cultivares tolerantes à seca (BRESSIANI, BUTTERFIELD; SILVA, 2011).

O desenvolvimento de cultivares tolerantes ao déficit hídrico tem sido uma das prioridades dos programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar no país. Entretanto, apesar dos avanços obtidos pelo melhoramento convencional, a escassez de informações genéticas e moleculares sobre os mecanismos de tolerância à seca e sua herança são quesitos limitantes para geração de variedades melhoradas com sucesso (BRESSIANI, BUTTERFIELD; SILVA, 2011). Isso acontece porque a maioria dos estudos dessa natureza avalia a expressão de genes responsivos à seca em um curto período de estresse, geralmente severo e aplicado sob plantas jovens, o que pode conduzir a avaliações errôneas da sensibilidade ou tolerância que tais plantas terão em condições reais de campo, onde o estresse perdura, frequentemente, por vários meses.

Assim, a compreensão e correlação da expressão dos genes e os produtos de sua expressão envolvidos nas respostas à deficiência hídrica prolongada poderá

ser a chave para desvendar e caracterizar novos mecanismos que permitam a adaptação destas plantas em condição limitante de água (RODRIGUES et al., 2009; GUPTA et al., 2010; ISKANDAR et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011).

Para isso, é necessário primeiramente caracterizar o germoplasma de cana-de-açúcar quanto à tolerância ao déficit hídrico avaliando a atividade fotossintética, o teor de clorofila, número de folhas verdes, número de perfilhos, condutância estomática entre outras variáveis. Em seguida, é necessário fazer um sequenciamento do transcriptoma para compreender a função de um gene específico e sua interação com diversos outros, para entender a complexa rede de respostas que as plantas utilizam para se proteger do déficit hídrico prolongado. São esses conhecimentos em conjunto que impulsionam o surgimento de novas ideias de engenharia genética para modificar, a nível molecular, os mecanismos de defesa, alterando as respostas fisiológicas e agrônômicas das culturas ao déficit hídrico (NEPOMUCENO et al., 2011).

Para realizar estudos de transcriptoma envolvendo a identificação de genes diferencialmente expressos em resposta ao déficit hídrico, tem-se utilizado várias técnicas. Uma das técnicas amplamente utilizada para o estudo do transcriptoma é o RNA-Seq, o qual utiliza tecnologias de sequenciamento de nova geração, caracterizadas por apresentarem um custo muito menor e rapidez na obtenção das sequências, além de maior acurácia em relação ao sequenciamento convencional (Sanger) (METZKER, 2010), e preparação das amostras simplificada, através da eliminação da etapa de clonagem (PINTO et al. 2011). Além disso, esta técnica permite um sequenciamento de alto rendimento, produzindo milhões de sequências curtas de RNAm que serão posteriormente montados em transcritos, usando ou não um genoma de referência (KUMAR et al., 2014).

A cana-de-açúcar possui um genoma altamente complexo e, além disso, o mesmo ainda não se encontra disponível. Dessa forma, com a montagem *de novo* do transcriptoma sequenciado é possível a reconstrução dos transcritos e detecção dos genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico prolongado, contribuindo, assim, com os programas de melhoramento genético da cultura e com o conhecimento sobre o genoma desse organismo.

Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar fisiologicamente as cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250 (tolerante à seca) e RB85453 (sensível à seca), submetidas ao déficit hídrico prolongado, e identificar genes exclusivamente expressos na cultivar tolerante quando comparada à sensível, utilizando a técnica de RNA-Seq e a montagem *de novo* do transcriptoma de folhas dessas cultivares.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da cana-de-açúcar: origem, morfologia, fisiologia e adaptação

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma monocotiledônea alógama e semi-perene que pertence à divisão Magnoliophyta, classe Liliopsida, subclasse Commelinidae, ordem Cyperales e família Poaceae (CESNIK; MIOCQUE, 2004). Essa família, conhecida como família das gramíneas, também é representada pelos cereais, tais como milho, arroz, trigo e sorgo, além de algumas culturas forrageiras (TZVELEV, 1989; apud PALHARES, 2010).

Esta cultura originou-se na Nova Guiné, onde era tida como planta silvestre e ornamental. Da Nova Guiné, espalhou-se em várias linhas do sul do Oceano Pacífico, aparecendo como planta produtora de açúcar na Índia. Os primeiros a desenvolverem as técnicas de produção de açúcar na forma cristalizada, tal como se conhece atualmente, parecem ter sido os persas (DELGADO; CÉSAR, 1977). Contudo, foi a América que ofereceu à cana-de-açúcar excelentes condições para o seu desenvolvimento, sendo introduzida no Brasil na época dos descobrimentos, cuja plantação e desenvolvimento ocorreram com a criação dos engenhos (MOZAMBANI et al., 2006).

Essa planta se desenvolve em forma de touceira, sendo a parte aérea formada por colmos (caule típico das gramíneas, com nós e entrenós), folhas, inflorescências e frutos e a parte subterrânea formada por raízes e rizomas (caules subterrâneos, ricos em reservas, providos de nós e entrenós e de crescimento horizontal) (MOZAMBANI et al., 2006).

Por ser uma matéria-prima renovável, de rápido crescimento e corte anual, a cultura da cana-de-açúcar possui alto poder de absorção e fixação do gás carbônico (CO₂), o principal responsável pelo aquecimento global, presente na atmosfera. Essa característica é assegurada em virtude do comportamento fisiológico C₄ da cultura, representando máxima eficiência no processo de assimilação de carbono com taxas de fixação estimadas em até 100 mg de CO₂ fixado por dm² de área foliar por hora (PAULA et al., 2010).

Com relação ao crescimento da cana-de-açúcar, quatro estágios distintos têm sido caracterizados (Figura 1): brotação e emergência, perfilhamento, crescimento dos colmos e maturação dos colmos. O primeiro estágio, brotação e emergência, depende da qualidade da muda, ambiente, época e manejo do plantio. Neste estágio, ocorrem o enraizamento inicial e o aparecimento das primeiras folhas. Na fase de perfilhamento, ocorre a emissão de colmos por uma mesma planta, os quais recebem a denominação de perfilhos. Este processo é regulado por hormônios e é neste estágio que ocorre a formação da touceira da cana-de-açúcar. A fase de crescimento dos colmos, por sua vez, é caracterizada pelo crescimento e desenvolvimento dos mesmos, que ganham altura e começam a acumular açúcar na base. Essa fase é estimulada por luz, umidade e calor. O último estágio, denominado de maturação, caracteriza-se pelo intenso acúmulo de sacarose nos colmos, determinando a qualidade da matéria-prima dos colmos industrializáveis (GASCHO; SHIH, 1983 *apud* EMBRAPA, 2016).

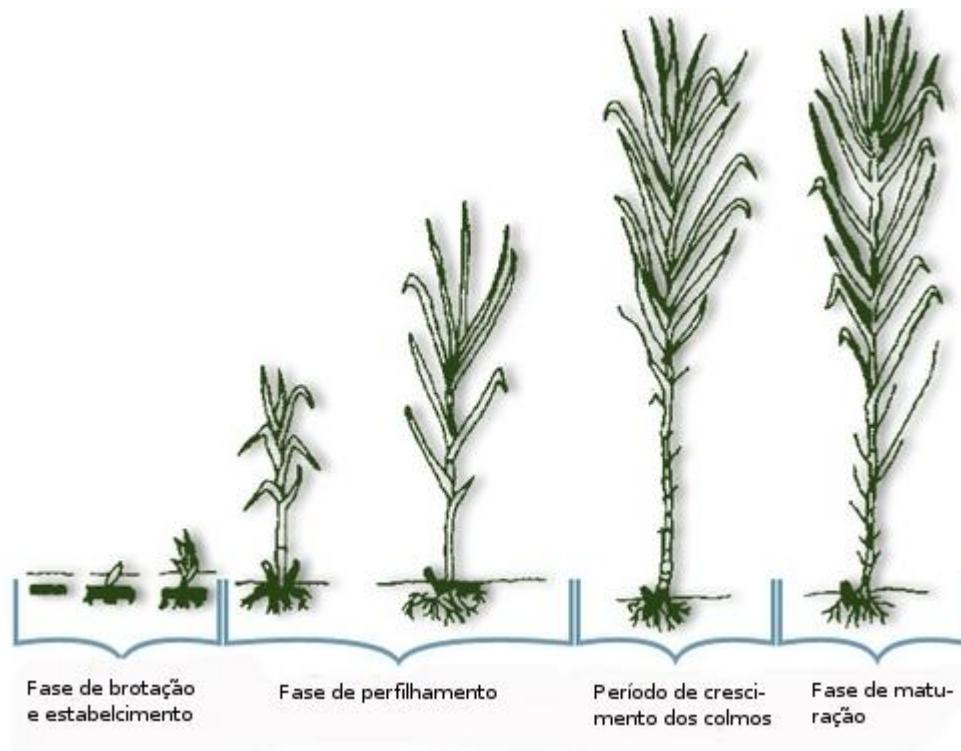


Figura 1. Estágios de desenvolvimento da cana-de-açúcar. Fonte: GASCHO; SHIH, 1983.

Apesar de a cana-de-açúcar ser adaptada às condições de alta luminosidade, elevadas temperaturas e relativa falta de chuva, a cultura precisa de grandes quantidades de água para suprir suas necessidades hídricas nos estágios de desenvolvimento em que apenas 30% de seu peso são representados pela matéria seca e 70% pela água. A capacidade de a planta absorver água pelas folhas é maior do que em qualquer outra gramínea, no entanto, são as raízes, por meio dos seus pelos absorventes, as responsáveis pela maior quantidade de absorção da mesma. O orvalho da madrugada e os chuviscos, que não chegam a atingir o solo, são absorvidos pelas folhas. Dessa forma, a cana-de-açúcar é uma espécie ideal para cultivo em regiões tropicais e subtropicais (SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006).

O ciclo evolutivo da cultura pode ser de 12 (cana de ano) e 18 meses (cana de ano e meio) em cana-planta (SCARPARE, 2011). É possível realizar de cinco a seis cortes a cada plantio de cana, sendo a primeira colheita proveniente do plantio a partir das mudas, denominada cana-planta e as outras colheitas feitas a partir da rebrota da cana-planta, denominada de cana-soca (FREITAS, 2011). O conhecimento a respeito da cultura e do seu ciclo é importante para melhor manejá-la, uma vez que toda e qualquer produção vegetal que vise máxima produtividade econômica, fundamenta-se na interação de três fatores: a planta, o ambiente de produção e o manejo (SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006).

2.2 Importância econômica da cana-de-açúcar

A importância da cana-de-açúcar pode ser atribuída à sua alta capacidade de adaptação a diversos ambientes edafoclimáticos e, principalmente, à sua múltipla utilização (SILVA, 2007). Dentre as várias formas de emprego, a cana-de-açúcar pode ser utilizada como matéria prima para a produção de açúcar, álcool, fármacos, ração animal, adubos orgânicos, e seus subprodutos e resíduos são utilizados para geração de energia elétrica (EMBRAPA, 2016). Deste modo, por ser a principal matéria-prima utilizada pela indústria sucroalcooleira para a produção de açúcar e etanol, a cana-de-açúcar é uma das culturas mais importantes no cenário socioeconômico brasileiro (BENETT, 2011).

A indústria sucroalcooleira teve forte aumento no Brasil a partir de 1975, com a criação do Programa Pró-Álcool pelo governo federal, como estratégia para lidar com a crise do petróleo. A partir de então, os programas de melhoramento investiram em tecnologias, aplicadas tanto na agricultura como na indústria, tornando a cana-de-açúcar essa cultura bem estabelecida no Brasil (MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009).

Com isso, o Brasil ocupa atualmente não apenas a posição de maior produtor mundial de cana, como também a de maior produtor de açúcar, sendo responsável por 61,8% das exportações de açúcar de cana no mundo, e conquista, cada vez mais, o mercado externo com o uso do biocombustível como alternativa energética (MAPA, 2016). No caso do etanol, o país é o segundo maior produtor (ranking liderado pelos Estados Unidos) (UNICA, 2016). É previsto que o país deva alcançar taxa média de aumento da produção de 3,25% até 2018/19, e colher 47,34 milhões de toneladas de açúcar. Para as exportações de açúcar, o volume previsto para 2019 é de 32,6 bilhões de toneladas. O etanol produzido no Brasil também conta com projeções positivas para os próximos anos, devidas principalmente, ao crescimento do consumo interno (MAPA, 2016).

No país, a área plantada de cana-de-açúcar destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2015/16 foi de 8.654,2 mil hectares. Para esta mesma safra houve uma produção de 665,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar e uma produtividade de 76.909 kg/ha, com uma produção de 33,5 milhões de toneladas de açúcar e de 30,5 bilhões de litros de etanol. A produção do país teve um incremento de 4,9% em relação à safra passada, devido ao fato de a produtividade nos canaviais de São Paulo, maior estado produtor, se recuperar de uma forte restrição hídrica da safra passada. O estado de São Paulo, com 52% da produção e área de 4.498,3 mil hectares, junto aos estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Alagoas e Pernambuco lideram a produção (CONAB, 2016).

Dessa forma, fica evidente que a produção de cana-de-açúcar no Brasil está concentrada nas regiões Centro-Sul e Nordeste (Figura 2). No mapa a seguir, é possível visualizar em vermelho as áreas onde se concentram as plantações e as usinas produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade, de acordo com os dados oficiais do IBGE, UNICAMP (Universidade Estadual de Campinas-SP) e do CTC

(Centro de Tecnologia Canaveira). No total, o país conta atualmente com 371 unidades produtoras em atividade e com 70 mil produtores rurais de cana-de-açúcar. A atividade canaveira é responsável por mais de 900 mil empregos diretos e por um PIB (produto interno bruto) setorial de 43 bilhões de dólares (montante equivalente a 2% do PIB brasileiro) (UNICA, 2016).

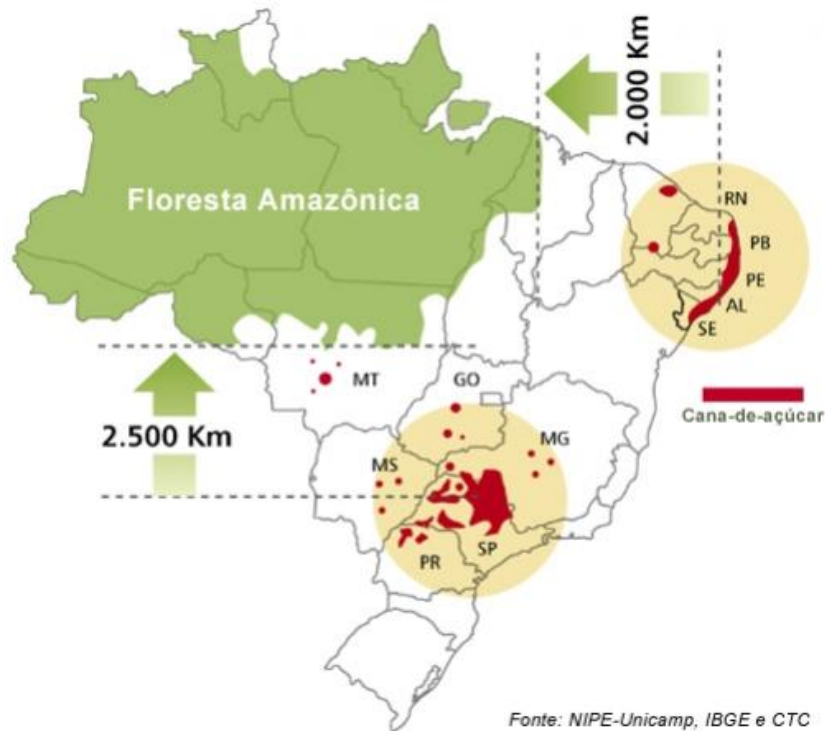


Figura 2. Mapa das áreas de plantações de cana-de-açúcar e das unidades produtoras de açúcar, etanol e bioeletricidade no Brasil. Fonte: UNICA, 2016.

De acordo com o exposto acima, é indiscutível a importância do setor sucroalcooleiro na sociedade brasileira, seja pelo grande potencial na geração de empregos diretos e indiretos, seja pelas exportações de açúcar e etanol, que contribuem com o equilíbrio da balança comercial (MARQUES et al., 2006).

Sendo assim, para manter altos níveis de produção, é necessário investimento contínuo em pesquisa, pois essa é a base para o desenvolvimento de tecnologias de produção agrícola capazes de permitir a identificação de plantas mais aptas, sistemas de produção mais eficientes e regiões com potencial de cultivo

(MAPA, 2015). No entanto, para que o crescimento do setor sucroalcooleiro seja mantido, ele não deve ser apoiado somente no aumento da produção de cana-de-açúcar em virtude da incorporação de novas áreas, mas também no aumento da produtividade. Para tanto, a contribuição do melhoramento genético vegetal com o lançamento de variedades geneticamente superiores é de fundamental importância (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

A identificação de genes responsáveis por qualidades agronomicamente desejáveis e sua posterior manipulação por meio de técnicas de biologia molecular podem proporcionar a obtenção de variedades de cana bem sucedidas, diminuindo de forma significativa a perda na agricultura, além de possibilitar o aproveitamento de solos até então não utilizáveis (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

2.3 Cultivares de cana-de-açúcar

As cultivares de cana-de-açúcar são consideradas uma das colunas mestres da produção de matéria-prima e do crescimento sustentável do setor sucroenergético, e o melhoramento genético é, significativamente, a área que mais contribui para avanços no setor. Nas três últimas décadas foi possível obter acréscimos de mais de 30% em produtividade, em virtude do emprego de variedades melhoradas geneticamente (ALONSO, 2009).

Dentre as diversas cultivares de cana-de-açúcar, a cultivar SP81-3250 caracteriza-se por possuir hábito levemente decumbente com pouco acamamento, despalha média, crescimento robusto, apresentando uniformidade e alto perfilhamento. Os colmos apresentam comprimento e diâmetro médios, de cor verde arroxeada ao sol e verde amarelada sob a palha, com pouca cera, ausência de rachaduras, gemas de tamanho médio com pouca saliência do tipo oval, apresentando pelos no ápice e folhas de largura média (SIMÕES NETO, 2009).

Estudos fisiológicos realizados com a SP81-3250 indicaram que a cultivar possui maturação mais lenta (TASSO JÚNIOR et al., 2011) e quando comparada a outras cultivares ganha destaque no grupo das que atingem maiores alturas, maior teor de BRIX (sólidos solúveis totais), maior número de cana por hectare e maior produtividade (CAPONE et al., 2011). Pincelli (2010) estudando cultivares de cana-

de-açúcar sob déficit hídrico verificou que a SP81-3250 apresentou os maiores valores nas variáveis fisiológicas estudadas.

Já a cultivar RB855453 caracteriza-se por ser de difícil tombamento, florescimento frequente, bom fechamento de entrelinhas, ótima brotação, médio perfilhamento, possui elevada exigência de ambiente e não deve ser plantada como cana de ano. Tem alta produtividade agrícola e teor de sacarose muito elevado. Possui resistência a maioria das doenças, sendo a colheita desta cultivar indicada entre maio e julho (HOFFMANN et al., 2008). Pincelli (2010), avaliando as variáveis de crescimento, densidade estomática, clorofila e matéria seca da parte aérea e das raízes, verificou que em condição de déficit hídrico, a cultivar RB855453 obteve os menores valores nestas variáveis em relação às outras cultivares estudadas.

2.4 Deficiência hídrica

As plantas são frequentemente submetidas a condições ambientais adversas, o que resulta em estresses, que afetam negativamente seu crescimento, desenvolvimento e/ou produtividade. Esses estresses podem ser bióticos e abióticos, e podem ocorrer de forma isolada ou concomitante (GONÇALVES, 2008). Dentre os vários tipos de estresses, o déficit hídrico tem influência expressiva na agricultura. A intensidade e a frequência do déficit hídrico constituem os fatores de maior importância à limitação da produção agrícola global, por isso muitos esforços têm sido realizados para melhorar a produtividade dos cultivos agrícolas em condições de seca (CATIVELLI et al., 2008; OLIVEIRA, 2012).

Segundo Taiz e Zeiger (2009), o déficit hídrico pode ser definido como todo conteúdo de água de uma célula ou tecido que está abaixo do conteúdo de água presente no estado de maior hidratação, e o mesmo ocorre quando a perda de água é superior a absorção.

O primeiro sintoma do estresse por déficit hídrico é o murchamento foliar, causado pela desidratação e perda de turgor da folha (TAIZ; ZEIGER, 2013). Juntamente com este sintoma, ocorre a diminuição nos ciclos de mitose, reduzindo, dessa forma, a taxa de divisão celular. Conseqüentemente, o número e o tamanho de novas células ficam comprometidos, ocasionando diretamente a redução no

desenvolvimento da planta e a diminuição no vigor vegetativo (FAROOQ et al., 2009).

Tudo isso é gerado através de respostas celulares complexas nas plantas, as quais podem ser divididas entre efeitos primários e secundários. Os efeitos primários alteram condições químicas e físicas da célula, as quais, depois de alteradas, modificam características bioquímicas, genéticas e metabólicas, levando a produção dos fatores secundários. Alguns dos efeitos primários são reduções da pressão de turgor e do teor relativo de água, como descritos anteriormente. Os efeitos secundários, por sua vez, são aqueles que iniciam os processos de degradação celular como produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, redução da respiração e da fixação de CO₂, citotoxicidade iônica, desestabilização de membranas, proteínas e parede celular, resultando, em último caso, na morte de células e tecidos (TAIZ; ZEIGER, 2013; apud VASCONCELOS, 2015).

Dessa forma, a resposta vegetal ao déficit hídrico envolve uma complexa rede de expressão coordenada de genes, que atuam em três categorias: percepção do estresse, cascatas de sinalização e controle transcricional; proteção de membranas e proteínas, osmoproteção e remoção de espécies reativas de oxigênio; e coleta e transporte de água e íons (WANG; VINOGRAD; ALTMAN, 2003; URANO et al., 2010; GHOSH; XU, 2014).

Essa resposta das plantas depende de alguns fatores, tais como: duração e severidade do estresse, genótipo da planta, idade e estágio de desenvolvimento da mesma (GAO et al., 2013). Deste modo, as plantas podem ter mecanismos de tolerância ou sensibilidade em relação ao déficit hídrico (CHAVES et al., 2003; CAMBRAIA, 2005). A tolerância ao estresse é uma expressão usada para mensurar o sucesso da planta em sobreviver e se desenvolver dentro de um ambiente que está em desequilíbrio, e significa biologicamente um balanço entre adaptação genética e plasticidade fenotípica (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Em cana-de-açúcar, mecanismos comuns de resposta ao déficit hídrico como, por exemplo, senescência foliar, fechamento dos estômatos e sistema radicular profundo são observados em variedades consideradas mais tolerantes à seca, e a intensidade de expressão desses mecanismos muda entre as variedades (INMAN-BAMBER; SMITH, 2005).

As características das variedades é que definem a eficiência fotossintética da cana-de-açúcar, além da influência das alterações climáticas que prevalecem durante todo o desenvolvimento vegetativo (BARBOSA, 2010). Dentre os estágios fenológicos da cultura, a cana-de-açúcar apresenta significativa demanda hídrica no período do perfilhamento e do rápido crescimento que ocorrem 60 a 150 após o plantio (RAMESH, 2000; MACHADO et al., 2009), principalmente porque é nestas fases onde aproximadamente 70 a 80% da produção da cana é constituída (SINGH; RAO, 1987). Sendo assim, esse é o período em que a cultura está mais sensível ao déficit hídrico, uma vez que a planta obtém nesta fase um rápido desenvolvimento e expressiva área foliar, necessitando de uma maior quantidade de água para viabilizar a troca de gases com a atmosfera (PIRES et al., 2008).

Se houver baixa disponibilidade hídrica no desenvolvimento da cana-de-açúcar, podem ocorrer alterações no número de folhas verdes, na área foliar, na densidade e condutância estomáticas, no teor relativo de água, no conteúdo de clorofila, altura e diâmetro de colmos e alterações no acúmulo de matéria seca da parte aérea e das raízes (PINCELLI, 2010).

Esses conhecimentos sobre o comportamento da cultura em situações de déficit hídrico é importante, uma vez que o setor sucroalcooleiro brasileiro está em expansão, ocupando regiões do oeste do Estado de São Paulo e áreas de cerrado, onde o cultivo da cana-de-açúcar não era comum (ARANTES, 2012). Na região Centro-Oeste, onde está concentrada uma parte significativa do cerrado, houve na safra de 2011/2012 um crescimento significativo de 233.840 mil hectares no cultivo da cana (CONAB, 2012). Apesar do relevo plano que facilita a mecanização e do baixo custo de aquisição dessas áreas de produção, essas regiões de expansão apresentam estacionalidade pluviométrica, e esse longo período de restrição hídrica durante o ano pode afetar o desenvolvimento e a produção dos canaviais (ARANTES, 2012; CONAB, 2012).

Esses efeitos na produtividade já puderam ser observados em duas safras próximas: na safra de 2011/2012 e na de 2014/2015. Na safra de 2011/2012, a lavoura de cana-de-açúcar teve um desenvolvimento abaixo do ideal e inferior ao da safra anterior, resultando em uma produtividade menor que a estimada inicialmente pelos produtores. Várias foram as causas para esta queda, mas o clima foi o

principal fator que provocou diminuição da produção. As chuvas escassas nas regiões Centro-Oeste e Sudeste resultaram em problemas com relação à brotação e ao desenvolvimento do canavial, tanto nas áreas colhidas, como nas áreas de renovação e expansão (CONAB, 2011). A safra de 2014/2015 também sofreu com as adversidades climáticas durante o período de desenvolvimento da cultura, o que impactou diretamente as produtividades esperadas, que ficaram aquém das obtidas na safra passada. O decréscimo se concentrou com maior intensidade na região Sudeste, onde as precipitações pluviométricas ficaram novamente abaixo do normal, o que refletiu no desenvolvimento e rendimento da cultura. A queda no rendimento agrícola foi de 9,6%, chegando a atingir 10,5% no estado de São Paulo (CONAB, 2014).

No Brasil, os impactos previstos das mudanças climáticas sobre a precipitação atmosférica e os déficits de umidade do solo nas fases críticas do crescimento das culturas, sugerem que há uma necessidade urgente de realizar análises mais detalhadas das áreas prioritárias de cultivo, com o objetivo de desenvolver variedades mais tolerantes à seca, combinadas a solos férteis e a estratégias de manejo da água para diminuir os efeitos previstos (ASSAD, 2013).

A produção de novas variedades de cana e a seleção das mesmas em relação aos mecanismos de tolerância à seca são necessárias. Os programas de melhoramento da cana-de-açúcar devem buscar além dos ganhos em produção, variedades que tolerem e sejam eficientes quando colocadas nesses novos sistemas produtivos, aumentando, assim, a produtividade (BATISTA, 2013). O desenvolvimento de novas variedades de cana-de-açúcar tolerantes a seca pode ser feito através do melhoramento genético clássico, com o cruzamento de genitores que contenham a característica, ou através da introdução em variedades comerciais já existentes, por engenharia genética, de genes que confirmem esta característica (FERRO, 2008).

Para esta última opção, é necessário compreender melhor não apenas a expressão dos genes, mas também os produtos da sua expressão envolvidos nas respostas à deficiência hídrica prolongada, a fim de caracterizar os mecanismos que permitem a adaptação em condição limitante de água (RODRIGUES et al., 2009; GUPTA et al., 2010; ISKANDAR et al., 2011).

2.5 Transcriptoma

Um evento significativo na ciência foi à descoberta da estrutura do DNA por Watson e Crick, em 1953, o que deu origem a áreas completamente novas e influenciou muitas outras já estabelecidas (NELSON, COX, 2014). Desde a descoberta do DNA, vários estudos foram realizados, sendo iniciados nos anos 90, os estudos de sequenciamento de genomas (SNUSTAD; SIMONS, 2001). Os projetos genomas surgiram com o intuito de entender as bases do funcionamento dos seres vivos. Foi a partir das informações obtidas nesses estudos que foram obtidos os segmentos genômicos utilizados no desenvolvimento biotecnológico (COSTA, 2011).

Contudo, os dados obtidos nos projetos de sequenciamento não têm contribuído da forma esperada para compreender o papel dos genes e das proteínas no funcionamento dos organismos, visto que o genoma é um elemento virtualmente estático, enquanto que os seus produtos, RNAs mensageiros e proteínas, são dinâmicos, caracterizados por mudanças contínuas em resposta a estímulos internos e externos (FURLAN; FERRAZ; BORTOLOSSI, 2007). Sendo assim, a genômica que é a ciência que estuda os genomas, é dividida em genômica estrutural e genômica funcional. A genômica estrutural estuda a estrutura dos genomas, enquanto a genômica funcional descreve a função específica de genes e proteínas, buscando relacionar as etapas do fluxo da informação biológica, além de relacionar a regulação da expressão gênica com mecanismos bioquímicos e fisiológicos (FRAGOSO et al., 2011).

Em um mesmo indivíduo, todas as células, salvo algumas exceções, têm o mesmo genoma estrutural, ou seja, possuem todas as informações genéticas necessárias para gerar um organismo inteiro. Entretanto, ao se especializar, cada célula passa a expressar somente uma parte dessas informações. Em estudos de genômica funcional, obtêm-se as informações do que está sendo expresso nas células e tecidos (RNAs e proteínas) do organismo. Dessa forma, as abordagens mais utilizadas nos estudos de genômica funcional têm sido a análise da expressão gênica (transcriptoma) e do padrão proteico (proteoma) codificado pelo genoma estrutural numa determinada condição ambiental (COSTA, 2011).

A transcriptômica é a ciência que estuda o transcriptoma, que, por definição, é o conjunto completo de RNAs transcritos de determinado organismo, de determinada espécie, de determinada idade, de determinado tecido, em determinadas condições ambientais, sob determinado tratamento experimental, e etc. Ou seja, se o genoma é o conjunto de genes de um determinado organismo, ele não muda para o mesmo. No entanto, um grande número de transcriptomas diferentes pode ser gerado de um único organismo, considerando todas as condições em que ele é submetido (FRAGOSO et al., 2011). Dessa forma, a transcriptômica permite investigar o padrão de expressão de milhares de genes concomitantemente, de um organismo ou tipo celular, em um habitat ou condição, e em uma determinada fase da vida (MARQUES; SILVA, 2004).

Compreender a dinâmica do transcriptoma é fundamental para desvendar os elementos funcionais do genoma e compreender as variações fenotípicas produzidas por combinações de fatores genotípicos e ambientais (ZHANG et al., 2012). O estudo do transcriptoma tem como objetivo determinar quando e onde os genes são ativados ou reprimidos em vários tipos de células e tecidos (ADAMS, 2008). Pode-se quantificar o número de transcritos e as alterações nos níveis de expressão de cada um deles ao longo do desenvolvimento e sob diferentes condições (WANG et al., 2009). Na agricultura, essa última aplicação permite, por meio do monitoramento das mudanças no nível de expressão gênica, identificar vias biológicas alteradas em situações onde uma perturbação externa é inserida no sistema, como por exemplo, a infestação por um parasita, infecção por um patógeno, alterações na dieta, restrição hídrica e outros tipos de estresse (GIACHETTO; HIGA, 2014).

Avanços técnicos notáveis em transcriptômica estão disponíveis para esclarecer a configuração molecular das plantas em resposta ao estresse abiótico (URANO, 2010). Diversos grupos de pesquisa têm se dedicado a esclarecer os mecanismos utilizados pelas plantas para se defenderem do déficit hídrico, o que resultou em inúmeros trabalhos realizados para analisar o transcriptoma de plantas submetidas a esse estresse, como os de CARDOSO-SILVA et al., 2014; VANTINI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2011; VARGAS et al., 2014; FERREIRA et al., 2012 e

GENTILE et al., 2013 em cana-de-açúcar, o de KAKUMANU et al., 2012 em milho, o de TRIPATHI et al., 2015 em soja e o de BOWMAN et al., 2013 em algodão.

Para estudar transcriptomas podem ser utilizadas diferentes tecnologias: a) macroarranjos e microarranjos, que são baseadas na hibridização de sondas; b) sequenciamento de regiões específicas de fragmentos de cDNA; c) análise de fragmentos amplificados via PCR (WANG et al., 2009). Entre esses vários métodos de estudo de transcriptomas, as técnicas de RNA-seq e de microarranjo destacam-se como as mais utilizadas na quantificação da expressão de genes em larga escala (KOGENARU et al., 2012).

A tecnologia de microarranjo tem sido muito utilizada em estudos de transcriptoma, no entanto, esta tecnologia pode revelar apenas a expressão dos genes que estão presentes no arranjo. Além disso, possíveis interpretações errôneas dos resultados de microarranjo podem acontecer devido à hibridação não específica. Por outro lado, o RNA-seq pode revelar muitos transcritos raros e desconhecidos, oferecendo uma maior acurácia e precisão na análise do transcriptoma (MARTINELLI, 2012).

Dessa forma, o método denominado RNA-Seq (sequenciamento do RNA) tem vantagens claras sobre as abordagens existentes e revolucionou a maneira com que são analisados os transcriptomas (WANG et al., 2009).

2.6 RNA-seq

As novas tecnologias de sequenciamento começaram a ser comercializadas em 2005 e estão evoluindo rapidamente desde então (CARVALHO; SILVA, 2010). Dentre as novas plataformas de sequenciamento, as principais são: o pirosequenciamento da Roche/454, sequenciamento por ligação da Life Technologies/SOLiD e sequenciamento por síntese da Illumina/Solexa (WANG et al. 2009; JAIN, 2011), sendo esta última a tecnologia mais utilizada pela alta cobertura de leituras geradas por corrida (CLARKE et al., 2013).

Todas essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas que geram informações sobre milhões de pares de bases em uma única corrida. Essas novas plataformas possuem como características comuns a

capacidade de gerar muito mais informações que as geradas pelo sequenciamento de Sanger, com uma grande economia de tempo e custo por base para o sequenciamento. Essas vantagens advêm do uso da clonagem *in vitro* e de sistemas de suporte sólido para as unidades de sequenciamento, não sendo mais necessários o intensivo trabalho laboratorial de produção de clones bacterianos, a montagem das placas de sequenciamento e a separação dos fragmentos em géis (CARVALHO; SILVA, 2010).

Dessa forma, desde a comercialização das tecnologias de sequenciamento de nova geração, o custo do sequenciamento foi reduzido e a capacidade de sequenciamento por máquina aumentou. De fato, está acontecendo uma mudança de paradigma na execução dos experimentos. Os fatores tempo e dinheiro, que determinaram o sucesso e o insucesso de adoção das estratégias, iniciaram um redirecionamento metodológico (FRAGOSO et al., 2011). Com isso, esses sequenciadores de nova geração e suas plataformas possibilitaram a utilização de um novo método de sequenciamento de bibliotecas de cDNA muito utilizado atualmente, que é o RNA-seq (HAAS, 2012).

O RNA-seq é o primeiro método que permite uma avaliação quantitativa e precisa de todo o transcriptoma de maneira muito eficiente. Uma das grandes vantagens deste método é a ausência quase total de ruídos, além de fornecer uma alta cobertura capaz de detectar de uma a numerosas cópias de RNA por célula (PINTO et al., 2011). O RNA-seq minimiza os erros experimentais e simplifica a preparação das amostras (MOROZOVA; MARRA; 2008), sendo necessárias pequenas quantidades de amostras de RNA para o sequenciamento (WANG et al., 2009).

Atualmente, pode-se descobrir com esse método o perfil do transcriptoma de qualquer organismo. Ele pode detectar novas transcrições, variações de um único nucleotídeo (SNPs), “indels” (pequenas inserções e deleções) e outras mudanças previamente desconhecidas (ILLUMINA, 2016).

As etapas do RNA-seq são basicamente as seguintes: preparação da amostra, sequenciamento, captura da imagem e análise dos dados (METZKER, 2010).

O sequenciamento dos fragmentos no protocolo de RNA-Seq da Illumina/Solexa, tecnologia utilizada neste trabalho, pode ser “single-read” ou “paired-end”, ou seja, uma população de RNAm é convertida em uma biblioteca de cDNA fragmentada ao acaso, com adaptadores ligados a uma (“single-read”) ou em ambas (“paired-end”) as extremidades. Em seguida, ocorre uma amplificação por PCR a partir de uma extremidade ou de ambas (JAIN, 2011). O sequenciamento “paired-end” foi utilizado nesse trabalho, porque facilita a detecção de rearranjos genômicos, elementos de sequências repetidas, assim como fusões de genes e novos transcritos. As leituras geradas a partir do sequenciamento “paired-end” têm maior probabilidade de se alinharem a uma referência, o que melhora a qualidade do conjunto de dados (ILLUMINA, 2016).

O sequenciamento nesta plataforma é realizado por síntese usando DNA polimerase e nucleotídeos terminadores marcados com diferentes fluoróforos. A novidade dessa plataforma consiste na clonagem *in vitro* dos fragmentos em uma plataforma sólida de vidro, processo conhecido como PCR de fase sólida. A superfície de clonagem (“flow cell”) é dividida em oito linhas (“lanes”) que podem ser utilizadas para o sequenciamento de até oito bibliotecas. Em cada linha, adaptadores são fixados à superfície pela extremidade 5', deixando a extremidade 3' livre para servir na iniciação da reação de sequenciamento dos fragmentos imobilizados no suporte por hibridização (Figura 3) (CARVALHO; SILVA, 2010).

As etapas de preparo das amostras e sequenciamento na plataforma Illumina são as seguintes: os adaptadores são ligados em ambas as extremidades dos fragmentos de cDNA da amostra, o que permite a fixação do cDNA ao suporte de sequenciamento por hibridização a um dos adaptadores fixados (Figura 3). No primeiro ciclo de amplificação, nucleotídeos não marcados são disponibilizados para que haja a síntese da segunda fita do fragmento imobilizado no suporte. A elevada densidade de adaptadores no suporte facilita a hibridização do adaptador livre dos fragmentos imobilizados a sua sequência complementar fixa perto do clone inicial durante o ciclo de anelamento. Após o ciclo de anelamento, o fragmento forma uma estrutura em “ponte” na superfície de sequenciamento e a extensão ocorre, formando a fita complementar também em “ponte”. No ciclo de desnaturação, as fitas são separadas e linearizadas. Esses ciclos são repetidos 35 vezes e as cópias

geradas de cada fragmento nessa PCR de fase sólida permanecem próximas umas das outras, formando um “cluster” de sequenciamento. Nos próximos ciclos de amplificação, nucleotídeos terminadores marcados são fornecidos para as reações de sequenciamento que ocorrem dentro de cada “cluster”. A alta densidade dos “clusters” de sequenciamento permite que o sinal de fluorescência gerado com a incorporação de cada um dos nucleotídeos terminadores tenha uma intensidade suficiente para garantir sua detecção exata. Após a incorporação de cada nucleotídeo no fragmento em síntese, é realizada a leitura do sinal de fluorescência. Em seguida, ocorre uma etapa de lavagem para remoção dos reagentes excedentes, do terminal 3' bloqueado e do fluoróforo do nucleotídeo incorporado no ciclo anterior, para que a reação de sequenciamento prossiga. A leitura das bases é feita pela análise sequencial das imagens capturadas em cada ciclo de sequenciamento (SHENDURE & JI, 2008; apud CARVALHO; SILVA, 2010).

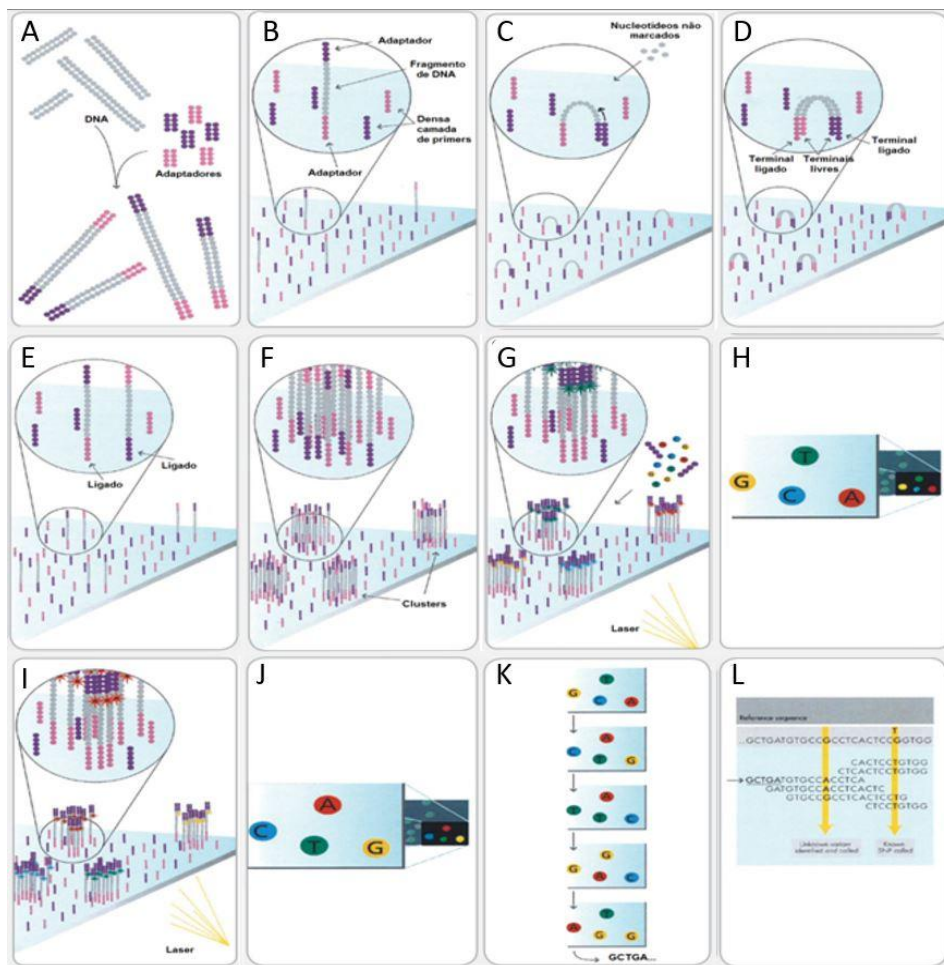


Figura 3. Representação esquemática do princípio tecnológico da plataforma Illumina.

O DNA é fragmentado aleatoriamente e ligado a adaptadores A e B em ambas as extremidades (A). As moléculas de DNA fita simples são aderidas por afinidade ao suporte sólido onde estão também aderidos em alta densidade oligonucleotídeos complementares aos adaptadores A e B (B). Durante a etapa de anelamento (C), no primeiro ciclo de amplificação da PCR em fase sólida, o adaptador da extremidade livre da molécula aderida ao suporte encontra seu oligonucleotídeo complementar no suporte, formando uma estrutura em ponte. Uma vez fornecidos os reagentes necessários, a PCR é iniciada utilizando a extremidade 3' livre do oligonucleotídeo como primer (C e D). Na etapa de desnaturação (E), a “ponte” é desfeita mediante elevação de temperatura. Repete-se a etapa de anelamento (F), formando novas estruturas em ponte e iniciando um novo ciclo de amplificação. Após uma série desses ciclos, serão obtidos “clusters” de moléculas idênticas ligadas ao suporte (G). Com a incorporação de nucleotídeos terminadores marcados e excitação a laser (H), é gerado um sinal, o qual é captado por dispositivo de leitura e interpretado como um dos quatro possíveis nucleotídeos componentes da cadeia (I). O processo de incorporação de nucleotídeos marcado, excitação e leitura é repetido para cada nucleotídeo componente da sequência (J, K). A leitura é feita de forma sequencial, o que permite a montagem da sequência completa de cada “cluster” (L). Adaptado de ILLUMINA, 2007 e CARVALHO; SILVA, 2010.

O sequenciamento na plataforma Illumina pode gerar terabytes de dados em imagem. O programa Firecrast (Illumina) de análise de imagens capta as informações para que o programa Bustard as convertam em uma sequência de DNA de código IUPAC associado com um índice de intensidade e qualidade. Por fim, o programa chamado Gerald realiza a calibração da qualidade e filtragem dos dados e, finalmente, produz um arquivo de texto contendo sequências curtas de leitura em formato FASTQ. A última etapa, que é a análise dos dados, é considerada a mais crítica do processo, uma vez que é produzida uma enorme quantidade de dados, requerendo uma infraestrutura computacional adequada para execução das análises, bem como locais para o armazenamento físico desses dados. Além disso, o grande número de sequências torna esta etapa a mais demorada da tecnologia RNA-Seq (WILHELM et al., 2010).

Dificuldades à parte, o sequenciamento de RNA nesta e em outras plataformas de nova geração, tem transformado várias áreas de pesquisa biológica, incluindo a agricultura. Os estudos genéticos foram amplamente beneficiados com o avanço na obtenção de informações que podem ser aplicadas no pré-melhoramento e melhoramento genético de espécies vegetais de interesse econômico (GIACHETTO; HIGA, 2014).

2.7 Montagem *de novo*

O sequenciamento do transcriptoma completo ou sequenciamento do RNA (RNA-seq) por meio de tecnologias de sequenciamento de nova geração começou a revelar o complexo e dinâmico cenário do transcriptoma de vários organismos, de leveduras a humanos, em um nível sem precedentes de sensibilidade e acurácia (MARTIN; WANG, 2011). O número cada vez maior de dados sendo produzidos nesta nova era genômica tem levado à evolução de ferramentas de bioinformática, procedimentos computacionais e sistemas de hardware mais poderosos que começam a tirar proveito do sequenciamento de alto desempenho (NEPOMUCENO et al., 2012).

Montadores de transcriptomas baseados em RNA-seq têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Eles se dividem em duas categorias gerais: os baseados em genomas de referências e os baseados em montagens *de novo* (CHANG et al., 2015). O termo montagem *de novo* vem do latim e significa “desde o princípio”. Ele se refere aos métodos utilizados para determinar a sequência completa do DNA quando não há disponível nenhuma sequência genômica para ser utilizada como referência (ALKAN et al., 2011).

A decisão para usar a estratégia da montagem *de novo* ou baseada na referência, caso esta última esteja disponível, fundamenta-se no custo, na aplicação biológica, no esforço para atingir a acurácia necessária e no tempo de montagem (MARTINS et al., 2013).

Para garantir a montagem *de novo* de um transcriptoma de alta qualidade, um cuidado particular deve ser tomado na elaboração do experimento de RNA-seq. Na fase de geração de dados, ocorrem todas as etapas já descritas no subitem 2.6 desta revisão. Na fase de análise dos dados (Figura 4), as leituras curtas geradas

são pré-processadas para remover erros de sequenciamento e outros artefatos. As leituras são posteriormente montadas para reconstruir os RNAs originais e avaliar a sua abundância (contagem de expressão). A acurácia e a precisão da contagem de expressão de genes são influenciadas pelos métodos de construção das bibliotecas de cDNA e das tecnologias de sequenciamento. Deste modo, esses fatores podem influenciar a qualidade dos transcriptomas montados (MARTIN; WANG, 2011).

