

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE POLIMORFISMO DE
NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP) NA REGIÃO CODIFICADORA
DE DUAS CULTIVARES CONTRASTANTES DA CANA-DE-
AÇÚCAR SUBMETIDAS À PROLONGADA LIMITAÇÃO
HÍDRICA**

Bárbara Balisa de Carvalho
Engenheira Agrônoma

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE POLIMORFISMO DE
NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP) NA REGIÃO CODIFICADORA
DE DUAS CULTIVARES CONTRASTANTES DA CANA-DE-
AÇÚCAR SUBMETIDAS À PROLONGADA LIMITAÇÃO
HÍDRICA**

Discente: Bárbara Balisa de Carvalho

Orientadora: Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientador: Prof. Dr. Jesus Aparecido Ferro

Coorientadora: Dra. Daniele Fernanda Jovino Gimenez

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).

2022

C331a

Carvalho, Bárbara Balisa de

Análise E Validação De Polimorfismo De Nucleotídeo Único (Snp) Na Região
Codificadora De Duas Cultivares Contrastantes Da Cana-De-Açúcar
Submetidas À Prolongada Limitação Hídrica / Bárbara Balisa de Carvalho. –
Jaboticabal, 2022

54 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Maria Inês Tiraboschi Ferro

Coorientadora: Daniele Fernanda Jovino Gimenez

1. Expressão diferencial. 2. Polimorfismo de nucleotídeo único. 3.
Cana-de-açúcar. 4. Reação em cadeia da polimerase em tempo real. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP) NA REGIÃO CODIFICADORA DE DUAS CULTIVARES CONSTRATANTES DE CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS À PROLONGADA LIMITAÇÃO HIDRÍCA

AUTORA: BÁRBARA BALISA DE CARVALHO
ORIENTADORA: MARIA INES TIRABOSCHI FERRO
COORIENTADOR: JESUS APARECIDO FERRO
COORIENTADORA: DANIELE FERNANDA JOVINO GIMENEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA INES TIRABOSCHI FERRO (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental / FCAV UNESP Jaboticabal

Pesquisadora POLIANA FERNANDA GIACHETTO (Participação Virtual)
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / EMBRAPA Campinas/SP

Pesquisadora Dra. LUCIANA ROSSINI PINTO (Participação Virtual)
IAC - Centro de Cana / Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 25 de novembro de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Bárbara Balisa de Carvalho - nascida em 31 de maio de 1995, no município de Perdões, Minas Gerais, filha de Ticiane Balisa e Luiz Henrique Ramos Carvalho. Formou-se em Engenharia Agrônoma pela Universidade Federal de Lavras em Dezembro de 2019. Em março de 2020 iniciou o curso de mestrado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Genética e Melhoramento de Plantas) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp/Jaboticabal, sob a orientação da Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro.

*“ Quanto mais aumenta nosso conhecimento,
mais evidente fica nossa ignorância.”*

John F. Kennedy

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente à minha mãe e aos meus avós, que sempre estiveram dispostos a tudo para me ajudar.

À minha filha Ísis pela força que ela me dá e por ser o meu combustível para ir à luta diariamente.

Ao meu companheiro Rodrigo pelo apoio de sempre.

Aos meus amigos de Jaboticabal Alice, Igor, Gabriel e Tamires, pelas risadas e auxílio nos tempos de desespero.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FCAV/Unesp) pela oportunidade de realização do mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida

À Profa. Dra. Maria Inês Tiraboschi Ferro, pela orientação, ensinamentos, confiança, carinho, incentivo e amizade durante todo desenvolvimento desse trabalho. Muito obrigada!

À Dra. Daniele Fernanda Jovino Gimenez, pela coorientação, ensinamentos, auxílios e preciosas dicas nos trabalhos de bancada.

Às meninas do Centro de Recursos Biológicos e Genômicos (CREBIO): Agda, Mariza e Célia, agradeço pela colaboração e disponibilidade em ajudar sempre que possível. Um adendo especial à Marilza pela ajuda nos trabalhos de bancada.

A todos os alunos, funcionários e professores do Departamento de Tecnologia, que de alguma maneira contribuíram para a realização desse trabalho.