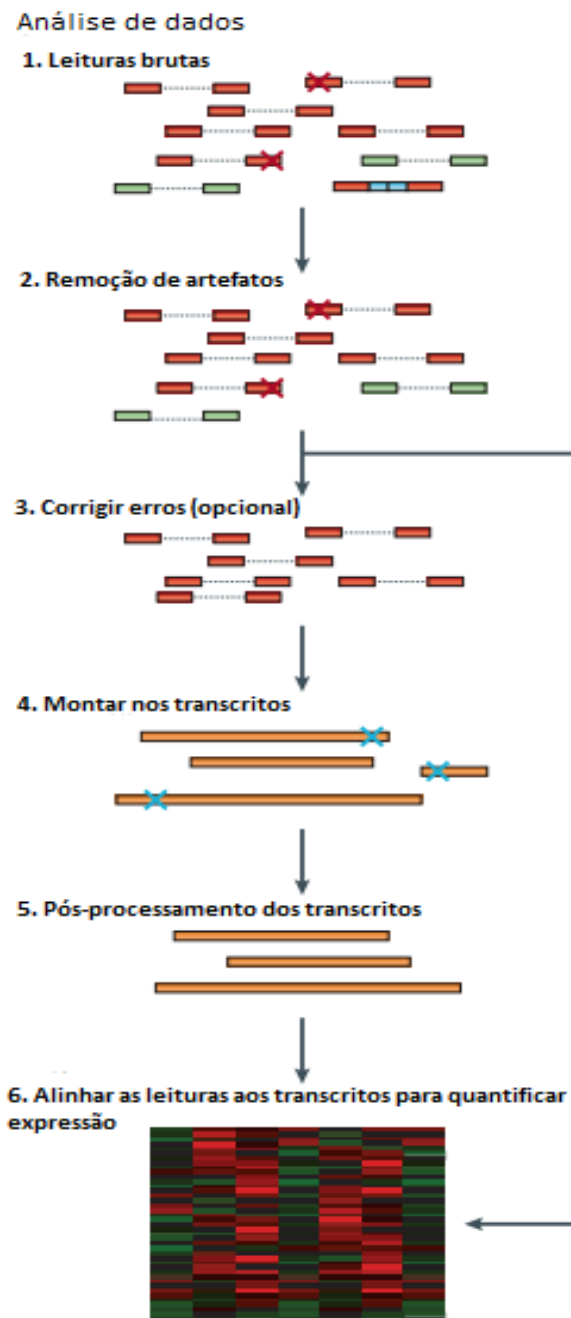


Figura 4. Análise de dados de RNA-seq. Após o sequenciamento, as leituras são pré-processadas para remover as de baixa qualidade e os artefatos, tais

como sequências de adaptadores (azul), DNA contaminante (verde) e duplicatas de PCR (estágios 1 e 2). Em seguida, os erros de sequências (cruzes vermelhas) são opcionalmente removidos (estágio 3) para melhorar a qualidade das leituras. As leituras pré-processadas são então montadas em transcritos (laranja, estágio 4) e submetidas a processos de pós-montagem para remover erros de montagem (cruzes azuis). Os transcritos são então pós-processados (estágio 5) e o nível de expressão de cada um é então estimado pela contagem do número de leituras que se alinham para cada transcrito (estágio 6). Fonte: MARTIN; WANG, 2011.

Atualmente, os algoritmos de montagem do genoma funcionam utilizando todos os segmentos de DNA de uma vez, alinhando-os uns com os outros e tentando identificar as regiões onde dois segmentos de leitura se sobrepõem. As sobreposições podem ser incorporadas linearmente no processo de montagem. Quanto mais curtas as sequências, maior a quantidade de sobreposições necessárias para realizar a montagem. Além disso, a cobertura genômica, que é o número de vezes que uma determinada região do genoma é coberta por segmentos de leitura, contribui para aumentar a precisão da região considerada (EKBLÖM; WOLF, 2014).

A utilização de segmentos de leitura com extremidades pareadas, isto é, com sobreposição de sequências de DNA nas suas duas extremidades, torna mais fácil o processo de obtenção de sequências montadas. Quando duas ou mais das sequências obtidas do processo de sequenciamento são emparelhadas (por possuírem extremidades pareadas), são produzidas sequências maiores chamadas de “contigs”. Estes, por sua vez, podem ser emparelhados, gerando sequências ainda maiores chamadas de “scaffolds” (BAKER, 2012).

Nesta abordagem são utilizados os grafos De Bruijn, os quais usam os k-mers (sequências de bases com tamanho K) para representar os nós. Os pares de nós são conectados entre si através de uma sobreposição de sequências de exatamente (k-1). Montadores como o Trinity e o Velvet realizam a reconstrução diretamente em cima dos grafos De Bruijn, sem perder nenhuma isoforma (ZERBINO; BIRNEY, 2008; MARTIN et al., 2010; ROBERTSON et al., 2010; GRABHERR et al., 2011).

Uma vez compreendido o método utilizado na montagem, é necessário saber os prós e os contras dessa abordagem. Quando comparada a estratégia baseada em genoma de referência, a montagem *de novo* do transcriptoma tem várias vantagens. Primeiramente, ela não depende de um genoma de referência, e para a maioria dos organismos que não tem um genoma de alta qualidade pronto, a montagem *de novo* pode providenciar um conjunto inicial de transcritos, permitindo estudos de expressão por RNA-seq. Além disso, a montagem pode ser realizada mesmo quando um genoma de referência está disponível, uma vez que pode recuperar transcritos de segmentos do genoma que estão faltando, ou pode detectar transcritos de fontes exógenas desconhecidas (MARTIN; WANG, 2011).

Apesar dessas vantagens, as sequências de leituras obtidas de plataformas comuns de sequenciamento de nova geração, incluindo Illumina, Solid e 454, são frequentemente muito curtas (35-500bp), como já citado anteriormente. Reconstruir um transcriptoma compreensivo a partir de sequências curtas implica em muitos desafios de bioinformática (MARTIN; WANG, 2011). Além disso, em relação à complexidade do genoma e ao tempo de montagem, montagens *de novo* são ordens de magnitude mais lentas, consomem muito mais memória de processamento e exigem mais interatividade e atenção do que montagens com referência (MARTINS, 2013). Outros três desafios computacionais também podem ser observados nessa abordagem: o primeiro, é que um gene pode ser representado por milhares de leituras, como também por apenas algumas; o segundo é que as leituras podem originar tanto transcritos maduros (apenas éxons), quanto também precursores de RNA que não sofreram o splicing completo (podem conter íntrons); por fim, como as leituras são sequências curtas, e os genes podem assumir diferentes isoformas, torna-se um desafio identificar precisamente quais leituras produzem qual isoforma (GARBER et al., 2011).

Quanto às diferentes estratégias de montagem *de novo*, estas apresentam vantagens e desvantagens quando comparadas entre si em velocidade e precisão. A montagem *de novo* é quase sempre complexa e difícil, particularmente quando o genoma é grande e possui sequências que se repetem muitas vezes (como é o caso da cana-de-açúcar), causando falhas na montagem (ALKAN et al., 2011). Apesar disso, são desenvolvidos sempre muitos estudos para superar essas falhas.

De qualquer forma, essa abordagem, mesmo que trabalhosa, contribui significativamente para o desenvolvimento de recursos genômicos, estudos funcionais e para os programas de melhoramento de plantas e animais (MARTINS, 2013).

2.8 Estudos sobre transcriptoma de cana-de-açúcar sob déficit hídrico

A cana-de-açúcar é um organismo que possui uma composição genética muito complexa em virtude da sua origem relacionada a processos de hibridação interespecífica, sendo que *Saccharum officinarum* apresenta $x=10$ cromossomos (D'HONT *et al.*, 1995) e *Saccharum spontaneum* possui $x=8$ cromossomos (D'HONT *et al.*, 1996). As plantas do gênero *Saccharum* apresentam altos níveis de ploidia e, frequentemente apresentam números atípicos de cromossomos (aneuploidia). Estudos de hibridização “in situ” têm confirmado que o genoma dos híbridos modernos de cana-de-açúcar é composto pela reunião dos genomas de *S. officinarum* e *S. spontaneum*, com a predominância de *S. officinarum*. Esses híbridos comerciais são quase todos férteis e possuem um número de cromossomos que varia de 100 a 130 (FERRO, 2008).

VETTORE *et al.* (2003) já afirmavam que o conhecimento sobre todo o genoma da cana-de-açúcar era uma tarefa enorme, devido ao elevado nível de ploidia citado acima, e também por nenhum dos mapas genéticos estarem ainda completos. Atualmente, a cultura de cana-de-açúcar continua sem um genoma de referência disponível, já que possui um genoma altamente complexo, além da escassez de ferramentas para análises específicas para poliplóides, criando vários desafios a serem enfrentados tanto pelos programas de melhoramento convencional, como pelos programas biotecnológicos. Dessa forma, é descrito a seguir um breve histórico sobre as pesquisas relacionadas ao genoma e transcriptoma de cana-de-açúcar, evidenciando o esforço constante de vários grupos de pesquisa em compreenderem cada vez melhor essa cultura, a fim de disponibilizar no mercado variedades cada vez mais produtivas.

Uma das primeiras abordagens para estudo do transcriptoma de cana-de-açúcar foi à baseada em ESTs (que são etiquetas de sequências expressas). Os

primeiros estudos utilizando ESTs de cana-de-açúcar foram desenvolvidos por um grupo da África do Sul, utilizando amostras de palmito e colmo (CARSON; BOTHA, 2000; CARSON; BOTHA, 2002). Apesar de terem analisado apenas um pequeno conjunto de sequências (menos de 500 ESTs), os dados foram suficientes para mostrar a diversidade das funções fisiológicas envolvidas na cana (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

Contudo, a maior coleção de ESTs de cana-de-açúcar sequenciada foi proveniente do projeto paulista de sequenciamento denominado SUCEST (VETTORE et al., 2001; VETTORE et al., 2003). A partir do banco de dados gerado por esse projeto foi possível identificar genes associados ao estresse por frio (NOGUEIRA et al., 2003) e também por estresse oxidativo (KURAMAE et al., 2002); genes inibidores de protease associados a resistência a patógeno (SOARES-COSTA et al., 2002; FALCO; SILVA-FILHO, 2003; MELLO et al., 2003), tecido-especificidade envolvida na transdução de sinal (PAPINI-TERZI et al., 2005) e também avaliar tecido-especificidade de transposons (DE ARAUJO et al., 2005). Com o projeto SUCEST, um conjunto básico e fundamental de dados para um maior entendimento dos processos fisiológicos e bioquímicos da cana-de-açúcar foi disponibilizado. Foram gerados 43.141 prováveis transcritos de cana-de-açúcar (SASs, “Sugarcane Assembled Sequences”), dos quais cerca de 29,7% não apresentaram nenhuma homologia com sequências gênicas ou protéicas previamente identificadas em qualquer outro organismo. Com o intuito de caracterizar sequências obtidas através do projeto SUCEST, diversos projetos foram iniciados em laboratórios especializados em várias linhas de pesquisa (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

Os estudos mais tradicionais em biologia molecular estavam restritos normalmente a análises pontuais que não proporcionavam uma visão abrangente do funcionamento sincronizado dos genes. Essas metodologias normalmente permitiam avaliar um número muito restrito de genes. Nos últimos anos foram sendo desenvolvidas tecnologias que permitiram a análise simultânea de um grande número de genes, tais como o SAGE (“Serial Analysis of Gene Expression”, VELCULESCU et al., 1995) e os arranjos de DNA (macroarranjos e microarranjos) (NÓBREGA; DORNELAS, 2006).

Vários trabalhos com cana-de-açúcar foram realizados usando estas tecnologias, principalmente para estudo do déficit hídrico. Um exemplo de trabalho envolvendo a tecnologia SAGE no estudo do transcriptoma é o de Kido et al.(2012). O referido trabalho foi o primeiro a analisar acessos de cana-de-açúcar com respostas contrastantes sob estresse hídrico com uma combinação de um perfil de transcriptoma de alto rendimento (tecnologia SuperSage) associada com a plataforma de sequenciamento de nova geração.

Um trabalho realizado por Rodrigues et al.(2011) também utilizou uma dessas tecnologias (macroarranjo) para identificar genes que são reprimidos e ou induzidos por déficit hídrico na cana-de-açúcar. O nível de expressão de 3.575 cDNAs independentes de cultivares de cana contrastantes a tolerância à seca foi medido por hibridização com RNA extraído de amostras coletadas no segundo, oitavo e décimo dias de estresse, que representavam condições de deficiência hídrica leve, moderada e severa, respectivamente. Dos genes avaliados, cerca de 1.670 mostraram-se diferencialmente expressos, sendo que 62% eram induzidos por diferentes condições de estresse, enquanto muitos genes reprimidos eram exclusivos para cada tempo.

Outra tecnologia utilizada em estudos de transcriptomas de cana-de-açúcar é a de cDNA-AFLP. Como exemplo de trabalho sobre déficit hídrico em cana-de-açúcar utilizando esta tecnologia, tem-se o de Vantini et al.(2015). A análise de cDNA-AFLP realizada por esses autores, permitiu comparar o perfil de expressão de genes em tecidos de raízes de cultivares de cana-de-açúcar contrastantes a tolerância à seca. Um total de 173 fragmentos diferencialmente expressos foi detectado na cultivar tolerante ao estresse hídrico. De 13 grupos, três tiveram maior representação. Isto inclui 23% de proteínas desconhecidas, sem classificação no NCBI, 21% de proteínas hipotéticas e 20% de proteínas relacionadas ao estresse. A maioria dos genes foi expressa no primeiro e terceiro dias de estresse, o que sugere, segundo os autores, que os genes da cascata de sinalização são ativados mais rapidamente em resposta ao déficit hídrico na cultivar tolerante do que na sensível.

Estudos mais recentes sobre transcriptoma de cana-de-açúcar utilizam a tecnologia de sequenciamento de nova geração ou RNA-seq, como já citado na

revisão deste trabalho. O RNA-Seq permite dentre outras coisas, a identificação de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) em regiões transcritas, os quais podem ser utilizados na detecção de expressão alelo-específica e também como marcadores moleculares. Como exemplo dessa aplicação, tem-se o trabalho de Cardoso-Silva et al. (2014) que aplicaram a tecnologia de RNA-Seq a seis genótipos de cana-de-açúcar. Os autores identificaram SNPs exclusivos de cada genótipo, os quais possuem uma alta probabilidade de associação com as características de interesse econômico particulares a cada um deles. Estratégias como essas que têm por objetivo a busca de SNPs em regiões codificadoras, por meio do sequenciamento em larga escala do transcriptoma de tecidos alvo de cultivares ou variedades contrastantes para características de interesse (como tolerância à seca, por exemplo), podem ser utilizadas (GIACHETTO; HIGA, 2014).

Também têm sido realizados estudos de microRNAs envolvidos na resposta à seca em cana-de-açúcar. Gentile et al. (2015) relataram em uma revisão os perfis de expressão de microRNAs observados em várias condições experimentais utilizando diferentes cultivares de cana que diferiam na tolerância à seca. Segundo os autores, uma melhor compreensão sobre a rede regulatória de miRNAs e seus alvos sob déficit hídrico tem um grande potencial para contribuir com os programas de melhoramento de cana-de-açúcar, seja como marcadores moleculares, ou através da utilização de abordagens biotecnológicas.

Até o momento, têm-se disponível na literatura poucos trabalhos que avaliaram os efeitos do déficit hídrico prolongado em cultivares de cana-de-açúcar contrastantes à tolerância à seca. O presente trabalho foi delineado e conduzido, a fim de simular as condições reais de campo, onde são normalmente encontradas restrições hídricas prolongadas, principalmente sob os estágios de desenvolvimento em que a cultura requer mais água. Dessa forma, o presente trabalho é um dos poucos a compreender como uma cultivar de cana-de-açúcar tolerante à seca responde ao déficit hídrico prolongado, e como os resultados do seu comportamento podem contribuir para o melhoramento de variedades mais tolerantes à seca.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material vegetal e delineamento experimental

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação, no Departamento de Tecnologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, em São Paulo, Brasil, localizado a uma altitude de 610 m, com as seguintes coordenadas geográficas: latitude (21°15'22" S) e longitude (48°18'58" W). Neste trabalho, foram utilizadas duas cultivares comerciais de cana-de-açúcar consideradas referências em produtividade: SP81-3250 utilizada como padrão de tolerância à seca, e RB855453, sensível à deficiência hídrica (PINCELLI ; SILVA, 2012).

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, no esquema fatorial 2×3 (dois genótipos (G) × três tensões hídricas do solo (T)), em três épocas amostrais, com quatro repetições, totalizando 24 unidades experimentais. As quatro repetições foram utilizadas apenas nas análises fisiológicas. Para as análises moleculares foram utilizadas apenas três repetições biológicas, perfazendo um total de 54 amostras. As condições ambientais de temperatura média e umidade relativa do ar da casa de vegetação foram monitoradas com auxílio de termohigrômetro e mantidas em $29 \pm 4,3$ °C e $75 \pm 10\%$, respectivamente.

Cada unidade experimental foi composta por um vaso de plástico contendo 50 dm³ de um latossolo típico das regiões canavieiras do estado de São Paulo, que foi previamente coletado na profundidade de 0 a 20 cm. Alíquotas representativas desse solo foram homogeneizadas e submetidas à análise química e granulométrica (RAIJ; QUAGGIO, 1983). A partir dos resultados das análises, realizou-se o planejamento da correção e da adubação (de plantio e cobertura), de acordo com as exigências nutricionais da cultura (RAIJ et al., 1997) e recomendações de Malavolta (1980), para experimentos em vasos (Figura 5).



Figura 5. Correção e adubação do solo para experimentos em vasos.

Visando determinar as tensões hídricas do solo (T) mais adequadas para caracterizar os tratamentos com e sem restrição hídrica, determinou-se inicialmente a curva de retenção hídrica para o solo proposto, com o intuito de se obter a umidade correspondente às diferentes tensões. Para isso, foram coletadas amostras do solo dos vasos com auxílio de anel volumétrico de 4,8 cm de diâmetro e 3,0 cm de altura para determinação da densidade e da capacidade de retenção de água por secamento, nas tensões de 0,001; 0,006; 0,01; 0,033; 0,06; 0,1 e 0,3 MPa (megapascal) (BEUTLER et al., 2002; BRITO et al., 2009), com o auxílio de uma câmara de pressão de Richards com placa porosa (EMBRAPA, 1997). As curvas de retenção foram ajustadas com base no modelo matemático proposto por GENUCHTEN (1980) e, a partir destas, foi estimada a retenção de água a 1,5 MPa, com vistas a calcular a capacidade de água disponível.

Para obtenção das mudas, toletes de cana-de-açúcar provenientes da Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Jaú – APTA Pólo Centro Oeste, previamente tratados, foram plantados em recipientes de plástico com capacidade para $0,50 \text{ dm}^3$ contendo areia lavada e peneirada. As mudas originadas da brotação de uma gema foram mantidas em areia, sem qualquer restrição hídrica, durante 30 dias. Após este período, foram selecionadas quanto à sanidade e homogeneidade e duas mudas foram transplantadas para cada vaso de plástico de 50 dm^3 , as quais foram cultivadas no solo proposto por 30 dias sem restrição hídrica (período necessário para o estabelecimento e adaptação do sistema radicular), ou seja, até completarem 60 dias de idade (dias após o plantio - DAP) (Figura 6).



Figura 6. Procedimentos para instalação do experimento: A) Material vegetal: toletes de cana-de-açúcar; B) Plantio dos toletes em recipientes de plástico com areia; C) Obtenção das mudas de cana-de-açúcar para plantio; D) Seleção das mudas para plantio; E) Limpeza das mudas selecionadas; F) Transplante das mudas para vasos de plástico de 50 dm³ (unidades experimentais).

A partir desse momento, as plantas com 60 dias de idade foram submetidas a três tratamentos distintos: controle (T1: sem restrição hídrica, de -0,010 a -0,015 MPa), déficit hídrico moderado (T2: -0,050 a -0,055 MPa) e déficit hídrico severo (T3: -0,080 MPa).

O controle do conteúdo de água no solo foi realizado por meio de tensiometria digital a partir do monitoramento diário das leituras das tensões do solo a fim de se garantir a umidade no nível concernente a cada tratamento. Para isso, foram instalados dois tensiômetros de punção em cada unidade experimental, um na profundidade de 10 cm e outro na de 30 cm, para monitoramento diário da umidade do solo (QUEIROZ, 2010). A estimativa da umidade do solo de cada vaso foi realizada a partir da média das leituras dos tensiômetros instalados nos vasos. A reposição de água foi realizada por meio de um tubo de PVC com perfurações ao longo de toda a sua extensão, instalado no centro geométrico do vaso, garantindo rápida distribuição da umidade do solo em todos os estratos do vaso (Figura 7).

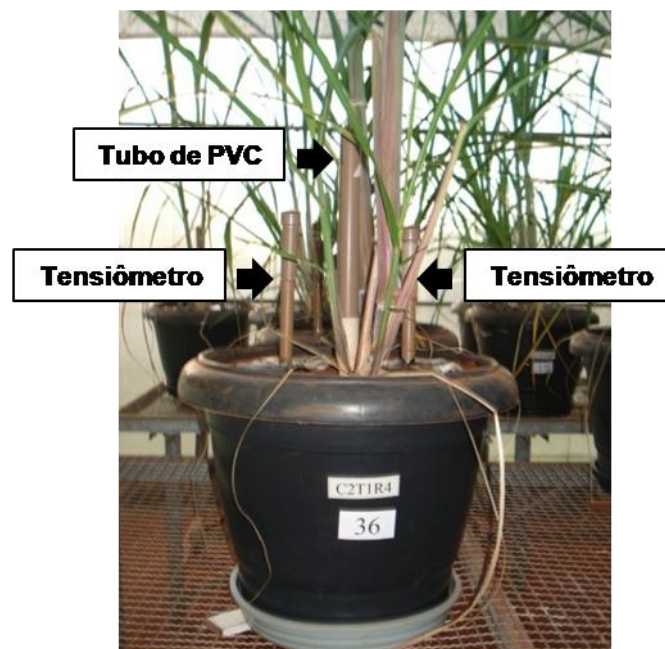


Figura 7. Unidade experimental com os dois tensiômetros de punção (de 10 e 30 cm) e o tubo de PVC instalados.

As plantas submetidas aos três tratamentos distintos foram avaliadas em três épocas amostrais: 30 dias após a aplicação dos tratamentos (DAT), 60 DAT e 90 DAT, constituindo-se das idades de 90, 120 e 150 DAP, respectivamente (Figura 8), período dentro do qual aproximadamente 70% a 80% da produção de cana é constituída (SINGH; RAO, 1987).

Em todas as plantas utilizou-se a primeira folha totalmente expandida e com lígula aparente (folha +1) para a realização das análises fisiológicas aos 30, 60 e 90

dias após aplicação dos tratamentos. Para as análises moleculares de expressão gênica usando RNA-seq foram coletadas as folhas +1 logo após as avaliações fisiológicas, nas mesmas épocas amostrais (30, 60 e 90 DAT).



Figura 8. Condução do experimento em casa de vegetação após aplicação das três distintas tensões hídricas em MPa (T1 - sem restrição hídrica; T2 - restrição hídrica moderada, T3 - restrição hídrica severa) – A) Cinco dias após aplicação dos tratamentos B) Sessenta dias após aplicação dos tratamentos e C) Noventa dias após a aplicação dos tratamentos.

3.2 Análises fisiológicas

Como descrito no item 3.1, em todas as unidades experimentais (vasos com 50 dm³) foram plantadas duas mudas de cana-de-açúcar. Dessa forma, todos os valores das análises fisiológicas descritas a seguir são resultantes da média das duas plantas por vaso.

Em todas as plantas foram realizadas avaliações do número de perfilhos, da área foliar, do índice de cor verde da folha, do potencial hídrico foliar, da fotossíntese e da concentração interna de CO₂.

3.2.1 Número de perfilhos e área foliar

Foi quantificado o número de perfilhos de cada unidade experimental por meio de contagem e avaliada a área foliar, através de medições do comprimento e largura do limbo foliar na porção mediana da folha +1, com auxílio de uma fita métrica e régua, respectivamente. A área foliar foi calculada segundo metodologia

descrita por Hermann e Câmara (1999): $AF = C \times L \times 0,75 \times (N+2)$, em que C é o comprimento da folha +1, L é a largura da folha +1, 0,75 é o fator de correção para área foliar da cultura, e N é o número de folhas abertas com pelo menos 20% de área verde.

3.2.2 Potencial hídrico foliar

A folha +1 do perfilho principal de cada vaso foi cortada para avaliar o potencial de água na folha (Ψ_w), a partir de uma bomba de pressão de Scholander (Soil Moisture Equipment, EUA). A pressão foi aplicada até ocorrer exsudação a partir do corte feito no pecíolo da folha. As medições foram avaliadas entre 8:00 e 10:00 h, período correspondente a chamada janela térmica.

3.2.3 Índice de cor verde da folha (via SPAD)

A estimativa do índice de cor verde da planta foi determinada usando o medidor SPAD-502 (Minolta Corp, Ramsey, NJ, EUA). Foi utilizada uma média de três leituras na folha +1 de cada planta. A análise do desenvolvimento da planta (índice SPAD) corresponde à leitura do conteúdo de cor verde em folha, e o seu valor é equivalente à quantidade de luz transmitida através da folha em duas regiões de comprimentos de onda de vermelho e infravermelho. A quantidade de luz vermelha absorvida indica a quantidade de clorofila, enquanto que a quantidade de luz absorvida ao lado do comprimento de onda infravermelho serve como referência interna para compensar a espessura da folha.

3.2.4 Fotossíntese e concentração interna de CO₂

A assimilação de CO₂ (fotossíntese) e a concentração interna de CO₂ (C_i) foram avaliadas com um analisador de gases por infravermelho, portátil (modelo LCPro+ SYSTEM, ADC) acoplado a uma fonte de luz. A concentração de CO₂ do ar

variou de $370 \pm 10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durante as avaliações. A intensidade luminosa foi controlada artificialmente pelo LCPro+ SYSTEM em $2000 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. As avaliações foram realizadas entre 8:00 e 10:00 h na porção mediana da folha +1 completamente expandida.

3.2.5 Análise estatística

Os resultados de todas as variáveis foram submetidos à análise de variância pelo teste F num esquema fatorial 2×3 (duas cultivares x três tensões hídricas do solo), dentro de cada época de avaliação (30, 60 e 90 DAT). As médias foram comparadas pelo teste Tukey a 5% de probabilidade. Tais cálculos foram executados com auxílio do programa Sisvar (FERREIRA, 2011).

3.3 Análises moleculares

3.3.1 Coleta das folhas de cana-de-açúcar

Após a aplicação dos tratamentos e análises fisiológicas, as amostras (folhas +1) das plantas foram coletadas para as análises moleculares em 30, 60 e 90 DAT. Depois da coleta, foram retiradas a nervura central de todas as folhas para não dificultar a extração do RNA. Em seguida, as folhas +1 foram cortadas em pedaços menores que foram envolvidos em papel alumínio devidamente etiquetados e imediatamente transferidos para o nitrogênio líquido. Posteriormente, as amostras foram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até o momento de serem utilizadas para a extração do RNA total (Figura 9).



Figura 9. Coleta e armazenamento das folhas de cana-de-açúcar tolerante e sensível à seca.

3.3.2 Extração de RNA total das plantas

A extração de RNA requer muitos cuidados para evitar a contaminação das amostras com RNAses, que são enzimas que degradam o RNA em componentes menores. Desta forma, todo material de plástico utilizado para a extração foi tratado com hidróxido de sódio (NaOH) 0,5 N e as vidrarias foram submetidas depois de lavadas com detergente neutro e água destilada a um aquecimento de 180°C por seis horas. Todas as soluções utilizadas para extração foram feitas com água ultra pura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Além disso, os pipetadores, a superfície da bancada e os equipamentos utilizados foram tratados com RNaseZap® (“Life Technologies Corporation”), que é uma solução que elimina as enzimas que degradam o RNA.

As extrações de RNA total do material vegetal obtido (folhas +1) foram realizadas com a utilização do Kit comercial Purelink RNA Mini Kit da Ambion®. Foram realizadas extrações de RNA de 54 amostras, resultantes de: 2 cultivares (SP81-3250 e RB855453, tolerante e sensível à seca, respectivamente), 3 tratamentos (controle, déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo), 3 épocas amostrais (30, 60 e 90 DAT) e 3 repetições (Tabelas 1 e 2).

Para cada amostra foram utilizados 250 mg de folhas, as quais foram maceradas em cadinho contendo nitrogênio líquido até a dissolução total do material vegetal. A amostra macerada foi rapidamente transferida para tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 600 µL de tampão de lise proveniente do kit

("Lise buffer") e β -mercaptoetanol. O conteúdo do tubo foi homogeneizado com vortex por 2 minutos e centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, ao qual foi adicionado etanol 70% no mesmo volume em que o sobrenadante foi coletado. O sobrenadante contendo etanol foi homogeneizado em vortex por 30 segundos.

Um volume de 700 μ L dessa solução foi transferido para uma coluna "Spin Cartridge" com um tubo de coleta (cedidos pelo fabricante) para uma centrifugação a 12.000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente. Depois da centrifugação, a solução que passou pela coluna e ficou retida no tubo de coleta foi descartada. Em seguida, utilizando a mesma coluna e o mesmo tubo de coleta, foram adicionados 350 μ L do tampão de lavagem I ("Wash buffer I") para nova centrifugação a 12.000 g por 30 segundos a temperatura ambiente, para então descartar o conteúdo do tubo de coleta e voltá-lo a coluna. Em seguida, foram adicionados 80 μ L de DNase I a temperatura ambiente por 30 minutos, para remover qualquer contaminação com DNA genômico. Após esse tratamento, foi repetido o passo anterior de lavagem com o "Wash buffer I".

Posteriormente, foram adicionados 500 μ L de tampão de lavagem II ("Wash buffer II") na coluna com o tubo de coleta e centrifugado a 12.000 g por 30 segundos a temperatura ambiente, sendo descartado o tubo de coleta no final deste procedimento e inserido outro novo na coluna. Depois de trocado o tubo, este passo de lavagem com "Wash buffer II" foi repetido mais uma vez. O eluído do tubo de coleta foi descartado e foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 2 minutos a temperatura ambiente para secagem da membrana. O tubo de coleta foi descartado e a coluna foi colocada em um novo tubo de microcentrifuga de 1,5 mL para eluição do RNA total em 50 μ L de água ultra pura, livre de RNase, a qual foi colocada no centro da coluna. Após incubação por 2 minutos a temperatura ambiente, foi realizada uma centrifugação a 12.000 g por 2 minutos. Do volume final de RNA total (50 μ L) foi retirada uma alíquota de 1,5 μ L, e todo o RNA foi armazenado em ultrafreezer a -80°C.

Tabela 1. Amostras de RNA total extraídas da cultivar de cana-de-açúcar SP81-3250, tolerante ao déficit hídrico prolongado (30, 60 e 90 DAT), sob três níveis de disponibilidade hídrica no solo: não estressado (controle), déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo.

Amostras de RNA	Descrição das amostras de RNA total
SSTN3-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 3: 30 DAT; 1: repetição
SSTN3-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 3: 30 DAT; 2: repetição
SSTN3-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 3: 30 DAT; 3: repetição
SSTN6-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 6: 60 DAT; 1: repetição
SSTN6-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 6: 60 DAT; 2: repetição
SSTN6-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 6: 60 DAT; 3: repetição
SSTN9-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 9: 90 DAT; 1: repetição
SSTN9-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 9: 90 DAT; 2: repetição
SSTN9-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; N: não estressada; 9: 90 DAT; 3: repetição
SSTM3-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 3: 30 DAT; 1: repetição
SSTM3-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 3: 30 DAT; 2: repetição
SSTM3-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 3: 30 DAT; 3: repetição
SSTM6-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 6: 60 DAT; 1: repetição
SSTM6-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 6: 60 DAT; 2: repetição
SSTM6-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 6: 60 DAT; 3: repetição
SSTM9-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 9: 90 DAT; 1: repetição
SSTM9-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 9: 90 DAT; 2: repetição
SSTM9-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; M: déficit moderado; 9: 90 DAT; 3: repetição
SSTS3-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 3: 30 DAT; 1: repetição
SSTS3-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 3: 30 DAT; 2: repetição
SSTS3-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 3: 30 DAT; 3: repetição
SSTS6-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 6: 60 DAT; 1: repetição
SSTS6-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 6: 60 DAT; 2: repetição
SSTS6-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 6: 60 DAT; 3: repetição
SSTS9-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 9: 90 DAT; 1: repetição
SSTS9-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 9: 90 DAT; 2: repetição
SSTS9-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; T: tolerante; S: déficit severo; 9: 90 DAT; 3: repetição

Tabela 2. Amostras de RNA total extraídas da cultivar de cana-de-açúcar RB855453, sensível ao déficit hídrico prolongado (30, 60 e 90 DAT), sob três níveis de disponibilidade hídrica no solo: não estressada (controle), déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo.

Amostras de RNA	Descrição das amostras de RNA total
SSSN3-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 3: 30 DAT; 1: repetição
SSSN3-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 3: 30 DAT; 2: repetição

Continuação da Tabela 2

Amostras de RNA	Descrição das amostras de RNA total
SSSN3-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 3: 30 DAT; 3: repetição
SSSN6-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 6: 60 DAT; 1: repetição
SSSN6-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 6: 60 DAT; 2: repetição
SSSN6-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 6: 60 DAT; 3: repetição
SSSN9-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 9: 90 DAT; 1: repetição
SSSN9-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 9: 90 DAT; 2: repetição
SSSN9-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; N: não estressada; 9: 90 DAT; 3: repetição
SSSM3-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 3: 30 DAT; 1: repetição
SSSM3-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 3: 30 DAT; 2: repetição
SSSM3-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 3: 30 DAT; 3: repetição
SSSM6-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 6: 60 DAT; 1: repetição
SSSM6-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 6: 60 DAT; 2: repetição
SSSM6-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 6: 60 DAT; 3: repetição
SSSM9-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 9: 90 DAT; 1: repetição
SSSM9-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 9: 90 DAT; 2: repetição
SSSM9-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; M: déficit moderado; 9: 90 DAT; 3: repetição
SSSS3-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 3: 30 DAT; 1: repetição
SSSS3-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 3: 30 DAT; 2: repetição
SSSS3-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 3: 30 DAT; 3: repetição
SSSS6-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 6: 60 DAT; 1: repetição
SSSS6-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 6: 60 DAT; 2: repetição
SSSS6-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 6: 60 DAT; 3: repetição
SSSS9-1	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 9: 90 DAT; 1: repetição
SSSS9-2	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 9: 90 DAT; 2: repetição
SSSS9-3	SS: <i>Saccharum</i> spp; S: sensível; S: déficit severo; 9: 90 DAT; 3: repetição

3.3.3 Quantificação e análise da integridade do RNA total

Uma vez obtidos os RNAs totais de todas as amostras, os mesmos foram avaliados quanto a qualidade, quantidade e integridade, antes de serem utilizados para construção das bibliotecas de cDNA. Para estimar a qualidade do RNA, foi utilizado o espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (“Thermo Fisher Scientific Inc.”), para a leitura de absorbância das amostras nos comprimentos de onda 260, 280 e 230 nm. A razão A260nm/A280nm avalia as contaminações com proteínas e a razão A260nm/A230nm avalia a contaminação com outros compostos, como sais, polissacarídeos e compostos orgânicos como o fenol. Quando estas razões

apresentam valores entre 1,8 a 2,0 e acima de 2,0, respectivamente, pode-se considerar o RNA de boa qualidade.

A quantidade de RNA total extraído foi determinada com o fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit “Qubit® RNA HS Assay”. As amostras de RNA foram avaliadas quanto a sua integridade no Bioanalyzer 2100 (“Agilent Technologies”), utilizando o kit “Agilent RNA 6000 nano LabChip”, de acordo com as recomendações do fabricante. No Bioanalyzer, as amostras de RNA foram separadas por eletroforese utilizando-se o microchip “Eukaryote Total RNA Pico”, (Agilent Technologies) e detectadas por emissão de fluorescência induzida por laser. A utilização de um marcador de peso molecular durante a eletroforese permite estimar os tamanhos dos fragmentos gerados pelas amostras de RNA (Figura 10).

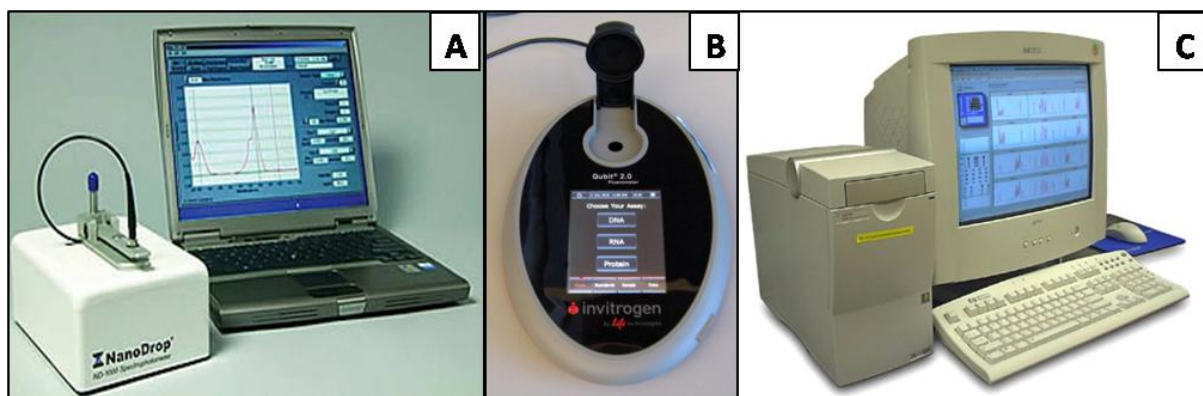


Figura 10. Equipamentos utilizados para determinar a qualidade, a quantidade e a integridade do RNA total, respectivamente. A) espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.); B) fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen); C) Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

3.3.4 Construção das bibliotecas de cDNA

Para a construção das bibliotecas de cDNA, a quantidade inicial de RNA total recomendada pela Illumina é de 0,1 a 4 µg. Baseado nessa recomendação, foram utilizados neste trabalho 1,5 µg de RNA total de cada amostra para a construção das bibliotecas de cDNA. Dessa forma, a partir dessa concentração de RNA total das plantas, o RNA mensageiro (RNAm) foi isolado e purificado pelo kit de preparação

das amostras “TruSeq RNA Sample Preparation v2” (Illumina) de acordo com as recomendações do fabricante.

A etapa de isolamento e purificação do RNAm foi baseada na ligação da cauda poli-A dessa molécula ao oligo (dT) presente em esferas magnéticas, separando-os uns dos outros. Depois de isolado, o RNAm foi fragmentado por enzimas presentes no kit em sequências que variaram de 245 a 300 pb. Em seguida, a primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir do RNA fragmentado, utilizando-se uma transcriptase reversa e oligonucleotídeos randômicos. Posteriormente, o RNAm molde foi removido e a segunda fita do cDNA foi sintetizada. A partir desta etapa, o kit “Agencourt Ampure beads” foi utilizado nas etapas de limpeza das amostras, uma vez que as esferas magnéticas desse kit separam o cDNA dupla fita do restante dos reagentes. Em seguida, os fragmentos de cDNA dupla fita com extremidades coesivas resultantes da etapa de fragmentação foram convertidas em extremidades cegas pelo “End Repair Mix”. A atividade da exonuclease 3'-5' deste mix remove os nucleotídeos da extremidade 3' e a polimerase adiciona nucleotídeos na extremidade 5'. Depois da reparação das pontas, foi adicionada uma base adenina em cada extremidade 3' dos fragmentos de cDNA para evitar que esses fragmentos se ligassem uns aos outros, e também para facilitar a ligação dos adaptadores que possuem uma base timina. Os adaptadores responsáveis por identificar as amostras foram ligados às extremidades dos fragmentos de cDNA.

Posteriormente, os fragmentos de cDNA foram submetidos a uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com oligonucleotídeos específicos para as sequências dos adaptadores, com o objetivo de aumentar o número de fragmentos de bibliotecas que continham os adaptadores ligados nas duas pontas. Para verificar a qualidade das bibliotecas de cDNA, foi realizada uma análise pelo Agilent Technologies Bioanalyzer 2100. Para validação, as bibliotecas foram quantificadas por meio do fluorômetro Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit “Qubit® dsDNA BR Assay”.

Após esta etapa, as bibliotecas de cDNA foram diluídas para uma concentração de 10 nM. A concentração foi verificada utilizando o Qubit® 2.0 (Invitrogen) com o kit “Qubit® dsDNA HS Assay”. Confirmada a concentração de 10 nM, as bibliotecas foram diluídas novamente para uma concentração de 1,5 nM. A

concentração final de cada biblioteca foi calculada usando qRT-PCR, de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as bibliotecas de cDNA foram normalizadas a 16 pmoles.

3.3.5 Clusterização e sequenciamento

Nesta etapa de clusterização foi utilizado o kit “TruSeq SR Cluster Kit v3 – cBot-HS”, de acordo com as recomendações do fabricante. As 54 bibliotecas normalizadas, juntamente com os reagentes para PCR de fase sólida e a “flow cell” (lâmina onde ocorre a clonagem in vitro), foram colocados no equipamento de automação cBot (Illumina). Foram utilizadas duas lâminas (“flow cell”) contendo oito linhas (“lane”) cada uma. Nas linhas de um a seis de cada lâmina foram colocadas quatro amostras diferentes, nas linhas sete foram colocadas três amostras diferentes e nas linhas oito os controles do kit, totalizando 27 amostras por lâmina. O equipamento cBot colocou as bibliotecas de cDNA na lâmina, onde ocorreram as reações de hibridização e PCR em fase sólida, o que resultou nos “clusters” (várias cópias da molécula de DNA molde) gerados para cada fragmento das bibliotecas ligadas na lâmina.

Após a clusterização, foi realizado o sequenciamento dos “clusters” nas Facilitys de sequenciamento da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) / UNESP Jaboticabal e da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) /USP Piracicaba, utilizando a plataforma HiScanSQ System (Illumina) para sequenciamento “paired-end” de fragmentos de 50 pb, e a plataforma HiSeq2500 System (Illumina) para fragmentos de 100 pb, respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante. As 54 bibliotecas foram sequenciadas de modo a se obter no mínimo cerca de 20 milhões de leituras por biblioteca.

3.4 Análise dos dados do sequenciamento

3.4.1 Processamento das leituras e filtragem dos dados (trimagem)

As leituras geradas no sequenciamento foram agrupadas por bibliotecas e transcritas para arquivos de texto, contendo as sequências de bases, em um formato FASTQ. Essas leituras foram processadas, sendo retiradas regiões de baixa qualidade e adaptadores usando o programa SeqyClean (versão 1.8.10) (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqyclean>). Os parâmetros do programa SeqyClean para retirada dos adaptadores foram mantidos, exceto o tamanho mínimo de sequências que foi alterado para 25 nucleotídeos. Para eliminação de regiões de baixa qualidade foi utilizado o índice de qualidade Phred Q30, que refere-se a uma probabilidade de 0,1% de uma base ter sido reconhecida incorretamente.

3.4.2 Montagem *De Novo* do transcriptoma de cana-de-açúcar

As bibliotecas sem adaptadores e somente com as regiões de alta qualidade foram então usadas na montagem do transcriptoma com o programa Trinity (GRABHERR et al., 2013) (versão r20140717). Foi realizada uma única montagem para o transcriptoma das duas cultivares (SP81-3250 e RB855453). Os seguintes parâmetros foram alterados no Trinity: “min_kmer_cov”, que estipula a contagem mínima de “k-mers” para a sequência ser montada pelo processo Inchworm, foi incrementado para 10; “min_glue”, que estipula o número mínimo de leituras necessárias para unir dois contigs pelo processo Chrysalis, foi incrementado para 4; “normalize_max_read_cov”, que define o máximo de cobertura no processo de normalização das leituras, foi incrementado para 350; “path_reinforcement_distance”, que define o mínimo de sobreposição de leituras no transcrito sendo montado pelo processo Butterfly, foi reduzido para 45. Os demais parâmetros de configuração do programa Trinity foram mantidos para a realização da montagem sem qualquer sequência referência para direcionar o processo de montagem.

3.4.3 Montagem de uma montagem referência

O Trinity é um programa que contém para as sequências de transcritos montados, um padrão de nomenclatura $c<n^{\circ}>_g<n^{\circ}>_i<n^{\circ}>$ (por exemplo: c1_g1_i1), para a identificação do componente da montagem (c), gene (g) e isoforma (i). As isoformas diferentes (i) que correspondem ao mesmo gene representam sequências compartilhadas com estruturas distintas, frequentemente promovidas por encadeamentos alternativos de exons (“splicing” alternativo). Já os diferentes genes montados (g) podem até representar partes do mesmo gene, se esse gene não teve cobertura suficiente com o sequenciamento realizado. O componente (c) é uma definição inteiramente operacional do Trinity e representa o agrupamento (“cluster”) de leituras (“reads”) relacionadas, ou seja, que contêm alguma similaridade, e por isso, componentes comuns até podem representar genes relacionados (por exemplo: genes parálogos).

3.4.4 Estimativa de abundância dos transcritos e normalização

As leituras foram mapeadas no transcriptoma de referência com a utilização do programa Bowtie2 (v.2.1.0) (LANGMEAD; SALZBERG, 2012), configurado com os parâmetros ajustados para aumentar a sensibilidade nas buscas por um alinhamento válido.

A estimativa de abundância dos transcritos montados foi realizada com o utilitário do pacote Trinity (align_and_estimate_abundance.pl) utilizando o método implementado no programa eXpress (v.1.5.1). Esses dados de abundância também foram normalizados por FPKM (“Fragments Per Kilobase of exon per Million fragments mapped”) dentro de cada biblioteca e entre bibliotecas utilizando TMM (“Trimmed Mean of M-values”) com “scripts” auxiliares do Trinity.

3.4.5 Anotação dos transcritos

Para a anotação dos transcritos foi utilizado alguns bancos de dados de referência: os transcriptomas e proteomas preditos de *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) e *Sorghum bicolor* (*S. bicolor*), ambos obtidos do repositório da plataforma

Phytozome (v.10) (GOODSTEIN et al., 2012), os transcriptomas disponíveis de cana-de-açúcar SoGI (v.3.0) (*Saccharum officinarum* Gene Index) e SCG (SugarCane Genes) (v.1.0) (GRATIVOL et al., 2014), ESTs do banco de dados dbEST e RNAs do GenBank para *Saccharum spp.* e o UniGene de *Saccharum officinarum*. As análises foram realizadas comparando a montagem com os transcriptomas referências no espaço de nucleotídeos (blastn) e no espaço de aminoácidos (blastx/tblastx), e com os proteomas apenas no espaço de aminoácidos (blastx/tblastn). Todas as comparações (parâmetros: e-value 1e-5 e -dbsize 500000000) foram realizadas duas vezes, uma com o transcriptoma montado como item de consulta (“query”) e outra com o banco de dados (db). Esse procedimento foi necessário, a fim de se encontrar os melhores correspondentes recíprocos (“Reciprocal Best Hits”). Para ser reconhecido como um correspondente válido, os alinhamentos com as melhores pontuações (somente os que possuíam pontuação dentro de um limiar de até 5% abaixo da melhor pontuação), com uma cobertura de alinhamento de no mínimo 50% da sequência consultada e uma identidade maior ou igual a 75% de no mínimo 50 aminoácidos (blastx/tblastx/tblastn) ou 150 nucleotídeos (blastn) foram considerados. As sequências com as variantes transcricionais montadas foram utilizadas nessas comparações.

3.4.6 Identificação dos genes diferencialmente expressos

Para comparar a expressão gênica entre os tratamentos, foi utilizado o método edgeR (v.3.8.5) (ROBINSON et al., 2010; MCCARTHY; CHEN; SMYTH, 2012) implementado em pacote R/Bioconductor (v.3.1.2/v.3.0) (GENTLEMAN et al., 2004). O edgeR contém implementações de métodos estatísticos como o teste exato de Fisher para detecção da expressão gênica diferencial. Todas as comparações possíveis foram realizadas com este método e selecionadas de acordo com o valor absoluto de log₂-fold-change acima de 1 (log₂FC>=1), ou seja, com “fold change” maior do que 2 (FC>=2) e valor de significância estatística após ajuste de acordo com a taxa de falsas descobertas (“FDR – False Discovery Rate”) abaixo de 0,001 (p-value ajustado <=0,001).

3.4.7 Identificação dos genes exclusivos da cultivar tolerante

Após a identificação dos genes diferencialmente expressos entre as cultivares, os genes exclusivos da cultivar tolerante foram selecionados com base na contagem efetiva de leituras (“effective counts reads”). Se houve um valor para a contagem de “reads”, o transcrito foi considerado detectado. Dessa forma, foram considerados genes exclusivos da cultivar tolerante, aqueles que apresentaram média da contagem efetiva de leituras < 1 na cultivar sensível e média > 5 na cultivar tolerante.

3.4.8 Agrupamento de perfis de genes exclusivos em 30, 60 e 90 DAT, sob os diferentes tratamentos

Os genes exclusivos da cultivar tolerante foram separados em grupos (“clusters”), de acordo com seus perfis de expressão pelo método de agrupamento hierárquico Ward.D2, utilizando um total de oito agrupamentos definidos por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Esse agrupamento foi realizado no ambiente R por meio da função `hclust()`. O número de agrupamentos foi considerado adequado para separar os genes exclusivos da cultivar tolerante, pois um número maior ou menor de grupos poderia unir ou separar muitos genes, dificultando as análises. Um número grande geraria muitos grupos de perfis semelhantes, enquanto um número pequeno criaria poucos grupos com o colapso de perfis distintos.

3.4.9 Categorização e anotação dos transcritos de cada grupo (“cluster”)

A descrição funcional de cada transcrito exclusivo da cultivar tolerante foi realizada pela ferramenta Blast2GO (CONESA et al., 2005), um programa que integra os sistemas Blastx do NCBI com os sistemas de categorização funcional do “Gene Ontology Consortium” e “GO Slim Viewer”. A anotação de ontologias gênicas baseia-se em mineração de dados oriundos de sequências públicas com anotação

disponível, com similaridade mínima de 60% entre as sequências. Ao final, as moléculas diferencialmente expressas são classificadas em três domínios: a) processo biológico, que indica as operações ou os conjuntos de eventos moleculares com início e fim definidos em que o produto do gene estudado participa e que são fundamentais para o funcionamento de uma célula, tecido, órgãos ou organismo; b) função molecular, que indica as atividades elementares do produto do gene a nível molecular; e c) componente celular, que indica a parte da célula ou o ambiente extracelular em que o produto do gene desempenha sua função (MURATA, 2013).

A identificação de domínios proteicos das sequências foi feita com base numa metodologia comparativa, implementada pela ferramenta InterProScan5 (JONES et al., 2014). A identificação é feita a partir de uma sequência de nucleotídeos convertida para aminoácidos, ou diretamente de sequências protéicas, e permite verificar em detalhes as características de um determinado domínio, seja ele envolvido diretamente ou indiretamente com funções biológicas quaisquer, como aquelas descritas pelas ontologias gênicas: componente celular, processo biológico ou função molecular.

Após o uso destes programas e no auxílio destes para determinação prévia das funções de cada sequência, foram realizadas análises dos genes exclusivos com base na literatura científica disponível até o momento.

3.4.10 Identificação de genes órfãos (“no hits”) envolvidos na resposta ao déficit hídrico

Dentre os genes considerados exclusivos da cultivar tolerante, foram selecionados os genes diferencialmente expressos entre as condições déficit hídrico moderado (M) vs. controle (N) e déficit hídrico severo (S) vs. controle (N), em seus respectivos tempos (S30 vs. N30, M30 vs. N30, S60 vs. N60, M60 vs. N60, S90 vs. N90, M90 vs. N90). Os genes diferencialmente expressos identificados nas condições de déficit hídrico comparadas ao controle, que não tiveram resultados de busca pelo Blastx contra o banco NR (versão de maio de 2015) foram considerados genes órfãos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análises fisiológicas

4.1.1 Análise de variância e teste de médias

Os resultados das variáveis fisiológicas foram submetidos à análise de variância pelo teste F (F) e teste de médias - teste de Tukey a 5% de probabilidade (Tabelas 3, 4 e 5).

Tabela 3. Análise de variância pelo teste F das variáveis fisiológicas avaliadas aos 30 DAT.

Causas de variação	Graus de Liberdade	F (Número de perfilhos)	F (Área foliar)	F (Potencial hídrico)	F (Índice de cor verde)	F (Fotossíntese)	F (concentração interna de CO ₂)
Cultivar	1	214,88**	2.482,79**	115,97**	0,68 ^{NS}	0,28 ^{NS}	0,86 ^{NS}
Tensão	2	0,74 ^{NS}	109,36**	113,27**	0,47 ^{NS}	23,93**	4,92*
Cultivar * tensão	2	0,99 ^{NS}	37,27**	2,62 ^{NS}	0,33 ^{NS}	3,84*	0,44 ^{NS}
Bloco	3	0,56 ^{NS}	0,57 ^{NS}	0,42 ^{NS}	1,86 ^{NS}	3,58*	1,63 ^{NS}
Erro	15						
CV (%)		19,92	5,50	8,03	5,07	8,78	11,63
Nº de observações		72	72	72	72	72	72

NS: não significativo; *: significativo (P<0,05); **: significativo (P<0,01); CV: coeficiente de variação.

Tabela 4. Análise de variância pelo teste F das variáveis fisiológicas avaliadas aos 60 DAT.

Causas de variação	Graus de Liberdade	F (Número de perfilhos)	F (Área foliar)	F (Potencial hídrico)	F (Índice de cor verde)	F (Fotossíntese)	F (concentração interna de CO ₂)
Cultivar	1	614,76**	1.116,54**	619,29**	36,88**	5,19*	2,13 ^{NS}
Tensão	2	13,29**	303,43**	404,52**	81,52**	13,79**	17,58**
Cultivar * tensão	2	3,78*	108,59**	43,57**	7,88**	3,06 ^{NS}	0,71 ^{NS}
Bloco	3	2,07 ^{NS}	0,88 ^{NS}	2,14 ^{NS}	0,50 ^{NS}	0,14 ^{NS}	1,37 ^{NS}
Erro	15						
CV (%)		12,41	8,10	3,21	3,44	21,43	11,20
Nº de observações		72	72	72	72	72	72

NS: não significativo; *: significativo (P<0,05); **: significativo (P<0,01); CV: coeficiente de variação.

Tabela 5. Análise de variância pelo teste F das variáveis fisiológicas avaliadas aos 90 DAT.

Causas de variação	Graus de Liberdade	F (Número de perfilhos)	F (Área foliar)	F (Potencial hídrico)	F (Índice de cor verde)	F (Fotossíntese)	F (concentração interna de CO ₂)
Cultivar	1	535,55**	2.111,72**	33,13**	94,16**	38,05**	5,01*
Tensão	2	50,11**	675,88**	87,93**	259,96**	230,02**	4,82*
Cultivar * tensão	2	1,98 ^{NS}	125,18**	3,87*	21,26**	21,15**	0,65 ^{NS}
Bloco	3	3,24*	1,56 ^{NS}	0,62 ^{NS}	0,09 ^{NS}	0,53 ^{NS}	0,53 ^{NS}
Erro	15						
CV (%)		11,07	5,36	5,33	3,31	10,44	18,77
Nº de observações		72	72	72	72	72	72

NS: não significativo; *: significativo (P<0,05); **: significativo (P<0,01); CV: coeficiente de variação.

Entre as variáveis morfológicas já estudadas e consideradas eficientes para diferenciar cultivares tolerantes de cultivares sensíveis ao déficit hídrico estão a área foliar, o número de folhas verdes, a altura da planta e o número de perfilhos (PINCELLI, 2010; HOLANDA, 2012). Em relação às variáveis fisiológicas pode-se usar para diferenciação de cultivares tolerantes o índice de cor verde das folhas, a fotossíntese, a transpiração, a condutância estomática, a concentração interna de CO_2 , a eficiência instantânea de carboxilação, a eficiência instantânea de uso de água e a eficiência intrínseca de uso da água (PINCELLI, 2010; SILVA et al., 2013).

Dessa forma, para confirmar em nosso estudo a tolerância e a sensibilidade das cultivares SP81-3250 e RB855453 ao déficit hídrico prolongado, respectivamente, conforme verificado por Pincelli e Silva (2012), foram avaliadas as seguintes variáveis fisiológicas: número de perfilhos (Figura 11), área foliar (Figura 12), potencial hídrico foliar (Figura 13), índice de cor verde da folha (Figura 14), fotossíntese (Figura 15) e concentração interna de CO_2 (Figura 16) em 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos tratamentos (T1- sem restrição hídrica, T2- restrição hídrica moderada e T3- restrição hídrica severa). Os resultados obtidos são mostrados a seguir:

4.1.2 Número de perfilhos

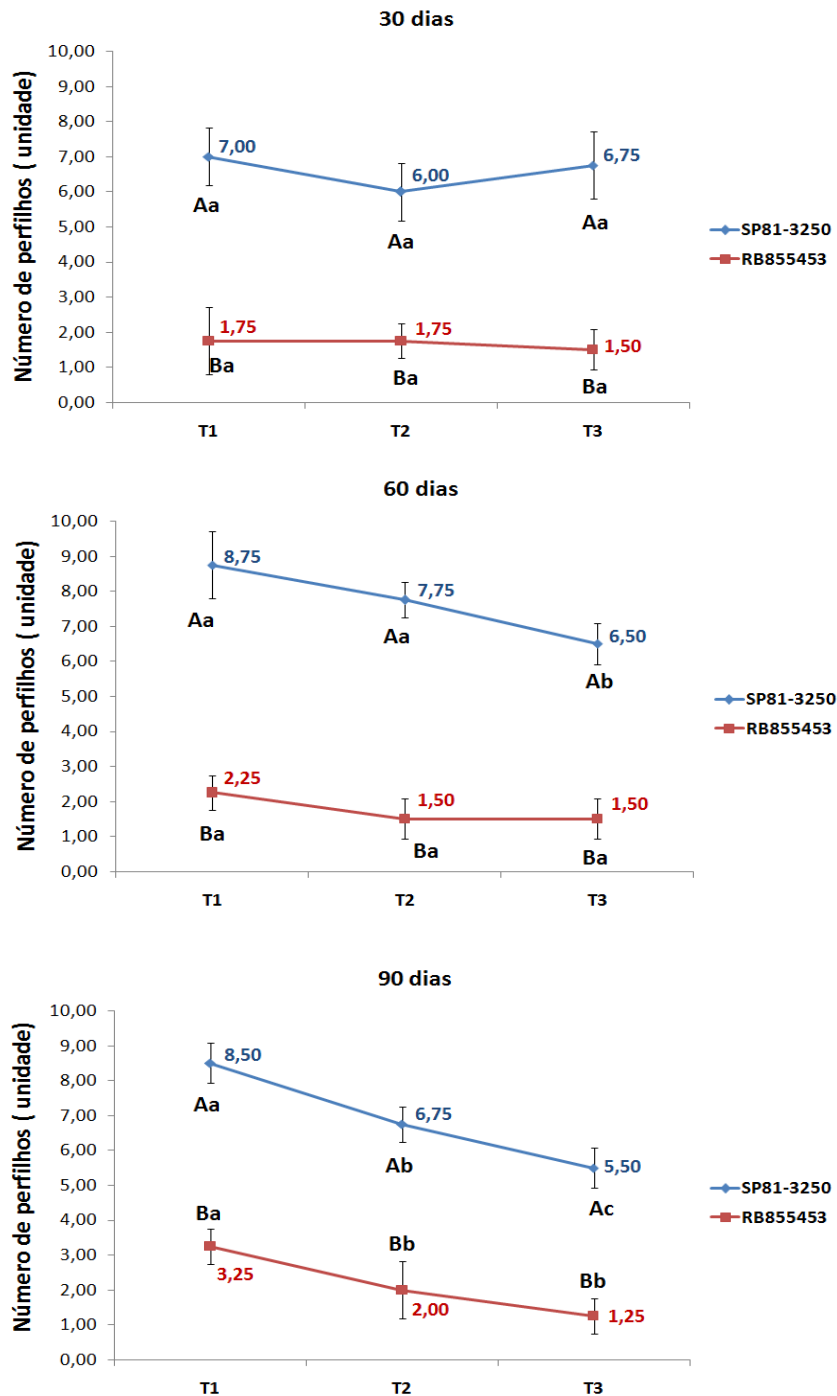


Figura 11. Número de perfilhos por vaso das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo (T). Letras maiúsculas comparam as médias das cultivares dentro de uma mesma tensão e letras minúsculas comparam médias entre as tensões dentro de uma mesma cultivar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si. Resultados a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O número de perfilhos de cada cultivar foi avaliado nas diferentes tensões dentro de cada época (30, 60 e 90 DAT). Houve diferença significativa para o número de perfilhos aos 60 e 90 DAT entre as tensões dentro de cada cultivar, assim como entre as cultivares em todas as épocas. Entretanto, em 30 DAT não foi observado diferença significativa entre as tensões dentro de cada cultivar. Apesar do número de perfilhos ser uma característica com forte componente genético, em que a cultivar tolerante apresentou nos controles números de perfilhos bem maiores que a cultivar sensível, foi necessário verificar o quanto cada cultivar foi afetada com a intensidade do déficit hídrico prolongado, para realmente poder classificá-las como tolerantes ou sensíveis ao mesmo (Figura 11).

Para isso, o número de perfilhos de ambas as cultivares na tensão 1 (T1) foi considerado 100% e foi calculada a porcentagem de perfilhos das mesmas na tensão 3 (T3). A cultivar tolerante apresentou redução de 3,57% em 30 DAT, de 25,71% em 60 DAT e de 35,29% em 90 DAT, enquanto a cultivar sensível apresentou redução de 14,29% em 30 DAT, de 33,33% em 60 DAT e de 61,54% em 90 DAT. Ou seja, mesmo o perfilhamento sendo uma característica genética, em que a cultivar SP81-3250 apresenta naturalmente mais perfilhos do que a cultivar RB855453, essa última ainda foi mais afetada com o déficit hídrico, com menor número de perfilhos em todas as tensões e épocas amostrais (Figura 11).

Cada perfilho possui um comportamento independente devido aos seus órgãos próprios como raízes, colmos e folhas, no entanto, todos os perfilhos que compõem a touceira continuam mantendo ligações entre si possibilitando a troca de nutrientes e água entre eles (RIPOLI et al., 2007). Sendo assim, uma das possíveis explicações para a redução do número de perfilhos de acordo com a severidade do déficit hídrico, é que na fase de perfilhamento intenso aumenta a competição entre os perfilhos pelos fatores de crescimento como luz, água e espaço, podendo causar a morte dos perfilhos mais novos (SEGATO; MATTIUZ; MOZAMBANI, 2006). Se a água for escassa, a competição entre os perfilhos é ainda maior.

Nossos resultados são similares aos encontrados por Silva et al. (2015), que ao avaliarem o número de perfilhos e número de plantas de cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação (100, 75, 50, 25 e 0% de reposição hídrica), verificaram menor número de perfilhos nas menores porcentagens de

reposição hídrica. Batista (2013) ao avaliar morfofisiologicamente duas variedades de cana-de-açúcar, RB867515 e RB855536, sob diferentes regimes hídricos (irrigado e sequeiro), também observou redução do número de perfilhos das cultivares em condição de sequeiro.

No nosso trabalho, foi evidente que a escassez de água promoveu a competição entre os perfilhos de cada planta, entretanto, na cultivar tolerante essa característica competitiva apresentou-se menor. Assim, essa variável mostrou-se eficiente na caracterização de cultivares tolerantes à seca.

4.1.3 Área foliar

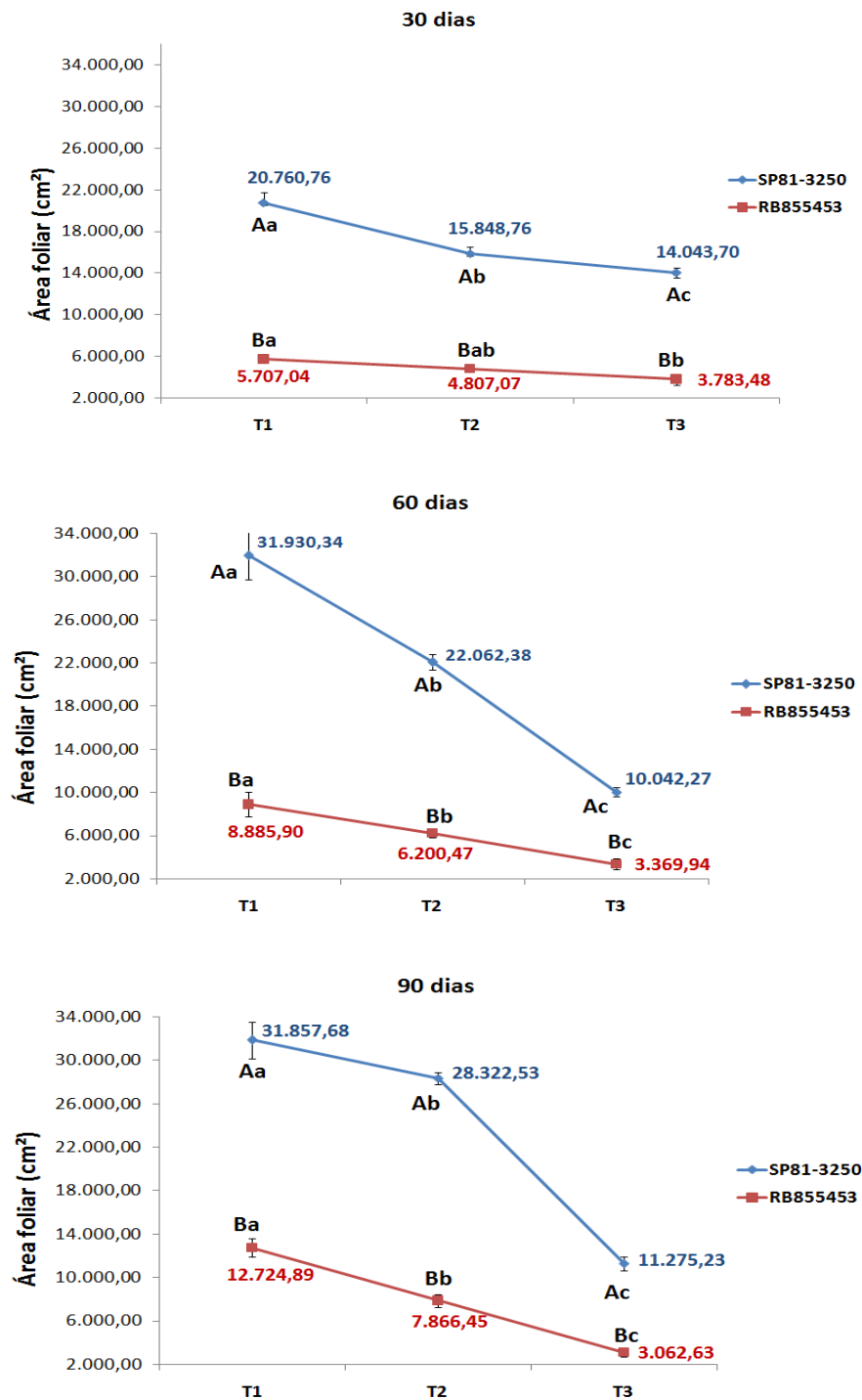


Figura 12. Área foliar das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo (T). Letras maiúsculas comparam as médias das cultivares dentro de uma mesma tensão e letras minúsculas comparam médias entre as tensões dentro de uma mesma cultivar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si. Resultados a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

A área foliar de cada cultivar foi avaliada nas diferentes tensões em cada época de estresse. Foi verificada diferença significativa para área foliar, entre as cultivares e entre as tensões, em todas as épocas de déficit hídrico avaliadas. A área foliar, assim como o número de perfilhos, é uma característica genética da planta. Com isso, pôde-se observar que a cultivar tolerante também apresentou nos controles maior área foliar do que a cultivar sensível.

Para verificar qual o efeito do déficit hídrico prolongado, independente das características genéticas da planta, os valores da área foliar de ambas as cultivares na T1 foram considerados 100%, e em seguida foi calculada a porcentagem correspondente de área foliar na T3 nas duas cultivares. A cultivar tolerante apresentou redução de área foliar de 32,69% em 30 DAT, de 68,65% em 60 DAT e de 64,58% em 90 DAT, enquanto a cultivar sensível apresentou redução de 33,33% em 30 DAT, de 61,80% em 60 DAT e de 75,59% em 90 DAT. Desse modo, a redução da área foliar da cultivar tolerante foi menor que a da cultivar sensível em 30 e 90 DAT, mas em 60 DAT observou-se o oposto. Apesar de a cultivar tolerante apresentar maior redução de área foliar em 60 DAT, em 90, onde o déficit hídrico é mais prolongado, ela se recuperou e teve uma redução 11% menor que a sensível (Figura 12).

A área foliar total é um importante componente da produção e acumulação de biomassa. As folhas individuais grandes ou áreas foliares totais grandes proporcionam uma superfície ampla de evaporação de água, o que é proveitoso para o esfriamento foliar, mas pode levar ao rápido esgotamento da água do solo ou à excessiva e prejudicial absorção de energia solar. Sendo assim, uma das possíveis explicações para redução da área foliar em resposta ao déficit hídrico prolongado, é a de que quanto menor a área foliar, menor a transpiração, o que resulta na conservação efetiva do recurso hídrico limitado no solo por um período mais longo. As plantas podem reduzir sua área foliar pela redução no alongamento celular e/ou pela iniciação da senescência (TAIZ e ZEIGER, 2013).

De maneira similar ao nosso trabalho, a diminuição da área foliar em resposta ao déficit hídrico também foi observada por Pincelli e Silva (2012). Ao analisarem as respostas de variáveis morfológicas de quatro cultivares comerciais de cana-de-açúcar (SP81-3250, SP83-2847, RB855453 e RB72454), sob dois regimes hídricos

(sem deficiência e com deficiência hídrica), observaram que as cultivares SP81-3250 e SP83-2847 apresentaram menor dano a área foliar e a outras variáveis estudadas, sendo consideradas tolerantes à deficiência hídrica. Gonçalves (2008) também obteve resultados parecidos com o nosso ao analisar a resposta de quatro cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica durante a fase inicial de crescimento vegetativo. O estresse hídrico elevou os níveis de prolina e diminuiu a área foliar das cultivares estudadas pelo autor.

Como a análise dessa variável pode evidenciar uma diferença entre as cultivares quanto ao déficit hídrico prolongado, a mesma pode ser indicada para avaliar cultivares quanto à tolerância à seca.

4.1.4 Potencial hídrico foliar

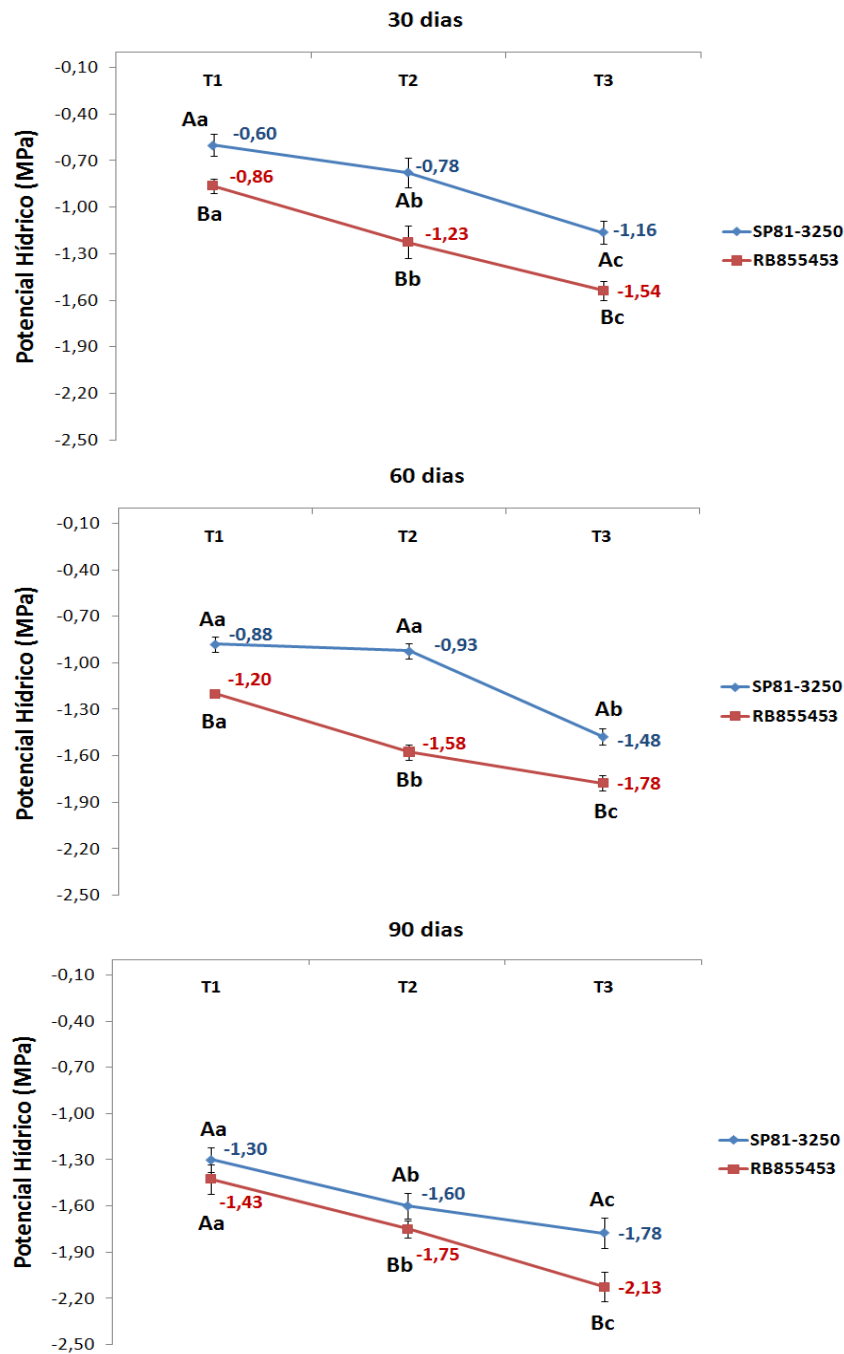


Figura 13. Potencial hídrico foliar das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo (T). Letras maiúsculas comparam as médias das cultivares dentro de uma mesma tensão e letras minúsculas comparam médias entre as tensões dentro de uma mesma cultivar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si. Resultados a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

O potencial hídrico foliar foi medido nas folhas +1 das duas cultivares nas diferentes tensões em cada época amostral. Houve diferença significativa entre as cultivares e entre as tensões em todas as épocas amostrais. Diferente das variáveis citadas acima, o potencial hídrico foliar não é uma característica de forte componente genético (Figura 13). Dessa forma, as mudanças nos valores são devidas principalmente ao efeito do déficit hídrico nas plantas. Mesmo não sendo necessária a normalização dos valores do potencial hídrico foliar nos controles das duas cultivares (considerados 100%), isso foi feito para todas as variáveis estudadas, a fim de facilitar a compreensão do quanto cada variável foi afetada pelo déficit hídrico.

Os valores de potencial hídrico são sempre negativos, e as plantas podem continuar a absorver água somente enquanto o potencial hídrico for mais baixo (mais negativo) que o da água do solo (TAIZ; ZEIGER, 2013). Dessa forma, quanto mais negativo o valor do potencial hídrico foliar, maior a perda de água na planta e mais desidratada fica a mesma.

A cultivar tolerante apresentou perda de água de T1 para T3 de 93,33% em 30 DAT, de 68,18% em 60 DAT e de 36,92% em 90 DAT, enquanto a cultivar sensível apresentou perda de água de 79,07% em 30 DAT, de 48,33% em 60 DAT e de 48,95% em 90 DAT. Apesar dos valores da perda serem maiores para a cultivar tolerante em 30 e 60 DAT entre as tensões, em 90 DAT as plantas tiveram perda de água bem inferior em relação a outra cultivar. Além disso, como já comentado acima, a normalização para calcular essas diferenças foi apenas para facilitar a compreensão na maioria das variáveis estudadas, cujos valores não podem causar uma compreensão errônea, pois ao analisarmos a Figura 13, podemos verificar que o potencial hídrico foliar foi maior em todas as épocas e tensões para cultivar tolerante quando comparada com a cultivar sensível. Dessa forma, é evidente que embora a redução de água entre os tratamentos seja maior na cultivar tolerante, suas plantas se mantiveram mais hidratadas do que as da cultivar sensível ao longo de todos os tratamentos, inclusive no controle, e em todas as épocas amostrais.

O potencial hídrico é igual ao potencial osmótico mais a pressão hidrostática. Uma diminuição na pressão hidrostática abaixaria o potencial hídrico, mas também resultaria em perda de turgor e cessação do crescimento. Por outro lado, uma

redução em potencial osmótico pode manter um gradiente de potencial hídrico entre as células, o solo e a planta ou entre a planta e a atmosfera, sem diminuição em turgor ou crescimento. O ajuste osmótico nada mais é do que a capacidade das células vegetais de acumularem solutos e usá-los para diminuir o potencial hídrico durante períodos de estresse osmótico. Dessa forma, durante o déficit hídrico, o potencial hídrico do citosol e do vacúolo deve ser levemente mais baixo que do ambiente circundante, para manter um gradiente de potencial hídrico que permita a absorção de água (TAIZ; ZEIGER, 2013). Isso justifica os valores de potencial hídrico em nosso trabalho serem menores ao longo dos tratamentos e das épocas avaliadas.

Nossos resultados são similares aos encontrados por Vieira et al. (2014), que ao avaliarem indicadores morfológicos e fisiológicos do estresse hídrico em cana-de-açúcar submetidas a diferentes lâminas de irrigação, verificaram que o potencial hídrico foliar foi menor para menores lâminas de irrigação, com destaque para o tratamento que recebeu menos água (25%). Garcia (2015), ao avaliar a dinâmica temporal do estado fisiológico de quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas a dois ciclos de déficit hídrico e um de reidratação, verificou que as variedades de cana-de-açúcar apresentaram decréscimos em todas as variáveis fisiológicas analisadas (incluindo potencial hídrico) após a exposição ao primeiro ciclo de déficit hídrico.

Dessa forma, o potencial hídrico foliar é mais um parâmetro que pode ser utilizado para caracterizar cultivares tolerantes à seca.

4.1.5 Índice de cor verde da folha

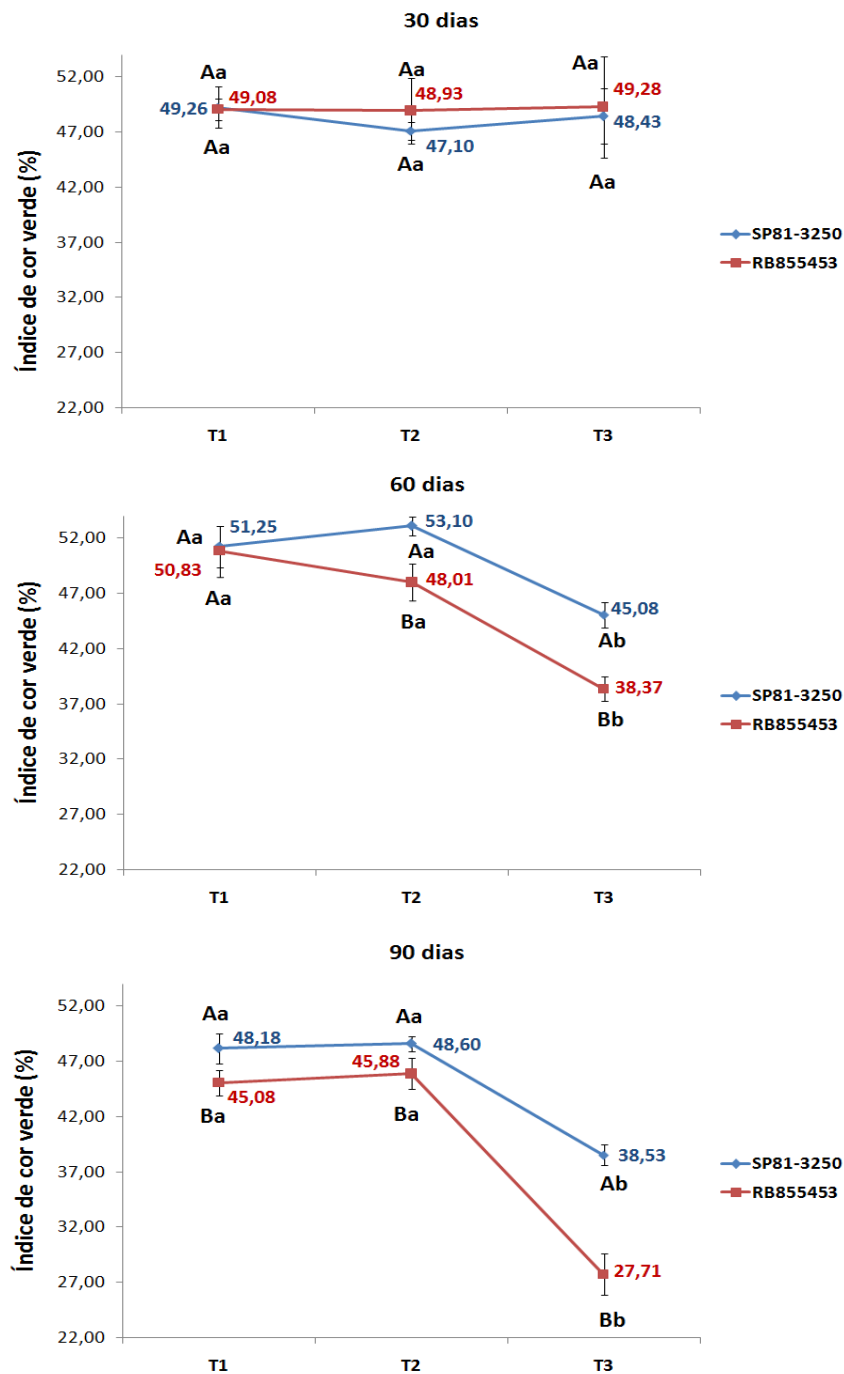


Figura 14. Índice de cor verde das folhas das cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo (T). Letras maiúsculas comparam as médias das cultivares dentro de uma mesma tensão e letras minúsculas comparam médias entre as tensões dentro de uma mesma cultivar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si. Resultados a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Ao analisarmos o índice de cor verde da folha, verificamos que houve diferença significativa entre as cultivares contrastantes e as tensões em 60 e 90 DAT, onde os valores de índice de cor verde da folha foram maiores para a cultivar tolerante, entretanto, não houve diferença significativa em 30 DAT. Os valores do índice de cor verde da folha foram maiores para a cultivar tolerante em 60 e 90 DAT, em que houve diferença significativa. A cultivar tolerante apresentou redução de índice de cor verde da folha de 1,68% em 30 DAT, de 12,04% em 60 DAT e de 20,02% em 90 DAT, enquanto a cultivar sensível apresentou aumento de 0,40% em 30 DAT, diminuição de 24,51% em 60 DAT e de 38,53% em 90 DAT (Figura 14).

A análise do índice de cor verde da folha permite verificar a integridade do aparato fotossintético durante o processo de fotossíntese, o que fornece uma medida rápida e precisa para a detecção de plantas tolerantes ao déficit hídrico (RONG-HUA et al., 2006, PERCIVAL; SHERIFFS, 2002). É importante ressaltar que valores de índice SPAD abaixo de 40 indicam o início da deficiência de clorofila, o que afeta o processo fotossintético (TORRES NETTO et al., 2005). A cultivar tolerante apresentou um valor de índice SPAD abaixo de 40 apenas sob déficit hídrico severo em 90 DAT (38,53%), enquanto a cultivar sensível foi mais afetada, apresentando valores abaixo de 40 sob déficit hídrico severo em 60 (38,37%) e 90 DAT (27,71%), respectivamente (Figura 14).

Vários trabalhos têm mostrado que o déficit hídrico diminui o índice de cor verde das plantas. Guimarães (2011), ao estudar o efeito do déficit hídrico em vinte variedades de cana-de-açúcar, verificou que o déficit hídrico imposto pela suspensão da irrigação durante 3, 10 e 20 dias causou redução do conteúdo relativo de clorofila. Foi constatado pela autora, que o conteúdo relativo de clorofila foi eficiente em diferenciar variedades de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à deficiência hídrica. Silva et. al (2014), também analisaram as respostas de quatro cultivares de cana-de-açúcar submetidas a deficiência hídrica por meio de pigmentos fotossintéticos, e verificaram que a deficiência hídrica afetou com maior intensidade duas das cultivares avaliadas (as mais sensíveis), devido às maiores reduções nos pigmentos fotossintéticos e no índice SPAD.

No nosso trabalho ficou evidente que a cultivar tolerante foi menos afetada pelo déficit hídrico prolongado por apresentar maiores índices de cor verde da folha,

sendo esta uma técnica indicada na seleção de cultivares tolerantes sob restrição hídrica.

4.1.6 Fotossíntese

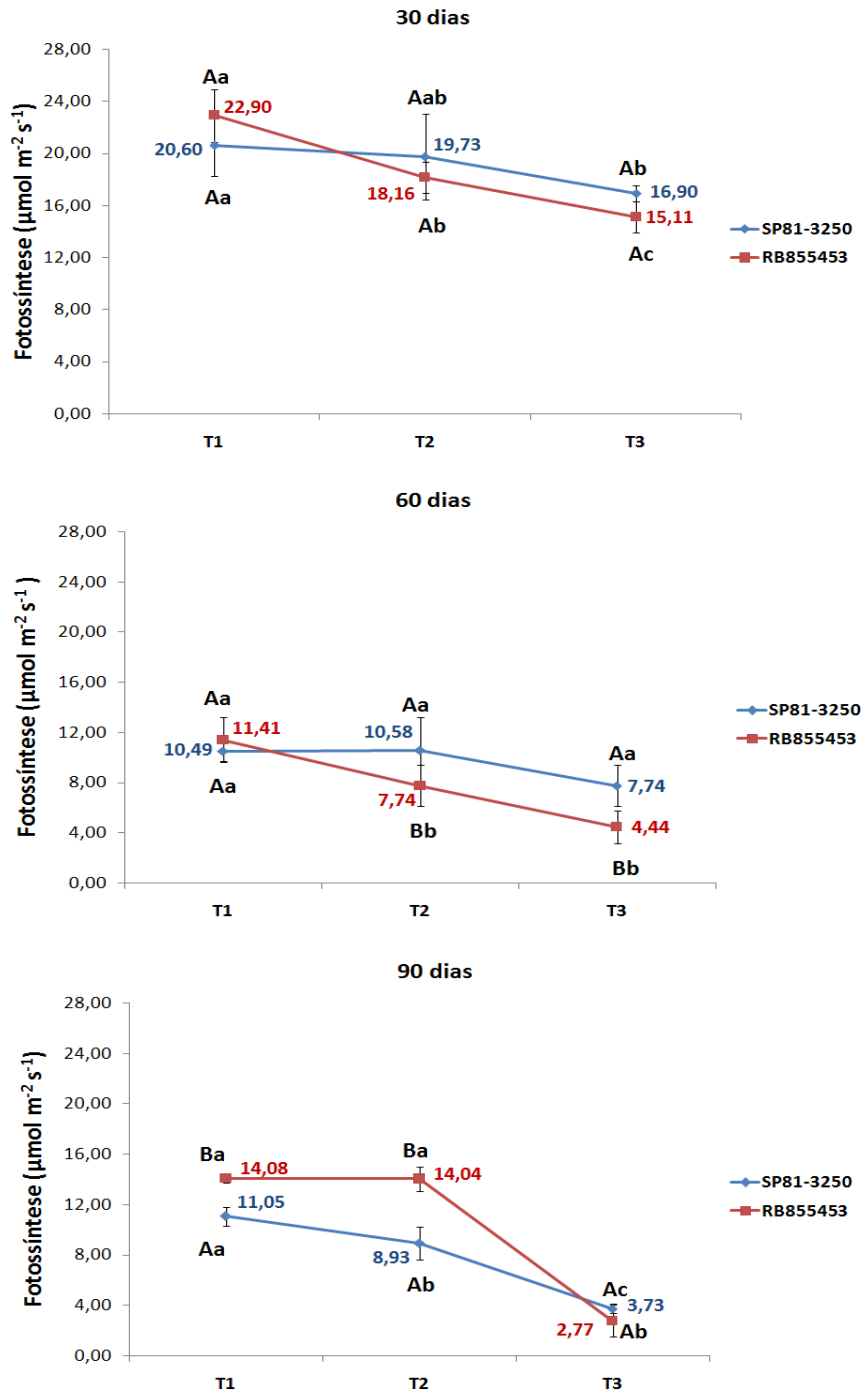


Figura 15. Fotossíntese nas cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo (T). Letras maiúsculas comparam as médias das cultivares dentro de uma mesma tensão e letras minúsculas comparam médias entre as tensões dentro de uma mesma cultivar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si. Resultados a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Também foi avaliada a fotossíntese das cultivares SP81-3250 (tolerante) e RB855453 (sensível) em todas as tensões e em cada época amostral. Não houve diferença significativa entre as cultivares em 30 DAT, apenas para tensão. Houve diferença significativa entre as cultivares e tensões em 60 e 90 DAT. A atividade fotossintética na cultivar tolerante foi maior que na sensível aos 90 DAT, na condição de déficit hídrico mais severo (T3).

Interessantemente, embora a cultivar tolerante tenha apresentado maior nível de redução da área foliar em 60 DAT, a mesma teve a capacidade de reverter essa situação em 90 DAT, o que resultou no aumento da fotossíntese na condição de restrição hídrica mais severa e nessa última época de estresse. A cultivar tolerante apresentou redução da fotossíntese de 17,96% em 30 DAT, de 26,21% em 60 DAT e de 66,24% em 90 DAT, enquanto a cultivar sensível apresentou redução de 34,02% em 30 DAT, de 61,09% em 60 DAT e de 80,33% em 90 DAT (Figura 15).

O déficit hídrico afeta a atividade fotossintética por meio de alguns mecanismos como, por exemplo, alteração do nível dos metabólitos intermediários, inibição do sistema de transporte de elétrons fotossintéticos, fechamento dos estômatos e alteração da taxa de respiração (CORDEIRO, 2012).

Resultados similares ao nosso trabalho também foram obtidos por Silva e Costa (2009), ao avaliarem cultivares de cana-de-açúcar em condições de irrigação e sequeiro, em que observaram redução da taxa de fotossíntese por unidade de área foliar em resposta ao déficit hídrico, mostrando como a fotossíntese é afetada pela seca. Em um estudo realizado por Marchiori (2014), em que mudas de cana-de-açúcar de uma cultivar tolerante à seca e outra sensível foram submetidas a três condições hídricas, foi avaliada a plasticidade fenotípica de características morfológicas e fisiológicas. Nesse estudo realizado pelo autor, as plantas de ambas as cultivares submetidas ao déficit hídrico severo apresentaram redução da fotossíntese se comparadas às plantas referência, porém, a redução foi menor na cultivar tolerante.

Avaliar a fotossíntese também auxilia na caracterização de cultivares tolerantes à seca, uma vez que o processo fotossintético é muito afetado pelo déficit hídrico.

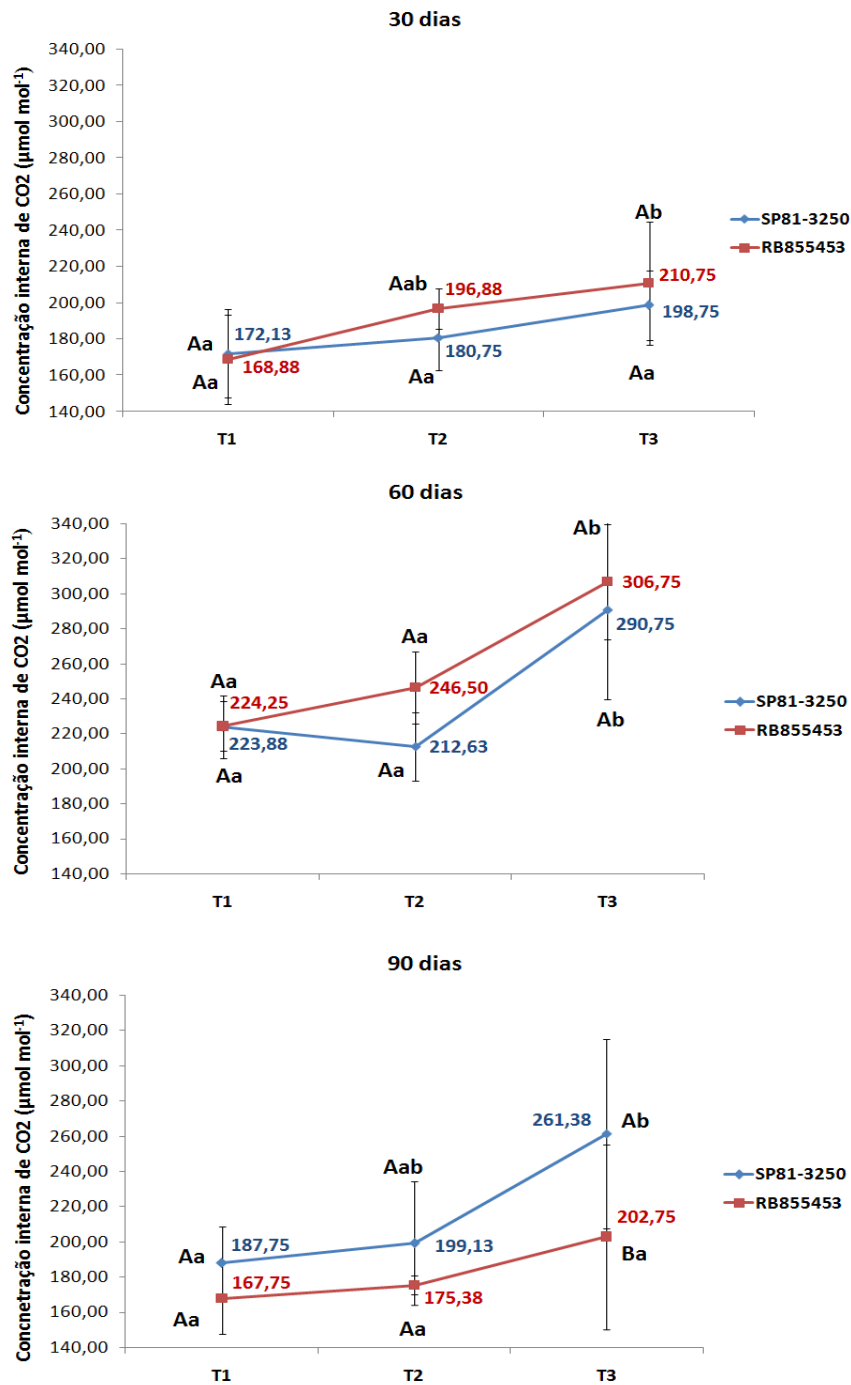
4.1.7 Concentração interna de CO₂

Figura 16. Concentração interna de CO₂ nas cultivares SP81-3250 e RB855453 após aplicação do déficit hídrico sob três tensões hídricas do solo (T). Letras maiúsculas comparam as médias das cultivares dentro de uma mesma tensão e letras minúsculas comparam médias entre as tensões dentro de uma mesma cultivar. Médias acompanhadas de letras iguais não diferem entre si. Resultados a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

Considerando a última variável fisiológica analisada (concentração interna de CO₂), verificou-se que não houve diferença significativa entre as cultivares em 30 e 60 DAT, mas houve entre as tensões. Foi observada diferença significativa entre as cultivares apenas em 90 DAT, bem como entre as tensões. Nas épocas em que não houve diferença significativa entre as cultivares, a concentração interna de CO₂ foi maior na cultivar sensível. Em 90 DAT, os valores se inverteram, e a cultivar tolerante apresentou maior concentração interna de CO₂ (Figura 16).

A cultivar tolerante apresentou aumento da concentração interna de CO₂ (Ci) de 15,46% em 30 DAT, de 29,87% em 60 DAT e de 39,22% em 90 DAT, enquanto a cultivar sensível apresentou aumento de 24,79% em 30 DAT, de 36,79% em 60 DAT e de 20,86% em 90 DAT (Figura 16).

À medida que ocorre aumento do déficit hídrico nos vegetais, pode ocorrer aumento da concentração interna de CO₂. Zhao, Glaz e Comstock (2010), ao avaliarem a concentração interna de CO₂ em cana-de-açúcar submetida ao déficit hídrico, observaram aumento na Ci e consideraram que este aumento era devido às reduzidas atividades enzimáticas em razão da diminuição da fotossíntese. Ashraf e Harris (2013), afirmam ainda que o fechamento dos estômatos pode ter um efeito inibidor mais sobre a transpiração do que sobre a difusão de CO₂ nos tecidos foliares e inibir mais a atividade enzimática dos processos de fotossíntese, reduzindo, conseqüentemente, a eficiência instantânea de carboxilação.

Em estudo realizado por Graça (2009), em que foram avaliadas cultivares de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico em situação de estresse, também foi observado que a deficiência hídrica afetou todo o aparato fotossintético das plantas de forma diferenciada dentro e entre as cultivares. As cultivares tolerantes foram menos afetadas, mas houve aumento significativo da concentração interna de CO₂ em todas as cultivares sob déficit hídrico. Um aumento na concentração interna de CO₂ também foi descrito em plantas de sorgo sob regime de déficit hídrico (COUSINS et al., 2002).

Dessa forma, fica claro que a concentração interna de CO₂ é alterada pelo déficit hídrico e que a análise da mesma pode auxiliar na caracterização de plantas tolerantes e sensíveis à seca.

4.1.8 Caracterização das cultivares através das variáveis fisiológicas

Todas as variáveis fisiológicas analisadas foram eficientes em distinguir as cultivares SP81-3250 e RB855453 quanto à tolerância e a sensibilidade à deficiência hídrica, respectivamente, uma vez que a cultivar tolerante apresentou menores reduções dos parâmetros avaliados que a cultivar sensível.