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

SUMÁRIO

RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Cana-de-açúcar: a planta, o histórico e a economia	4
2.2. Mecanismo de resposta ao déficit hídrico em plantas.....	5
2.3. Estudos fisiológicos, genéticos e moleculares em cana-de-açúcar submetida a prolongada limitação hídrica	7
2.4. Marcadores Moleculares do tipo SNP (<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>).....	8
2.5. Análise do transcriptoma e PCR quantitativa em Tempo Real	10
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Experimento em casa de vegetação e material vegetal	12
3.2. RNA-Seq	12
3.3. Seleção dos transcritos alvos para o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	13
3.4. Obtenção dos RNAs e Síntese de cDNA	16
3.5. Desenho de iniciadores para os transcritos alvos	17
3.6. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadore.....	18
3.7. Eficiência de Amplificação da PCR	19
3.8. Quantificação Relativa da Expressão Gênica pelo Método do CT Comparativo ($\Delta\Delta Ct$).....	19
3.9. Análise Estatística	20
4. RESULTADOS	21
4.1. Seleção dos transcritos alvos para o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)	21
4.2. Titulação dos Oligonucleotídeos	21
4.3. Curva Padrão	23

4.4. Análise da Expressão Relativa	26
4.4.1. Serina/Treonina Quinase	26
4.4.2. ABF	29
4.4.3. Universal Stress Protein (USP).....	32
5. DISCUSSÃO	34
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

ANÁLISE E VALIDAÇÃO DE POLIMORFISMO DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNP) NA REGIÃO CODIFICADORA DE DUAS CULTIVARES CONTRASTANTES DA CANA-DE-AÇÚCAR SUBMETIDAS À PROLONGADA LIMITAÇÃO HÍDRICA

RESUMO - A cana-de-açúcar é uma cultura de grande importância econômica. O estresse hídrico é um dos fatores que prejudica a produtividade e tem sido alvo de preocupação por parte dos melhoristas e da comunidade científica frente ao cenário de mudanças climáticas. As ferramentas moleculares são uma forte aliada aos programas de melhoramento no desenvolvimento de cultivares resilientes às mudanças climáticas. O objetivo do estudo foi validar o nível de expressão gênica de três transcritos de cana-de-açúcar e comparar o perfil da expressão destes transcritos com SNPs exclusivos na cultivar tolerante com os da cultivar sensível sem SNPs, através da técnica de qRT-PCR. Foram utilizadas duas cultivares de cana-de-açúcar, SP81-3250, considerada padrão para tolerância, e RB855453, padrão para cultivar sensível, as quais foram submetidas ao estresse hídrico prolongado (90 dias). A coleta de folhas foi realizada aos 30, 60 e 90 dias após o início do déficit hídrico e as amostras de RNA obtidas foram submetidas ao sequenciamento (RNA-seq). A partir do transcriptoma montado das duas cultivares juntas, foram identificados SNPs na região codificadora de genes relacionados à tolerância ao estresse hídrico, exclusivos da cultivar tolerante. Os transcritos escolhidos para a análise foram também diferencialmente expressos pela técnica do RNA-seq: Serina/Treonina Quinase, um fator de transcrição ABF e um transcrito que codifica uma Proteína Universal do Estresse (USP). Em geral, foi visto uma diferença significativa na expressão dos genes na cultivar tolerante com SNPs em comparação com a sensível sem SNPs. A cultivar tolerante percebe o estresse primeiro e, assim, ativa mais rapidamente a maquinaria gênica responsável pelo mecanismo de proteção contra a perda de água, o que afeta também o sistema enzimático antioxidante protetor, diminuindo a perda de água desta cultivar. A presença de SNP na cultivar tolerante pode ter influência na maior indução dos transcritos analisados em comparação com a cultivar sensível, podendo estar ligados à forma em que a cultivar lida com esse estresse, porém é necessário estudos moleculares mais aprofundados sobre o assunto.

Palavras-chave: Transcriptoma, qRT-PCR, Poliploides, SNPs, Estresse Hídrico, *Saccharum spp.*

ANALYSIS AND VALIDATION OF SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM (SNP) IN THE CODING REGION OF TWO CONTRASTING SUGARCANE CULTIVARS SUBMITTED TO PROLONGED WATER LIMITATION