Nosso trabalho utilizou essas duas cultivares como padrão de tolerância e sensibilidade baseado no trabalho de Pincelli e Silva (2012), que avaliaram o comportamento dessas cultivares em um período máximo de 56 dias de déficit hídrico. Como não se tinham informações até o momento a respeito de como essas cultivares se comportariam em períodos de déficit hídrico mais prolongado, os resultados do nosso trabalho foram importantes por mostrarem que essas duas cultivares continuaram mantendo suas características de tolerância e sensibilidade em 30, 60 e 90 DAT, similar ao que pode acontecer em condições reais de campo.

Compreender as respostas fisiológicas de cana-de-açúcar em diferentes níveis de déficit hídrico em plantas com idades superiores as utilizadas pela maioria dos trabalhos publicados até o momento, foi de grande importância para prever com maior segurança o comportamento das cultivares estudadas.

Esses resultados fisiológicos nos permitiram avançar nas demais etapas do trabalho, possibilitando a investigação em nível molecular, de genes envolvidos na resposta das plantas tolerantes ao déficit hídrico prolongado.

4.2 Análises moleculares

4.2.1 Análise da qualidade do RNA

Uma vez realizadas as análises fisiológicas, foram coletadas as folhas+1 em 30, 60 e 90 DAT e obtidos os RNAs totais de todas as amostras para as análises moleculares. Esses RNAs foram avaliados quanto a qualidade, quantidade e integridade, antes de serem utilizados para construção das bibliotecas de cDNA. Os RNAs totais precisam apresentar boa qualidade, quantidade adequada e integridade suficiente para serem utilizados na construção das bibliotecas. Para isso, os RNAs

foram avaliados primeiramente no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) para verificação da qualidade, através da leitura de absorvância nos comprimentos de onda 260 nm, 280 nm e 230 nm. A relação das leituras 260/280 nm e 260/230 nm estima a qualidade dos ácidos nucleicos. As amostras de RNA são consideradas de boa qualidade quando as leituras de 260/280 nm apresentam relações de 1,8 a 2,0 e 260/230 nm quando acima de 2,0. Relações fora destes valores indicam contaminantes na amostra com proteínas ou tiocianato de guanidina respectivamente (SAMBROOK; FRITCH; MANIATS, 1989). Na Tabela 6, podemos verificar que a relação A260/280 nm variou de 1,97 a 2,22 e a relação A260/230 nm variou de 0,33 a 2,38. Essa última relação apresenta valores abaixo do desejado em virtude do Kit de extração utilizado, e não por falhas na etapa de extração, fato também verificado por outros pesquisadores em nosso laboratório. Através dessa análise, nossas amostras mostraram um padrão ideal para prosseguir com o experimento.

Outra análise também foi realizada para verificar a concentração das amostras de RNA total utilizando-se o equipamento Qubit. A fluorimetria permite quantificar o RNA total e estimar a contaminação por DNA e por proteína, utilizando fluoróforos específicos para os mesmos, sendo a principal vantagem deste método a possibilidade de quantificar separadamente os ácidos nucleicos, que acabam sendo “somados” na espectrofotometria. Os dados da Tabela 6 mostram que as concentrações de RNA total variaram de 38,10 a 250,0 ng/ μ L, tendo, portanto, uma concentração de RNA suficiente para se realizar a construção das bibliotecas e o sequenciamento dos transcritos.

A última análise realizada antes de destinar as amostras para a construção das bibliotecas de cDNA foi a avaliação da integridade do RNA total através do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (“Agilent Technologies”). Esta etapa é de fundamental importância, uma vez que apenas RNAs íntegros são utilizados na construção das bibliotecas de cDNA. A avaliação no Bioanalyzer é baseada na razão entre as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S e no sinal de emissão de fluorescência entre os dois picos de detecção das bandas. São analisados também os sinais fluorescentes captados em regiões diferentes do eletroferograma. O software do equipamento expressa a integridade das amostras baseado em um

sistema numérico de 1 a 10, onde o 1 representa o perfil mais degradado e o 10 o mais intacto, chamado de “RNA Integrity Number (RIN)” (BISELLI, 2011). Os resultados do número de integridade do RNA (RIN) de todas as amostras de RNA total apresentaram valores entre 7,3 a 8,2 (Tabela 6). Amostras com um RIN abaixo de 6,0 indicam que o RNA total está parcialmente degradado (HUNICKE-SMITH, 2012), o que demonstra que todos os nossos RNAs extraídos estavam íntegros e de qualidade para o sequenciamento.

Os eletroforogramas de todas as amostras geradas no Bioanalyzer (Figuras 17, 18 e 19) apresentaram dois picos além dos baseados na razão entre as bandas de RNA ribossomal 18S e 28S. Uma das possíveis explicações é que esses dois picos menores possam ser de RNAs ribossomais pequenos de cloroplastos, pois na literatura foi encontrado esse mesmo padrão de bandas em *Arabidopsis thaliana*, sendo os dois picos extras provenientes de RNAs ribossomais pequenos de cloroplastos. Essas informações estão presentes no protocolo da Agilent Technologies (disponível no site: http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/5185-5818_v4.0.pdf).

Tabela 6. Valores de qualidade, quantidade e integridade das amostras de RNA total nos equipamentos NanoDrop, Qubit e Bioanalyzer, respectivamente.

Amostra*	Repetição Biológica	NanoDrop		Qubit (ng/μL)	Bioanalyzer RIN
		260/280nm	260/230nm		
SSTN3	1	2,10	2,12	162,0	7.9
SSTN3	2	2,16	1,18	200,0	7.8
SSTN3	3	2,07	2,2	43,4	7.9
SSTM3	1	2,12	2,21	200,0	7.9
SSTM3	2	2,10	1,95	140,0	7.8
SSTM3	3	2,08	1,85	150,0	7.8
SSTS3	1	2,09	0,95	56,0	7.7
SSTS3	2	2,12	2,35	120,0	7.7
SSTS3	3	1,97	1,09	81,0	7.4
SSSN3	1	2,12	2,16	63,0	7.9
SSSN3	2	2,10	2,23	170,0	8.0
SSSN3	3	2,11	1,96	162,0	7.4
SSSM3	1	2,08	2,11	71,0	7.9
SSSM3	2	2,10	1,71	91,4	7.8

Continuação da Tabela 6

Amostra*	Repetição Biológica	NanoDrop		Qubit (ng/μL)	Bioanalyzer RIN
		260/280nm	260/230nm		
SSSM3	3	2,06	2,25	140,0	8.0
SSSS3	1	2,15	2,01	87,0	7.7
SSSS3	2	2,05	0,33	38,1	7.3
SSSS3	3	2,09	2,38	250,0	7.3
SSTN6	1	2,14	1,79	156,0	8.0
SSTN6	2	2,04	1,1	176,0	8.0
SSTN6	3	2,13	1,36	188,0	7.9
SSTM6	1	2,17	0,73	134,0	7.8
SSTM6	2	2,14	2,25	116,0	8.0
SSTM6	3	2,14	1,7	116,0	8.0
SSTS6	1	2,15	1,94	192,0	7.9
SSTS6	2	2,17	1,57	164,0	7.4
SSTS6	3	2,09	1,37	106,0	7.8
SSSN6	1	2,18	0,97	120,0	8.2
SSSN6	2	2,07	2,21	138,0	8.0
SSSN6	3	2,18	0,46	130,0	7.8
SSSM6	1	2,15	2,29	134,0	7.8
SSSM6	2	2,06	2,22	198,0	8.1
SSSM6	3	2,13	1,53	146,0	8.0
SSSS6	1	2,18	1,27	168,0	8.0
SSSS6	2	2,12	1	77,40	7.6
SSSS6	3	2,13	1,18	192,0	7.9
SSTN9	1	2,16	2,00	97,6	8.0
SSTN9	2	2,07	1,80	134,0	7.8
SSTN9	3	2,18	1,97	124,0	7.8
SSTM9	1	2,20	2,05	114,0	7.8
SSTM9	2	2,15	2,24	81,8	7.8
SSTM9	3	2,18	1,58	106,0	7.8
SSTS9	1	2,22	1,60	128,0	7.8
SSTS9	2	2,17	1,45	164,0	7.9
SSTS9	3	2,09	2,03	86,2	7.5
SSSN9	1	2,17	1,77	140,0	7.8
SSSN9	2	2,18	2,18	160,0	7.8
SSSN9	3	2,13	1,67	136,0	7.8
SSSM9	1	2,18	2,09	156,0	8.2
SSSM9	2	2,19	1,29	54,0	8.0
SSSM9	3	2,20	1,95	192,0	8.0
SSSS9	1	2,08	1,77	118,0	8.1
SSSS9	2	2,18	1,72	132,0	8.1
SSSS9	3	2,16	1,59	134,0	7.4

*SS- *Saccharum* spp.; S- cultivar sensível (RB855453) / T- cultivar tolerante (SP81-3250); Tratamento: N- não estressado; M- déficit hídrico moderado; S- déficit hídrico severo; Épocas de déficit hídrico: 3 - 30 DAT, 6- 60 DAT, 9- 90 DAT.

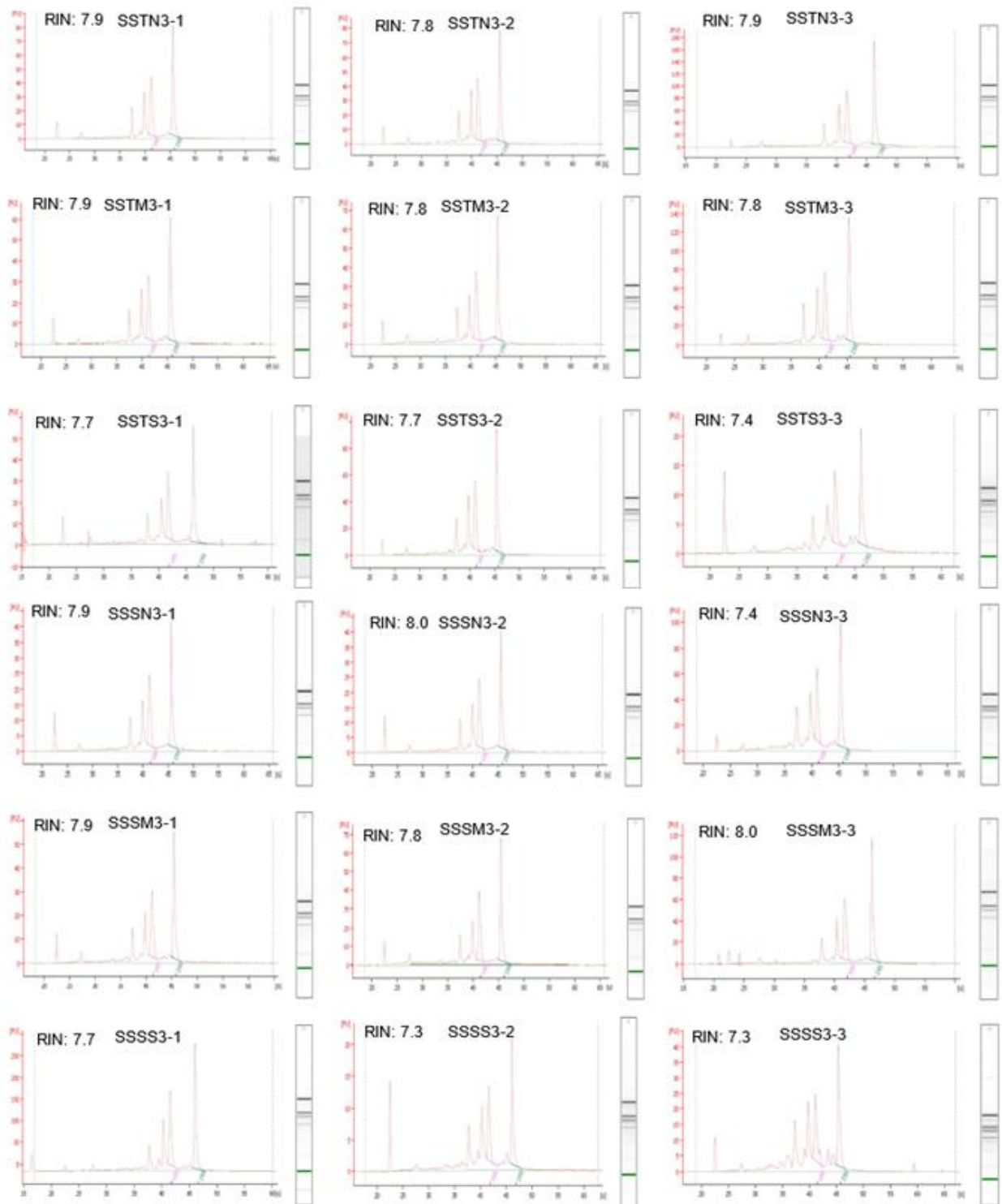


Figura 17. Eletroferogramas gerados pelo Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer) mostrando os valores de RIN das amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 30 dias de déficit hídrico.

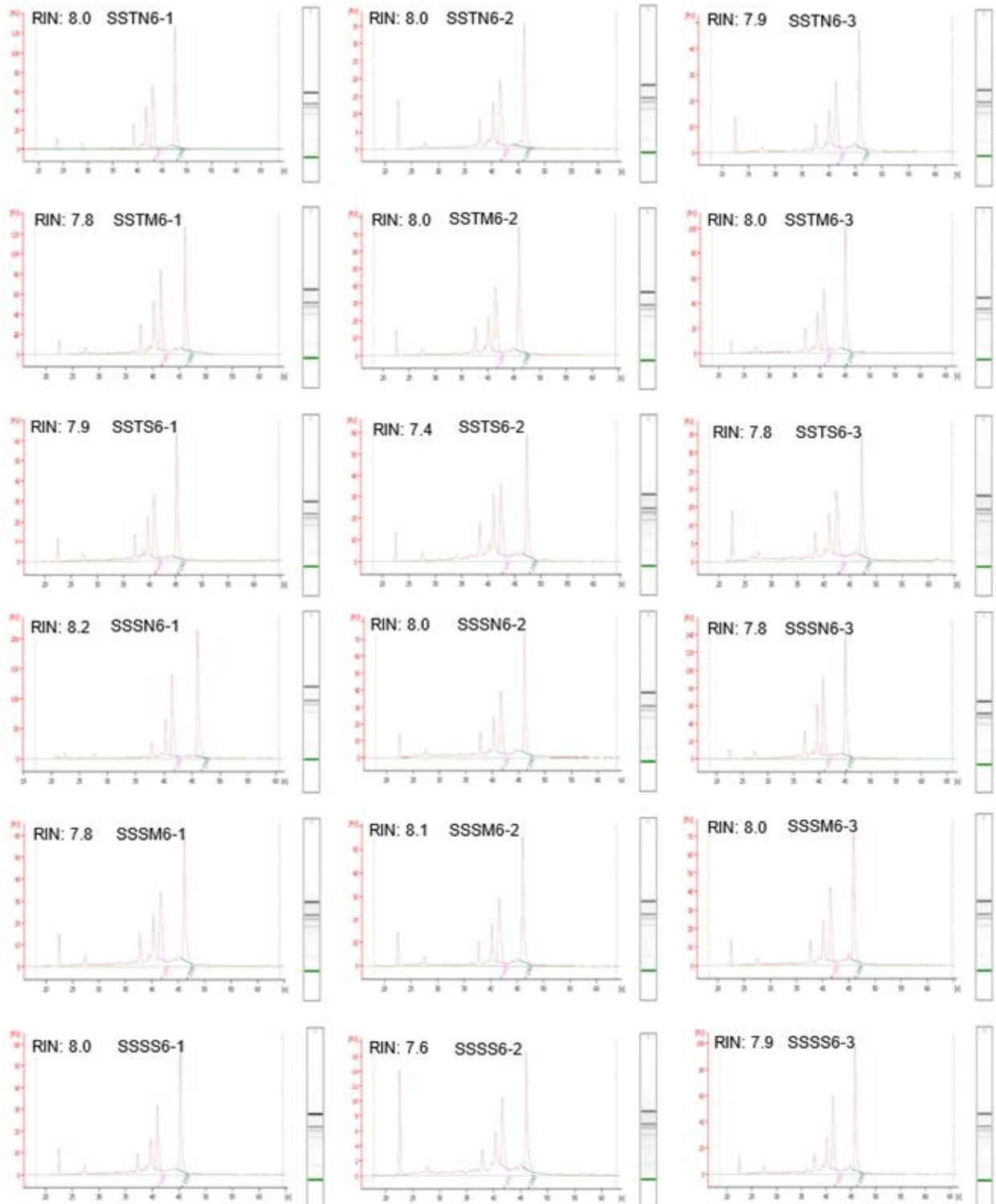


Figura 18. Eletroferogramas gerados pelo Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer) mostrando os valores de RIN das amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 60 dias de déficit hídrico.

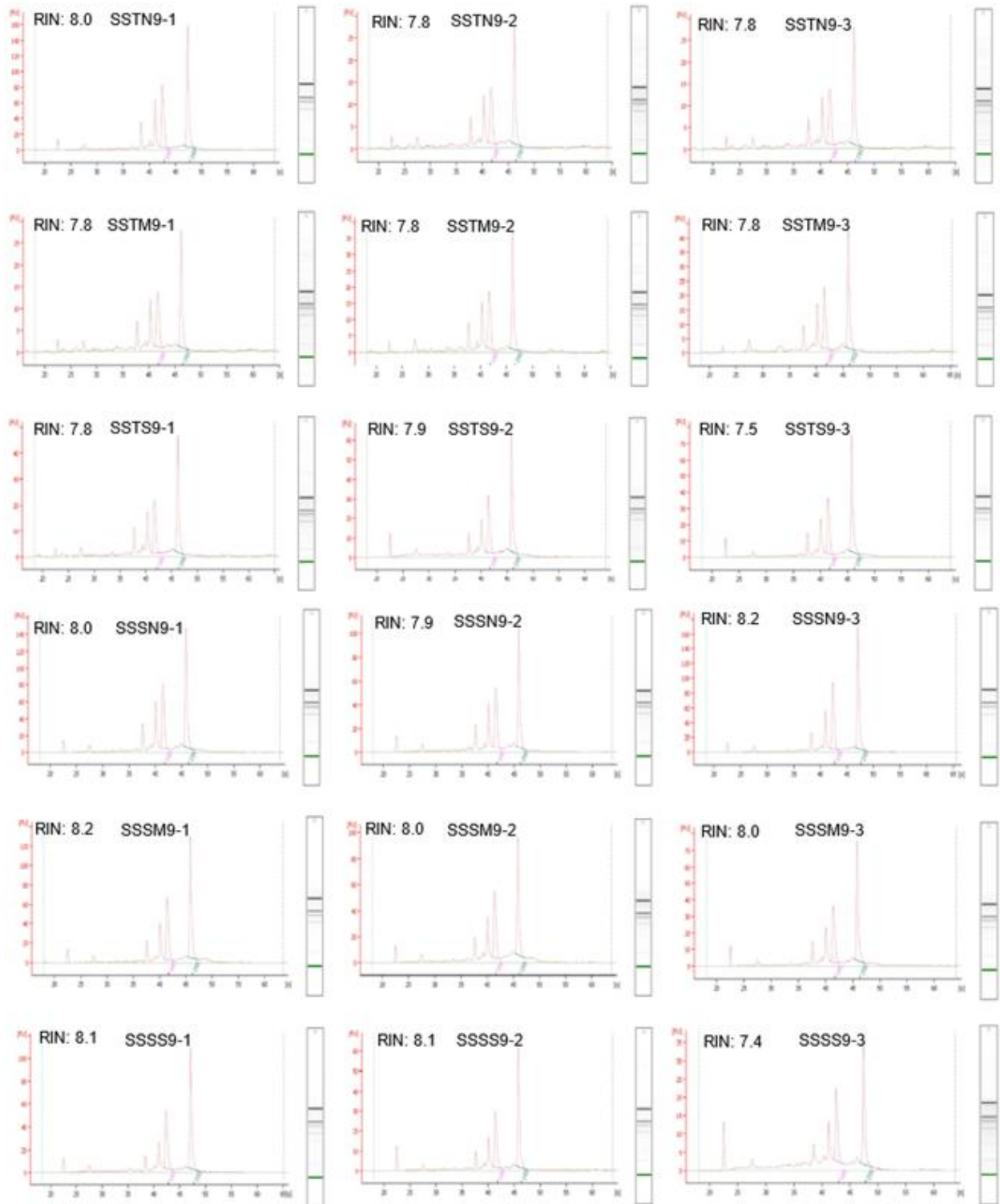


Figura 19. Eletroferogramas gerados pelo Bioanalyzer (Agilent 2100 Bioanalyzer) mostrando os valores de RIN das amostras de RNA total de folhas de cana-de-açúcar coletadas aos 90 dias de déficit hídrico.

4.2.2 Processamento das leituras e filtragem dos dados (trimagem)

As leituras geradas no sequenciamento do RNA das 54 amostras resultantes das cultivares tolerante (SP81-3250) e sensível (RB855453), sob déficit hídrico prolongado (30, 60 e 90 DAT) e sob três tratamentos (controle, déficit hídrico moderado e déficit hídrico severo) foram agrupadas por bibliotecas e transcritas para arquivos de texto. Essas leituras foram processadas, sendo retiradas regiões de baixa qualidade e adaptadores. A Tabela 7 mostra o número de leituras geradas para cada amostra antes e após o processamento, bem como o índice de qualidade anterior e posterior ao mesmo.

Após o processamento dos dados obtidos pelo sequenciamento de segunda geração, verificamos que a quantidade de sequências de baixa qualidade descartada foi muito pequena, fazendo com que o número de sequências pós-processamento (1.631.373.110) não diminuísse muito quando comparado às sequências brutas (1.712.145.471), evidenciando a boa qualidade das mesmas.

Tabela 7. Resultado do número de sequências pré e pós-processadas após o sequenciamento nas plataformas HiScanSQ e HiSeq2500 System (Illumina).

Amostra*	Nº de Sequências Pré-Processamento	Qualidade Pré-Proc, (bases Q \geq 30)	Nº de Sequências Pós-Processamento [PS / UPS]	Qualidade Pós-Proc, (bases Q \geq 30)
SSTN3-1	18.647.749	87,02%	17.362.876 / 770.016	92,01%
SSTN3-2	24.129.298	85,15%	21.947.827 / 1.153.591	91,05%
SSTN3-3	26.932.633	92.32 %	26.572.302/ 309.541	94,43%
SSTN6-1	16.533.394	56,46%	11.867.917 / 2.148.253	74,21%
SSTN6-2	17.686.387	93,73%	16.758.089 / 472.872	96,62%
SSTN6-3	33.564.272	91.65 %	32.594.671/ 645.201	94,54%
SSTN9-1	49.232.187	85,37%	45.574.668 / 2.206.604	91,02%
SSTN9-2	31.107.404	93.46 %	30.690.302/ 319.665	95,15%
SSTN9-3	58.270.794	84,88%	53.385.711 / 2.923.818	90,97%
SSTM3-1	16.803.821	85,36%	15.541.732 / 764.869	90,84%

Continuação da tabela 7

Amostra*	Nº de Sequências Pré-Processamento	Qualidade Pré-Proc, (bases Q>=30)	Nº de Sequências Pós-Processamento [PS / UPS]	Qualidade Pós-Proc, (bases Q>=30)
SSTM3-2	27.031.164	93,23 %	26.703.462 / 289.237	95,29%
SSTM3-3	47.733.844	69,93%	39.505.095 / 4.240.403	82,05%
SSTM6-1	57.691.801	90,06%	54.722.730 / 1.781.261	93,83%
SSTM6-2	26.594.489	85,65%	24.564.720 / 1.210.347	91,15%
SSTM6-3	14.508.881	92,62%	13.886.313 / 421.227	95,53%
SSTM9-1	16.301.413	93,25 %	15.763.220 / 212.129	99,86%
SSTM9-2	31.756.126	93,11%	30.444.340 / 927.620	95,91%
SSTM9-3	26.325.899	94,06%	25.200.140 / 689.797	96,66%
SSTS3-1	16.816.298	64,11%	13.374.402 / 1.801.375	77,51%
SSTS3-2	19.588.072	94,47%	18.787.571 / 523.371	96,90%
SSTS3-3	19.895.781	86,56%	18.579.249 / 863.560	91,45%
SSTS6-1	9.747.705	94,19%	9.319.799 / 273.445	96,85%
SSTS6-2	30.367.143	68,10%	24.480.225 / 2.945.581	81,54%
SSTS6-3	16.161.803	93,97 %	15.945.083 / 168.495	97,34%
SSTS9-1	25.441.538	86,53%	23.738.953 / 1.052.168	91,58%
SSTS9-2	60.509.713	58,21%	43.537.533 / 7.346.218	76,51%
SSTS9-3	23.909.879	92,34%	22.681.916 / 718.095	95,49%
SSSN3-1	37.480.176	87,32%	34.918.211 / 1.543.226	92,30%
SSSN3-2	45.350.518	92,65%	43.131.408 / 1.367.349	95,79%
SSSN3-3	25.488.492	90,09%	24.064.391 / 837.671	93,91%
SSSN6-1	29.039.554	85,37%	26.774.945 / 1.476.724	91,07%
SSSN6-2	20.848.855	93,22 %	20.572.037 / 232.620	96,21%
SSSN6-3	96.079.473	54,96%	66.899.978 / 12.309.346	74,34%
SSSN9-1	17.256.307	57,95%	12.686.858 / 2.186.074	74,68%
SSSN9-2	14.342.805	90,44%	13.698.100 / 424.382	93,79%
SSSN9-3	10.580.680	93,03%	10.166.485 / 291.615	95,63%
SSSM3-1	38.911.273	93,26%	38.404.159 / 388.435	95,04%

Continuação da tabela 7

Amostra*	Nº de Sequências Pré-Processamento	Qualidade Pré-Proc, (bases Q>=30)	Nº de Sequências Pós-Processamento [PS / UPS]	Qualidade Pós-Proc, (bases Q>=30)
SSSM3-2	33.933.745	93,06%	32.289.286 / 948.575	95,97%
SSSM3-3	71.347.235	83,60%	65.172.047 / 3.631.983	90,06%
SSSM6-1	52.928.530	86,06%	48.952.197 / 2.374.817	91,56%
SSSM6-2	38.212.092	92,25%	36.421.002 / 1.170.214	95,45%
SSSM6-3	22.917.019	93,06 %	22.433.452 / 361.528	94,77%
SSSM9-1	32.162.909	84,36%	29.590.019 / 1.525.240	90,37%
SSSM9-2	26.905.877	85,80%	25.048.047 / 1.174.794	90,99%
SSSM9-3	8.243.162	85,47%	7.586.580 / 375.340	90,75%
SSSS3-1	20.258.101	86,08%	18.795.417 / 855.861	91,33%
SSSS3-2	17.723.650	92,55%	16.856.170 / 648.912	95,80%
SSSS3-3	62.759.848	59,80%	46.343.765 / 7.598.328	76,89%
SSSS6-1	43.230.312	86,66%	39.823.263 / 1.838.796	92,18%
SSSS6-2	58.256.808	68,74%	47.179.589 / 5.512.213	81,77%
SSSS6-3	32.428.127	93,80%	30.910.668 / 995.007	96,64%
SSSS9-1	37.205.810	93,74 %	36.770.189 / 317.268	96,06%
SSSS9-2	22.522.578	92,46 %	22.156.521 / 262.882	94,31%
SSSS9-3	32.442.047	92,79 %	32.027.468 / 342.053	94,76%
Total de leituras	1.712.145.471	-	1.631.373.110	-

Nas colunas, em ordem: a denominação das amostras; o número de sequências geradas; qualidade Phred (Q>=30) em porcentagem dessas sequências pré-processadas; número de sequências após o processamento evidenciando as sequências pareadas (PS) e as sequências não pareadas (UPS) e a qualidade Phred (Q>=30) em porcentagem dessas sequências.

*SS- *Saccharum* spp.; S- cultivar sensível (RB855453) /T- cultivar tolerante (SP81-3250); Tratamento: N- não estressado; M- déficit hídrico moderado; S- déficit hídrico severo; Épocas de estresse: 3- 30 DAT, 6- 60 DAT, 9- 90 DAT. Repetição biológica: 1, 2 e 3.

4.2.3 Montagem *de novo*

Foi realizado pelo software Trinity uma montagem única das duas cultivares. Este processo de montagem resultou em um total de 161.295 isoformas, sendo 86.087 genes distintos com o tamanho médio de 850,79 bases e um total de 137.228.298 bases. Com relação à isoforma mais longa, o tamanho médio foi de 732,55 com 63.063.129 bases. Essa montagem resultou em um N50 dos genes igual a 1.294, e um N50 das isoformas igual a 1.146 e uma porcentagem de GC de 42,76 (Tabela 8).

A anotação dos transcritos obtidos foi realizada através de análise com InterProScan e BLAST+ (blastp/blastx), considerando uma série de bancos de dados de referência. Através da Tabela 9, verificamos que o maior número de genes anotados na montagem aparece nos bancos de dados de cana-de-açúcar (SOGI, ESTs e UNIGENE) e do *Sorgum bicolor*. Isso pode ser explicado pelo fato de o sorgo ser o organismo filogeneticamente mais próximo da cana-de-açúcar, apresentando grande semelhança genética.

Nossos resultados tiveram valores próximos aos obtidos por Cardoso-Silva et al. (2014) que realizaram a montagem *de novo* do transcriptoma de seis cultivares de cana-de-açúcar, em que o N50 dos genes únicos foi de 1.367 e a porcentagem de GC de 46,39. Em trabalho realizado por LI et al. (2016) também foi realizada a montagem *de novo* do transcriptoma de duas cultivares de cana-de-açúcar para avaliar genes envolvidos na abscisão foliar, e os resultados foram próximos aos do nosso trabalho e ao de Cardoso-Silva et al. (2014), com porcentagem de GC de 48,23 e N50 de 1.177.

Vicentini et al. (2015) também realizaram a montagem *de novo* do transcriptoma de duas cultivares de cana-de-açúcar contrastantes em relação ao conteúdo de lignina e obtiveram um total de 85.151 transcritos montados e N50 dos genes únicos de 1.385 pares de base.

Isso demonstra que os parâmetros da nossa montagem estão próximos aos relatados na literatura, evidenciando a boa qualidade da mesma.

Tabela 8. Estatística descritiva da montagem do transcriptoma da cana-de-açúcar, utilizando o programa Trinity.

	Total de genes	Total de transcritos	Porcentagem de GC	N50*	Mediana	Média	Número total de bases
Genes	86.087	161.295	42.76	1.294	551	850,79	137.228.298
Isoforma mais longa	-	-	-	1146	430	732,55	63.063.129

*N50: Número em que 50% dos genes / isoformas estão acima desse valor e 50% abaixo desse valor.

Tabela 9. Resultados da anotação do transcriptoma da cana-de-açúcar contra os diferentes bancos de dados.

Banco de dados de referência	Número de genes anotados na montagem	Número de genes anotados na montagem (%)	Número de registros únicos anotados na montagem	Número de registros únicos anotados na montagem (%)	Total de registros do banco de dados de referência
PRINTS	2.182	2,53	411	19,06	2.156
Pfam	14.621	16,98	3.495	23,56	14.831
InterPro	14.197	16,49	3.497	15,05	23.232
SwissProt	4.275	4,96	5.947	1,08	547.357
Transcriptomas					
BlastN/BlastN					
<i>S. bicolor</i>	20.993	24,38	17.914	45,41	39.441 [*] (33.032) ^{**}
<i>A. thaliana</i>	250	0,29	302	0,85	35.386 [*] (27.416) ^{**}
SOGI	22.899	26,59	36.564	30,13	121.342
SCG	7.102	8,24	9.973	27,04	36.871
<i>S. officinarum</i> (UNIGENE)	13.808	16,03	13.273	86,22	15.394
<i>Saccharum</i> (ESTs)	13.574	15,76	20.993	32,56	64.470
<i>Saccharum</i> (mRNA)	481	0,55	516	69,44	743
tBlastX/tBlastX					
<i>S. bicolor</i>	14.475	16,81	12.900	32,70	39.441 [*] (33.032) ^{**}
<i>A. thaliana</i>	2.543	2,95	3.309	9,35	35.386 [*] (27.416) ^{**}
SOGI	20.884	24,25	34.751	28,63	121.342
SCG	5.852	6,79	8.118	22,01	36.871
<i>S. officinarum</i> (UNIGENE)	13.335	15,49	13.392	86,99	15.394
<i>Saccharum</i> (ESTs)	11.748	13,64	17.747	27,52	64.470
<i>Saccharum</i> (mRNA)	502	0,58	484	65,14	743
Proteomas					
BlastX/tBlastN					
<i>S. bicolor</i>	14.084	16,36	14.374	36,44	39.441 [*] (33.032) ^{**}
<i>A. thaliana</i>	2.723	3,16	3.839	10,84	35.386 [*] (27.416) ^{**}

*Número de transcritos / **Número de genes

4.2.4 Identificação dos genes diferencialmente expressos

Foram considerados genes diferencialmente expressos pelo programa edgeR, os genes com o valor de “Fold Change” maior do que 2 ($FC \geq 2$), e valor de significância estatística (p-value) abaixo de 10^{-3} ($\leq 0,001$). Foram identificados 38.314 genes diferencialmente expressos, considerando todas as comparações possíveis, sendo 33.078 genes comuns as duas cultivares (SP81-3250 e RB855453) e 5.236 genes exclusivos.

4.2.5 Análise dos “clusters” contendo genes exclusivos da cultivar tolerante em 30, 60 e 90 DAT sob os diferentes tratamentos

Foram identificados 5.236 genes exclusivos, sendo 2.635 genes exclusivos da cultivar tolerante e 2.601 genes exclusivos da cultivar sensível. Os genes exclusivos da tolerante foram agrupados de acordo com os perfis de expressão (valores normalizados por TMM- “Trimmed Mean of M-values”) ao longo das épocas de déficit hídrico. Os agrupamentos (“clusters”) de 1 a 8 representando esses genes exclusivos estão apresentados nas Figuras 20a e 20b.

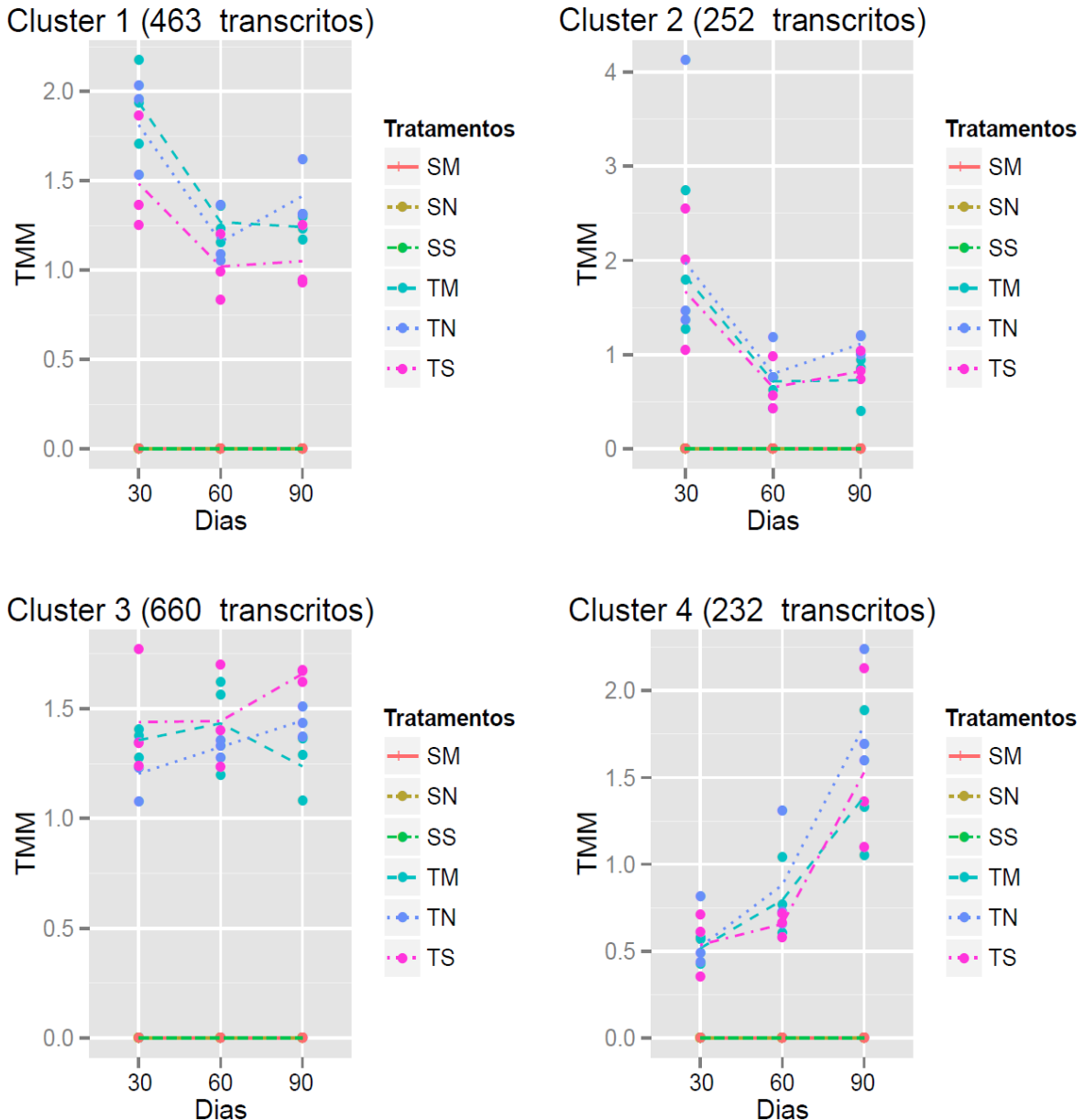


Figura 20a. “Clusters” 1 a 4, representando diferentes padrões de expressão dos transcritos exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250), submetida a três tratamentos (controle (N), déficit hídrico moderado (M) e déficit hídrico severo (S)) em três épocas amostrais (30, 60 e 90 DAT). Os valores de expressão entre as bibliotecas foram normalizados por TMM (“Trimmed Mean of M-values”) para cálculo dos genes diferencialmente expressos e posterior identificação dos genes exclusivos. A figura evidencia que os genes presentes em cada “cluster” não são expressos na cultivar sensível (S) RB855453 em nenhum tratamento e em nenhuma época amostral. Os três pontos de uma mesma cor representam a mediana dos valores de expressão dos transcritos para cada repetição biológica (total de três repetições), e a linha traçada representa a mediana das três repetições.

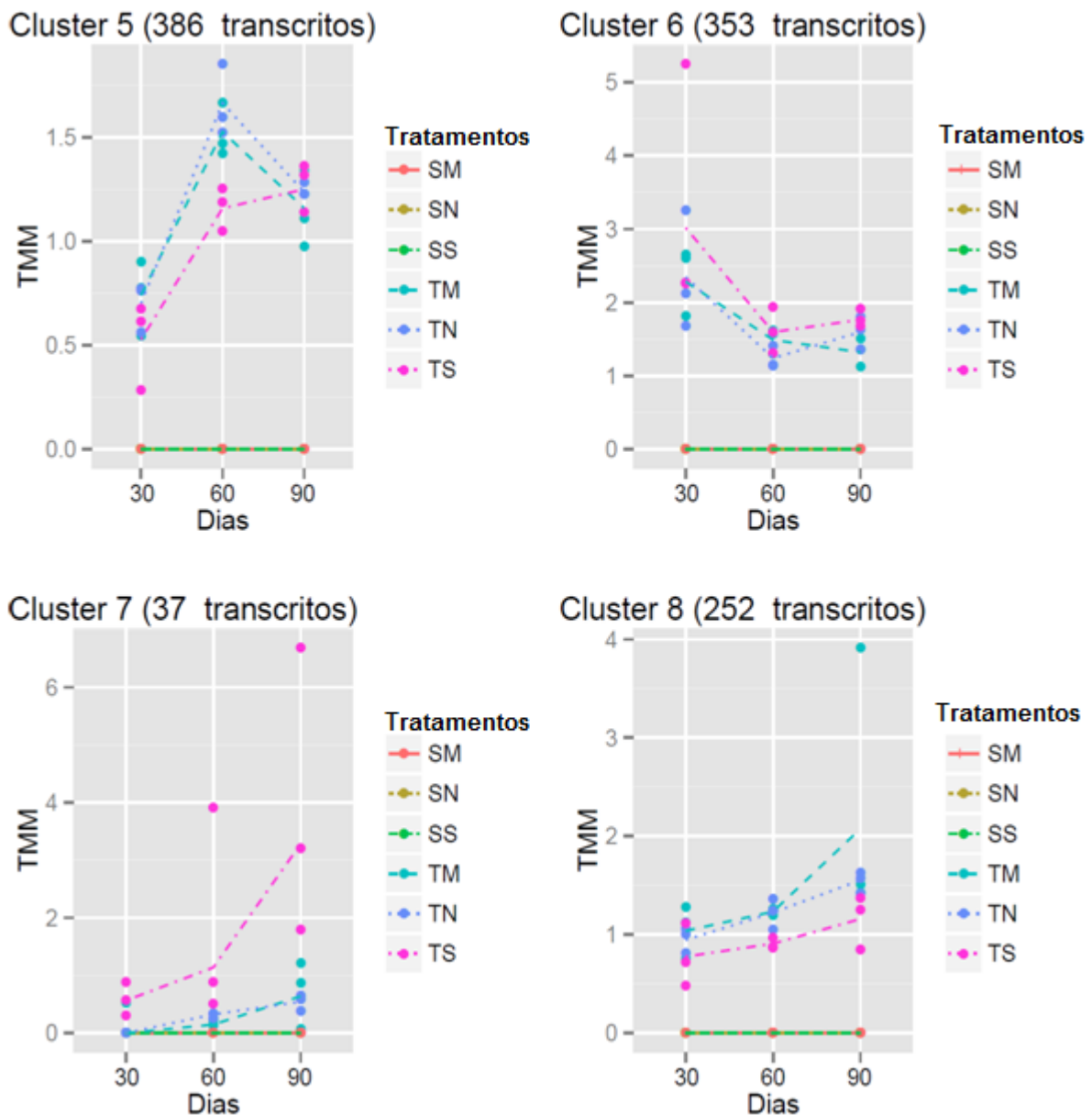


Figura 20b. “Clusters” 5 a 8, representando diferentes padrões de expressão dos transcritos exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250), submetida a três tratamentos (controle (N), déficit hídrico moderado (M) e déficit hídrico severo (S)) em três épocas amostrais (30, 60 e 90 DAT). Os valores de expressão entre as bibliotecas foram normalizados por TMM (“Trimmed Mean of M-values”) para cálculo dos genes diferencialmente expressos e posterior identificação dos genes exclusivos. A figura evidencia que os genes presentes em cada “cluster” não são expressos na cultivar sensível (S) RB855453 em nenhum tratamento e em nenhuma época amostral. Os três pontos de uma mesma cor representam a mediana dos valores de expressão dos transcritos para cada repetição biológica (total de três repetições), e a linha traçada representa a mediana das três repetições.

O “cluster” 1 contém 463 transcritos que foram mais expressos em 30 DAT, com a expressão diminuindo em 60 e praticamente se mantendo a mesma em 90 DAT. Com relação aos tratamentos, houve maior expressão dos transcritos no tratamento de déficit hídrico moderado, depois no controle e no déficit hídrico severo, respectivamente. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 0,8 a 2,25.

O “cluster” 2 contém 252 transcritos que também foram mais expressos em 30 DAT, com a expressão diminuindo em 60, e voltando a aumentar um pouco em 90 DAT. Com relação aos tratamentos, os valores foram muito próximos entre os mesmos, com uma expressão um pouco maior dos transcritos no controle, depois em déficit hídrico moderado e severo, respectivamente. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 0,5 a 4,0.

O “cluster” 3 contém 660 transcritos que apresentaram uma expressão pouco variada nas épocas de déficit hídrico e nos tratamentos. Os transcritos foram um pouco mais expressos em 90 DAT e no tratamento severo. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 1,0 a 1,75.

O “cluster” 4 contém 232 transcritos que foram mais expressos em 90 e menos expressos em 30 DAT. Com relação aos tratamentos, houve maior expressão dos transcritos no controle, com a expressão sendo muito semelhante em déficit hídrico moderado e severo. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 0,5 a 2,25.

O “cluster” 5 contém 386 transcritos que foram mais expressos em 60 e menos expressos em 30 DAT. Com relação aos tratamentos, houve maior expressão dos transcritos no controle, depois em déficit hídrico moderado e severo, respectivamente. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 0,5 a 1,75.

O “cluster” 6 contém 353 transcritos que foram mais expressos em 30 DAT, com a expressão diminuindo em 60 e se mantendo praticamente a mesma em 90 DAT. Com relação aos tratamentos, houve maior expressão dos transcritos em déficit hídrico severo e um pouco menor nos outros tratamentos. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 1,0 a 5,0.

O “cluster” 7 contém 37 transcritos com expressão maior em 90 e menor em 30 DAT, ou seja, a expressão foi aumentando ao longo das épocas amostrais. Com relação aos tratamentos, houve maior expressão dos transcritos em déficit hídrico severo e menor nos outros tratamentos. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 0,1 a 6,0.

O “cluster” 8 contém 252 transcritos que foram mais expressos em 90 e menos expressos em 30 DAT. Os transcritos foram mais expressos em déficit hídrico moderado e menos expressos em déficit hídrico severo. Os valores de expressão normalizados por TMM variaram de aproximadamente 0,5 a 4,0.

Todos os transcritos dos “clusters” da cultivar tolerante (SP81-3250) apresentaram expressão alterada ao longo das diferentes épocas de estresse e nos diferentes tratamentos. Os transcritos dos “clusters” 1, 2 e 6 apresentaram perfis de expressão similares, mas com valores de expressão normalizados diferentes. Os transcritos dos “clusters” 4, 7 e 8 também apresentaram perfis similares entre si com valores de expressão diferentes. Já os transcritos dos “clusters” 3 e 5 apresentaram perfis de expressão únicos, sem similaridade com nenhum outro “cluster”.

Analisando todos os “clusters” da cultivar tolerante, fica evidente que os genes não foram exclusivos de nenhuma época amostral e de nenhum tratamento específico, mas tiveram sua expressão alterada nessas situações.

4.2.6 Anotação dos transcritos exclusivos da cultivar tolerante

A classificação funcional dos genes exclusivos da cultivar tolerante foi realizada no programa Blast2GO em relação a processo biológico, função molecular e componente celular para cada um dos “clusters”.

A distribuição baseada no Gene Ontology (GO) foi feita por níveis (de 1 a 4). O nível 1 é a própria divisão em três categorias do GO: processos biológicos, função molecular e componente celular. O nível 2 é o mais abrangente dos 3 restantes e o nível 4 é a categorização mais detalhada. Sendo assim, foi escolhido para análise o nível 2 (Apêndice A), com a finalidade de reduzir o nível de sobreposição na classificação. Baseado nessa categorização é possível observar os principais processos e funções que são ativados pelas plantas sob condição de déficit hídrico e

em qual local da célula estas reações ocorrem (Figuras 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34 e 35).

Para a cultivar tolerante, as principais categorias observadas foram as mesmas em todos os “clusters”. Para o processo biológico, foi encontrado um maior número de sequências no processo metabólico, processo celular e processo de organismo simples. Para função molecular, se destacaram a função de ligação e de atividade catalítica. Para componente celular, os genes foram encontrados em maior número na célula, em organelas e na membrana (Apêndice A).

A categorização baseada no GO foi o primeiro passo para o início da anotação gênica dos genes exclusivos da cultivar tolerante. Depois disso, foram selecionados alguns genes de cada “cluster” da cultivar SP81-3250 que estão envolvidos na resposta das plantas ao déficit hídrico de acordo com a literatura consultada. Foi realizado um Blastx dos genes selecionados para confirmação da anotação e os mesmos são apresentados a seguir (Tabela 10).

Tabela 10. Anotação pelo Blastx dos genes exclusivos selecionados de cada “cluster” da cultivar SP81-3250 (tolerante ao déficit hídrico prolongado).

Genes	Tamanho (bases)	Anotação	Identidade	E-value	Acesso
Cluster 1					
c56751_g1_i1	773	DNA helicase [Saccharum hybrid cultivar R570]	36%	2e-24	AGT16820.1
c54561_g1_i10	2057	PREDICTED: zinc finger MYM-type protein 1-like [Setaria italica]	57%	1e-109	XP_004954628.1
c8719_g1_i2	719	GRF zinc finger family protein, expressed [Oryza sativa Japonica Group]	54%	2e-13	AAP54043.2
c29936_g1_i2	327	glutathione-S-transferase [Saccharum hybrid cultivar GT28]	43%	1e-06	AFO59574.1
c55999_g3_i1	578	PREDICTED: regulatory protein NPR1 [Setaria italica]	84%	2e-07	XP_004968514.1
c49187_g1_i2	817	PREDICTED: disease resistance protein RPM1-like [Setaria italica]	59%	9e-114	XP_004968689.1
Cluster 2					
c67835_g1_i1	572	F-box domain containing protein-like [Oryza sativa Japonica Group]	46%	4e-19	BAC83076.1
c33739_g1_i1	763	histone deacetylase 5 [Arabidopsis thaliana]	44%	4e-10	NP_200914.2
Cluster 3					
c59181_g3_i2	1150	NAC domain-containing protein 73-like [Setaria italica]	63%	8e-16	XP_004960907.1
c59657_g5_i1	2280	PREDICTED: E3 SUMO-protein ligase SIZ2-like isoform X2 [Setaria italica]	77%	5e-15	XP_014661072.1

Continuação da Tabela 10

Genes	Tamanho (bases)	Anotação	Identidade	E-value	Acesso
Cluster 4					
c3348_g1_i1	828	PREDICTED: putative cytochrome P450 superfamily protein isoform X2 (<i>Zea mays</i>)	90%	3e-133	XP_008667628.1
c55877_g1_i10	274	aspartic proteinase oryzasin-1 precursor [<i>Zea mays</i>]	89%	3e-14	NP_001148782.1
Cluster 5					
c55589_g6_i5	374	cell division control protein 50 [<i>Zea mays</i>]	66%	3e-13	AFW66342.1
c55069_g10_i1	313	tubulin-specific chaperon-like protein [<i>Oryza sativa Indica Group</i>]	79%	9e-13	ACM17606.1
Cluster 6					
c58871_g2_i20	628	Ethylene-insensitive protein 2-like isoform X1 (<i>Setaria italica</i>)	83%	1e-48	XP_004982078.1
c8839_g1_i1	753	PREDICTED: F-box protein At5g07610-like [<i>Brachypodium distachyon</i>]	36%	6e-19	XP_003561635.1
Cluster 7					
c58797_g5_i1	1055	NB-ARC domain containing protein [<i>Oryza sativa Japonica Group</i>]	52%	8e-38	ABA99535.1
c54904_g1_i14	886	Putative serine/threonine-protein kinase [<i>Aegilops tauschii</i>]	48%	1e-24	EMT29237.1
Cluster 8					
c53932_g3_i1	670	putative AP2/EREBP transcription factor superfamily protein [<i>Zea mays</i>]	56%	9e-07	AFW73432.1
c43937_g1_i4	295	PREDICTED: probable WRKY transcription factor 33-like [<i>Setaria italica</i>]	73%	4e-10	XP_004982253.1

4.2.7 Genes exclusivos da cultivar SP81-3250 envolvidos na tolerância ao déficit hídrico prolongado

“Cluster” 1:

Dentre os vários genes expressos nesse grupo, foram selecionados para análise alguns genes que estão envolvidos na resposta das plantas ao estresse abiótico. Um deles é o gene que codifica a proteína DNA helicase.

As helicases são enzimas que se ligam e podem remodelar ácidos nucleicos ou complexos protéicos de ácidos nucleicos. Existem DNA e RNA helicases. As DNA helicases proporcionam o desenrolamento da cadeia dupla de DNA de maneira dependente de ATP, e com isso desempenham um importante papel na maioria dos processos genéticos básicos incluindo replicação, reparação, recombinação, transcrição e tradução. As helicases são divididas em cinco grupos principais nomeados como superfamílias (SF)- SF1 até SF5. Os maiores grupos são a SF1 e a SF2. Proteínas da família DEAD-box são pertencentes à superfamília 2 (SF2) (VASHISHT; TUJETA, 2006).

A helicase DEAD-box pode desempenhar uma importante função na estabilização do crescimento em plantas sob condições de estresse pela regulação de algumas vias induzidas pelo mesmo. Existem atualmente alguns estudos sobre a expressão de helicases DEAD-box em resposta a estresses abióticos. A indução de genes que codificam helicases DEAD-box já foi relatada em condições de congelamento ou estresse por frio. O exato mecanismo de tolerância ao estresse mediado por helicases ainda não tem sido bem compreendido. O que se tem de compreensão até o momento é que pode haver dois mecanismos possíveis de ação das helicases: i) em nível de transcrição ou tradução para aumentar ou estabilizar a síntese de proteínas; e ii) associação com múltiplas subunidades complexas de proteínas de DNA para alterar a expressão gênica (TUJETA; GILL; TUJETA, 2012).

Nas etapas de transcrição e tradução, o RNAm e a síntese de proteínas são muito sensíveis ao estresse. A etapa de iniciação da tradução é prejudicada após estresses abióticos e a reativação da máquina de tradução pode representar um gargalo durante a adaptação a essas condições. Para que as plantas possam enfrentar essas situações adversas, RNAs helicases não apenas removem

estruturas secundárias de RNA, mas também protegem o RNAm da degradação, em particular sob condições em que a transcrição e a tradução são desacopladas, como resultado da iniciação da tradução ineficiente (TUJETA; GILL; TUJETA, 2012) (Figura 21).

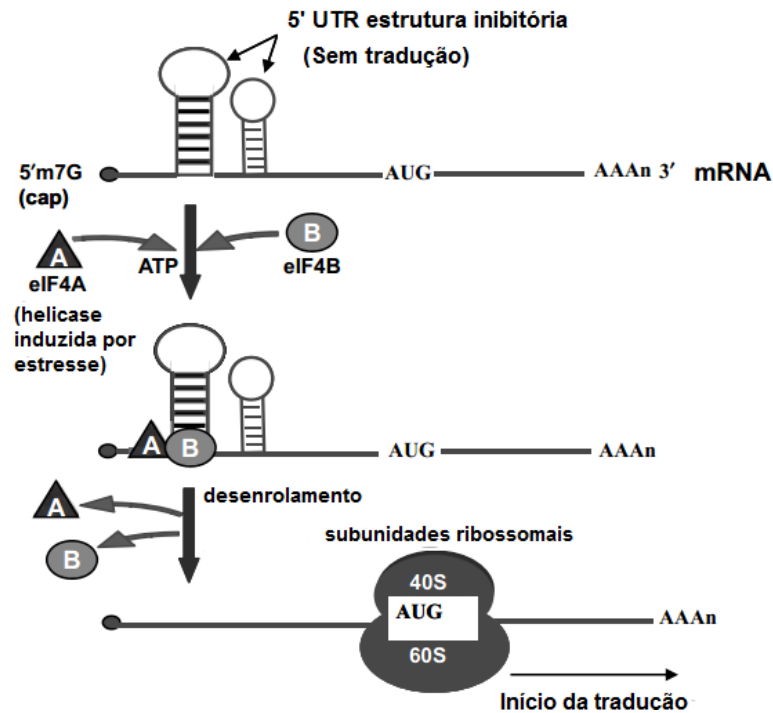


Figura 21. Modelo hipotético para o possível mecanismo de tolerância ao estresse por helicase. O eIF4A é um membro da família de RNA helicase DEAD-box. Estresses podem aumentar a formação de estruturas secundárias inibitórias na região 5' UTR do RNAm de muitos genes essenciais. O eIF4 é responsável por remover a estrutura secundária do RNAm. O eIF4A e eIF4B, ligam-se a 5' UTR e desenrolam juntos a estrutura secundária inibitória de um modo dependente de ATP, o que facilita a ligação do ribossomo. Depois disso, essa organela verifica o códon de iniciação (AUG) e a síntese de proteínas começa normalmente, a qual foi inibida anteriormente em função do impacto negativo do estresse. Adaptado de TUJETA; GILL; TUJETA, 2012.

Alguns trabalhos têm sido realizados para testar o envolvimento de DNA helicases nas respostas aos estresses abióticos. Em trabalho realizado por Sahoo; Gill e Tujeta (2012) foi testada na variedade de arroz Indica IR64 a superexpressão de PDH45 (DNA helicase 45 de ervilha), uma homóloga do fator de iniciação da tradução 4A (eIF4A), para verificar a resposta da mesma ao estresse salino. Já tinha

sido relatado que PDH45 desempenhava um importante papel na tolerância ao estresse por sal em tabaco e na variedade de arroz Binnatoa. As plantas de arroz IR64 transformadas com PDH45 apresentaram tolerância à salinidade. Foram observados nos transgênicos, sob tratamento de sal, melhores desempenhos fisiológicos e de rendimento, incluindo conteúdo de nutrientes endógenos (N, P, K, Na) quando comparados com o tipo selvagem.

Segundo os mesmos autores, baseado na homologia de proteínas com eIF4A, a PDH45 pode atuar em nível da tradução para melhorar ou estabilizar a síntese de proteínas sob condições de estresse e seria uma candidata ideal para o desenvolvimento de variedades de culturas tolerantes ao estresse salino.

Posteriormente, foi realizado um trabalho por Augustine et al. (2015) utilizando o mesmo gene que codifica PDH45 para verificar o aumento da tolerância à seca e à salinidade em cana-de-açúcar. O gene da helicase isolado de ervilha foi transformado em uma variedade comercial de cana-de-açúcar Co86032, e os transgênicos foram avaliados quanto à tolerância ao estresse de umidade do solo e salinidade. Os transgênicos exibiram significativamente maior tolerância ao déficit hídrico quando comparados ao tipo selvagem. A superexpressão do gene que codifica a PDH45 em cana-de-açúcar também levou a expressão de DREB-2, induzido por genes relacionados ao estresse. Os resultados apresentados pelos autores sugerem a possibilidade de desenvolver aumento da tolerância ao estresse abiótico em variedades de cana-de-açúcar através da superexpressão do gene PDH45, sendo este o primeiro estudo a respeito do envolvimento deste gene na tolerância ao estresse abiótico em cana-de-açúcar.

No nosso trabalho, a maior expressão desse gene em 30 DAT e no tratamento de déficit hídrico moderado (Figura 20a) sugere que a DNA helicase pôde atuar na tradução e em outros processos nesse período para melhorar ou estabilizar a síntese de proteínas necessárias a manutenção das plantas em condições de déficit hídrico prolongado.

Outros dois genes identificados nesse “cluster” foram os que codificam o fator de transcrição “zinc finger” (ZF). O fator de transcrição “zinc finger” tem um motivo “zinc finger” conservado e se liga a íons zinco através dos seus resíduos de cisteína e histidina usando “os dedos de zinco”. Os ZF podem desempenhar importantes

funções biológicas pela interação com o DNA ou cromatina, RNA e outras proteínas. Eles possuem várias funções biológicas como crescimento e desenvolvimento de plantas, respostas a fitohormônios e a estresses bióticos e abióticos (LI et al., 2013).

Eles formam uma família relativamente grande de fatores de transcrição em plantas. Essas proteínas são classificadas em diversos tipos, como C_2H_2 , C_2HC , C_2HC_5 , C_3HC_4 , $CCCH$, C_4 , C_4HC_3 , C_6 e C_8 , baseado no número e localização dos resíduos característicos. O tipo C_2H_2 está mais envolvido no crescimento e desenvolvimento das plantas. A alteração da expressão dos genes que codificam o fator de transcrição tipo C_2H_2 melhorou a tolerância ao estresse em *Arabidopsis*, arroz, tabaco e petúnia. Muitos estudos têm demonstrado o potencial de manipular genes C_2H_2 para conferir tolerância reforçada a salinidade, frio, seca, calor, estresse osmótico e oxidativo (KIELBOWICZ-MATUK, 2012).

Xu et al. (2008) identificaram um gene que codifica a proteína “zinc finger” tipo TFIIIA (C_2H_2) de arroz em resposta ao estresse hídrico e salino. Foi relatada a análise funcional desse gene, denominado ZFP252, usando a estratégia de ganho e perda de função. Os autores descobriram que a superexpressão desse gene em arroz aumentou a quantidade de prolina livre e outros açúcares solúveis, elevou a expressão de genes de defesa ao estresse e melhorou a tolerância do arroz ao estresse hídrico e salino em comparação com as plantas não transgênicas. Os autores sugerem que o gene ZFP252 desempenha um papel importante na resposta do arroz ao estresse salino e hídrico e é útil na engenharia de plantas para o aumento da tolerância aos mesmos.

Sugano et al. (2003) identificaram um gene de petúnia ZPT2-3, que codifica uma proteína “zinc finger” tipo C_2H_2 e avaliaram a superexpressão desse gene em petúnias transgênicas em resposta a vários estresses. A superexpressão constitutiva desse gene em plantas de petúnias transgênicas aumentou a tolerância à desidratação. Esse resultado demonstra o envolvimento de ZPT2-3 na resposta da planta a esse estresse e sugere a sua potencial utilidade para melhorar a tolerância à seca.

Mukhopadhyay; Vij e Tyagi (2004) avaliaram o gene OSISAP1 que também codifica uma proteína “zinc finger” de arroz induzida pelo frio, dessecação, sal, submersão, metais pesados e ferimentos. Sua superexpressão em tabaco mostrou

tolerância ao frio, a desidratação e ao sal nas fases de germinação de sementes e de plântulas.

No nosso trabalho, os genes que codificam as proteínas “zinc finger” apresentaram o mesmo padrão de expressão da DNA helicase, que foi maior em 30 DAT e no tratamento de déficit hídrico moderado. Isso poderia ser explicado pelo fato de esse ser o primeiro período em que a planta percebeu o estresse e desencadeou uma série de processos para se manter na situação de déficit hídrico. Os “zinc finger” podem ter controlado a expressão de vários genes responsivos e não responsivos ao estresse em 30 DAT, e uma vez que a expressão desses genes foi controlada, a expressão dos “zinc finger” pôde ser reduzida e mantida ao longo do tempo (Figura 20a).

Outro gene identificado nesse “cluster” é o que codifica a glutathione-S-transferase. É bem estabelecido que cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, são uma das principais fontes de espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como radicais superóxido, radicais hidroxila, oxigênio e peróxido de hidrogênio. As EROS desempenham duplo papel na fisiologia e bioquímica de plantas. Elas são importantes moléculas de sinalização secundária, mas ao mesmo tempo, são produtos tóxicos do metabolismo aeróbico que se acumulam no interior das células durante o estresse oxidativo. O equilíbrio entre a geração e a eliminação enzimática e não enzimática de EROS pode ser perturbado pela seca. Durante o déficit hídrico, esses distúrbios no equilíbrio resultam em um repentino aumento no potencial redox celular, que pode danificar muitos componentes celulares incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (LABUDDA; AZAM, 2014).

A expressão de genes que regulam a síntese de enzimas antioxidantes como ascorbato peroxidase, glutathione-S-transferase e tioredoxina, pode proteger os tecidos vegetais dos danos causados pelo estresse oxidativo (ASHRAF et al., 2008; MIAN; SENADHEERA; MAATHUIS, 2011; NAKAUNE et al., 2012).

As glutathione-S-transferases são uma família de enzimas de detoxificação bem caracterizadas envolvidas na tolerância a estresses, as quais catalisam a conjugação da glutathione reduzida a substratos eletrofílicos. Dessa forma, glutathione-S-transferases foram descobertas primeiramente como enzimas que podem metabolizar vários compostos tóxicos exógenos (xenobióticos) por meio da

conjugação destes com glutathione reduzida (XU et al., 2015), produzindo conjugados destes compostos solúveis em água, o que reduz sua toxicidade (CATANEO et al., 2003).

Em trabalho realizado por Gallé et al. (2009), foi verificada a presença de glutathione-S-transferase em resposta ao déficit hídrico em trigo, durante o período de enchimento dos grãos. Neste trabalho, os autores mediram a atividade e a expressão das glutathione-S-transferases em quatro cultivares de *Triticum aestivum* (duas tolerantes e duas sensíveis à seca). Os genes TaGSTU1B e TaGSTF6 que codificam glutathione-S-transferases foram avaliados e mostraram um alto nível de expressão induzida pela seca nas quatro cultivares analisadas, mas a maior expressão foi detectada em uma cultivar tolerante. Além disso, a indução da atividade da glutathione-S-transferase em resposta ao déficit hídrico foi detectada mais precocemente nas cultivares tolerantes do que nas sensíveis.

Xu et al. (2015) também avaliaram o envolvimento da glutathione-S-transferase na resposta ao déficit hídrico. Neste trabalho, os autores clonaram em *Arabidopsis thaliana* um gene de glutathione-S-transferase de tomate, designado LeGSTU2. As plantas transgênicas ficaram normais em termos de crescimento e maturidade em comparação com as plantas tipo selvagem, e apresentaram maior tolerância ao sal e ao estresse osmótico induzidos por NaCl e manitol, respectivamente. O aumento da tolerância das plantas transgênicas foi correlacionado com as mudanças nos níveis de prolina e atividade de enzimas antioxidantes.

O perfil de expressão da glutathione-S-transferase no nosso trabalho (maior em 30 DAT), pode ser explicado possivelmente pelo aumento das espécies reativas de oxigênio na fase mais inicial do déficit hídrico, sendo necessária a presença dessa enzima para diminuir o estresse oxidativo. Na fase mais prolongada do déficit hídrico, as EROS podem ter apresentado níveis mais controlados, o que poderia explicar a diminuição da expressão de glutathione-S-transferase em 60 e 90 DAT (Figura 20a).

Outro gene encontrado nesse “cluster” é o que codifica a proteína NPR1, receptora do hormônio ácido salicílico.

O ácido salicílico é um composto fenólico que desempenha um importante papel na regulação do crescimento das plantas, desenvolvimento, maturação e

respostas de defesa. Esse hormônio melhora significativamente a tolerância das plantas ao frio, calor, seca e outros estresses abióticos (KANG et al., 2012).

Muita coisa ainda não é conhecida em detalhes moleculares sobre a via de sinalização do ácido salicílico, e o receptor desse hormônio foi descoberto apenas recentemente. Em 2012, dois grupos de pesquisa independentes contribuíram com novos resultados sobre a percepção desse hormônio e sua cascata de sinalização, estando esses resultados centrados na proteína NPR1. Um dos estudos mostrou que a proteína NPR1 se liga diretamente ao ácido salicílico, atuando como seu receptor (WU et al., 2012). Já o outro estudo, propôs que dois parálogos de NPR1, NPR3 e NPR4, se ligam ao ácido salicílico e controlam a degradação de NPR1 mediada pelo proteassoma, através da ligação deles com esse receptor (FU et al., 2012). Ambos os trabalhos demonstram, contudo, o papel fundamental de NPR1 na via de sinalização do ácido salicílico (KUAI; MACLEOD; DESPRÉS, 2015).

NPR1 pode ser encontrado no núcleo ou citoplasma e atua como um cofator do fator de transcrição TGA (um repressor transcricional). NPR1 aumenta a ligação desse fator de transcrição no promotor do gene PR1 para ativar a transcrição desses genes (VIDHYASEKARAN, 2015).

Na ausência do ácido salicílico, NPR1 é inibido, sendo degradado pelo proteassoma através da cullin E3 ligase. NPR3 e NPR4 têm sido identificadas como proteínas adaptadoras de CUL3 E3 ligase, ou seja, elas marcam a degradação de NPR1 de maneira dependente da concentração de ácido salicílico (FU et al., 2012).

No nosso trabalho, esse gene apresentou maior expressão em 30 DAT e no tratamento de déficit hídrico moderado, sugerindo que o ácido salicílico estava mais abundante nesse período, controlando as respostas dependentes desse hormônio. O ácido salicílico está envolvido com o crescimento das plantas, fechamento estomático, fotossíntese e produção de enzimas antioxidantes, o que pode explicar possivelmente a redução das variáveis fisiológicas ao longo das épocas de déficit hídrico (Figura 20a).

Nesse “cluster” também foi encontrado o gene que codifica a proteína de resistência a doença RPM1, em resposta a via de sinalização do ácido salicílico.

RPM1 é uma proteína de membrana NBS-LRR, o que significa que ela contém um putativo domínio de ligação de nucleotídeo (NBs) e um terminal carboxilo com repetições ricas em leucina (LRR) (BOYES; NAM; DANGL, 1998).

Poucos trabalhos têm sido publicados sobre a proteína RPM1. Entretanto, um trabalho recente publicado por Li et al. (2016) relata uma possível função dessa proteína em cana-de-açúcar.

Esses autores realizaram um experimento de RNA-seq em cana-de-açúcar para identificar genes relacionados à abscisão foliar, com o intuito de melhorar variedades de cana que possam perder as folhas durante o tempo de maturação, reduzindo os custos de colheita. A análise da expressão diferencial revelou 1.202 transcritos superexpressos na abscisão foliar em plantas de cana-de-açúcar. Entre os transcritos superexpressos, 62 foram anotados por regular a via de interação planta-patógeno. Destes 62 transcritos, 36 foram anotados por codificar proteínas de resistência a doenças, incluindo 7 transcritos RPM1, 7 RPP13 e 6 RPP3-like. Ambos, RPM1 e RPP13 podem desencadear o processo de defesa da planta. A superexpressão de transcritos que codificam proteínas de resistência a doenças em plantas sugeriu que o sistema de defesa da cana-de-açúcar foi ativado por algum motivo, e pode contribuir na perda de folhas de cana-de-açúcar durante o período de maturação.

Como no nosso trabalho essa proteína apresentou aumento da expressão no tratamento de déficit hídrico moderado e em 30 DAT, diminuindo com as épocas de déficit hídrico, podemos sugerir que o ácido salicílico está envolvido na tolerância da cultivar SP81-3250 ao déficit hídrico, uma vez que essa proteína envolvida na abscisão foliar, não manteve expressão muito alta nos demais períodos de déficit hídrico prolongado (60 e 90 DAT) (Figura 20a).

“Cluster” 2:

Nesse “cluster” também foram selecionados alguns genes possivelmente envolvidos na resposta ao déficit hídrico prologando. Um deles foi o gene que codifica a proteína F-box.

As proteínas são continuamente sintetizadas e degradadas em todas as células vivas e sua meia-vida pode variar de apenas alguns minutos ou horas até várias semanas. Dessa forma, o turnover proteico não é necessário apenas para a eliminação de proteínas desnaturadas, deformadas ou danificadas, mas também desempenha um papel essencial ajustando a abundância de proteínas e enzimas reguladoras cruciais. A degradação de proteínas é um evento pós-traducional responsável pela regulação de uma infinidade de processos fisiológicos, permitindo uma rápida resposta celular interna e a sinais externos (STEFANOWICZ; LANNOO; VAN DAMME, 2015).

A estratégia das plantas de responderem a estímulos ambientais pela eliminação de proteínas danificadas é realizada através do sistema ubiquitina proteassoma 26S. Nesse sistema, as proteínas alvo a serem eliminadas são especificamente reconhecidas e etiquetadas pela ligação com moléculas de ubiquitina (Ub), num processo chamado ubiquitinação, para a degradação final pelo proteassoma 26S. O processo de marcação de proteínas com a cadeia Ub depende da ação sequencial de três enzimas: a enzima de ativação de Ub (E1), a enzima de conjugação (E2), e a enzima ligase (E3) (STEFANOWICZ; LANNOO; VAN DAMME, 2015).

O principal tipo de E3 Ub ligases, o complexo SCF (Skp-Cullin-F-box), é composto de quatro componentes principais: Skp1, Cul1/Cdc53, Roc1/Rbx1/Hrt1, e proteínas F-box. O componente F-box da maquinaria SCF é responsável por reconhecer diferentes substratos para a ubiquitinação (HO; TSAI; CHIEN, 2006).

A cascata de conjugação da ubiquitina acontece da seguinte maneira: a enzima E1 ativa a ubiquitina impulsionada pela hidrólise de ATP para formar um tioéster intermediário de alta energia, em que o grupo C-terminal da ubiquitina é ligado através de uma ligação tioéster a E1. Em seguida, a ubiquitina ativada é transferida para a enzima E2 por transesterificação. A transferência da Ub da enzima E2 à proteína alvo é mediada por uma enzima E3. Subsequentemente, uma cadeia poliubiquitina é sintetizada pela sucessiva adição de porções ubiquitina a moléculas Ub. Finalmente, as proteínas multi-ubiquitinadas são reconhecidas pelo proteassoma 26S e proteolisadas em peptídeos, e a Ub é reciclada. No principal tipo de ubiquitina E3 ligase, que é o complexo SCF, a proteína Cullin-1 interage com

Skp1 e a proteína F-box no seu terminal amino, e se associa com a molécula Roc1/Rbx1/Hrt1 de domínio RING no terminal carboxilo, o qual que se associa, por sua vez, com a enzima E2 conjugada a Ub. Diferentes substratos são reconhecidos através do terminal carboxilo da proteína F-box e a Ub é transferida para o substrato a partir de E2 pela mediação da enzima E3 (Figura 22) (YU et al., 2007).

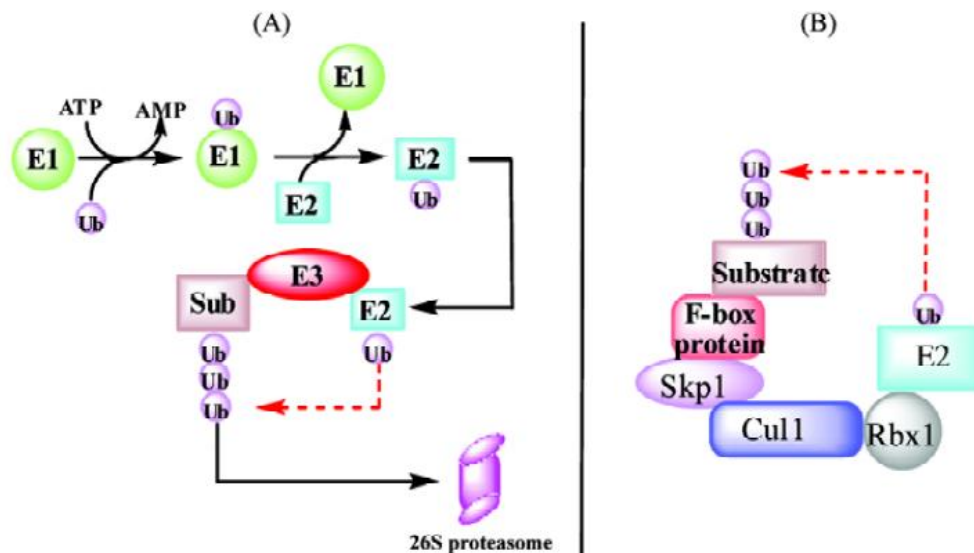


Figura 22. (A) via ubiquitina proteossoma; (B) estrutura do complexo SCF. Fonte: YU et al., 2007.

A família de proteínas F-box é a maior superfamília de proteínas conhecidas com centenas de representantes identificados em diferentes espécies de plantas. As proteínas F-box estão associadas com muitos eventos biológicos no desenvolvimento de plantas e na sinalização do estresse, incluindo morfogênese, percepção hormonal e sinalização, ciclo celular, senescência, resposta ao estresse abiótico e interação planta patógeno (STEFANOWICZ; LANNON; VAN DAMME, 2015).

Bu et al. (2014), também encontraram no trabalho deles proteínas F-box em *A. thaliana* com papéis importantes na resposta das plantas a tolerância à seca. Uma delas foi a proteína MAX2, conhecida por seu papel na sinalização celular, envolvimento na senescência foliar e fotomorfogênese, além de ser crucial para a resposta das plantas à seca e ao estresse osmótico durante a germinação de sementes e crescimento das plântulas. O mecanismo pelo qual MAX2 pôde controlar

diversas vias de sinalização permanece pouco esclarecido, embora seja sugerido que ela possa estar associada em muitos complexos SCF diferentes e na marcação de substratos específicos envolvidos em diferentes vias de sinalização e em diferentes estágios de desenvolvimento (BU et al., 2014; SHEN et al., 2012).

Também tem sido relatada na literatura uma proteína F-box de trigo, chamada TaFBA1. Essa proteína foi recentemente identificada como sendo expressa sob estresse hídrico e salino, bem como após o tratamento com ácido abscísico (ABA). A superexpressão desse gene em tabaco conferiu aumento da tolerância das plantas ao déficit hídrico (ZHOU et al., 2014).

No trabalho realizado por Jain et al. (2007), os autores afirmam que o estresse abiótico afeta a maquinaria celular de genes e, muito provavelmente, os componentes da maquinaria de degradação, como as proteínas F-box. Para confirmar isso, a expressão de genes que codificam proteínas F-box em arroz foi analisada sob condição de estresse abiótico por análise de microarranjo, realizada com o RNA isolado de plântulas de arroz submetidas à salinidade, a dessecação e ao tratamento por frio. Foram identificados 43 genes diferencialmente expressos que codificaram proteínas F-box sob uma ou mais das condições de estresse mencionadas. Desses genes, 16 foram diferencialmente expressos sob a condição de estresse por dessecação, o que sugere que esses genes que codificam proteínas F-box podem ser utilizados na produção de plantas transgênicas tolerantes ao estresse abiótico.

No nosso trabalho, os genes que codificam as proteínas F-box tiveram maior expressão em 30 DAT, não havendo praticamente diferença entre os tratamentos (Figura 20a). Isso pode ser devido à alta quantidade de proteínas reguladoras danificadas ou deformadas nesse período, que precisavam ser eliminadas. Durante os períodos mais prolongados de déficit hídrico, pode ser que a quantidade de algumas proteínas danificadas ou reguladoras de processos fisiológicos tenha sido controlada, permitindo uma leve redução da expressão dos genes que codificam as proteínas F-box em 60 e 90 DAT (Figura 20a).

Também foi identificado nesse “cluster” um gene que codifica a proteína histona desacetilase. Diferentes tipos de estresses ambientais causam alterações no estado de metilação do DNA, bem como modificações das histonas nucleossomais.

Compreender como os mecanismos epigenéticos estão envolvidos na resposta das plantas ao estresse ambiental é altamente desejável, não apenas para uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares de resposta das plantas ao estresse, mas também para a possível aplicação disso na manipulação genética de plantas (LUO et al., 2012).

Alguns estudos têm demonstrado que a regulação de genes em plantas geralmente depende de modificações pós-traducionais na estrutura da cromatina, e que essas modificações estão relacionadas principalmente a alterações na cauda N-terminal de histonas. As enzimas denominadas “modificadoras de histonas” são as que estão envolvidas nesse processo e são classificadas de acordo com a sua ação em: histona acetiltransferase, histona desacetilase, histona metiltransferase e histona desmetilase (KIM et al., 2010).

A reversível acetilação e desacetilação de histonas desempenham um papel crucial na regulação da atividade do gene eucariótico. A acetilação das histonas do núcleo geralmente induz uma “abertura” da estrutura da cromatina e é associada com a ativação de genes, enquanto a desacetilação da histona é muitas vezes relacionada com a “compactação” da cromatina e repressão do gene. A desacetilação da histona é catalisada por histonas desacetilases (LIU et al., 2014). As histonas desacetilases podem ser divididas em quatro grupos, sendo eles: RDP3, HDA1 e SIR2, que tem homologia com histonas desacetilases de leveduras; e HD2, que é específico de plantas (SOUZA, 2012).

Diferentes genes de histonas desacetilases podem ter distintas funções na resposta das plantas ao estresse abiótico, através da regulação de diferentes conjuntos de genes responsivos ao mesmo (ZHENG et al., 2016).

Vários trabalhos têm sido realizados para verificar a função das histonas desacetilases em relação ao estresse abiótico. Zhao et al. (2015) selecionaram um gene de arroz que codifica uma histona desacetilase tipo HD2 (específica de plantas), chamado HDT70, e verificaram a sua função na resposta ao estresse abiótico. A superexpressão desse gene em arroz melhorou a tolerância ao estresse osmótico e salino durante a fase de plântula. Os resultados desses autores sugerem que esse gene pode desenvolver um importante papel na regulação da germinação de sementes em resposta ao estresse abiótico em arroz.

Sridha e Wu (2006), também estudaram um gene que codifica uma histona desacetilase HD2 em *A. thaliana*, chamado AtHD2C. A superexpressão desse gene em plantas de *Arabidopsis* conferiu um fenótipo insensível ao ácido abscísico. Além disso, as plantas com esse gene superexpresso exibiram transpiração reduzida e aumento da tolerância ao sal e ao estresse por seca quando comparadas com as plantas tipo selvagem. Esse estudo fornece, portanto, evidências de que o gene AtHD2C pode modular respostas ao ácido abscísico e ao estresse abiótico.

Como o gene que codifica a histona desacetilase não teve quase diferença de expressão entre os tratamentos e apresentou aumento da expressão em 30 DAT em nosso trabalho, podemos supor que esse gene estaria relacionado com a repressão de um maior número de genes alvos nesse período, sendo essa uma resposta necessária para as plantas se manterem sob condição normal e de déficit hídrico. Uma vez regulados alguns genes, sua expressão pôde ser diminuída, controlando talvez a expressão de um número menor de genes em déficit hídrico prolongado (Figura 20a).

“Cluster” 3:

Nesse “cluster” foi identificado um gene que codifica um fator de transcrição, denominado NAC. A família NAC de fatores de transcrição é específica de vegetais e é uma das maiores no genoma de plantas. Essa família contém um domínio N-terminal de ligação ao DNA altamente conservado e um diversificado domínio C-terminal, regulador da transcrição (LATA et al., 2011). Apesar dos seus domínios de ligação ao DNA serem altamente conservados, sua notável diversificação em todas as plantas, reflete suas inúmeras funções (PURANIK et al., 2012). A denominação “NAC” foi derivada a partir dos três primeiros nomes de fatores de transcrição descritos contendo o domínio NAC, nomeadamente NAM, ATAF1-2 e CUC2 (LATA et al., 2011).

Vários membros dessa família têm sido identificados e caracterizados em plantas modelos como *A. thaliana*, em culturas como o arroz, a soja e o trigo, bem como em espécies de árvores modelo como *Populus trichocarpa* e em citros (PURANIK et al., 2012). As proteínas NAC podem controlar um grande número de

processos celulares por regularem a expressão de genes alvos. Os fatores de transcrição se ligam diretamente aos promotores dos genes alvos em sequências específicas do DNA e ativam ou reprimem a transcrição do gene controlado pelo promotor (FERRO, 2008).

Assim, elas podem estar envolvidas na resposta ao estresse por controlarem a transcrição de genes e por serem capazes de formar também múltiplos complexos protéicos. Essa família de fatores de transcrição pode desempenhar um papel importante, atuando na tolerância a vários estresses, sendo candidatos promissores no desenvolvimento de culturas tolerantes economicamente importantes (PURANIK et al., 2012). Já foi observado que plantas transgênicas de *A. thaliana* e arroz superexpressando genes NAC exibiram melhor tolerância à seca (NAKASHIMA et al., 2012).

A expressão de genes NACs responsivos ao estresse pode ser fortemente regulada por vias ABA-dependente ou ABA-independente, por causa das diferenças nos seus elementos promotores. Esses elementos incluem os ABREs (elementos responsivos ao ABA), DREs, LTREs (elementos responsivos a baixa temperatura), sítios de ligação MYB (mieloblastose) e MYC (mielocitomatose), W-box, elementos responsivos ao ácido jasmônico e elementos responsivos ao ácido salicílico (PURANIK et al., 2012).

Como já mencionado, vários trabalhos têm demonstrado o envolvimento de proteínas NAC na resposta ao estresse abiótico em várias culturas, incluindo a cana-de-açúcar. Ferro (2008) avaliou a expressão gênica no palmito de plântulas de cana-de-açúcar submetidas à restrição hídrica, através de duas abordagens de genômica funcional: identificação e análise de etiquetas de sequências expressas (ESTs) e análise de genes diferencialmente expressos utilizando macroarranjo de DNA complementar (cDNA). As plântulas foram submetidas à restrição hídrica por 17 dias e os palmitos foram coletados em 1, 5, 9, 13 e 17 dias após o início da restrição hídrica. Duas bibliotecas de ESTs de palmitos de plântulas não estressadas construídas pelo SUCEST foram utilizadas como controle. Um fator de transcrição da família NAC foi diferencialmente expresso durante o déficit hídrico, com aumento da expressão de acordo com o aumento do estresse.

Nogueira et al. (2005) também usando o banco de dados de ESTs de cana-de-açúcar (SUCEST), identificaram 26 membros da família de proteínas de domínio NAC, referidas coletivamente como NACs de *Saccharum sp* (SsNACs). Um desses genes, denominado SsNAC23, foi fortemente induzido a 4°C, mas não a 12°C, o que sugere que ele está envolvido na resposta ao estresse por baixas temperaturas. Esse mesmo gene também foi induzido em plantas submetidas ao déficit hídrico através de tratamento com polietilenoglicol (PEG), por um período máximo de 48 horas.

No nosso trabalho, o perfil de expressão do gene NAC não apresentou grandes alterações ao longo das épocas de déficit hídrico. Pode-se sugerir que o fator de transcrição NAC esteve controlando a expressão de genes alvos ao longo de todo o período de deficiência hídrica, entretanto, o mesmo mostrou-se um pouco mais expresso em 90 DAT e no tratamento de déficit hídrico severo (Figura 20a).

Nesse “cluster” também foi encontrado um gene que codifica a proteína SUMO E3 ligase.

A modulação da atividade das proteínas é fundamental para o funcionamento dos organismos vivos, particularmente durante rápidas mudanças ambientais, em que respostas fisiológicas devem ocorrer de maneira rápida e reversível. Essa modulação pode ocorrer pela adição de pequenas moléculas a proteínas alvos, um processo conhecido como modificação pós-traducional. Importantes modificadores de proteínas incluem não apenas fosfato, metil, acetil, lipídios e açúcares, mas também pequenos peptídeos. A ubiquitina é o exemplo mais importante desse último, mas uma série de modificadores semelhantes à ubiquitina tem sido descritos (CASTRO et al., 2012).

Um exemplo desses modificadores são as proteínas SUMO (“Small ubiquitin-like modifier”). Em contraste com a ubiquitina, onde a principal função é facilitar a degradação de proteínas, as proteínas SUMO funcionam como modificadoras da atividade das proteínas de regulação, além de atuarem na regulação do ciclo celular, na alteração da localização subcelular, na modulação da transcrição e nas interações proteína-proteína (LYZENGA; STONE, 2012).

Semelhante a via da ubiquitina, a via da sumoilação requer a ação sequencial de três enzimas (E1, E2 e E3). O processo de sumoilação começa com a ativação

da região C-terminal da SUMO por uma enzima de ativação E1. Em seguida, ocorre uma subsequente transferência para a enzima de conjugação SUMO E2, e então com a ajuda de uma E3 ligase, a SUMO é finalmente conjugada ao substrato protéico. As SUMO E3 ligases melhoram a etapa da conjugação (CATALA et al., 2007).

As proteínas SUMO podem ser removidas dos conjugados por SUMO proteases, com a proteína retornando então ao seu estado não modificado. Assim, o balanço entre as formas conjugadas/desconjugadas é um dos principais determinantes na modulação da função das proteínas SUMO. Essas modificações altamente reversíveis colocam as SUMO como rápidas reguladoras transcricionais em resposta ao estresse (CASTRO et al., 2012).

Em plantas, o aumento nos conjugados SUMO está intimamente relacionado à resposta a estímulos ambientais, incluindo o frio, o calor, a salinidade, a seca, a modulação de ácido abscísico e outros hormônios e a homeostase de nutrientes (ZHANG et al., 2013).

Catala et al. (2007) ao analisarem o genoma de *Arabidopsis thaliana* encontraram um gene que codifica uma E3 ligase SIZ1, expresso em todos os tecidos da planta, e verificaram a importância do mesmo em situação de déficit hídrico através de mutação. Comparado com o tipo selvagem, o mutante que não possuía a E3 ligase SIZ1 foi menor em estatura por causa da redução da expressão de genes envolvidos na sinalização e biossíntese de brassinoesteróides. Plantas mutantes *siz1-3* apresentaram significativamente menor tolerância ao déficit hídrico. Nesse trabalho, uma análise da expressão de todo o genoma de *A. thaliana* identificou aproximadamente 1.700 genes que foram induzidos pela seca, com SIZ1 sendo responsável pela expressão de aproximadamente 300 deles. Esses resultados indicam que a SUMO E3 ligase desempenha um papel essencial na resposta ao déficit hídrico através da regulação da expressão de genes.

No nosso trabalho, a expressão desse gene foi maior no tratamento de déficit hídrico severo e não alterou muito ao longo das épocas de déficit hídrico. Pode-se sugerir que a SUMO E3 ligase atuou modulando a transcrição e a atividade de proteínas reguladoras de vários processos fisiológicos, ao longo de todo o período de déficit hídrico, sendo esta uma forma de tolerância da planta (Figura 20a).

“Cluster” 4:

Nesse “cluster” foi encontrado um gene que codifica a enzima citocromo P450. Citocromos P450 monooxigenases são enzimas presentes nos procariontes, plantas e animais, que catalisam a oxidação de vários substratos. Em plantas, um grande número de genes P450 desempenha papéis importantes em vários processos. Eles catalisam etapas biossintéticas para uma grande variedade de metabólitos de plantas, incluindo pigmentos, compostos relacionados com a defesa, protetores de UV, lignina, ácidos graxos e fitohormônios. Dessa forma, o número de genes P450 codificado no genoma dos vegetais é mais elevado do que em outros organismos, o que reflete as grandes funções biológicas dos mesmos no metabolismo primário e secundário de plantas (MAO et al., 2013).

As reações catalisadas por estas enzimas são muito diversas, entretanto, elas envolvem geralmente a transferência de seus átomos de oxigênio para um substrato e redução de outro átomo para formar água na presença de NADPH e NADP (REICHHARTA; BAK; PAQUETTE, 2002; COON, 2005). A atividade desta enzima é alta em plantas se recuperando de estresse abiótico, incluindo estresse hídrico (KIM; TSUKAYA, 2002).

Gimenez et al. (2013) analisaram plântulas de cana-de-açúcar classificadas como tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico em condições de supressão da rega por 1, 3, 5 e 10 dias. Os palmitos de cana-de-açúcar das plantas controle e das plantas submetidas ao déficit hídrico foram analisados pela técnica de cDNA-AFLP. Neste trabalho, os autores também identificaram expresso um gene que codifica a enzima citocromo P450 na cultivar tolerante, indicando que o estudo desses genes é importante para compreender os mecanismos de tolerância à seca.

Em trabalho realizado por Ferro (2008) com plantas de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico, também foram identificados dois transcritos diferencialmente expressos da família de citocromos P450, sendo que um deles apresentou perfil de indução ao longo do período de 17 dias de déficit hídrico.

Kim e Choi (2010) testaram a função de citocromo P450 em situação de déficit hídrico, produzindo plantas de arroz transgênicas superexpressando o gene ATCYP78A7. As plantas transgênicas de arroz foram submetidas a dez dias de

supressão da rega juntamente com as do tipo selvagem (controle). Após sete dias de tratamento, as plantas selvagens passaram a apresentar sintomas de morte aparente, em contraste com as plantas transgênicas. Após a reidratação, observou-se que as plantas selvagens não conseguiram se recuperar, enquanto as plantas transgênicas voltaram ao seu estado normal, mostrando o papel desse gene na resposta de defesa das plantas.

No nosso trabalho, esse gene apresentou menor expressão em 30 e maior expressão em 90 DAT, aumentando, portanto, com a época de déficit hídrico. A expressão de citocromo P450 maior em 90 DAT pode sugerir que o mesmo atua na catálise de reações oxidativas de compostos endógenos e exógenos (que podem estar mais concentrados em 90 dias), e participa da síntese e metabolismo de muitos compostos importantes, que atuam como agentes de defesa vegetal (Figura 20a).

Outro gene encontrado no nosso trabalho com esse mesmo perfil de expressão foi o que codifica a proteinase aspártica. As proteases, também referidas como peptidases ou proteinases constituem uma grande categoria de enzimas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. As proteases que clivam ligações peptídicas nas regiões N ou C terminais de cadeias polipeptídicas são chamadas exopeptidases, e aquelas que clivam ligações peptídicas dentro da cadeia polipeptídica são classificadas como endopeptidases. As proteases podem ser classificadas como proteases aspárticas, cisteína, glutâmica, serina e treonina, dependendo dos aminoácidos presentes no sítio ativo, ou como metaloproteases se um íon de metal é requerido para a atividade catalítica. As aspárticas, também conhecidas como proteases ácidas, são uma subfamília de endopeptidases que tem sido isolada de diversas fontes, incluindo bactérias, vírus, fungos, plantas e animais (HSIAO, et al., 2014).

Elas são ativadas em pH ácido e estão envolvidas no processamento e ou degradação de proteínas em diferentes órgãos das plantas. Acredita-se que elas desempenham uma função na senescência de plantas, na resposta a estresses bióticos e abióticos, em processos de morte celular programada e na reprodução das plantas. Diferente das proteinases aspárticas de animais e microrganismos, as

proteínases aspárticas de plantas são relativamente pouco documentadas em relação as suas funções bioquímicas e biológicas (GUO et al., 2013).

O que é amplamente aceito, é que as proteases de plantas desempenham papéis chaves nas respostas a diversos estímulos ambientais e de desenvolvimento (GARCÍA-LORENZO et al., 2006).

Para elucidar as funções das proteínases aspárticas em resposta ao déficit hídrico, vários trabalhos têm sido realizados. Timotijevic et al. (2010) avaliaram um gene de proteínase aspártica (FeAP9) de trigo sarraceno em resposta a vários estresses. O déficit hídrico foi induzido pela retenção de rega em plantas completamente desenvolvidas. Folhas totalmente expandidas foram coletadas após, 3, 5, 7, 9, 11, 13 e 15 dias de seca. Através de PCR em tempo real, os autores descobriram que a expressão do gene FeAP9 foi induzida nas folhas do trigo sarraceno sob a influência de diferentes estresses abióticos, incluindo escuro, seca e luz UV-B, bem como ferimento e ácido salicílico. Os resultados mostram claramente a ativação do gene FeAP9 sob condições de estresse, e sugere um importante papel desta enzima na resposta anti-estresse do trigo sarraceno.

Yao et al. (2012) também analisaram um gene de *Arabidopsis thaliana* que codifica uma proteínase aspártica, chamado ASPG1, que pode atuar na prevenção dos efeitos da seca através da sinalização do ácido abscísico em células guarda. A superexpressão do gene ASPG1 aumentou a sensibilidade ao ABA em células guarda e reduziu a perda de água em plantas transgênicas. Nas plantas transgênicas, alguns alvos “downstream” nas vias de sinalização do ABA e ou seca foram alterados em vários níveis, sugerindo o envolvimento de ASPG1 dependente de ABA na prevenção da seca em *Arabidopsis*. Ao analisar a atividade de vários antioxidantes, incluindo superóxido dismutase e catalase nas plantas transgênicas, foi demonstrada a existência de um sistema de detoxificação eficaz para a prevenção da seca nessas plantas.

No trabalho realizado por Guo et al. (2013) foi analisado o perfil de expressão de genes que codificam proteínases aspárticas de uva (VvAP) em seis diferentes tecidos, e a abundância de transcritos sob vários estresses e tratamentos hormonais foram medidos. Para determinar se os genes VvPA eram sensíveis a estresses osmóticos em folhas de uva, a técnica de RT-PCR semi-quantitativa foi usada para

testar a abundância de transcritos sob tratamentos de estresse hídrico e salino. Vinte e sete genes VvPA foram expressos pelo menos em um dos seis tecidos examinados, 19 VvPA responderam no mínimo a um estresse abiótico, 12 VvPAs responderam a uma poderosa infecção por oídio, e a maioria dos VvPA responderam a tratamentos de ácido salicílico e ABA. Os transcritos VvAP28 e VvAP29 aumentaram em resposta a seca, indicando o envolvimento das proteinases aspárticas na resposta de tolerância ao déficit hídrico.

No nosso trabalho, o gene que codifica a proteinase aspártica aumentou a expressão em 90 DAT, indicando que ele pode estar envolvido nos processos de senescência e morte celular programada, que são indentificados no período mais prolongado de déficit hídrico (Figura 20a).

“Cluster” 5:

Nesse “cluster” foi identificado um gene que codifica uma proteína de controle da divisão celular. A proteína de controle da divisão celular 50 (CDC50/LEM3) pertence a uma família de proteínas de membranas que é necessária para a translocação de fosfolipídio através da membrana plasmática em *Saccharomyces cerevisiae* (KATO et al., 2002), e na interação de várias subunidades ALA em plantas, que são proteínas envolvidas na translocação de lipídios e na formação de vesícula secretora (POULSEN et al., 2008).

Poulsen et al. (2008) mostraram que mutações no aminofosfolipídio ATPase 3 (ALA3) de *Arabidopsis thaliana*, localizado no complexo de Golgi, resultavam em comprometimento do crescimento de raízes e brotos. O defeito de crescimento é acompanhado pela incapacidade da coifa da raiz em liberar as células da borda envolvidas na secreção de moléculas requeridas para eficiente interação da raiz com o ambiente. Os mutantes *ala3* são desprovidos das características de proliferação de vesícula contendo polissacarídeos e enzimas para secreção. Já tem sido demonstrado que membros da família de CDC50/Lem3p em levedura estavam envolvidos no tráfico de P4-ATPases. Estas são proteínas integradas de membrana, que se estendem para dentro do lúmen das organelas ou para o espaço extracelular, dependendo da localização de proteínas.

Isso sugere que a presença da proteína de controle da divisão celular, com maior expressão em 60 DAT no nosso trabalho, interage com ALA3, possibilitando a secreção de moléculas para interação com o ambiente. Depois de ter possibilitado isso nesse período, ocorreu uma diminuição da expressão desse gene em 90 DAT, possivelmente por ser uma época em que as plantas já desencadearam os mecanismos necessários para a sobrevivência e para se manterem sob condições estressantes. Como esse gene foi menos expresso no tratamentos de déficit hídrico severo em relação ao controle, podemos sugerir que o controle da divisão celular foi mais afetado em situação de seca. (Figura 20b).

Também foi encontrado nesse “cluster” um gene que codifica uma proteína chaperona específica de tubulina. “Heat Shock Proteins” (HSP), também conhecidas como “stress proteins” ou ainda como chaperonas moleculares, estão envolvidas na conformação de outras proteínas, inclusive das recém-formadas, regulando o enovelamento e impedindo a agregação protéica. Durante uma condição de estresse, a expressão gênica pode ser afetada, atingindo processos e moléculas importantes para a atividade celular, como alterações no citoesqueleto. Como as plantas estão sempre sujeitas a condições de estresse, elas possuem uma complexa rede de genes que codificam várias proteínas HSP importantes para a tolerância a essas condições estressantes (HUANG; XU, 2008; SREEDHAR; VANATHI; PAITHANKAR, 2010; ZHICHANG et al., 2010).

Existe uma forte interação entre o dobramento de proteínas celulares e sistemas de degradação mediados por chaperonas. Tem sido observado que HSPs induzidas por déficit hídrico previnem a agregação de proteínas e a desnaturação durante o mesmo. O crescimento celular, assim como a fotossíntese, estão entre os primeiros processos que são afetados pelo déficit hídrico (VASEVA et al., 2012).

Muito importante no ciclo celular são os microtúbulos, que são compostos de polímeros de proteínas tubulina. O monômero de tubulina dos microtúbulos é um heterodímero composto de um polipeptídeo α e um β tubulina. Existem cinco chaperonas específicas de tubulinas (TBCs) denominadas TBCA-TBCE. TBCA e TBCB se ligam e estabilizam polipeptídios α e β tubulina quase nativas. Essas chaperonas específicas de tubulina funcionam juntas como uma máquina de montagem de tubulinas, unindo as subunidades α e β em um heterodímero

firmemente associado. A existência dessa via evolutivamente conservada explica porque nunca tem sido possível isolar α ou β como entidades independentes estáveis na ausência dos seus parceiros cognatos (TIAN; COWAN, 2013).

Esse complexo de chaperonas TBCA-E específico de tubulina pode não somente montar heterodímeros alfa e beta tubulina, mas também atuar no sentido inverso para interromper esses heterodímeros, levando a degradação de tubulinas e desestabilização de microtúbulos (TIAN; SIMI; COWAN, 2010).

Em trabalho realizado por Bagniewska-Zadworna (2008), objetivou-se estimar a taxa de germinação das mudas de *Brassica napus* tolerantes a dessecação, examinando as consequências dessa condição na distribuição, estabilidade e orientação dos microtúbulos em diversas células. Em baixa intensidade de estresse por dessecação, pequenas mudanças no comportamento dos microtúbulos foram observadas. Uma dessecação mais intensa provocou a despolimerização dos microtúbulos, em que agregados anormais de tubulina foram observados. Sob essas condições não foram observadas divisões celulares. Devido aos defeitos dos microtúbulos observáveis, a hipersensibilidade deles no citoesqueleto pode ser um parâmetro simples e útil para estimar a intensidade do estresse ambiental. Os resultados obtidos nesse trabalho e em outros estudos indicam, portanto, que os microtúbulos corticais participam na adaptação das plantas a estresses ambientais.

A resposta ao estresse salino também inclui uma rápida despolimerização de microtúbulos, seguida pela formação de novos microtúbulos que acredita-se serem mais adequados para a sobrevivência celular em condições de alta salinidade. O papel do proteassoma e das chaperonas específicas de tubulina na degradação de tubulinas liberadas pela despolimerização dos microtúbulos tem sido documentado em plantas e animais. A estabilidade dos microtúbulos dependente do proteassoma é essencial para a reestruturação das matrizes de microtúbulos e o ajuste na dinâmica dos mesmos (WANG et al., 2011).

Dessa forma, pode-se sugerir que durante o déficit hídrico ocorre a despolimerização dos microtúbulos e agregados de tubulina, e as chaperonas específicas de tubulina atuam impedindo a formação desses agregados, destinando proteínas desnaturadas à degradação pelo proteassoma 26S. Atuando dessa maneira, as chaperonas específicas de tubulina possibilitam que a divisão celular

continue, garantindo o desenvolvimento das plantas, ainda que em níveis mais baixos durante o déficit hídrico prolongado. No nosso trabalho, o aumento da expressão do gene que codifica essa proteína em 60 DAT, pode estar associado com o fato de as plantas terem mais interferência do estresse durante o ciclo celular nesse período (Figura 20b).

“Cluster” 6:

No nosso trabalho foi encontrado nesse “cluster” um gene que codifica a proteína “ethylene insensitive 2” (EIN2). O fitohormônio etileno é uma molécula gasosa que regula muitos aspectos da fisiologia e desenvolvimento das plantas, incluindo o desenvolvimento de mudas, senescência de folhas e flores, amadurecimento de frutos, determinação do sexo floral, desenvolvimento dos pêlos radiculares e respostas a estresses bióticos e abióticos. Estudos genéticos têm identificado componentes chaves na via de sinalização do etileno (WANG; KONG; MA, 2009).

A via de sinalização desse hormônio é complexa, devido ao grande número de genes que estão envolvidos e os múltiplos processos e respostas que são regulados. A via de sinalização inclui os receptores do etileno ETR1, ETR2, ERS1, ERS2 e EIN4, que estão localizados no retículo endoplasmático e conectados a uma proteína quinase de resposta negativa constitutiva tripla 1 (CTR1). Na ausência do etileno, CTR1 regula negativamente a proteína “ethylene insensitive 2” (EIN2), enquanto que na presença do hormônio, os receptores desativam o regulador negativo CTR1. Uma vez desativado, um peptídeo sinal (EIN2C) é clivado a partir de EIN2 e transportado para o núcleo, onde a transcrição dos genes dependentes das proteínas “ethylene insensitive” 3 (EIN3) e “ethylene insensitive” 1 (EIL1) é ativada (KRANNICH et al., 2015).

Entre os genes envolvidos na sinalização do etileno, o EIN2 é o mais misterioso. A perda de função no mutante ein2 mostrou insensibilidade completa ao etileno em todas as respostas reguladas por esse hormônio, indicando seu papel extremamente importante e central na via de sinalização (JI; GUO, 2013). Assim, EIN2C pode ter duas localizações e papéis separados na sinalização do etileno: 1)

ativando e/ou estabilizando EIN3 e EIL1 no núcleo, e 2) inibindo a tradução dos transcritos de EBF1 e EBF2 (proteínas F-box que destinam EIN3 e EIL1 a degradação) nos corpos de processamento do citoplasma (ZHANG; WEN, 2015).

Diferentes elementos da via de sinalização do etileno foram propostos por serem associados com respostas ao estresse hídrico e salino (KRANNICH et al., 2015). Vários trabalhos têm sido realizados para verificar o envolvimento de EIN2 na resposta a estresses bióticos e abióticos. Huang et al. (2015) utilizaram a técnica de cDNA – SRAP para identificar genes que pudessem estar envolvidos na resposta da cana-de-açúcar a infecção por *Sporisorium scitamineum*, fungo causador do carvão. No total, 21 bandas com expressão diferencial significativa durante a análise de CDNA-SRAP foram clonadas e sequenciadas. O alinhamento de sequências indicou que 18 dos 19 genes diferencialmente expressos mostraram homologia entre 19 e 100% para certos genes no GenBank, incluindo os seguintes genes: topoisomerase (EU048780), “ethylene insensitive” (EU048778), e tetraspaninas (EU048770). Um ensaio de PCR em tempo real demonstrou que durante 0-72h após a infecção patogênica, a expressão dos genes da topoisomerase e do “ethylene insensitive” foram induzidas, enquanto a expressão do gene tetraspaninas foi reprimida. Esse padrão de expressão também foi observado sob tratamento com ácido salicílico, indicando que esses genes estavam envolvidos na resposta ao estresse biótico.

Arraes et al. (2015) também encontraram resultados envolvendo EIN2 em seu trabalho. Eles analisaram sementes de soja das variedades BR16 e EMBRAPA48, que são sensíveis e tolerantes ao déficit hídrico, respectivamente, quando germinadas e crescidas em casa de vegetação sob sete períodos de déficit hídrico (0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 min). Para cada período foram coletadas raízes e folhas para as análises. A expressão diferencial de um conjunto de cinco genes relacionados ao etileno em soja (MAT, ACS, ACO, ETR e CTR) foi validada com experimentos de PCR em tempo real que confirmaram as variações na expressão desses genes em soja. Em particular, duas famílias de genes de biossíntese de etileno (ACS e ACO) foram induzidas sob essas condições experimentais, enquanto CTR1 (envolvido na transdução de sinal de etileno) foi reprimido. Nas mesmas amostras, foram detectados altos níveis de produção de etileno, indicando o

envolvimento da biossíntese e sinalização do etileno na resposta da soja ao déficit hídrico.

Cao, Chen e Zhang (2008) também avaliaram o envolvimento de EIN2 na resposta ao estresse salino em *Arabidopsis thaliana*. Os mutantes sem EIN2 apresentaram completa insensibilidade ao etileno nos níveis morfológicos, fisiológicos e moleculares em plantas de *Arabidopsis*. Sob estresse salino, o mutante *ein2-1* foi severamente afetado tanto no crescimento das plântulas, quanto no processo de germinação de sementes, sugerindo que EIN2 é necessário para tolerância ao estresse salino. O envolvimento de EIN2 na resposta de tolerância ao estresse por chumbo em *Arabidopsis* também tem sido observado (CAO et al., 2009).

No nosso trabalho foi verificado aumento da expressão do gene que codifica EIN2 em 30 DAT, com a expressão diminuindo ao longo dos períodos de déficit hídrico. Isso pode estar relacionado com a resposta de tolerância ao déficit hídrico, uma vez que o etileno é um hormônio responsável pelo envelhecimento da planta, e não se apresentando em níveis elevados na mesma, pode permitir que elas se mantenham em condições morfológicas e fisiológicas ainda adequadas em déficit hídrico prolongado (Figura 20b).

Nesse “cluster” também foi encontrado outro gene que codifica uma proteína F-box. A função dessa proteína na resposta ao déficit hídrico já foi descrita na discussão do “cluster” 2.

“Cluster” 7:

Nesse “cluster” foi encontrado um gene que codifica uma proteína contendo domínio NB-ARC, o qual é encontrado em bactérias e eucariotos (FALEIROS, 2014).

A maioria das proteínas de resistência em plantas (proteínas R) contém um domínio de ligação de nucleotídeo (NB) e um domínio C-terminal com repetição rica em leucina, pertencendo a denominada família de proteínas NB-LRR. O domínio mais conservado em proteínas NB-LRR é o NB que é encontrado em proteínas APAF-1 de humanos, proteínas R de plantas e proteínas CED-4 de *Caenorhabditis elegans*, sendo por isso referido como domínio NB-ARC (WEN et al., 2015).

Vários motivos conservados têm sido identificados através do domínio NB-ARC em proteínas R. O domínio NB-ARC regula a atividade dessas proteínas, conferindo especificidade para o sistema imune inato em plantas (TAMELING et al., 2006; apud FALEIROS, 2014). Por ser um domínio presente em várias famílias de proteínas como G e ATPases, ele promove a hidrólise de nucleotídeos trifosfatados (ATP e GTP) em proteínas que atuam como sinalizadoras celulares (BELKHADIR, 2004).

Alguns trabalhos têm verificado a presença de proteínas com domínio NB-ARC em resposta a estresses bióticos e abióticos. Dabbas (2009) ao estudar os mecanismos moleculares envolvidos no processo de defesa de duas variedades de cana-de-açúcar, uma resistente e outra suscetível a infecção por *Xanthomonas albilineans* (bactéria causadora da escaldadura da folha na cultura da cana-de-açúcar), verificou alguns genes induzidos nas plantas após a inoculação, entre eles: o citocromo P450, uma proteína F-box e uma provável proteína contendo o domínio NB-ARC, envolvida no mecanismo de resistência.

Silveira et al. (2015) ao analisarem a expressão de genes relacionados a resposta à seca em tecidos de folhas de duas cultivares brasileiras de arroz, uma tolerante e outra sensível à seca, verificaram a presença de 65 genes relacionados a categoria “resposta ao estresse”, sendo 6 deles induzidos pela seca. Entre esses genes estava um que codificava uma proteína contendo domínio NB-ARC, mostrando a importância desse domínio na tolerância ao déficit hídrico.

Talukder, et al. (2015) também avaliaram o efeito do déficit hídrico em “tall fescue” (uma planta conhecida como festuca, pertencente a família Poaceae, cultivada nos Estados Unidos). O perfil do transcriptoma de um genótipo tolerante e outro sensível ao déficit hídrico foi analisado. Amostras de RNA de folhas, caules, raízes e inflorescências foram agrupadas e sequenciadas pela plataforma Illumina. Os domínios zf-RING_2, UDPGT, NB-ARC, Sugar_tr e transferase foram encontrados entre os 10 principais domínios que apareceram mais frequentemente no banco de dados de contigs.

No nosso trabalho, o gene que codifica uma proteína contendo esse domínio teve maior expressão em 90 DAT e sob o tratamento de déficit hídrico severo, evidenciando a grande importância desse domínio na resposta ao déficit hídrico,

uma vez que ativa a resposta imune inata das plantas, sendo um potencial candidato para programas de melhoramento (Figura 20b).

Outro gene também encontrado nesse “cluster” é o que codifica a enzima serina treonina quinase. Proteínas quinases e fosfatases são enzimas que catalisam a transferência do fosfato entre os seus substratos. Uma proteína quinase catalisa a transferência de γ -fosfato de ATP (ou GTP) para os substratos protéicos enquanto a proteína fosfatase catalisa a transferência do fosfato de uma fosfoproteína para uma molécula de água. Entre os vários tipos de modificações pós-traducionais, a fosforilação e a desfosforilação de proteínas são as modificações mais predominantes que regulam a estrutura e a função de proteínas celulares em um amplo espectro de processos celulares, variando do controle do destino celular a regulação do metabolismo. Dessa forma, a fosforilação pode resultar na ativação ou inativação de proteínas. Um exemplo da importância das quinases nos diferentes processos biológicos é que ainda que os genes dessas proteínas constituam apenas 2% da maioria dos genomas eucarióticos, elas fosforilam mais de 30% das proteínas celulares (CHENG et al., 2011).

Assim, a fosforilação proteica compreende também um dos principais e mais importantes mecanismos de controle do funcionamento celular em resposta a sinais externos (BARTELS; SUNKAR, 2005). Os receptores quinases normalmente estão localizados na membrana plasmática, que é a posição ideal para eles perceberem diretamente os sinais extracelulares (TAIZ; ZEIGER, 2013).

Os receptores como quinases (RLK) podem ser divididos em três subclasses principais de acordo com a especificidade dos diferentes substratos entre os domínios quinases. As subclasses são os receptores tirosina quinase que estão envolvidos na fosforilação de resíduos de tirosina, as serina treonina quinases que fosforilam resíduos de serina e treonina, e as histidinas quinases que fosforilam resíduos de histidina. Os receptores serina treonina quinases interagem com outras proteínas para realizar uma ampla gama de processos (AFZAL; WOOD; LIGHTFOOT, 2008).

Devido à sua importância, a utilização de proteínas quinases em plantas transgênicas através da regulação de genes, torna-se uma estratégia bastante promissora na obtenção de maior tolerância a estresses abióticos (SHINOZAKI;

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Um exemplo da importância dessas proteínas na tolerância ao déficit hídrico prolongado é a presença das mesmas em todos os “clusters” do nosso trabalho (Figura 20b).

No trabalho realizado por Vantini et al. (2015), foi anotado o receptor serina treonina quinase expresso em raízes de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico. Neste estudo, o receptor de serina treonina quinase que pertence à superfamília do inibidor de ribonuclease com repetição rica em leucina foi identificado no primeiro período de estresse.

Khan et al. (2014) ao analisarem o sequenciamento de uma biblioteca subtrativa de cDNA preparada a partir de tecido foliar, também encontraram uma proteína putativa de serina treonina quinase induzida em cana-de-açúcar por encharcamento.

No nosso trabalho, o gene que codifica o receptor serina treonina quinase com aumento da expressão em 90 DAT e em condições de déficit hídrico severo, pode estar atuando em conjunto com uma cascata de sinalização em resposta ao caráter de tolerância à seca (Figura 20b).

“Cluster” 8:

Nesse “cluster” foi encontrado um gene que codifica a superfamília de proteínas de fatores de transcrição AP2/EREBP.

A família de genes de fatores de transcrição AP2/EREBP (“APETALA2/ethylene-responsive element binding protein”) é caracterizada pela presença de um domínio de ligação ao DNA (chamado AP2). Essa família de genes é dividida em quatro subfamílias: AP2, DREB, ERF e RAV, e essa classificação baseia-se na presença de um ou dois domínios AP2. O nome da família foi determinado com base no membro fundador APETALA2 primeiramente caracterizado por Jofuku et al. (1994) (DIETZ; VOGEL; VIEHHAUSER, 2010).

Como o nome indica, essa família de fatores de transcrição é responsiva ao etileno. Esse hormônio vegetal é importante em muitos processos fisiológicos das plantas e induz respostas relacionadas aos diferentes estresses. Como o nível de transcrição de um gene é determinante importante da sua expressão, os

mecanismos moleculares pelos quais a transcrição gênica é regulada são de interesse crescente dos pesquisadores e têm se tornado um dos principais pontos de estudos em biologia molecular envolvendo o etileno (ITO et al., 2012). Entre os diferentes fatores de transcrição dessa família, os ERFs (“Ethylene Response Factor”) constituem o maior grupo (DIETZ; VOGEL; VIEHHAUSER, 2010) e são essenciais para o desenvolvimento das plantas, além de importantes reguladores das repostas de defesa das mesmas. Os ERFs são, portanto, os últimos elementos da cascata transcricional que constituem uma ampla família multigênica (ITO et al., 2012).

Como já comentado, os fatores de transcrição AP2/EREBP estão envolvidos na resposta a diversos estresses como temperaturas extremas (danos por congelamento ou elevadas temperaturas), seca, alta salinidade e infecção por patógeno (CHEN et al., 2016). Dessa forma, diversos estudos têm sido realizados mostrando o envolvimento desses fatores de transcrição na resposta ao estresse.

Um exemplo desses trabalhos é o de Chen et al. (2016) que analisaram a expressão de genes da família AP2/EREBP em resposta ao estresse em *Brachypodium distachyon*. A expressão de AP2/EREBP em diferentes tecidos e a expressão da subfamília DREB/ERF em *B. distachyon*, trigo e arroz sob estresse abiótico foram investigadas por sequenciamento de nova geração e perfis de microarranjo. Um total de 147 genes AP2/EREBP foram submetidos a análise de expressão sob as condições de estresse por frio, calor, seca e alta salinidade. Plantas de *Brachypodium* transgênicas superexpressando o gene Bradi4g35630 da subfamília DREB, exibiram um aumento da tolerância à seca e ao estresse por sal bem como por baixas temperaturas.

Trujillo et al. (2008) também fizeram estudos com AP2/EREBP em cana-de-açúcar. Eles descreveram em seu trabalho o SodERF3, um cDNA de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L. cv Ja60-5) que codifica uma proteína de ligação ao DNA de 201 aminoácidos que atua como reguladora transcricional da superfamília do fator responsivo ao etileno (ERF). Análises de Northern e Western blot mostraram que SodERF3 é induzido por etileno, ABA, estresse salino e ferimento. Plantas de tabaco transgênicas cultivadas em casa de vegetação (*Nicotiana tabacum* L. cv. SR1) expressando SodERF3 mostraram aumento da

tolerância à seca e ao estresse osmótico, uma característica desejada para engenharia das culturas.

No nosso trabalho, o gene que codifica essa família de fator de transcrição teve sua expressão aumentada ao longo das épocas de estresse, com o perfil mais expressivo no tratamento de déficit hídrico moderado. Isso sugere que esses fatores de transcrição poderiam atuar nas respostas de defesa das plantas por meio da ativação ou repressão de genes em todas as épocas de estresse, tendo sido mais induzidos no período mais prolongado (90 DAT), quando as plantas sofrem mais com o longo período de deficiência hídrica (Figura 20b).

Outro fator de transcrição encontrado nesse “cluster” é o WRKY. Esses fatores de transcrição são uma das maiores famílias de reguladores transcricionais em plantas e formam parte integrante das vias de sinalização que modulam muitos processos nos vegetais. Novas descobertas mostram que muitas vezes as proteínas WRKY atuam como ativadoras e repressoras de importantes processos nas plantas. Além disso, é bem estabelecido que um único fator de transcrição WRKY pode estar envolvido na regulação de vários processos aparentemente diferentes (RUSHTON, et al., 2010).

Dessa forma, as proteínas WRKY formam uma grande família de fatores de transcrição envolvida na regulação do desenvolvimento, senescência e resistência ao estresse (ZHU et al., 2013). A modificação dos padrões de expressão dos genes WRKY e/ou mudanças na atividade deles contribuem para a elaboração de várias vias de sinalização e redes regulatórias. Com isso, um único gene WRKY muitas vezes pode responder a diversos fatores de estresse e as suas proteínas podem participar na regulação de vários processos como reguladores negativos ou positivos (CHEN et al., 2012).

Esse comportamento de expressão imediata de genes WRKY garante o sucesso da transdução de sinal para ativar respostas adaptativas que resultam na tolerância das plantas ao estresse (CHEN et al., 2012).

Prabu et al. (2011) avaliaram o envolvimento desse gene na resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar. Nesse trabalho, os autores submeteram a variedade de cana-de-açúcar cv. Co740 a vários níveis de estresse por deficiência hídrica para isolar transcritos diferencialmente expressos ao estresse imposto. A

técnica de cDNA subtrativa foi utilizada para detectar genes diferencialmente expressos sob condições de estresse. A anotação das ESTs diferencialmente expressas na cultivar moderadamente tolerante ao déficit hídrico previu que a maioria das proteínas codificadas estava envolvida na organização celular, metabolismo de proteínas, transdução de sinal e transcrição. As proteínas reguladoras encontradas nessas ESTs incluíam o fator de transcrição contendo o domínio AP2, MYB, WRKY, LIM e fator de splicing snRNP. Esses fatores de transcrição têm sido relatados anteriormente como parte da via de regulação transcricional celular na resposta ao estresse hídrico e salino.

Chu et al. (2015) também avaliaram o gene WRKY em resposta ao déficit hídrico em algodão. Nesse estudo, o gene WRKY de *Gossypium hirsutum* (GhWRKY41) foi isolado e transformado em *Nicotiana benthamiana*. Os resultados mostraram que a superexpressão de GhWRKY41 aumentou a tolerância à seca e ao estresse salino em plantas de tabaco transgênicas, funcionando como regulador positivo do fechamento dos estômatos e regulando a eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a expressão de genes antioxidantes.

No nosso trabalho o gene que codifica o fator de transcrição WRKY também apresentou aumento da expressão ao longo das épocas de estresse e sob condição de déficit hídrico moderado. Esse gene, assim como o de AP2/EREBP, provavelmente esteve regulando a ativação e repressão de genes em resposta ao déficit hídrico prolongado (Figura 20b).

4.2.8 Relação dos genes exclusivos da cultivar tolerante na resposta ao déficit hídrico prolongado

Todos os genes descritos no item 4.2.7 são exclusivos da cultivar tolerante SP81-3250 e podem estar envolvidos na resposta ao déficit hídrico prolongado. Embora o papel desses genes nos mecanismos de defesa das plantas aos estresses abióticos esteja bem estabelecido na literatura, ainda não se tinham relatos a respeito de como eles atuariam e se atuariam em todas as épocas de déficit hídrico prolongado em cana-de-açúcar, uma vez que a maioria dos trabalhos sobre estresse hídrico nessa cultura foi realizada em curtos períodos de estresse.

Como a cana-de-açúcar tem um genoma muito complexo, qualquer informação a respeito do déficit hídrico prolongado, já contribui muito para demais pesquisas na área. Dependendo do objetivo do programa de melhoramento e dos produtores nas áreas cultiváveis, pode-se optar pela transformação genética utilizando genes mais expressos em 30, 60 ou 90 DAT e em condições mais moderadas ou severas de estresse.

É bem estabelecido na literatura que a seca desencadeia a produção do fitohormônio ácido abscísico (ABA), o qual resulta no fechamento dos estômatos e na indução da expressão de genes relacionados ao estresse. Desse modo, existem sistemas regulatórios que controlam a expressão de genes induzidos pela seca que são ABA-dependentes e/ou ABA-independentes (YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). Além disso, os produtos dos genes induzidos pela seca podem, segundo Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007), ser classificados em dois grupos.

O primeiro grupo, composto por proteínas regulatórias envolvidas na regulação da transdução de sinal e da expressão gênica ocasionada pelo estresse, compreende proteínas quinases, proteínas fosfatases, vários fatores de transcrição, enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolipídios e outras moléculas sinalizadoras (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007).

O segundo grupo inclui as proteínas que desempenham, muito provavelmente, um papel importante na tolerância ao estresse abiótico (proteínas funcionais). Entre elas estão as chaperonas, as proteínas LEA (“late embryogenesis abundant proteins”) a osmotina, as proteínas anticongelantes, as proteínas ligantes de RNAm, enzimas chaves para a biossíntese de osmólitos (prolina e açúcares), proteínas que formam canais de água, transportadores de açúcar e prolina, enzimas de detoxicação e várias proteases. (ZHANG; CREELMAN; ZHU, 2004, BARTELS; SUNKAR, 2005; UMEZAWA et al., 2006; apud FERRO, 2008) (Figura 23).

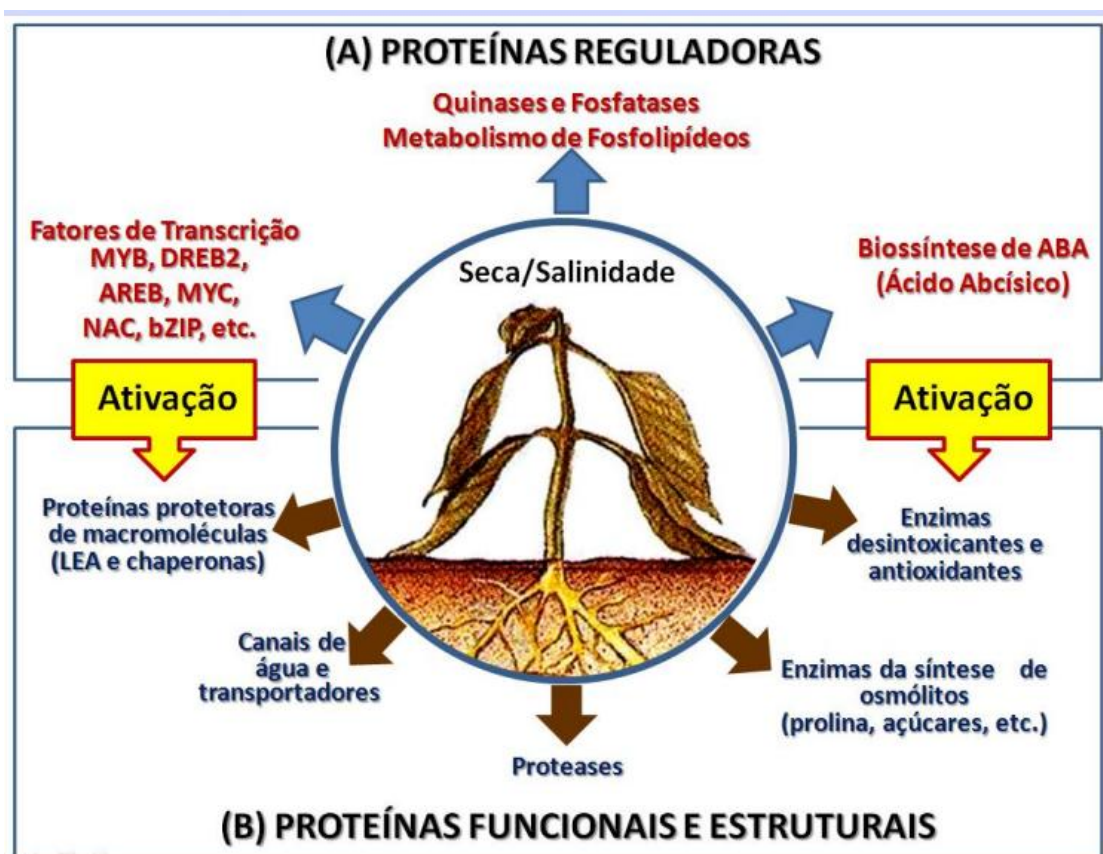


Figura 23. Principais categorias de genes envolvidos na resposta de angiospermas a estresses abióticos como seca e salinidade. O grupo A inclui fatores envolvidos na regulação e transdução de sinais (proteínas reguladoras) reconhecidamente ativadas após o estresse. Tais proteínas induzem cascatas de sinais envolvendo algumas proteínas do grupo B, consideradas funcionais e estruturais, envolvidas nos mecanismos de tolerância aos estresses citados. Fonte: BENKO-ISEPPON et al., 2011.

Entre os genes selecionados no nosso trabalho, foi encontrado no grupo de proteínas reguladoras (A) um gene que codifica uma serina treonina quinase, genes que codificam os fatores de transcrição NAC, “zinc finger”, AP2/EREBP, WRKY e genes induzidos por ABA. Pertencentes ao segundo grupo foram encontrados genes que codificam enzimas antioxidantes como glutathione-S-transferase, protease (proteinase aspártica) e proteínas protetoras de macromoléculas (chaperona específica de tubulina). Todos esses genes possivelmente estão atuando em conjunto na resposta de defesa das plantas ao déficit hídrico prolongado.

As proteinases aspárticas envolvidas em processos de degradação de proteínas e maturação podem explicar as reduções das variáveis fisiológicas, já que sua expressão aumentou com o período de déficit hídrico. As serinas treoninas quinases também podem sinalizar importantes mecanismos que envolvem a redução das variáveis fisiológicas, já que também teve sua expressão aumentada com as épocas de déficit hídrico.

Via de sinalização do etileno

Entre todos os genes relatados nesse trabalho, um que apresentou um perfil de expressão diferente do esperado, foi o que codifica a proteína EIN2 responsiva ao etileno, mais expresso em 30 DAT (“cluster” 6). Como o etileno é um hormônio relacionado ao amadurecimento vegetal, incluindo processos de senescência, esperava-se uma maior expressão desse gene em 90 DAT. Obviamente se prolongássemos mais ainda o período de estresse, altos níveis de expressão dos genes relacionados a essa via de sinalização do etileno seriam detectados, uma vez que a planta entra em algum momento, na fase de envelhecimento. Esse resultado fez com que investigássemos em mais detalhes a via de sinalização do etileno e como ela estaria atuando na resposta de tolerância da cultivar SP81-3250 ao déficit hídrico prolongado.

O funcionamento da via de sinalização do etileno ainda não está completamente estabelecido. Em trabalho realizado por Ji e Guo (2013) foi proposto o seguinte modelo (Figura 24):

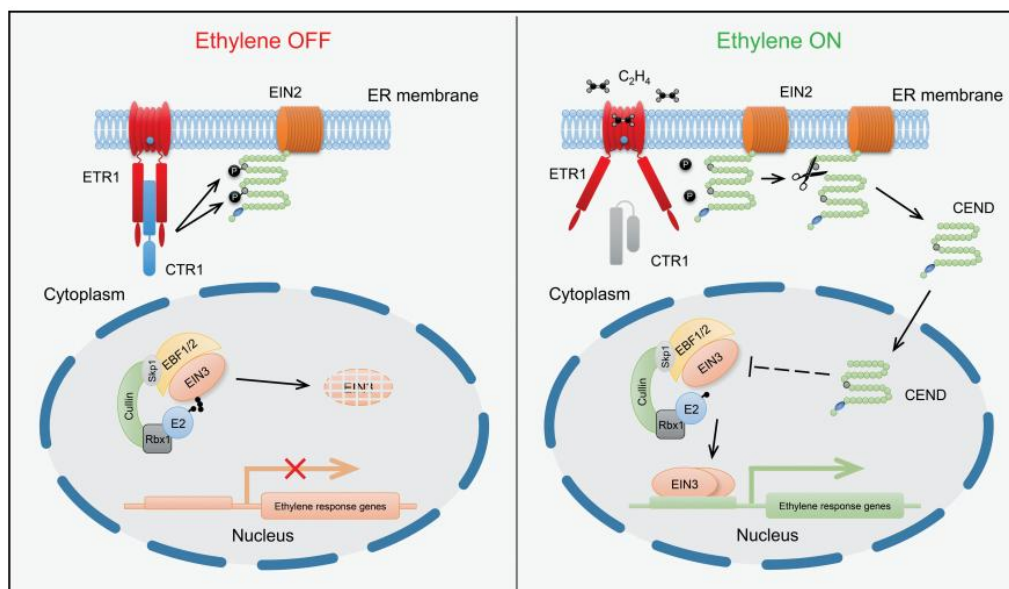


Figura 24. Modelo da sinalização do etileno proposto por Ji e Guo (2013). Na ausência de etileno, CTR1 (regulador negativo da resposta ao etileno) fosforila EIN2, impedindo a clivagem e translocação de EIN2 para o núcleo. As proteínas F-box EBF1 e EBF2 então medeiam a degradação de EIN3 no núcleo pelo sistema ubiquitina proteassoma. Na presença do etileno, a ligação do hormônio conduz a inativação dos receptores de etileno, localizados na membrana do retículo endoplasmático, e de CTR1, resultando na desfosforilação de EIN2, e assim, na sua clivagem. Tendo uma NLS (sequência de localização nuclear) funcional, o fragmento C-terminal clivado de EIN2 é então transportado para o núcleo e participa na estabilização de EIN3 e ativação de genes downstream (como os fatores da transcrição da família AP2/EREBP).

Mais recentemente, Li et al. (2015) propuseram um outro modelo (Figura 25) para a via de sinalização do etileno, complementar ao de Ji e Guo (2013):

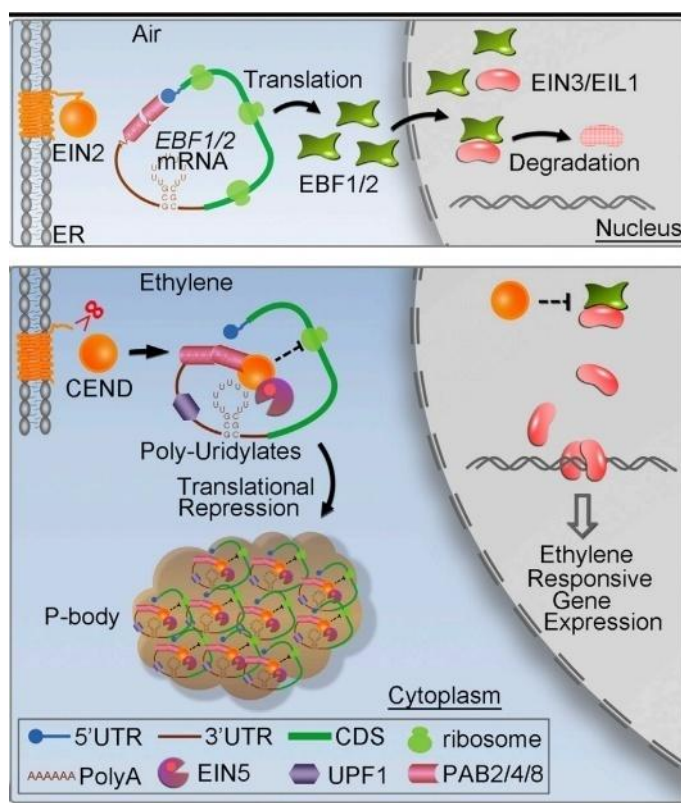


Figura 25. Modelo de sinalização do etileno. Nesse modelo são mostrados outros mecanismos de sinalização do etileno mediados por EIN2, por meio do qual essa proteína impõe a repressão traducional do RNAm EBF1 e EBF2. Nesse esquema, EIN2 é clivada e transportada para o núcleo. No entanto, essa clivagem e transporte podem representar parte da ação de EIN2 como uma localização nuclear induzida de CEND (C-terminal de EIN2) para ativar apenas parcialmente a sinalização do etileno. Um dos mecanismos reguladores chave da sinalização do etileno é a estabilização de proteínas EIN3/EIL1, em que o etileno atua para reprimir a degradação proteossômica dessas proteínas pelas proteínas F-box (EBF1-EBF2), de maneira dependente de EIN2. A expressão ectópica de qualquer fragmento 3'-UTR de EBF1 e EBF2 confere fenótipos com forte insensibilidade ao etileno através da promoção da tradução de RNAs EBF1/2 endógenos. A função citoplasmática de EIN2 é fundamental para desligar rapidamente a síntese proteica de EBF1/2, o que leva à rápida depleção de proteínas EBF1/2 devido à sua degradação proteossômica. Enquanto isso, um subconjunto de CEND é translocado para dentro do núcleo para estabilizar ainda mais e/ou ativar EIN3/EIL1 direta ou indiretamente.

De acordo com os resultados obtidos e as informações disponíveis na literatura acima mencionadas, um modelo de como a via de sinalização do etileno estaria funcionando na cultivar tolerante de cana-de-açúcar no nosso trabalho em condição de déficit hídrico prolongado foi proposto (Figura 26).

Ao analisarmos todos os períodos de déficit hídrico, foi verificado que a concentração interna de CO₂ aumentou em 60 DAT, e se manteve relativamente alta em 90 DAT, enquanto a expressão de EIN2 diminuiu nesses dois períodos. O CO₂ é um dos inibidores da ação do etileno (TAIZ e ZEIGER, 2013), o que poderia explicar possivelmente a diminuição da expressão de EIN2 ao longo do tempo. Além disso, identificamos, como citado acima, um gene que codifica uma serina treonina quinase, e o CTR1 que é um regulador negativo do etileno, é uma serina treonina quinase. Podemos sugerir que o CTR1 seja essa proteína, cujo gene codificante aumentou a expressão ao longo do tempo. Na medida em que a expressão do gene de EIN2 diminuiu, a do gene de CTR1 aumentou proporcionalmente. A família de fatores de transcrição AP2/EREBP que é responsiva ao etileno, também mostrou-se induzida, sugerindo que a via de sinalização do etileno estava ativada. No modelo, foi demonstrado como EIN2 pode atuar na via de sinalização do etileno: no núcleo pela estabilização de EIN3 e ativação de genes responsivos ao etileno; e no citoplasma pela inibição da tradução do RNAm que codificaria as proteínas F-box EBF1/2 que degradam EIN3 (JI; GUO, 2013; LI et al. 2015) (Figura 26).

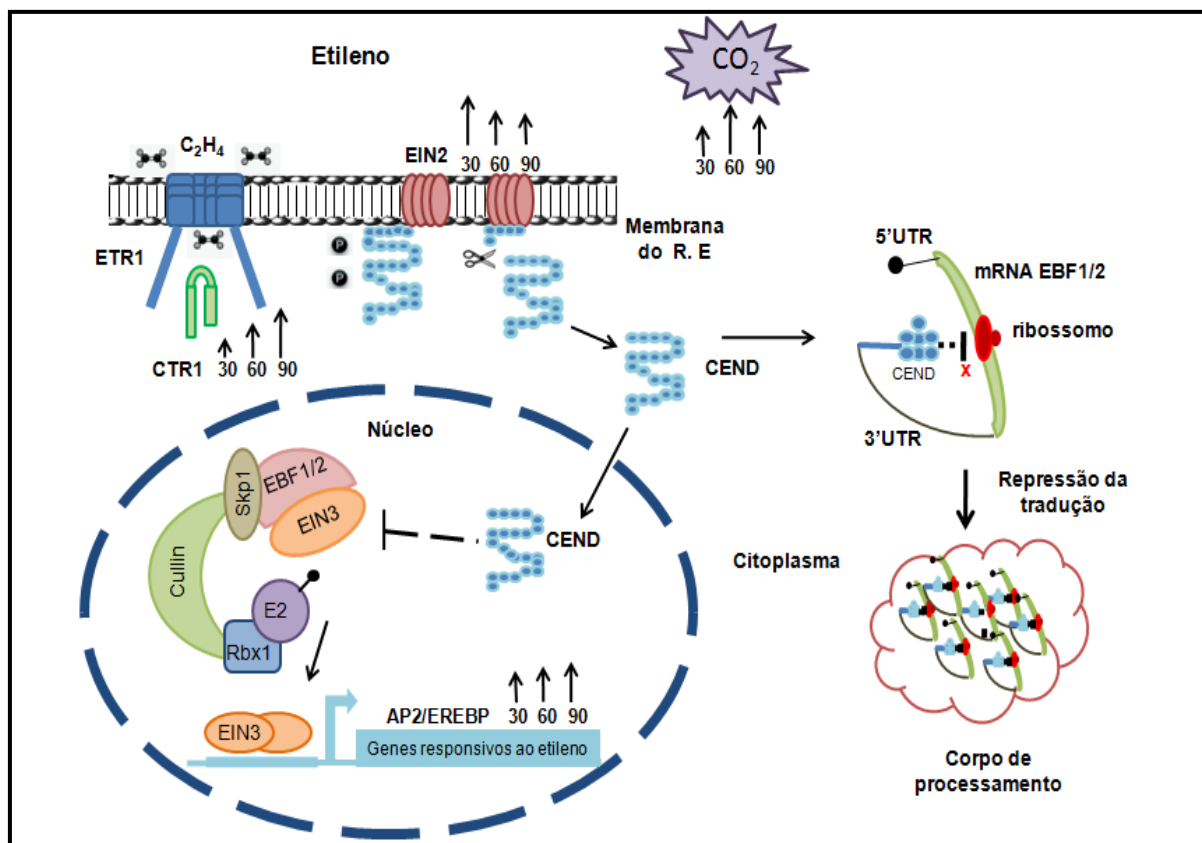


Figura 26. Modelo proposto para o funcionamento da via de sinalização do etileno em cana-de-açúcar sob déficit hídrico prolongado, com base nos trabalhos de Ji e Guo (2013) e de Li et al. (2015):. A concentração interna de CO_2 aumentou em 60 dias de déficit hídrico, e se manteve relativamente alta em 90 dias, enquanto a expressão de EIN2 diminuiu nesses dois períodos. O gene que codifica uma serina treonina quinase, possivelmente o CTR1, aumentou a expressão ao longo das épocas de déficit hídrico. O gene que codifica a família de fatores de transcrição AP2/EREBP responsiva ao etileno, aumentou a expressão em 90 dias de déficit hídrico, o que demonstra que a via de sinalização do etileno estava ativada.

Legenda: EIN2 (“ethylene insensitive2”); EIN3 (“ethylene insensitive 3”), CEND (porção C-terminal de EIN2); CTR1 (quinase reguladora negativa do etileno); ETR1 (receptor do etileno); EBF1/2 (proteínas F-box); Cullin, Skp1, Rbx (E3 ligase responsável por destinar proteínas para o sistema de degradação ubiquitina proteassoma).

Com isso, podemos sugerir que esse comportamento da cultivar SP81-3250 mostrado na Figura 26, está envolvido com seu caráter de tolerância ao déficit

hídrico prolongado, já que a diminuição nos níveis de EIN2 pode sugerir uma diminuição na percepção ou ação do etileno, pelo menos em parte. Como esse hormônio é responsável pela maturação da planta, a cultivar SP81-3250 consegue se manter sob condições prolongadas de déficit hídrico de maneira produtiva usando desse mecanismo de funcionamento da via.

Em trabalho realizado por Gratão et al. (2012) em tomates submetidos a estresse causado por tratamento com cádmio, pôde-se perceber uma relação com o nosso estudo. Os autores utilizaram três genótipos de tomate (um controle, um mutante insensível ao etileno e outro mutante insensível a auxina) que foram submetidos a tratamento com cádmio por um período de 40 dias. O genótipo controle foi mais danificado e sentiu mais os efeitos do cádmio, enquanto que os outros dois genótipos puderam suportar ou evitar o estresse imposto por esse elemento químico. Isso indica que o genótipo parcialmente insensível ao etileno conseguiu se manter em condições melhores do que o controle.

No nosso trabalho com cana-de-açúcar também foi verificado que a cultivar tolerante apresentou menos danos ao déficit hídrico prolongado, que pode ser por apresentar menor sensibilidade ao etileno nos períodos de 60 e 90 DAT.

Via de sinalização do ácido salicílico

Outra via de sinalização hormonal também identificada em nosso trabalho, que pode estar envolvida com o caráter de tolerância ao déficit hídrico da cultivar SP81-3250 é a do ácido salicílico. Esse hormônio interage com a formação do etileno, e podem estar atuando juntos nos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico prolongado. Os genes NPR1 e RPM1 relatados no “cluster 1”, estão envolvidos na via de sinalização desse hormônio. O NPR1 é o receptor do ácido salicílico e o RPM1 é um dos produtos finais da via de sinalização. Os genes que codificam a glutathione-S-transferase e WRKY também foram discutidos nesse trabalho e são dependentes da via de sinalização do ácido salicílico.

Em trabalho realizado por Kang et al. (2012), foram identificadas 35 proteínas induzidas por ácido salicílico, entre elas estava a glutathione-S-transferase, responsável pela resposta antioxidante. As espécies reativas de oxigênio podem

induzir a produção de ácido salicílico (LEÓN; LAWTON, RASKIN, 1995), e isso desencadeia por consequência, a expressão de enzimas antioxidantes (glutathione-S-transferase), que no nosso trabalho, apresentou um perfil de expressão similar a NPR1 e RPM1 (Figura 20a, “cluster 1”).

Os fatores de transcrição WRKY também são importantes reguladores das respostas de defesa dependentes de ácido salicílico. Esse hormônio induziu o aumento da expressão de vários fatores de transcrição WRKY em *Arabidopsis thaliana* (DONG; CHEN; CHEN, 2003, MAO et al. 2007). No nosso trabalho, esse fator de transcrição apresentou expressão similar ao longo do período do déficit hídrico (Figura 20b, “cluster 8”).

A via de sinalização do ácido salicílico atua da seguinte maneira: em baixos níveis de ácido salicílico, NPR1 não está disponível para induzir genes de defesa, uma vez que é destinado a degradação no proteossoma através da ligação com NPR4. Tanto NPR3, quanto NPR4 poderiam se ligar ao ácido salicílico, no entanto, NPR3 tem menor afinidade de ligação ao hormônio, do que NPR4 (que possui vários sítios de ligação ao ácido salicílico). Com o aumento da concentração de ácido salicílico após estresse biótico ou abiótico, o hormônio se liga a NPR4, interrompendo sua interação com NPR1, que agora fica livre para desempenhar o seu papel na ativação de genes de defesa (VIDHYASEKARAN, 2015). No nosso trabalho, entre os genes induzidos no final da via estão RPM1, glutathione-S-transferase e o fator de transcrição WRKY.

Como o ácido salicílico também está envolvido com o processo de maturação das plantas, podemos inferir que a diminuição da sua ação ao longo do período de déficit hídrico está envolvida com a tolerância à seca da cultivar SP81-3250, permitindo que a mesma se mantenha em condições ainda produtivas em déficit hídrico prolongado.

De acordo com as informações disponíveis na literatura e os resultados obtidos no nosso trabalho, foi proposto um modelo de como a via de sinalização do ácido salicílico estaria atuando na cultivar tolerante (Figura 27).

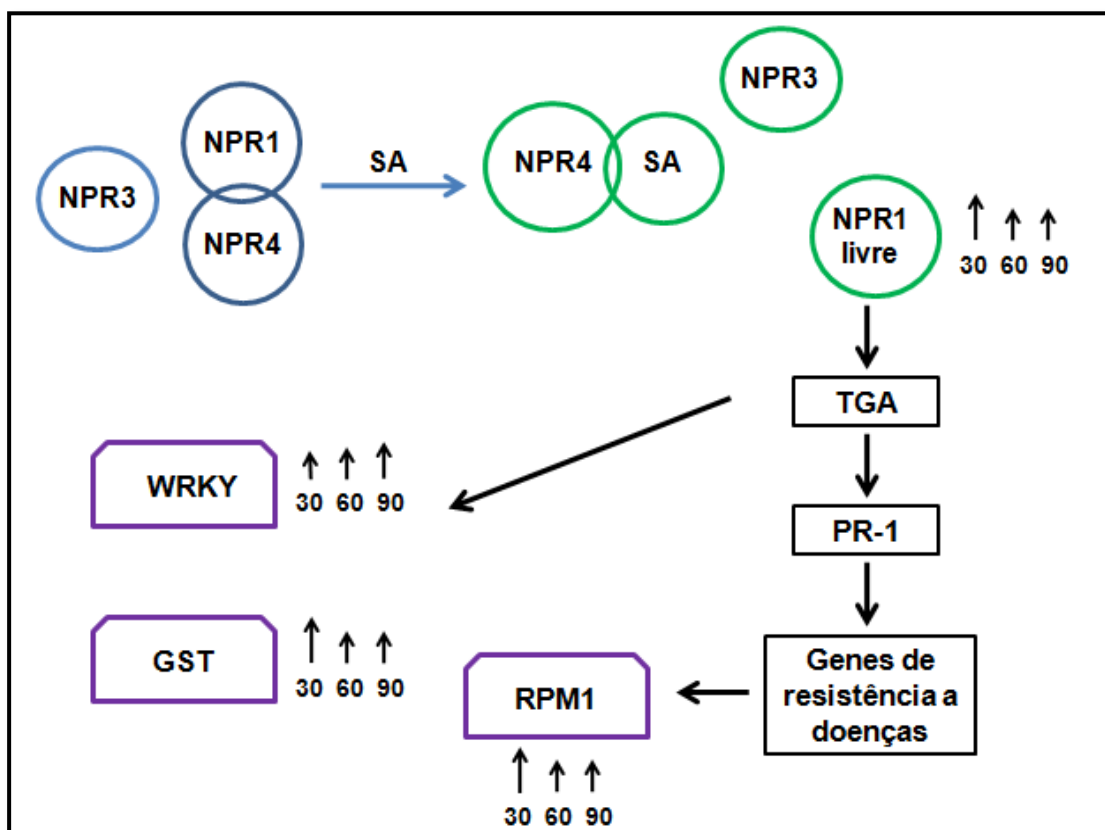


Figura 27. Modelo proposto para o funcionamento da via de sinalização do ácido salicílico em cana-de-açúcar sob déficit hídrico prolongado. O ácido salicílico induziu a expressão da glutatona-S-transferase, do fator de transcrição WRKY e da proteína de resistência a doença RPM1. A ação do ácido salicílico diminuiu ao longo do período de déficit hídrico prolongado. Adaptado de MOREAU; TIAN; KLESSIG, 2012.

Legenda. SA: ácido salicílico; GST: glutatona-S-transferase; 30, 60 e 90: dias após a aplicação dos tratamentos (DAT).

Esses resultados da via de sinalização do etileno e do ácido salicílico comprovam em nível molecular os resultados obtidos em estudos fisiológicos realizados nesta cultivar, indicando uma maturação mais lenta quando comparada a outras cultivares (TASSO JÚNIOR et al., 2011), inclusive com relação a cultivar RB855453 que possui maturação precoce (HOFFMANN et al., 2008).

4.2.9 Genes órfãos envolvidos na resposta ao déficit hídrico prolongado

Foram identificados 39 genes órfãos (“no hits”) exclusivos da cultivar SP81-3250 que foram diferencialmente expressos contra o controle em diversas comparações (Tabela 11). Isso demonstra que existem genes exclusivos de cana-de-açúcar (genes novos) que ainda não possuem anotação e que podem estar envolvidos na resposta de defesa ao déficit hídrico prolongado.

Tabela 11. Genes órfãos exclusivos da cultivar tolerante diferencialmente expressos em relação ao controle.

Genes órfãos			
c10680_g1_i1	c51999_g3_i5	c58088_g3_i14	c60586_g8_i1
c1389_g1_i1	c52473_g1_i10	c58088_g3_i8	c60748_g4_i1
c2308_g1_i1	c52473_g1_i6	c58110_g2_i2	c60807_g3_i4
c265_g1_i1	c53929_g2_i1	c58760_g2_i1	c64580_g1_i1
c28400_g1_i1	c54099_g1_i3	c59445_g6_i1	c65184_g1_i1
c3471_g1_i1	c55066_g7_i1	c59534_g3_i1	c67820_g1_i1
c37412_g4_i1	c56017_g1_i9	c59932_g3_i1	c6888_g1_i1
c42841_g1_i1	c56112_g2_i1	c60520_g4_i10	c7238_g1_i1
c45507_g3_i1	c56355_g2_i14	c60586_g1_i1	c8642_g1_i1
c48990_g2_i4	c56551_g4_i2	c60586_g2_i1	

Uma grande minoria de genes codificadores de proteínas de todos os genomas procariotos e eucariotos sequenciados é exclusiva (única) de cada espécie. Esses genes são chamados de “órfãos” por não terem, portanto, semelhança de sequência de codificação fora das suas espécies (normalmente quantificada pelo BLAST). Eles são frequentemente associados com a resposta ao estresse ambiental, características espécie-específicas ou padrões regulamentares. No entanto, devido às dificuldades em se estudar genes onde a análise comparativa não é possível, a valorização da importância deles tem sido muito baixa. Desde o advento do sequenciamento de nova geração, a análise de um grande número de genomas demonstrou que tais genes órfãos são comuns em todos os domínios da vida e vírus (ARENDSSEE; LI; WURTELE, 2014).

Como esses genes órfãos são recrutados para funções que regulam as respostas ao ambiente sempre variável, é desejável melhorar a nossa compreensão sobre a origem desses genes, pois essa é a chave para a compreensão de como novos genes podem surgir e adquirir funcionalidade em diferentes linhagens e condições (KHRAIWESH et al., 2015).

5. Conclusão

Nesse trabalho, observamos que o estudo de variáveis fisiológicas associado a análises moleculares fornecem resultados mais robustos e permitem inferir mais sobre o comportamento de uma cultivar de maneira sistêmica. Exemplos disso são os dois modelos de vias hormonais que foram propostos, um da via de sinalização do etileno e outro do ácido salicílico, mostrando o possível esquema de sinalização desses hormônios no caráter de tolerância ao déficit hídrico prolongado da cultivar SP81-3250.

Foram identificados 2.635 genes exclusivos da cultivar tolerante, dentre os quais foram analisados vinte genes envolvidos em mecanismos que favorecem a característica de tolerância ao déficit hídrico. Foram identificados também entre esses exclusivos, 39 genes órfãos e diferencialmente expressos em relação ao controle, podendo ser alvos de próximos estudos em programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar.

Dessa forma, mesmo sendo necessários mais estudos na área, uma vez que nosso trabalho é um dos poucos disponíveis na análise do déficit hídrico prolongado em cana-de-açúcar, essa pesquisa possibilitou a indicação de genes envolvidos com a tolerância à seca prolongada. Esses genes fornecem subsídios para futuros estudos, visando sua utilização em programas de melhoramento que almejem o desenvolvimento de cultivares mais tolerantes à seca.

6. Referências:

- ADAMS, J. Transcriptome: connecting the genome to gene function. **Nature Education**, v. 1, n. 1, p. 195, 2008.
- AFZAL, A. J.; WOOD, A. J.; LIGHTFOOT, D. A. Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 21, n. 5, p. 507-517, 2008.
- ALKAN, C.; SAJJADIAN, S.; EICHLER, E. E. Limitations of next-generation genome sequence assembly. **Nature Methods**, v.8, p. 61-65, 2011.
- ALONSO, O. Raio x dos canaviais: Censo revela variedades mais cultivadas. **Revista Canavieiros**, Sertãozinho, ed. 39. Ano IV. p. 20-21, set. 2009.
- ARANTES, M. T. **Potencial de cultivares de cana-de-açúcar sob os manejos irrigado e sequeiro**. 2012. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2012.
- ARENDSEE, Z. W.; LI, L.; WURTELE, E. S. Coming of age: orphan genes in plants. **Trends in Plant Science**, p. 1-11, 2014.
- ARRAES, F. B. M.; BENEVENTI, M. A.; SA, M. E. L.; PAIXAO, J. F. R.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; MARIN, S. R. R.; PURGATTO, E.; NEPOMUCENO, A. L.; GROSSI-DE-AS, M. F. Implications of ethylene biosynthesis and signaling in soybean drought stress tolerance. **BMC Plant Biology**, v.15, n. 213, p.1-20, 2015.
- ASHRAF, M.; ATHAR, H. R.; HARRIS, P. J. C.; KWON, T. R. Some prospective strategies for improving crop salt tolerance. **Advances in Agronomy**, v. 97, p. 45-110, 2008.
- ASHRAF, M.; HARRIS, P. J. C. Photosynthesis under stressful environments: an overview. **Photosynthetica**, v. 51, n. 2, p.163-190, 2013.
- ASSAD, E.; PINTO, H. S.; NASSAR, A.; HARFUCH, L.; FREITAS, S.; FARINELLI, B.; LUNDELL, M.; BACHION, L. C.; FERNANDES, E. C. M. **Impactos das mudanças climáticas na produção agrícola brasileira**. Washington, DC: Banco Internacional para Reconstrução e Desenvolvimento/Associação Internacional de Desenvolvimento ou O Banco Mundial, 2013. Disponível em: http://www.profor.info/sites/profor.info/files/docs/web%20brasil_2030_portugues.pdf. Acesso em: 09 de novembro de 2015.

AUGUSTINE, S. M.; NARAYAN, J. A.; SYAMALADEVI, D. P.; APPUNU, C.; CHAKRAVARTHI, M.; RAVICHANDRAN, V.; TUJETA, N.; SUBRAMONIAN, N. Introduction of Pea DNA Helicase 45 into sugarcane (*Saccharum spp.* Hybrid) enhances cell membrane thermostability and upregulation of stress-responsive genes leads to abiotic stress tolerance. **Molecular Biotechnology**, v. 57, p. 475-488, 2015.

BAGNIEWSKA-ZADWORNA, A. The root microtubule cytoskeleton and cell cycle analysis through desiccation of *Brassica napus* seedlings. **Protoplasma**, v. 233, p. 177-185, 2008.

BAKER, M. *De novo* genome assembly: what every biologist should know. **Nature Methods**, v. 9, p. 333-337, 2012.

BARBOSA, F. S. **Resistência à seca em cana-de-açúcar para diferentes níveis de disponibilidade hídrica no solo**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 1, p. 23–58, 2005.

BATISTA, L. M. T. **Avaliação morfofisiológica da cana-de-açúcar sob diferentes regimes hídricos**. 2013. 125 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

BELKHADIR, Y.; RAJAGOPAL, S.; DANGL, J. Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. **Current Opinion Plant Biology**, v. 7, n. 4, p. 391-399, 2004.

BENNETT, C. G. S.; BUZETTI, S.; SILVA, K. S.; TEIXEIRA FILHO, M. C. M.; GARCIA, C. M. P.; MAESTRELO, P. R. Produtividade e desenvolvimento da cana-planta e soca em função de doses e fontes de manganês. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p.1661-1668, 2011.

BENKO-ISEPPON, A. M.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; BERLARMINO, L. C.; BEZERRA NETO, J. P.; AMORIM, L. L. B.; FERREIRA NETO, J. R. C.; PANDOLFI, V.; AZEVEDO, H. M. A.; SILVA, R. L. O.; SANTOS, M. G.; ALVES, M. V. S.; KIDO, E. A. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112-1134, 2011.

BEUTLER, A. N.; CENTURION, J. F.; SOUZA, Z. M.; ANDRIOLI, I.; ROQUE, C. G. Retenção de água em dois tipos de latossolos sob diferentes usos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 26, n. 3, p. 829-834, 2002.

BISELLI, J. M.; **Expressão diferencial de microRNAs em células mononucleares do sangue periférico de crianças com síndrome de Down**. 2011. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde; Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas)-Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), São José do Rio Preto, 2011.

BOWMAN, M. J.; PARK, W.; BAUER, P. J.; UDALL, J. A.; PAGE, J. T.; RANEY, J.; SCHEFFLER, B. E.; JONES, D. C.; CAMPBELL, B. T. RNA-Seq transcriptome profiling of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) root tissue under water-deficit stress. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 12, p. 1-13, 2013.

BOYES, D. C.; NAM, J.; DANGL, J. L. The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. **Plant Biology**, v. 95, p. 15849-15854, 1998.

BRESSIANI, J.; BUTTERFIELD, M.; SILVA, J. Estratégias de melhoramento para ambientes sujeitos à deficiência hídrica: o exemplo da cana-de-açúcar. In: SIMPÓSIO SOBRE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM PLANTAS: ADAPTANDO AS CULTURAS AO CLIMA DO FUTURO, 2010, Goiânia. **Anais...** Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. p. 135-148.

BRITO, A. S.; LIBARDI, P. L.; GHIBERTO, P. J. Componentes do balanço de água no solo com cana-de-açúcar, com e sem adubação nitrogenada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, n. 2, p. 295-303, 2009.

BU, Q.; LV, T.; SHEN, H.; LUONG, P.; WANG, J.; WANG, Z.; HUANG, Z.; XIAO, L.; ENGINEER, C.; KIM, T. H.; SCHROEDER, J. I.; HUQ, E. Regulation of drought tolerance by the F-box protein MAX2 in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, v. 164, n. 1, p. 424-439, 2014.

CAMBRAIA, J. Aspectos bioquímicos, celulares e fisiológicos dos estresses nutricionais em plantas. In: NOGUEIRA, R. J. M. C.; ARAÚJO, E. L.; WILLADINO, L. G.; CAVALCANTE, U. M. **Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas**. Recife, UFRPE, 2005, cap. 2, p. 95-104.

CAO, S.; CHEN, Z.; LIU, G.; JIANG, L.; YUAN, H.; REN, G.; BIAN, X.; JIAN, H.; MA, X. The *Arabidopsis* Ethylene-Insensitive 2 gene is required for lead resistance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, p. 308-312, 2009.

CAO, Y-R.; CHEN, S-Y.; ZHANG, J-S. Ethylene signaling regulates salt stress response. **Plant Signaling & Behavior**, v. 3, n. 10, p. 761-763, 2008.

CAPONE, A.; LUI, J. J.; SILVA, T. R.; DIAS, M. A. R.; MELO, A. V. Avaliação do comportamento de quinze cultivares de cana-de-açúcar na Região Sul do Tocantins. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n. 3. p. 72-80, 2011.

CARDOSO-SILVA, C. B.; COSTA, E. A.; MANCINI, M. C.; BALSALOBRE, T. W. A.; CANESIN, L. E. C.; PINTO, L. R.; CARNEIRO, M. S.; GARCIA, A. A. F.; SOUZA, A. P.; VICENTINI, R. *De novo* assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. **PLOS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1-10, 2014.

CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Genes expressed in sugarcane maturing intermodal tissue. **Plant Cell Reports**, v. 20, p. 1075-1081, 2002.

CARSON, D. L.; BOTHA, F. C. Preliminary analysis of expressed sequence tags for sugarcane. **Crop Science**, v. 40, p. 1769-1779, 2000.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p.735-744, 2010.

CASTRO, P. H.; TAVARES, R. M.; BEJARANO, E. R.; AZEVEDO, H. SUMO, a heavyweight player in plant abiotic stress responses. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 69, p. 3269–3283, 2012.

CATALA, R.; OUYANG, J.; ABREU, I. A.; HU, Y.; SEO, H.; ZHANG, X.; CHUA, N-H. The Arabidopsis E3 SUMO ligase SIZ1 regulates plant growth and drought responses. **The Plant Cell**, v. 19, p. 2952–2966, 2007.

CATANEO, A. C.; DÉSTRO, G. F. G.; FERREIRA, L. C.; CHAMMA, K. L.; SOUSA, D. C. F. Atividade de glutationa-S-transferase na degradação do herbicida glyphosate em plantas de milho (*Zea mays*). **Planta Daninha**, Viçosa v. 21, n. 2, p. 307-312, 2003.

CATIVELLI, L.; RIZZA, F.; BADECK, F. W.; MAZZUCOTELLI, E.; MASTRANGELO, A. M.; FRANCIA, E.; MARE, C. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 105, p. 1-14, 2008.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento da cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa - Informação Tecnológica. 307p, 2004.

CHANG, Z.; LI, G.; LIU, J.; ZHANG, Y.; ASHBY, C.; LIU, D.; CRAMER, C. L.; HUANG, X. Bridger: a new framework for *de novo* transcriptome assembly using RNA-seq data. **Genome Biology**, v. 16, n. 30, p. 1-10, 2015.

CHAVES, M. M.; MAROCO, J. P.; PEREIRA, J. S. Understanding plant responses to drought - from genes to the whole plant. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 239-264, 2003.

CHEN, L.; HAN, J.; DENG, X.; TAN, S.; LI, L.; LI, L.; ZHOU, J.; PENG, H.; YANG, G.; HE, G.; ZHANG, W. Expansion and stress responses of AP2/EREBP superfamily in *Brachypodium distachyon*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-14, 2016.

CHEN, L.; SONG, Y.; LI, S.; ZHANG, L.; ZOU, C.; YU, D. The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 120-128, 2012.

CHENG, H-C.; QI, R. Z.; PAUDEL, H.; ZHU, H-J. Regulation and function of protein kinases and phosphatases. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-3, 2011.

CHU, X.; WANG, C.; CHEN, X.; LU, W.; LI, H.; WANG, X.; HAO, L.; GUO, X. The cotton WRKY gene GhWRKY41 positively regulates salt and drought stress tolerance in transgenic *Nicotiana benthamiana*. **PLOS ONE**, San Francisco, p. 1-21, 2015.

CLARKE, K.; YANG, Y.; MARSH, R.; XIE, L.; ZHANG, K. K. Comparative analysis of *de novo* transcriptome assembly. **Science China Life Sciences**, v. 56, n. 2, p. 156-162, 2013.

CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: Cana-de-açúcar. Quarto levantamento**, abril/2016. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_04_14_09_06_31_boletim_cana_portugues_-_4o_lev_-_15-16.pdf. Acesso em 19 de maio de 2016.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Segundo levantamento**, agosto/2012. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_08_09_15_07_05_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf. Acesso em 09 de novembro de 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar. Terceiro levantamento**, dezembro/2011. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/11_12_08_11_00_54_08.pdf. Acesso em 09 de novembro de 2015.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar 2014**. Disponível em: http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_12_19_09_02_49_boletim_cana_portugues_-_3o_lev_-_2014-15.pdf. Acesso em 09 de novembro de 2015.

CONESA, A.; GÖTZ, S.; GARCÍA-GÓMEZ, J. M.; TEROL, J.; TALÓN, M.; ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 18, p. 3674-3676, 2005.

COON, M. J. Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 1-25, 2005.

CORDEIRO, Y. E. M. **Potencial de uso em recuperação de áreas degradadas: um estudo de três espécies nativas da Amazônia oriental sob dois regimes hídricos**. 2012. 89 f. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Belém, 2012.

COSTA, A. M. Prospecção gênica e bioinformática. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. R. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 730 p, 2011.

COUSINS, A. B.; ADAM, N. R.; WALL, G. W.; KIMBALL, B. A.; PINTER JUNIOR, P. J.; OTTMAN, M. J.; LEAVITT, S. W.; WEBBER, A. N. Photosystem II energy use, non-photochemical quenching and the xanthophylls cycle in *Sorghum bicolor* grown under drought and free-air CO₂ enrichment (FACE) conditions. **Plant, Cell & Environmental**, Logan, v. 25, p. 1551-1559, 2002.

D'HONT, A.; GRIVET, L.; FELDMANN, P.; RAO, S.; BERDING, N.; GLASZMANN, J. C. Characterization of the double structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v. 250, n. 4, p. 405-413, 1996.

D'HONT, A.; RAO, S.; FELDMANN, P.; GRIVET, L.; ISLAM-FARIDI, N.; TAYLOR, P.; GLASZMANN, J. C. Identification and characterization of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* x *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridization. **Theoretical and Applied Genetics**, Berlin, v. 91, n. 2, p. 320-326, 1995.

DABBAS, K. M. **Perfil de expressão gênica de cana-de-açúcar submetida a estresse biótico com *Xanthomonas albilineans***. 2009. 205 f. Tese (Doutorado em Microbiologia Agropecuária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

DE ARAUJO, P. G.; ROSSI, M.; JESUS, E. M.; SACCARO JR, N. L.; KAJIHARA, D.; MASSA, R.; FELIX, J. M.; DRUMMOND, R. D.; FALCO, M. C.; CHABREGAS, S. M.; ULIAN, E. C.; MENOSSI, M.; SLUYS, M. A. V. Transcriptionally active transposable elements in recent hybrid sugarcane. **Plant Journal**, v. 44, p. 707-717, 2005.

DELGADO, A. A.; CÉSAR, M. A. A. **Elementos de tecnologia e engenharia do açúcar de cana**. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, v. 2, p. 364, 1977.

DIETZ, K-J.; VOGEL, M. O.; VIEHHAUSER, A. AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signaling. **Protoplasma**, v. 245, p. 3-14, 2010.

DONG, J.; CHEN, C.; CHEN, Z. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. **Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 21-37, 2003.

EKBLOM, R.; WOLF, J. B. W. A field guide to whole-genome sequencing, assembly and annotation. **Evolutionary Applications**, v. 7, p. 1026-1042, 2014.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fenologia da cana-de-açúcar**. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/arvore/CONTAG01_68_22122006154840.html. Acesso em 18 de janeiro de 2016.

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/cana-de-acucar/Abertura.html>. Acesso em 18 de janeiro de 2016.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. 2 ed. Rio de Janeiro: MAPA, p.15-16, 1997.

FALCO, M. C.; SILVA-FILHO, M. C. Expression of soybean proteinase inhibitors in transgenic sugarcane plants: Effects on natural defense against *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambidae). **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 41, p. 761-766, 2003.

FALEIROS, A. C. **Análise da interação de *Azospirillum brasilense* FP2 com raízes de milho (*Zea mays*) por qPCR, microscopia eletrônica e proteômica**. 2014. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Planta drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 29, p. 185-212, 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, T. H.; GENTILE, A.; VILELA, R. D.; COSTA, G. G. L.; DIAS, L. I.; ENDRES, L.; MENOSSI, M. microRNAs associated with drought response in the bioenergy crop sugarcane (*Saccharum* spp.). **PLOS ONE**, v. 7, n. 10, p. 1-14, 2012.

FERRO, M. I. T. **Estudo do estresse hídrico em cana-de-açúcar utilizando genômica funcional**. 2008. 186 f. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Julio de mesquita Filho”, Jaboticabal, 2008.

FRAGOSO, R. R.; NAKASU, E. Y. T.; ROCHA, T. L.; ROSA, A. J. M. Genômica Funcional. In: FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; JUNIOR, F. B. R.. **Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 730 p, 2011.

FREITAS, L. de. **Influência de fragmentos florestais nativos sobre os parâmetros químicos, físicos e microbiológicos de solos cultivados com cana-de-açúcar**. 2011. 112 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

FU, Z. Q.; YAN, S.; SALEH, A.; WANG, W.; RUBLE, J.; OKA, N.; MOHAN, R.; SPOEL, S. H.; TADA, Y.; ZHENG, N.; DONG, X. NPR3 and NPR4 are receptors for the immune signal salicylic acid in plants. **Nature**, v. 1, p. 228-232, 2012.

FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v 36, 2007.

GALLÉ, A.; CSISZÁR, J.; SECENJI, M.; GUÓTH, A.; CSEUZ, L.; TARI, I.; GYÖRGYÉY, J.; ERDEI, L. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: response to water deficit. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 17, p. 1878–1891, 2009.

GAO, R.; DUAN, K.; GUO, G.; DU, Z.; CHEN, Z.; LI, L.; HE, T.; LU, R.; HUANG, J. Comparative transcriptional profiling of two contrasting barley genotypes under salinity stress during the seedling stage. **International Journal of Genomics**, v. 2013, p. 1-19, 2013.

GARBER, M.; GRABHERR, M. G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature Methods**, London, v. 8, n. 6, p. 469-477, 2011.

GARCIA, F. H. S. **Dinâmica temporal do estado fisiológico de cana-de-açúcar sob déficit hídrico**. 2015. 57 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Fisiologia Vegetal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

GARCÍA-LORENZO, M.; SJODIN, A.; JANSSON, S.; FUNK, C. Protease gene families in *Populus* and *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, v. 6, n. 30, p. 1-24, 2006.

GASCHO, G. J.; SHIH, S. F. Sugarcane. In: TEARE, I. D.; PEET, M. M. **Crop Water Relations**, New York: John Wiley & Sons, p. 445-479, 1983.

GENTILE, A.; FERREIRA, T. H.; MATTOS, R. S.; DIAS, L. I.; HOSHINO, A. A.; CARNEIRO, M. S.; SOUZA, G. M.; CALSA JR. T.; NOGUEIRA, R. M.; ENDRES, L.; MENOSSI, M. Effects of drought on the microtranscriptome of field-grown sugarcane plants. **Planta**, v. 237, p. 783-798, 2013.

GENTILE, A.; DIAS, L. I.; MATTOS, R. S.; FERREIRA, T. H.; MENOSSI, M. MicroRNAs and drought responses in sugarcane. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 58, p. 1-13, 2015.

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.; ZHANG, J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. **Genome Biology**, v. 5, n. 10, R80, 2004.

GENUCHTEN, M. T. A. van. A closed-form equation for predicting the hydraulic conductivity of unsaturated soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 44, p. 892-897, 1980.

GHOSH, D.; XU, J. Abiotic stress responses in plant roots: a proteomics perspective. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 6, p. 1-13, 2014.

GIACHETTO, P. F.; HIGA, R. H. Bioinformática aplicada à agricultura. In: SILVIA MARIA FONSECA SILVEIRA MASSRUHÁ et al. (Eds.). **Tecnologias da informação e comunicação e suas relações com a agricultura**. Brasília, DF: Embrapa, 2014.

GIMENEZ, D. F. J.; DEDEMO, G. C.; VANTINI, J. S.; DA SILVA, A. C. B.; TEZZA, R. I. D.; DABBAS, K. M.; MUTTON, M. A.; FERRO, M. I. T. Análise dos parâmetros biométricos, acúmulo de prolina e identificação de genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico em cana-de-açúcar, por cDNA-AFLP. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 2, p. 209-225, 2013.

GONÇALVES, E. R. **Fotossíntese, osmorregulação e crescimento inicial de quatro variedades de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica**. 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Produção Vegetal) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo, 2008.

GOODSTEIN, D. M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R. D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D. S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p. 178-186, 2012.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-seq data. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2013.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOEN, N.; GNIRKE, A. RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

GRAÇA, J. P. **Avaliação de parâmetros fisiológicos em cultivares de cana-de-açúcar submetidas ao déficit hídrico**. 2009. 52 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2009.

GRATÃO, P. L.; MONTEIRO, C. C.; CARVALHO, R. F.; TEZOTTO, T.; PIOTTO, F. A.; PERES, L. E. P.; AZEVEDO, R. A. Biochemical dissection of diageotropica and Never ripe tomato mutants to Cd-stressful conditions. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 56, p. 79-96, 2012.

GRAVITOL, C.; REGULSKI, M.; BERTALAN, M.; MCCOMBIE, W. R.; DA SILVA, F. R.; ZERLOTINI NETO, A.; VICENTINI, R.; FARINELLI, L.; HEMERLY, A. S.; MARTIENSSEN, R. A.; FERREIRA, P. C. Sugarcane genome sequencing by methylation filtration provides tools for genomic research in the genus *Saccharum*. **Plant Journal**, v. 79, p. 162-172, 2014.

GUIMARÃES, A. C. R. **Caracterização de variedades de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) submetidas a déficit hídrico**. 2011. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências: Irrigação e Drenagem) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

GUO, R.; XU, X.; CAROLE, B.; LI, X.; GAO, M.; ZHENG, Y.; WANG, X. Genome-wide identification, evolutionary and expression analysis of the aspartic protease gene superfamily in grape. **BMC Genomics**, v. 14, p. 1-18, 2013.

GUPTA, V.; RAGHUVANSHI, S.; GUPTA, A.; SAINI, N.; GAUR, A.; KHAN, M. S.; GUPTA, R. S.; SINGH, J.; DUTTAMAJUMDER, S. K.; SRIVASTAVA, S.; SUMAN, A.; KHURANA, J. P.; KAPUR, R.; TYAGI, A. K. The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. **Funct Integr Genomics**, v. 10, p. 207-214, 2010.

HAAS, B. J.; CHIN, M.; NUSBAUM, C.; BIRREN, B. W.; LIVNY, J. How deep is deep enough for RNA-seq profiling of bacterial transcriptomes?. **BMC Genomics**, v. 13, n. 734, p. 1-11, 2012.

HERMANN, E. R.; CÂMARA, G. M. S. Um método simples para estimar a área foliar de cana-de-açúcar. **Revista da STAB**, v. 17, p. 32-34, 1999.

HO, M. S.; TSAI, P. I.; CHIEN, C. T. F-box proteins: the key to protein degradation. **Journal of Biomedical Science**, v.13, p. 181-191, 2006.

HOFFMANN, H. P.; SANTOS, E. G. D.; BASSINELLO, A. I.; VIEIRA, M. A. S. **Variedades RB de cana-de-açúcar**. Araras: Editora UFSCAR, 2008. 30p.

HOLANDA, L. A. **Resposta varietal da cana-de-açúcar à deficiência hídrica, durante o desenvolvimento inicial em um Latossolo Vermelho distrófico**. 2012. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2012.

HSIAO, N-W.; CHEN, Y.; KUAN, Y-C.; LEE, Y-C.; LEE, S-K.; CHAN, H-H.; KAO, C-H. Purification and characterization of an aspartic protease from the *Rhizopus oryzae* protease extract, Peptidase R. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 89-94, 2014.

HUANG, B.; XU, C. Identification and characterization of proteins associated with plant tolerance to heat stress. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 50, n. 10, p. 1230-1237, 2008.

HUANG, N.; ZHANG, Y. Y.; XIAO, X. H.; HUANG, L.; WU, Q. B.; QUE, Y. X.; XU, L. P. Identification of smut-responsive genes in sugarcane using cDNA-SRAP. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 6808-3818, 2015.

HUNICKE-SMITH, S. P. **DNA Sequencing Facility (Bionalyzer)**. 2012. Disponível em: <http://www.icmb.utexas.edu/core/DNA/Bioanalyzer/Bioanalyzer.html>. Acesso em: 05 de janeiro de 2016.

ILLUMINA. DNA sequencing with Solexa Technology. **Illumina Systems & Software**, 2007. Disponível em: http://www.plantsciences.ucdavis.edu/bit150/2006/JD_Lecture/Lecture%201%20Databases/Solexa_DNAsequencing.pdf. Acesso em 08 de dezembro de 2015.

ILLUMINA. **Paired- End Sequencing**, 2016. Disponível em: http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/paired-end-sequencing_assay.html. Acesso em 05 de setembro de 2016.

ILLUMINA. **RNA-seq Technology**, 2016. Disponível em: <http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/mrna-seq.html>. Acesso em: 18 de janeiro de 2016.

INMAN-BAMBER, N. G., SMITH, D. M. Water relations in sugarcane and response to water deficits. **Field Crops Research**, v. 92, p. 185-202, 2005.

ISKANDAR, H. M.; CASU, R. E.; FLETCHER, A. T.; SCHMIDT, S.; XU, J.; MACLEAN, D. J.; MANNERS, J. M.; BONNETT, G. D. Identification of drought-response genes and a study of their expression during sucrose accumulation and water deficit in sugarcane culms. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 12, p. 1-14, 2011.

ITO, T. M.; RAMPIM, M. C.; POLIDO, P. B.; SOUZA, S. G. H. de. Fatores de transcrição da família AP2/ERF e resposta em plantas aos estresses abióticos. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zootecia**, UNIPAR, Umuarama, v. 15, n. 2, supl. 1, p. 207-214, 2012.

JAIN, M. Next generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. **Briefings in functional genomics**, v. 2, p. 63-70, 2011.

JAIN, M.; NIJHAWAN, A.; ARORA, R.; AGARWAL, P.; RAY, S.; SHARMA, P.; KAPPOR, S.; TYAGI, A. K.; KHURANA, J. P. F-box proteins in rice. Genome-wide analysis, classification, temporal and spatial gene expression during panicle and seed development, and regulation by light and abiotic stress. **Plant Physiology**, v. 143, p. 1467-1483, 2007.

JI, Y.; GUO, H. From endoplasmic reticulum (ER) to nucleus: EIN2 bridges the gap in ethylene signaling. **Molecular Plant**, v. 6, n. 1, p. 11-14, 2013.

JONES, P.; BINNS, D.; CHANG, H-Y.; FRASER, M.; LI, W.; MCANULLA, C.; MCWILLIAM, H.; MASLEN, J.; MITCHELL, A.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; QUINN, A. F.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEW, M.; YONG, S-Y.; LOPEZ, R.; HUNTER, S. InterProScan 5: Genome-scale Protein Function Classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, 2014.

KAKUMANU, A.; AMBAVARAM, M. M. R.; KLUMAS, C.; KRISHNAN, A.; BATLANG, U.; MYERS, E.; GRENE, R.; PEREIRA, A. Effects of drought on gene expression in maize reproductive and leaf meristem tissue revealed by RNA-Seq. **Plant Physiology**, v. 60, p. 846-867, 2012.

KANG, G.; LI, G.; XU, W.; PENG, X.; HAN, Q.; ZHU, Y.; GUO, T. Proteomics reveals the effects of salicylic acid on growth and tolerance to subsequent drought stress in wheat. **Journal of Proteome Research**, v. 11, p. 6066-6079, 2012.

KATO, U.; EMOTO, K.; FREDRIKSSON, C.; NAKAMURA, H.; OHTA, A.; KOBAYASHI, T.; MURAKAMI-MUROFUSHI, K.; KOBAYASHI, T.; UMEDA, M. A Novel membrane protein, Ros3p, is required for phospholipid translocation across the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 40, p. 37855-37862, 2002.

KHAN, M. S.; KHRAIWESH, B.; PUGALENTHI, G.; GUPTA, R. S.; SINGH, J.; DUTTAMAJUMDER, S. K.; KAPUR, R. Subtractive hybridization-mediated analysis of genes and in silico prediction of associated microRNAs under waterlogged conditions in sugarcane (*Saccharum* spp.). **FEBS Open Bio**, v. 4, p. 533-541, 2014.

KHRAIWESH, B.; QUDEIMAT, E.; THIMMA, M.; CHAIBOONCHOE, A.; JIJAKLI, K.; ALZAHMI, A.; ARNOUX, M.; SALEHI-ASHTIANI, K. Genome-wide expression analysis offers new insights into the origin and evolution of *Physcomitrella patens* stress response. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-15, 2015.

KIDO, E. A.; FERREIRA NETO, J. R. C.; SILVA, R. L. O.; PANDOLFI, V.; GUIMARÃES, A. C. R.; VEIGA, D. T.; CHABREGAS, S. M.; CROVELLA, S.; ISEPPON, M. B. New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by supersage. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-14, 2012.

KIEŁBOWICZ-MATUK, A. Involvement of plant C2H2-type zinc finger transcription factors in stress responses. **Plant Science**, v. 185, p. 78-85, 2012.

KIM, G. T.; TSUKAYA, H. Regulation of the biosynthesis of plant hormones by cytochrome P450s. **Journal Plant Research**, v. 115, p. 169– 177, 2002.

KIM, H. B.; CHOI, S. B. **Cytochrome P450 gene for increasing seed size or water stress resistance of plant.** Patente Application Publication. Pub. n.US2010/0281576A1, 2010.

KIM, J-M.; TO, T. K.; NISHIOKA, T.; SEKI, M. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. **Plant, Cell & Environment**, v. 33, p. 604-611, 2010.

KOGENARU, S.; QING, Y.; GUO, Y.; WANG, N. RNA-Seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC Genomics**, v. 13, p. 629, 2012.

KRANNICH, C. T.; MALETZKI, L.; KUROWSKY, C.; HORN, R. Network candidate genes in breeding for drought tolerant crops. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 16378-16400, 2015.

KUAI, X.; MACLEOD, B. J.; DESPRÉS, C. Integrating data on the Arabidopsis NPR1/NPR3/NPR4 salicylic acid receptors; a differentiating argument. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 235, p. 30-34, 2015.

KUMAR, S.; SHAH, N.; GARG, V.; BHATIA, S. Large scale in-silico identification and characterization of simple sequence repeats (SSRs) from de novo assembled transcriptome of *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Plant Cell Reports**, v. 33, p. 905-918, 2014.

KURAMAE, E. E.; FENILLE, R. C.; ROSA JR, 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. 4, p. 251-259, 2002.

LABUDDA, M.; AZAM, F. M. S. Glutathione-dependent responses of plants to drought: a review. **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 83, n. 1, p. 3-12, 2014.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357–359, 2012.

LATA, C.; YADAV, A.; PRASAD, M. Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance. In: SHANKER A.; VENKATESWARLU, B. **Abiotic stress response in plants – physiological, biochemical and genetic perspectives.** InTech, p. 269-296, 2011.

LEÓN, J.; LAWTON, M. A.; RASKIN, I. Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. **Plant Physiology**, v. 108, n. 4, p. 1673–1678, 1995.

LI, M.; LIANG, Z.; ZENG, Y.; JING, Y.; WU, K.; LIANG, J.; HE, S.; WANG, G.; MO, Z.; TAN, F.; LI, S.; WANG, L. *De novo* analysis of transcriptome reveals genes associated with leaf abscission in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). **BMC Genomics**, v. 17, n. 195, p. 1-18, 2016.

LI, W. T.; HE, M.; WANG, J.; WANG, Y. P. Zinc finger protein (ZFP) in plants- A review. **Plant Omics Journal**, v. 6, n. 6, p. 474-480, 2013.

LI, W.; MA, M.; FENG, Y.; LI, H.; WANG, Y.; MA, Y.; LI, M.; AN, F.; GUO, H. EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in Arabidopsis. **Cell Press**, v. 163, p. 670-683, 2015.

LIU, X.; YANG, S.; ZHAO, M.; LUO, M.; YU, C. W.; CHEN, C. Y.; TAI, R.; WU, K. Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. **Molecular Plant**, v. 7, p. 764-772, 2014.

LUO, M.; LIU, X.; SINGH, P.; CUI, Y.; ZIMMERLI, L.; WU, K. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 129-136, 2012.

LYZENGA, W. J.; STONE, S. L. Abiotic stress tolerance mediated by protein ubiquitination. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 2, p. 599-616, 2012.

MACHADO, R. S.; RIBEIRO, R. V.; MARCHIORI, P. E. R.; MACHADO, D. F. S. P.; MACHADO, E. C.; LANDELL, M. G. A. Respostas biométricas e fisiológicas ao déficit hídrico em cana-de-açúcar em diferentes fases fenológicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 12, p. 1575-1582, 2009.

MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: **Agronômica Ceres**, p. 251, 1980.

MAO, G.; SEEBECK, T.; SCHRENKER, D.; YU, O. CYP709B3, a cytochrome P450 monooxygenase gene involved in salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 1-13, 2013.

MAO, P.; DUAN, M.; WEI, C.; LI, Y. WRKY62 transcription factor acts downstream of cytosolic NPR1 and negatively regulates jasmonate responsive gene expression. **Plant Cell Physiology**, v. 48, n. 6, p. 833-842, 2007.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Agroenergia**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/desenvolvimento-sustentavel/agroenergia>. Acesso em 04 de novembro de 2015.

MAPA- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Culturas: Cana-de-açúcar**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/cana-de-acucar>. Acesso em 04 de janeiro de 2016.

MARCHIORI, P. E. R. **Fisiologia de cana-de-açúcar sob déficit hídrico: plasticidade fenotípica, transporte de água, metabolismo antioxidante e fotossíntese**. 2014. 84 f. Tese (Doutorado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agronômico, Campinas, 2014.

MARQUES, M. O.; MUTTON, M. A.; AZANIA, A. A. P. M.; TASSO JUNIOR, L. C.; NOGUEIRA, G. A.; VALE, D. W. (Ed.). **Tópicos em Tecnologia Sucrialcooleira**. Jaboticabal: Gráfica Multipress Ltda., 191p., 2006.

MARQUES, M. V.; SILVA, A. M. **Genômica funcional: transcriptoma**. In: Luis Mir. (Org.). *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu, p. 119-135, 2004.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 671-682, 2011.

MARTIN, J. Rnnotator: an automated *de novo* transcriptome assembly pipeline from stranded RNA-seq reads. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 663, p. 1-8, 2010.

MARTINELLI, F.; URATSU, S. L.; ALBRECHT, U.; REAGAN, R. L.; PHU, M. L.; BRITTON, M.; BUFFALO, V.; FASS, J.; LEICHT, E.; ZHAO, W.; LIN, D.; D'SOUZA, R.; DAVIS, C. E.; BOWMAN, K. D.; DANDEKAR, A. M. Transcriptome profiling of citrus fruit response to Huanglongbing disease. **PLoS ONE**, v. 7, p. 1-16, 2012.

MARTINS, A. M. **Sequenciamento de DNA, montagem *de novo* do genoma e desenvolvimento de marcadores microssatélites, indels e SNPs para uso em análise genética de *Brachiaria ruziziensis***. 2013. 198 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

MATSUOKA, S.; FERRO, J. A.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, Heidelberg, v. 45, p. 372-381, 2009.

MCCARTHY, D. J.; CHEN, Y.; SMYTH, G. K. Differential expression analysis of multifactor RNA-seq experiments with respect to biological variation. **Nucleic Acids Resource**, v. 40, n. 10, p. 4288-4297, 2012.

MELLO, M. O.; TANAKA, A. S.; SILVA FILHO, M. C. Molecular evolution of Bowman-Birk type proteinase inhibitors in flowering plants. **Molecular Phylogenetics and evolution**, v. 27, p. 103-112, 2003.

METZKER, M. L. Sequencing Technologies – the next generation. **Nature Reviews Genetics**, v. 11, p. 31-46, 2010.

MIAN, A. A.; SENADHEERA, P.; MAATHUIS, F. J. M. Improving crop salt tolerance: anion and cation transporters as genetic engineering targets. **Plant Stress 5** (special issue 1), p. 64-72, 2011.

MOREAU, M.; TIAN, M.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid binds NPR3 and NPR4 to regulate NPR1- dependent defense responses. **Cell Research**, v. 22, p. 1631-1633, 2012.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next – generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, v. 92, p. 255-264, 2008.

MOZAMBANI, A. E.; PINTO, A. S.; SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M. História e morfologia da cana-de-açúcar. In: SILVELENA VANZOLINI SEGATO et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006, cap.1, p. 11-18.

MUKHOPADHYAY, A.; VIJ, S.; TYAGI, A. K. Overexpression of a zinc-finger protein gene from rice confers tolerance to cold, dehydration, and salt stress in transgenic tobacco. **Proceedings of National Academy Sciences USA**, v. 101, p. 6309–6314, 2004.

MURATA, M. M. **Transcriptoma da interação de tangerina Satsuma (*Citrus unshiu*) e laranja doce Hamlin (*Citrus sinensis*) infectadas com *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal do cancro cítrico**. 2013. 181 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia: Genética e Melhoramento de Plantas) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2013.

NAKASHIMA, K.; TAKASAKI, H.; MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. NAC transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 97-103, 2012.

NAKAUNE, M.; HANADA A.; YIN, Y.G; MATSUKURA, C.; YAMAGUCHI, S.; EZURA, H. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 52, p. 28-37, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEPOMUCENO, A. L.; ALVES, R. E.; GERHARDT, I. R.; DANTE, R. A.; FONSECA, C. E. L. **A nova era genômica e a biodiversidade brasileira**. Embrapa Labex US, maio de 2012. (Nota Técnica).

NEPOMUCENO, A. L.; FUGANTI, R.; KANAMORI, N.; PEREIRA, S. S.; RODRIGUES, F. A; NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; MARCELINO, F. C. Estratégias de engenharia genética para tolerância à seca em plantas através da expressão de fatores de transcrição. In: SIMPÓSIO SOBRE TOLERÂNCIA À DEFICIÊNCIA HÍDRICA EM PLANTAS: ADAPTANDO AS CULTURAS AO CLIMA DO FUTURO, 2010, Goiânia. **Anais...** Santo Antonio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2011. p. 103-109.

NÓBREGA, J. C. M.; DORNELAS, M. C. Biotecnologia e melhoramento da cana-de-açúcar. In: SILVELENA VANZOLINI SEGATO et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006, cap. 3, p. 39-56.

NOGUEIRA, F. T. S.; SCHLOGL, P. S.; CAMARGO, S. R.; FERNANDEZ, J. H.; ROSA JUNIOR, V. E.; POMPERMAYER, P.; ARRUDA, P. SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. **Plant Science**, v. 169, p. 93-106, 2005.

NOGUEIRA, F. T.; ROSA JR, V. E.; MENOSSI, M.; ULIAN, E. C.; ARRUDA, P. RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. **Plant Physiology**, v. 12, p. 27-38, 2003.

OLIVEIRA, R. C.; ROSA, M.; COSTA, A. C.; TEIXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; GAVA, G. J. de C. Efeitos da restrição hídrica e de nitrogênio no crescimento e na fisiologia da cana-de-açúcar. In: Workshop Internacional de Inovações Tecnológicas na Irrigação, IV Winotec, 2012, Fortaleza. **Proceedings...**, protocolo 138.

PALHARES, A. C. **Mapeamento genético de marcadores AFLP e de retrotransposons em cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAPINI-TERZI, F. S.; ROCHA, F. R.; VÊNCIO, R. Z.; OLIVEIRA, K. C.; FELIX, J. M.; VICENTINI, R.; ROCHA, C. S.; SIMÕES, A. C.; ULIAN, E. C.; di MAURO, S. M. Z.; SILVA, A. M.; PEREIRA, C. A.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. M. Transcription profiling of signal transduction-related genes in sugarcane tissues. **DNA Research**, v. 12, p. 27-38, 2005.

PAULA, M.; PEREIRA, F. A. R.; ARIAS, E. R. A.; SCHEEREN, B. R.; SOUZA, C. C.; MATA, D. S. Fixação de carbono e emissão dos gases de efeito estufa na exploração de cana-de-açúcar. **Ciência Agrotécnica**, Lavras-MG, v. 34, n. 3, p. 633-640, 2010.

PERCIVAL, G. C.; SHERIFFS, C. N. Identification of drought tolerance woody perennials using chlorophyll fluorescence. **Journal of Arboriculture**, Savoy, v. 28, n. 5, p. 215-223, 2002.

PINCELLI, R. P. **Tolerância à deficiência hídrica em cultivares de cana-de-açúcar avaliada por meio de variáveis morfofisiológicas**. 2010. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2010.

PINCELLI, R. P.; SILVA, M. A. Alterações morfológicas foliares em cultivares de cana-de-açúcar em resposta à deficiência hídrica. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 28, n. 4, p. 546-556, 2012.

PINTO, A. C.; MELO-BARBOSA, H. P.; MIYOSHI, A.; SILVA, A.; AZEVEDO, V. Application of RNA-seq to reveal the transcript profile in bacteria. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, n. 3, p. 1707-1718, 2011.

PIRES, R. C. M.; ARRUDA, F. B.; SAKAI, E. Irrigação e drenagem. In: DINARDO-MIRANDA, L. L.; VASCONCELOS, A. C. M. de.; LANDELL, M. G. de A. **Cana-de-açúcar**. Campinas: Instituto Agrônomo, p. 631-670, 2008.

POULSEN, L. R.; LÓPEZ-MARQUÉS, R. L.; McDOWELL, S. C.; OKKERI, J.; LICHT, D.; SCHULZ, A.; POMORSKI, T.; HARPER, J. F.; PALMGREN, M. G. The Arabidopsis P4-ATPase ALA3 localizes to the golgi and requires a β -subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. **The Plant Cell**, v. 20, p. 658-676, 2008.

PRABU, G.; KAWAR, P. G.; PAGARIYA, M. C.; PRASAD, D. T. Identification of water deficit stress upregulated genes in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 29, p. 291-304, 2011.

PURANIK, S.; SAHU, P. P.; SRIVASTAVA, P. S.; PRASAD, M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. **Trends in Plant Science**, v. 17, n. 6, p. 369-381, 2012.

QUEIROZ, R. J. B. **Resposta fisiológica e molecular de dois genótipos de milho à limitação hídrica**. 2010. 154 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2010.

RAIJ, B. van; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J. A.; FURLANI, A. M. C. **Recomendações de adubação e calagem para o estado de São Paulo**. 2. ed. Campinas, Instituto Agronômico & Fundação IAC (Boletim Técnico 100), p. 56- 57, 1997.

RAIJ, B. van; QUAGGIO, J. A. **Métodos de análise de solo para fins de fertilidade**. Campinas: Instituto Agronômico, 1983.

RAMESH, P. Effect of different levels of drought during the formative phase on growth parameters and its relationship with dry matter accumulation in sugarcane. **Journal Agronomy & Crop Science**, v. 185, p. 83-89, 2000.

RAO, C. M.; KUMAR, M. V.; REDDY, L. K. Management of sugarcane clones under limited moisture situations (drought) at formative stage. **Indian Sugar**, Indian, p. 949-953, 2005.

REICHHARTA, D. W.; BAK, S.; PAQUETTE, S. **Cytochromes P450**. The Arabidopsis Book Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 2002.

RIPOLI, T. C. C.; RIPOLI, M. L. C.; CASAGRANDE, D. V.; IDE, B. Y. **Plantio de cana-de-açúcar: estado da arte**. 2. ed. Piracicaba: T.C.C. RIPOLI, 2007, v. 1, p. 92-101.

ROBERTSON, G.; SCHEIN, J.; CHIU, R.; CORBETT, R.; FIELD, M.; JACKMAN, S. D.; MUNGALL, K.; LEE, S.; OKADA, H. M.; QIAN, J. Q.; GRIFFITH, M.; RAYMOND, A.; THIESSEN, N.; CEZARD, T.; BUTTERFIELD, Y. S.; NEWSOME, R.; CHAN, S. K.; SHE, R.; VARHOL, R.; KAMOH, B.; PHABHU, A. – L.; TAM, A.; ZHAO, Y. J.; MOORE, R. A.; HIRST, M.; MARRA, M. A.; JONES, S. J. M.; HOODLESS, P. A.; BIROL, I. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature Methods**, v. 7, n. 11, p. 909-912, 2010.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, p. 139-140, 2010.

RODRIGUES, F. A.; GRAÇA, J. P.; LAIA, M. L.; NHANI-JR, A.; GALBIATI, J. A.; FERRO, M. I. T.; FERRO, J. A. ZINGARETTI, S. M. Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 1, p. 43-53, 2011.

RODRIGUES, F. A.; LAIA, M. L.; ZINGARETTI, S. M. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Science**, v. 176, p. 286-302, 2009.

RONG-HUA, L.; GUO, P. G.; MICHAEL, B.; STEFANIA, G.; SALVATORE, C. Evaluation of chlorophyll content and fluorescence parameters as indicators of drought tolerance in barley. **Agricultural Science in China**, Beijing, v. 5, n. 10, p. 751-757, 2006.

RUSHTON, P. J.; SOMSSICH, I. E.; RINGLER, P.; SHEN, Q. J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 5, p. 247-258, 2010.

SAHOO, R. K.; GILL, S. S.; TUJETA, N. Pea DNA helicase 45 promotes salinity stress tolerance in IR64 rice with improved yield. **Plant Signaling & Behavior**, v. 7, n. 8, p. 1042-1046, 2012.

SAMBROOK, J.; FRITCH, E. F.; MANIATS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor: Press**. 1989.

SCARPARE, F. V. **Simulação do crescimento da cana-de-açúcar pelo modelo agrohidrológico SWAP/WOFOST**. 2011. 164 f. Tese (Doutorado em Ciências: Física do Ambiente Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SEGATO, S. V.; MATTIUZ, C. F. M.; MOZAMBANI, A. E. Aspectos fenológicos da cana-de-açúcar. In: SILVELENA VANZOLINI SEGATO et al. **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba, 2006, cap. 2, p. 19-36.

SHEN, H.; ZHU, L.; BU, Q. Y.; HUQ, E. MAX2 affects multiple hormones to promote photomorphogenesis. **Molecular Plant**, v. 5, p. 750–762, 2012.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 2, p. 221-227, 2007.

SILVA, A. L. C.; COSTA, W. A. J. M. Varietal variation in stomatal conductance, transpiration and photosynthesis of commercial sugarcane varieties under two contrasting water regimes. **Tropical Agricultural Research & Extension**, v. 12, n. 2, 2009.

SILVA, D. M. E. **Influência dos sistemas de exploração agrícola convencional e orgânico em cana-de-açúcar**. 2007. 78 f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SILVA, M. A.; JIFON, J. L.; SILVA, J. A. G.; SHARMA, V. Use of physiological parameters as fast tools to screen for drought tolerance in sugarcane. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 3, p. 193-201, 2007.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; ARANTES, M. T.; BRUNELLI, M. C.; HOLANDA, L. A. Respostas fisiológicas de cultivares de cana-de-açúcar submetidas à deficiência hídrica e a reidratação. **Revista Caatinga**, v. 26, n. 3, p. 28-35, 2013.

SILVA, M. A.; SANTOS, C. M.; VITORINO, H. S.; RHEIN, A. F. L. Pigmentos fotossintéticos e índice SPAD como descritores de intensidade do estresse por deficiência hídrica em cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 173-181, 2014.

SILVA, N. F.; CUNHA, F. N.; TEIXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; MOURA, L. C.; VIDAL, V. M. Perfilhamento da cana-de-açúcar submetida a diferentes lâminas de irrigação e fertirrigação nitrogenada. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 9, n. 3, p. 91-101, 2015.

SILVEIRA, R. D. D.; ABREU, F. R. M.; MAMIDI, S.; McCLEAN, P. E.; VIANELLO, R. P.; LANNA, A. C.; CARNEIRO, N. P.; BRONDANI, C. Expression of drought tolerance genes in tropical upland rice cultivars (*Oryza sativa*). **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 3, p.8181-8200, 2015.

SIMÕES NETO, D. E. Variedades de cana-de-açúcar no estado de Pernambuco: contribuição do melhoramento clássico da Ridesa-UFRPE. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, v.5-6, p.125-146, 2008-2009.

SINGH, S.; RAO, P. N. G. Varietal differences in growth characteristics in sugarcane. **The Journal of Agricultural Science**, v. 108, p. 245-247, 1987.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

SOARES-COSTA, A.; BELTRAMINI, L. M.; THIEMANN, O. H.; HENRIQUE-SILVA, F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 29, p. 1194-1199, 2002.

SOUZA, F. V. **Expressão de genes em resposta a estresse por restrição hídrica em sementes de *Ricinus communis* L. (Euphorbiaceae)**. 78 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SREEDHAR, A. S.; VANATHI, P.; PAITHANKAR, K. R. Stress proteins in biology and medicine: evolution, adaptation and clinical evaluation. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 1, n. 3, p. 1-36, 2010.

SRIDHA, S.; WU, K. Identification of AtHD2C as a novel regulator of abscisic acid responses in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v. 46, p. 124-133, 2006.

STEFANOWICZ, K.; LANNOO, N.; VAN DAMME, E. J. M. Plant F-box proteins – judges between life and death. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, p. 523-552, 2015.

SUGANO, S.; KAMINAKA, H.; RYBKA, Z.; CATALA, R.; SALINAS, J.; MATSUI, K.; OHME-TAKAQI, M.; TAKATSUJI, H. Stress-responsive zinc finger gene ZPT2-3 plays a role in drought tolerance in petunia. **The Plant Journal**, v. 36, n. 6, p. 830-841, 2003.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. edição. Porto Alegre: Artmed, 848p, 2009.

TAIZ, L. ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5ª edição. Porto Alegre: Artmed, 918p, 2013.

TALUKDER, S. K.; AZHAGUVEL, P.; MUKHERJEE, S.; YOUNG, C. A.; TANG, Y.; KROM, N.; SAHA, M. C. *De Novo* assembly and characterization of Tall Fescue transcriptome under water stress. **The Plant Genome**, v. 8, n. 2, p. 1-13, 2015.

TASSO JÚNIOR, L. C.; SILVA NETO, H. F.; MARQUES, M. O.; CAMILOTTI, F. Desempenho de cultivares de cana-de-açúcar nas condições de cana-planta de ano e meio (safra 2008/2009). **Ciência e Tecnologia**, v. 2, n. 1, p. 14-26, 2011.

TIAN, G.; SIMI, T.; COWAN, N. J. Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity. **Cytoskeleton**, v. 67, n. 11, p. 706-714, 2010.

TIAN, G.; COWAN, N. J. Tubulin- specific chaperones: components of a molecular machine that assembles the α/β heterodimer. In: CORREIA, J. J.; WILSON, L. (Eds.). **Microtubules, in Vitro**. New York: cap. 11, v. 115, p. 155-171, 2013.

TIMOTIJEVIC, G. S.; MILISAVLJEVIC, M. D.; RADOVIC, S. R.; KONSTANTINOVIC, M. M.; MAKSIMOVIC, V. R. Ubiquitous aspartic proteinase as an actor in the stress response in buckwheat. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, p. 61-68, 2010.

TORRES NETTO, A.; CAMPOSTRINI, E.; OLIVEIRA, J. G.; BRESSAN-SMITH, R. E. Photosynthetic pigments, nitrogen, chlorophyll a fluorescence and SPAD-502 readings in coffee leaves. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 104, n. 2, p. 199-209, 2005.

TRIPATHI, P.; RABARA, R. C.; SHEN, Q. J.; RUSHTON, P. J. Transcriptomics analyses of soybean leaf and root samples during water-deficit. **Genomics Data**, v. 5, p. 164-166, 2015.

TRUJILLO, L. E.; SOTOLONGO, M.; MENÉNDEZ, C.; OCHOGAVÍA, M. E.; COLL, Y.; HERNÁNDEZ, 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.

TUJETA, N.; GILL, S. S.; TUJETA, R. Helicases in improving abiotic stress tolerance in crop plants. In: Tujeta et al. (Eds.). **Improving crop resistance to abiotic stress**. Wiley-Blackwell, Germany, v. 1, p. 435-449, 2012.

UNICA- União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Setor sucroenergético – Mapa de Produção**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/>. Acesso em 04 de janeiro de 2016.

UNICA- União da Indústria de Cana-de-açúcar. **Setor sucroenergético – FAQ**. Disponível em: <http://www.unica.com.br/faq/>. Acesso em 04 de janeiro de 2016.

URANO, K. KURIHARA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress response. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 132-138, 2010.

VANTINI, J. S.; DEDEMO, G. C.; GIMENEZ, D. F. J.; FONSECA, L. F. S.; TEZZA, R. I. D.; MUTTON, M. A.; FERRO, J. A.; FERRO, M. I. T. Differential gene expression in drought-tolerant sugarcane roots. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 7196-7207, 2015.

VARGAS, L.; BRÍGIDA, A. B. S.; MOTA FILHO, J. P.; CARVALHO, T. G.; ROJAS, C. A.; VANEECHOUTTE, D.; BEL, M. V.; FARRINELLI, L.; FERREIRA, P. C. G.; VANDEPOELE, K.; HEMERLY, A. S. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with *Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. **PLOS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1-37, 2014.

VASCONCELOS, T. S. **Montagem de novo do transcriptoma de teça (Tectona grandis L. f.) e busca por genes relacionados ao estresse hídrico**. 2015. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

VASEVA, I.; SABOTIC, J.; SUSTAR-VOZLIC, J.; MEGLIC, V.; KIDRIC, M.; DEMIREVSKA, K.; SIMOVA-STOILOVA, L. The response of plants to drought stress: the role of dehydrins, chaperones, proteases and protease inhibitors in maintaining cellular protein function. In: NEVES, D. F.; SANZ, J. D. **Droughts: New Research**. Sofia, 2012, cap. 1, p. 1-45.

VASHISHT, A. A.; TUJETA, N. Stress responsive DEAD-box helicases: A new pathway to engineer plant stress tolerance. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 84, p. 150-160, 2006.

VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, p. 484-487, 1995.

VETTORE, A. L.; SILVA, F. R.; KEMPER, E. L.; SOUZA, G. M.; SILVA, A. M.; FERRO, M. I. T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GIGLIOTI, E. A.; LEMOS, M. V. F.; COUTINHO, L. L.; NOBREGA, M. P.; CARRER, H.; FRANÇA, S. C.; BACCI JR., M.; GOLDMAN, M. H. S.; GOMES, S. L.; NUNES, L. R.; CAMARGO, L. E. A.; SIQUEIRA, W. J.; SLUYS, M. A. V.; THIEMANN, O. H.; KURAMAE, E. E.; SANTELLI, R. V.; MARINO, C. L.; TARGON, M. L. P. N.; FERRO, J. A.; SILVEIRA, H. C. S.; H.; MARINI, D. C.; LEMOS, E. G. M.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; TAMBOR, J. H. M.; CARRARO, D. M.; ROBERTO, P. G.; MARTINS, V. G.; GOLDMAN, G. H.; DE OLIVEIRA, R. C.; TRUFFI, D.; COLOMBO, C. A.; ROSSI, M.; ARAUJO, P. G.; SCULACCIO, S. A.; ANGELLA, A.; LIMA, M. M. A.; ROSA JR, V. E.; SIVIERO, F.; COSCRATO, V. E.; MACHADO, M. A.; GRIVET, L.; DI MAURO, S. M. Z.; NOBREGA, F. G.; MENCK, C. F. M.; BRAGA, M. D. V.; TELLES, G. P.; CARA, F. A. A.; PEDROSA, G.; MEIDANIS, J.; ARRUDA, P. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genoma Research**, v. 13, n. 12, p. 2725- 2735, 2003.

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

VIDHYASEKARAN, P. Plant hormone signaling systems in plant innate immunity. In: **Signaling and Communication in Plants**, 2015, cap.2, p. 27-122.

VICENTINI, R.; BOTTCHER, A.; BRITO, M. S.; SANTOS, A. B.; CRESTE, S.; LANDELL, M. G. A.; CESARINO, I.; MAZZAFERA, P. Large-Scale transcriptome analysis of two sugarcane genotypes constrasting for lignin content. **PLOS ONE**, p. 1-19, 2015.

VIEIRA, G. H. S.; MANTOVANI, E. C.; SEDIYAMA, G. C.; DELAZARI, F. T. Indicadores morfo-fisiológicos do estresse hídrico para a cultura da cana-de-açúcar em função de lâminas de irrigação. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, suplement 1, p. 65-75, 2014.

WANG, S.; KUREPA, J.; HASHIMOTO, T.; SMALLE, J. A. Salt stress-induced disassembly of *Arabidopsis* cortical microtubule arrays involves 26S proteasome-dependent degradation of SPIRAL1. **The Plant Cell**, v. 23, p. 3412-3427, 2011.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 28, p. 1-14, 2003.

WANG, X.; KONG, H.; MA, H. F-box proteins regulate ethylene signaling and more. **Genes & Development**, v. 23, p. 391-396, 2009.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Review Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WEN, Z.; YAO, L.; WAN, R.; LI, Z.; LIU, C.; WANG, X. Ectopic expression in *Arabidopsis thaliana* of an NB-ARC encoding putative disease resistance gene from wild chinese *Vitis pseudoreticulata* enhances resistance to phytopathogenic fungi and bacteria. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 1087, p. 1-13, 2015.

WILHELM, B. T.; MARGUERAT, S.; GOODHEAD, I.; BAHLER, J. Defining transcribed regions using RNA-Seq. **Nature protocols**, v. 5, p. 255-266, 2010.

WU, Y.; ZHANG, D.; CHU, J. Y.; BOYLE, P.; WANG, Y.; BRINDLE, I. D.; DE LUCA, V.; DESPRÉS, C. The Arabidopsis NPR1 protein is a receptor for the plant defense hormone salicylic acid. **Cell Reports**, v. 1, p. 639-647, 2012.

XU, D. Q.; HUANG, J.; GUO, S. Q.; YANG, X.; BAO, Y. M.; TANG, H. J.; ZHANG, H. S. Overexpression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) **FEBS Letters**, v. 582, p. 1037-1043, 2008.

XU, J.; XING, X. J.; TIAN, Y. S.; PENG, R. H.; XUE, Y.; ZHAO, W.; YAO, Q. H. Transgenic arabidopsis plants expressing tomato glutathione-S-transferase showed enhanced resistance to salt and drought stress. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1-16, 2015.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 10, n. 2, p. 88-94, 2005.

YAO, X.; XIONG, W.; YE, T.; WU, Y. Overexpression of the aspartic protease ASPG1 gene confers drought avoidance in Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, v. 63, n. 7, p. 2579-2593, 2012.

YU, H.; WU, J.; XU, N.; PENG, M. Roles of F-box proteins in plant hormone responses. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 12, p. 915-922, 2007.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for *de novo* short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 821-829, 2008.

ZHANG, J.; LIANG, S.; DUAN, J.; WANG, J.; CHEN, S.; CHENG, Z.; ZHANG, Q.; LIANG, X.; LI, Y. *De novo* assembly and characterization of the transcriptome during seed development, and generation of genic-SSR markers in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **BMC Genomics**, v. 13, p. 90-102, 2012.

ZHANG, J.; WEN, C-K. Ethylene signalling: EIN2 dual targeting. **Nature Plants**, v. 1, n. 15192, p. 1-2, 2015.

ZHANG, S.; QI, Y.; LIU, M.; YANG, C. SUMO E3 Ligase AtMMS21 Regulates Drought Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 83-95, 2013.

ZHAO, D.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J.C. Sugarcane response to water-deficit stress during early growth on organic and sand soils. **American Journal of Agricultural and Biological Sciences**, v. 5, n. 3, p. 403-414, 2010.

ZHAO, J.; ZHANG, J.; ZHANG, W.; WU, K.; ZHENG, F.; TIAN, L.; LIU, X.; DUAN, J. Expression and functional analysis of the plant-specific histone deacetylase HDT701 in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 764, p. 1-8, 2015.

ZHENG, Y.; DING, Y.; SUN, X.; XIE, S.; WANG, D.; LIU, X.; SU, L.; WEI, W.; PAN, L.; ZHOU, D-X. Histone deacetylase HDA9 negatively regulates salt and drought stress responsiveness in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-11, 2016.

ZHICHANG, Z.; WANRONG, Z.; JINPING, Y.; JIANJUN, Z.; XUFENG, L. Z. L.; YANG, Y. Over-expression of *Arabidopsis* DnaJ (Hsp40) contributes to NaCl-stress tolerance. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 7, p. 972-978, 2010.

ZHOU, S.; SUN, X.; YIN, S.; KONG, X.; ZHOU, S.; XU, Y.; LUO, Y.; WANG, W. The role of the F-box gene TaFBA1 from wheat (*Triticum aestivum* L.) in drought tolerance. **Plant Physiology Biochemistry**, v. 84C, p. 213–223, 2014.

ZHU, X.; LIU, S.; MENG, C.; QIN, L.; KONG, L.; XIA, G. WRKY transcription factors in wheat and their induction by biotic and abiotic stress. **Plant Molecular Biology Reporter**, p. 1-15, 2013.

Anexo A:

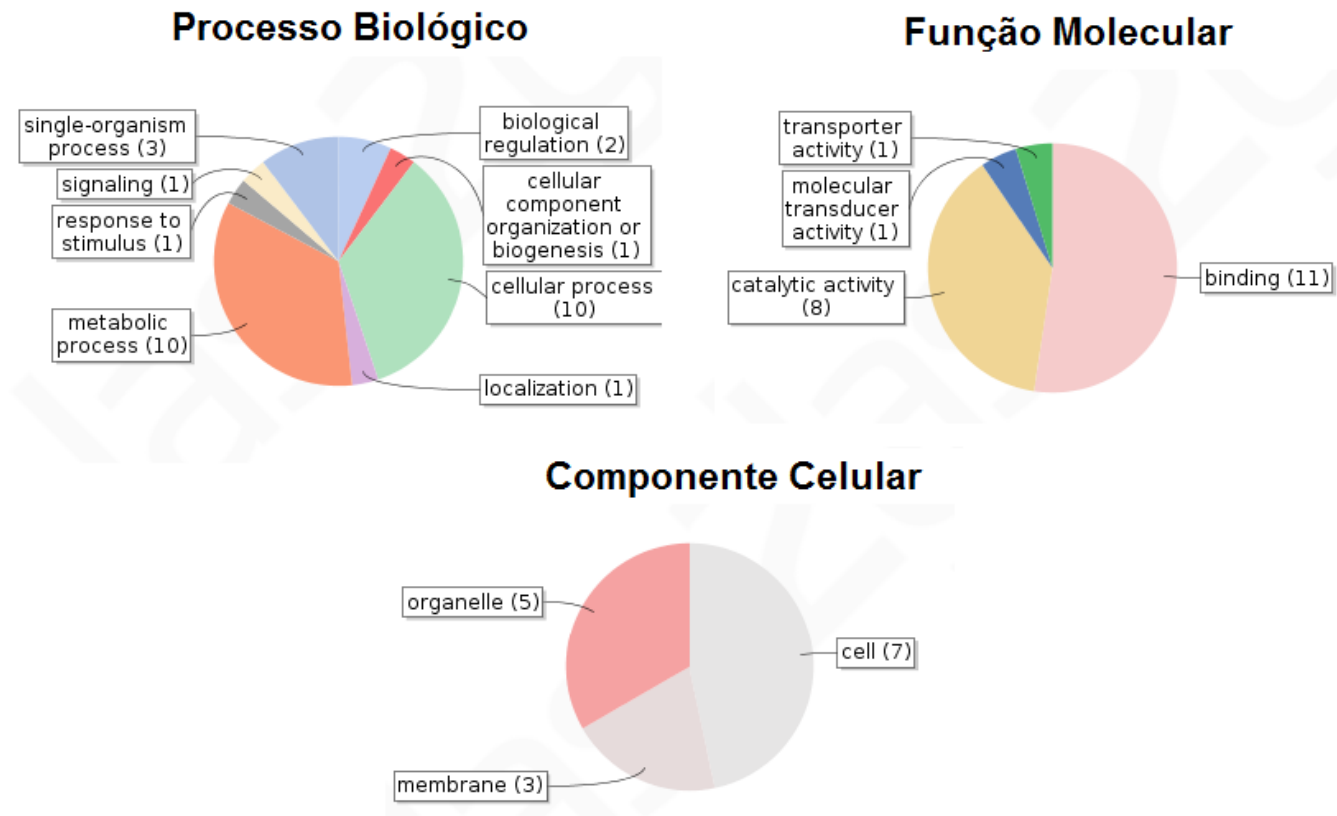


Figura 28. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 1, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

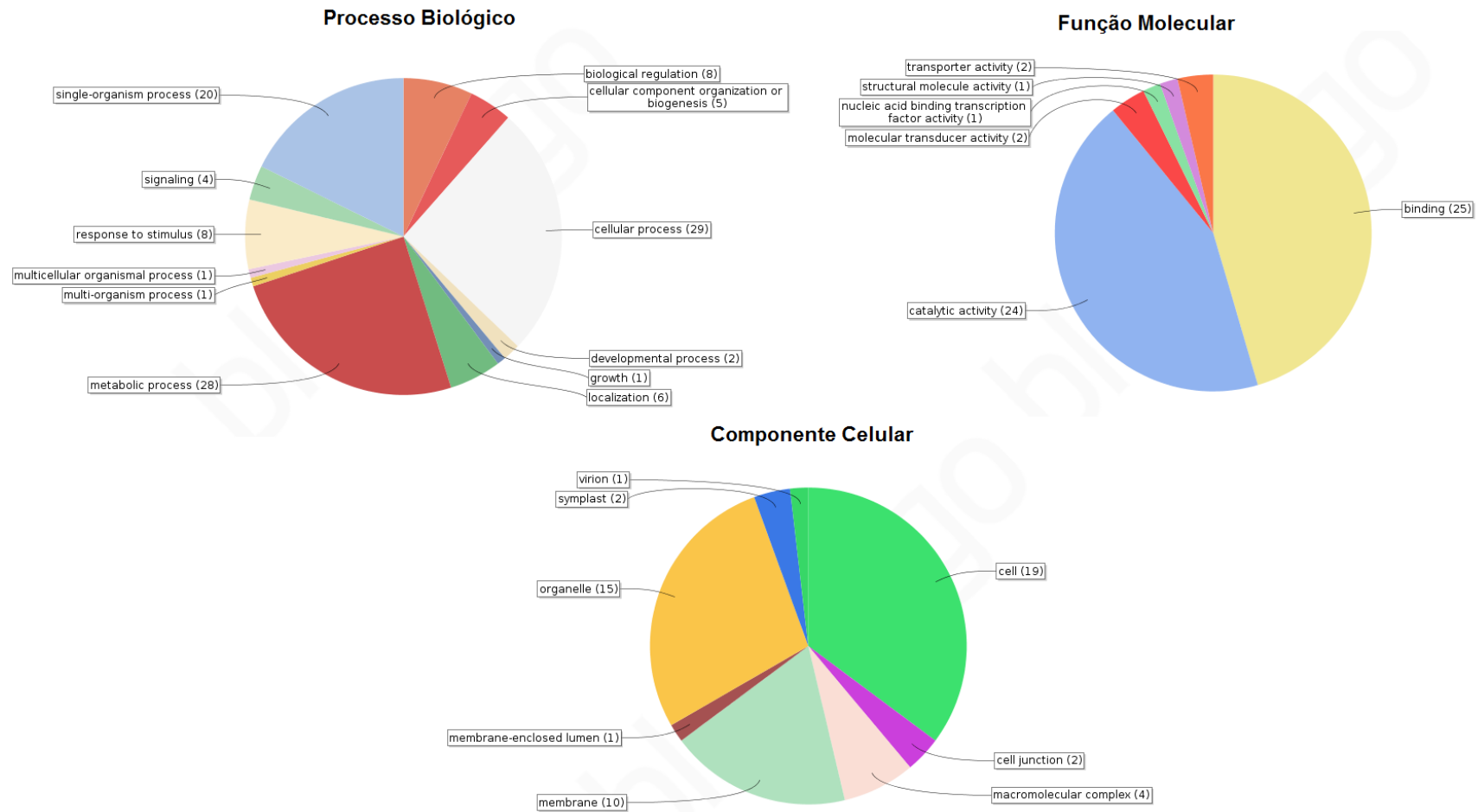


Figura 29. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 2, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

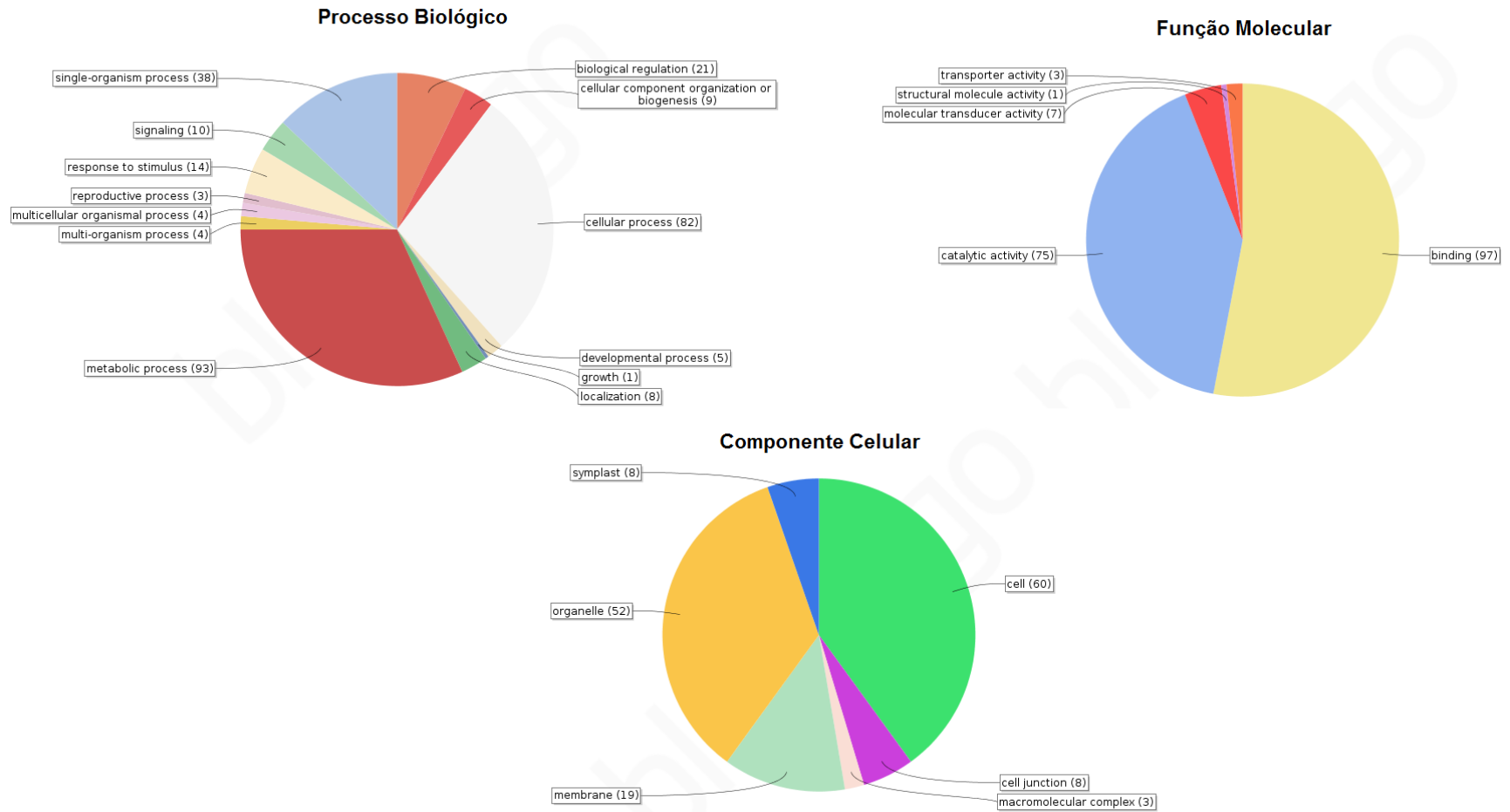


Figura 30. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 3, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

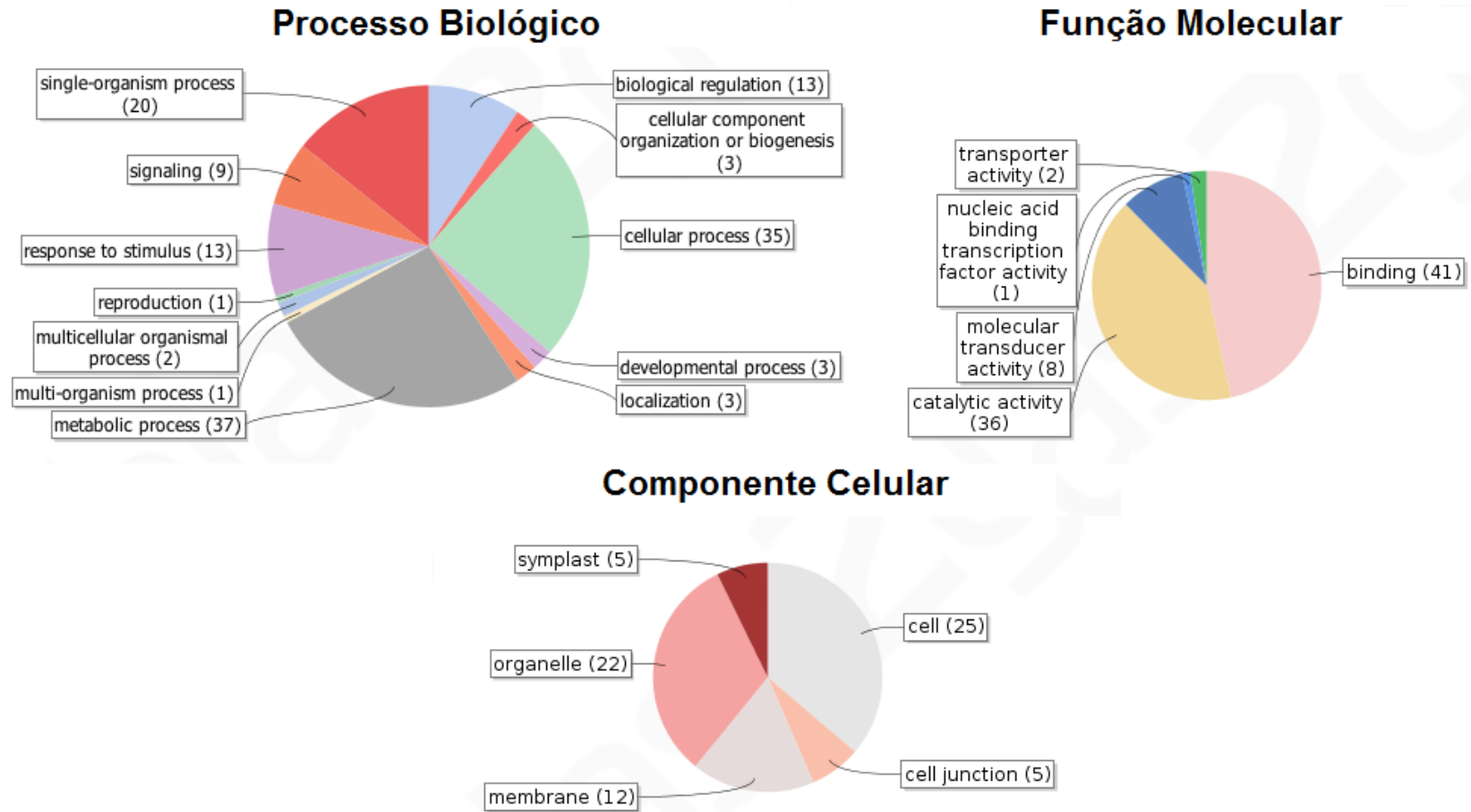


Figura 31. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 4, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

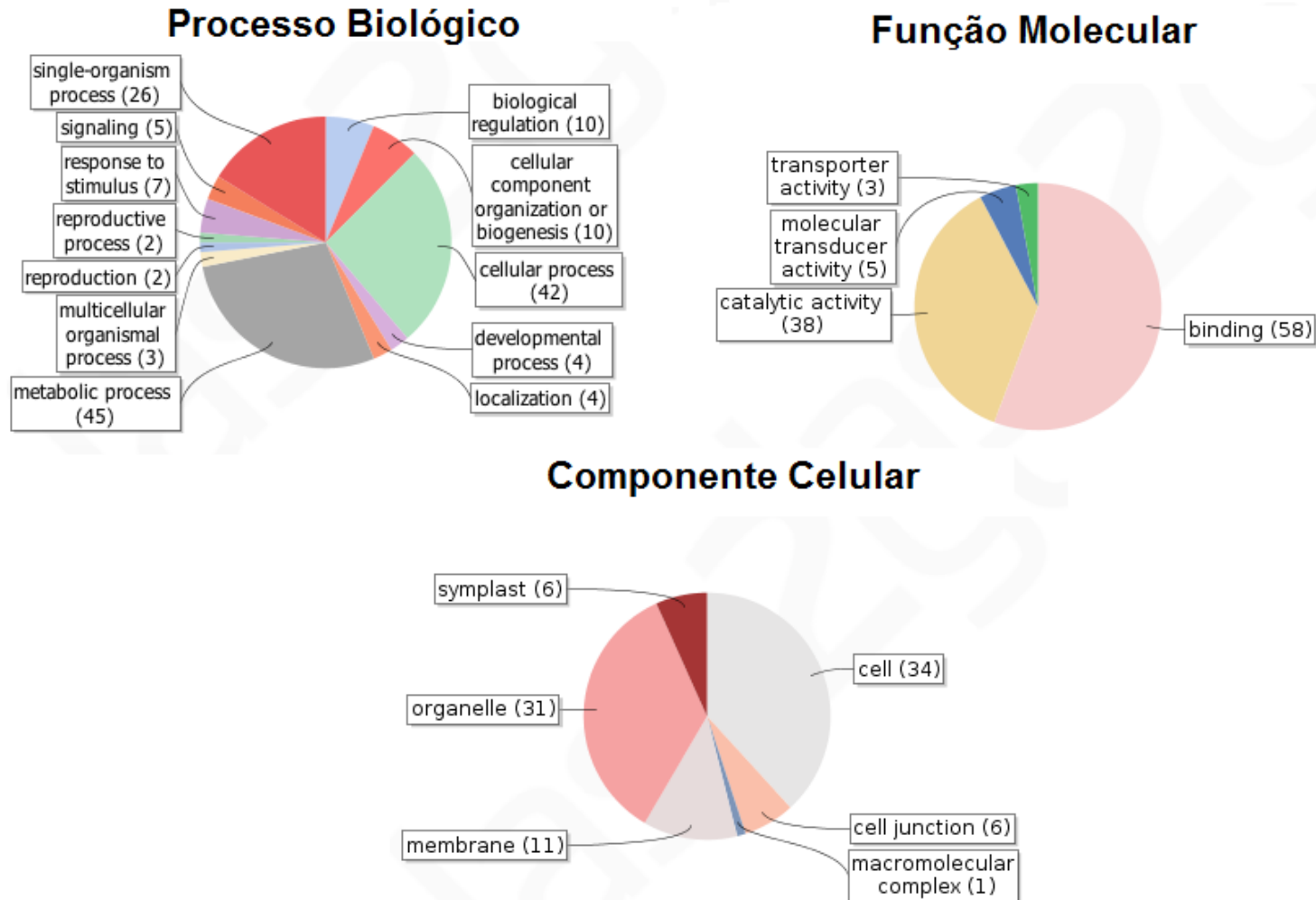


Figura 32. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 5, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

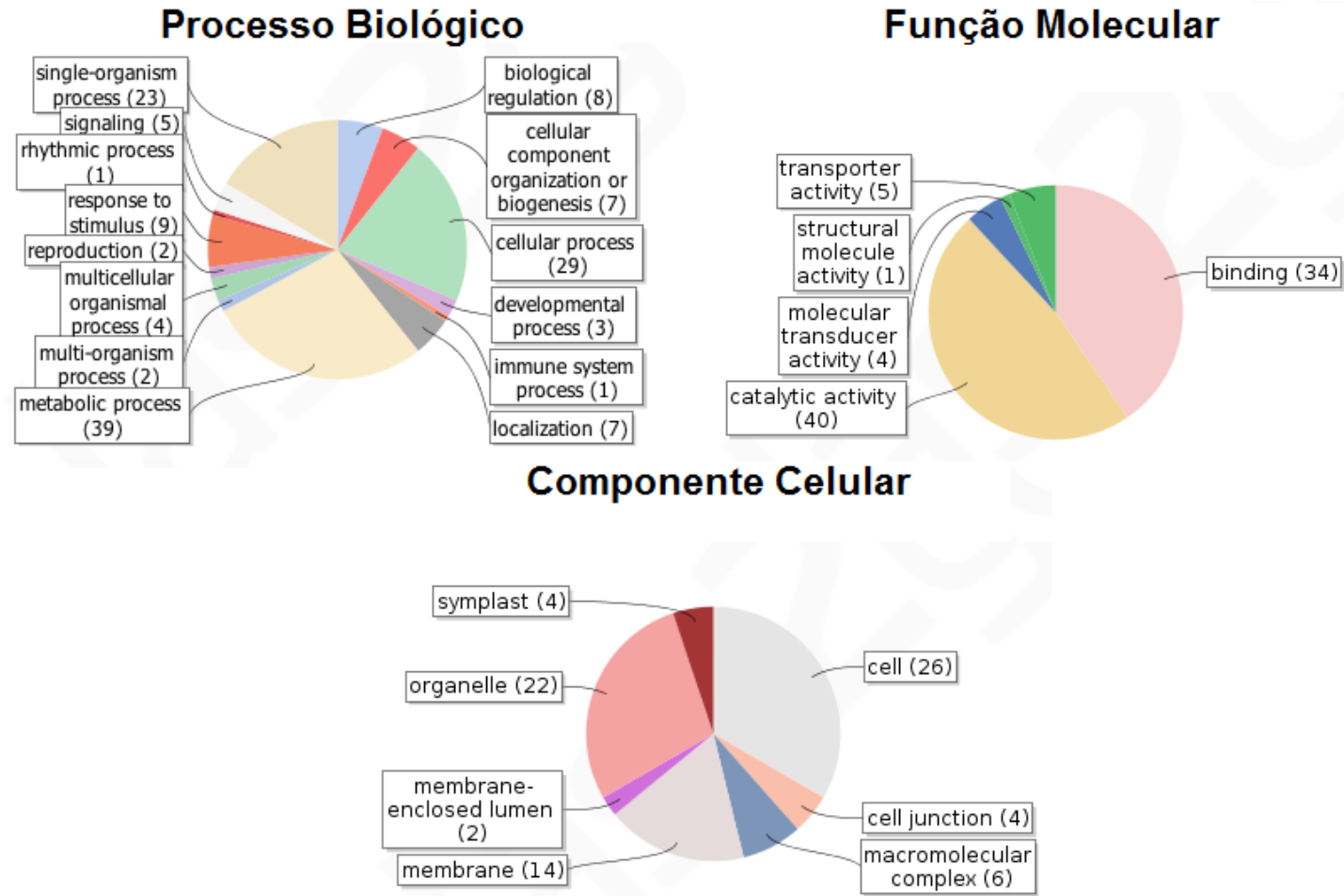


Figura 33. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 6, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

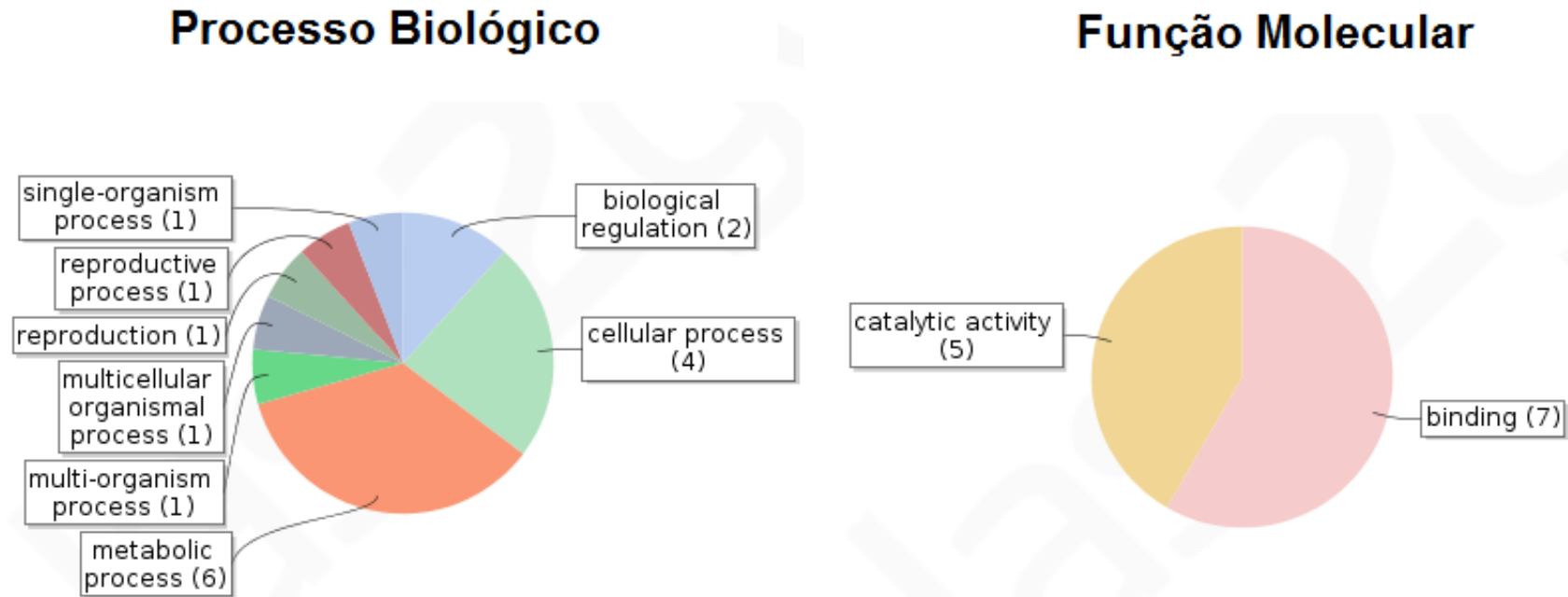


Figura 34. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico e função molecular dos transcritos do “cluster” 7, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).

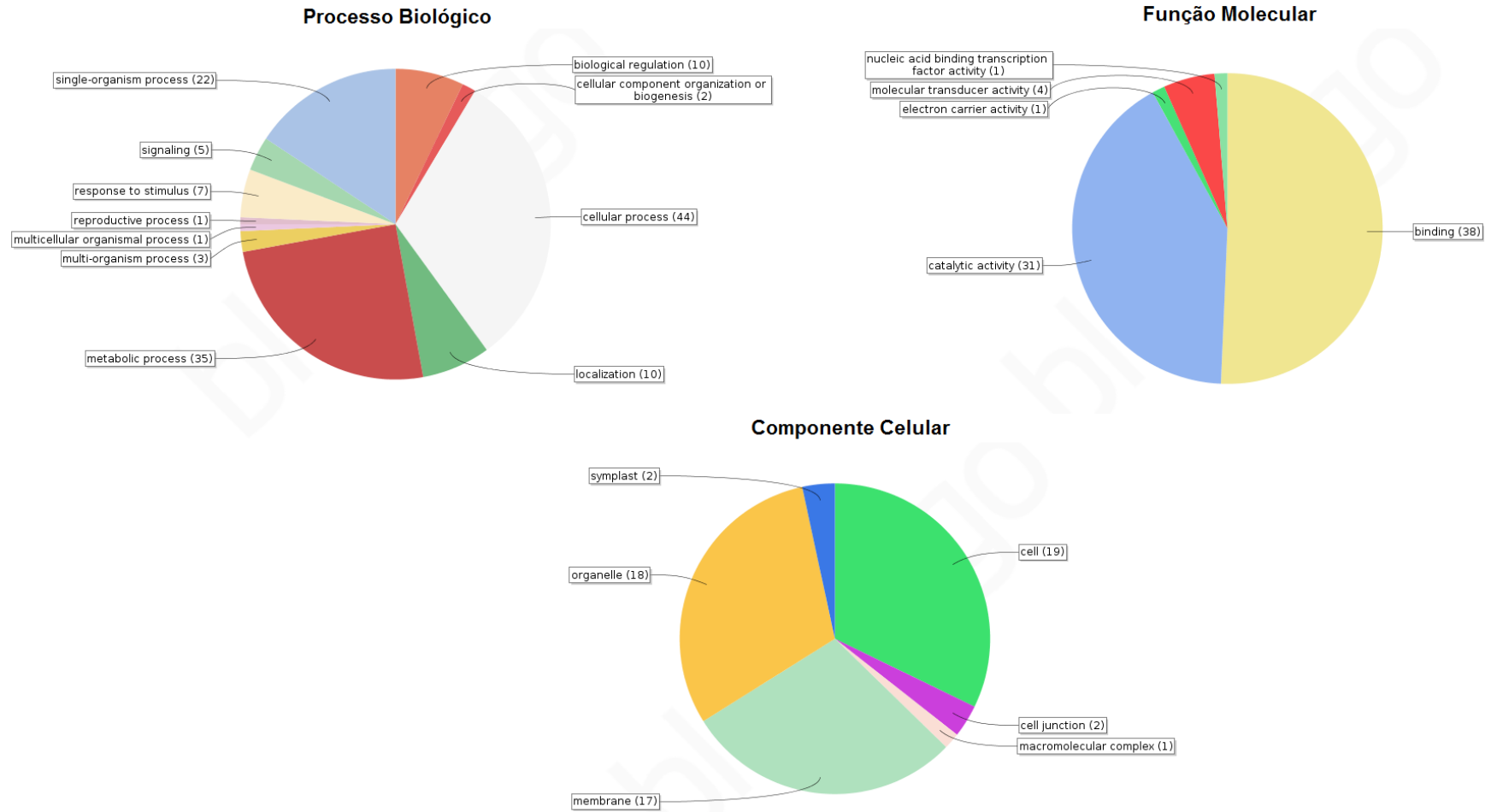


Figura 35. Gráfico nível dois ilustrando a categorização em processo biológico, função molecular e componente celular dos transcritos do “cluster” 8, exclusivos da cultivar tolerante (SP81-3250).