ABSTRACT - Sugarcane is a crop of great economic importance. Water stress is one of the factors that impair productivity and has been the subject of concern by breeders and the scientific community in the face of climate change. Molecular tools are a strong ally to breeding programs in the development of cultivars that are resilient to climate change. The objective of the study was to validate the gene expression level of 3 sugarcane transcripts and compare the expression profile of these transcripts with exclusive SNPs in the tolerant cultivar with those of the sensitive cultivar without SNPs, using the qRT-PCR technique. Two sugarcane cultivars were used, SP81-3250, considered standard for tolerance and RB855453, standard for sensitive cultivar, which were subjected to prolonged water stress (90 days). Leaf collection was performed at 30, 60 and 90 days after the onset of water deficit and the RNA samples obtained were submitted to sequencing (RNA-seq). From the assembled transcriptome of the two cultivars together, SNPs were identified in the coding region of genes related to tolerance to water stress, exclusive to the tolerant cultivar. The transcripts chosen for analysis were also differentially expressed by the RNA-seq technique: Serine/Threonine Kinase, an ABF transcription factor and a transcript that encodes a Universal Stress Protein (USP). Overall, a significant difference in gene expression was seen in the SNP-tolerant cultivar compared to the non-SNP-sensitive cultivar. The tolerant cultivar perceives stress first and, therefore, more quickly activates the genetic machinery responsible for the protection mechanism against water loss, which also affects the protective antioxidant enzymatic system, reducing the water loss of this cultivar. The presence of SNP in the tolerant cultivar may have an influence on the greater induction of the analyzed transcripts compared to the sensitive cultivar, and may be linked to the way in which the cultivar deals with this stress, but further molecular studies are needed on the subject.

Keywords: Transcriptome, qRT-PCR, Poliploids, SNPs, Water Stress, *Saccharum* spp.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ABF	Fator de ligação do elemento responsivo ao ABA
ARF	Fator de resposta a auxina
CDPK	Proteína quinase dependente de cálcio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FT	Fator de transcrição
HSF	Fator de transcrição de estresse térmico
HSP	Proteína de choque térmico
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
USP	Proteína universal de estresse
ZF	“Zinc Finger” ou Dedos de zinco

1. INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma planta C4, pertencente à família Poaceae, altamente poliplóide com hibridação interespecífica e é cultivada em regiões tropicais do mundo (Grivet et al. 1996; Manimekalai et al. 2019). A cultura exerce um papel importante no setor econômico mundial sendo utilizada nas indústrias alimentícia e energética devido aos seus produtos como o açúcar e o etanol.

Há uma grande preocupação com as perdas de produtividade devido a estresses ambientais, tais como a seca, para todos os países e os desafios enfrentados pelo setor agropecuário diante dos cenários de mudanças climáticas serão proporcionar segurança alimentar para a população mundial em constante aumento e com uma crescente demanda alimentar, protegendo o meio ambiente e seus ecossistemas (Mahajan e Tuteja, 2005; Rosenzweig et al. 2007).

Os efeitos da seca devido às mudanças climáticas no crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar dependem do estágio de crescimento da planta, do grau de déficit hídrico e da duração do estresse. A cultura é relativamente exigente em água e seu crescimento é altamente sensível ao déficit hídrico (Lakshmanan e Robinson, 2014). A falta de água tem efeitos positivos na produção de sacarose durante a fase de maturação, porém a planta possui uma suscetibilidade maior nas fases de perfilhamento e alongamento do caule, o que afeta diretamente o crescimento do caule e da folha durante as fases de crescimento, sendo estes os órgãos mais afetados (Machado et al, 2009; Ferreira et al, 2017). O estresse hídrico na cana-de-açúcar promove também a competição entre os perfilhos da planta, redução da área foliar, diminuição nos índices de cor verde e a atividade fotossintética (Telles et al. 2019).

Para contornar o problema da grande perda na produção devido a estresses abióticos como a falta de água, uma das alternativas seria o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca através do melhoramento genético. A complexidade do genoma da cana, estimado em torno de 10 Mbp, juntamente com alta ploidia, aneuploidia e polimorfismos (D'hont et al., 1996 e 1994; Arruda, 2002; D'hont, 2005; Aitken et al., 2014;), criam desafios para os programas de melhoramento

convencionais e moleculares. O estudo dos marcadores moleculares possibilita a identificação precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis (Henry, 2012). Os SNPs (polimorfismo de nucleotídeo único), são um tipo de marcador molecular que ocorrem em frequência dentro dos genomas de plantas, variando entre espécies diferentes e se tornaram marcadores de escolha para culturas devido à sua densidade no genoma, o menor tempo necessário para sua detecção, baixa taxa de erro, capacidade de identificar dosagem alélica, menor custo, avaliação inequívoca da dosagem alélica e nível de poliploidia no genoma complexo (Bundock et al., 2009; You et al., 2014). Segundo Cardoso-Silva et al. (2014), a descoberta de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) para a cultura da cana-de-açúcar é de fundamental importância para os programas de melhoramento, uma vez que podem diminuir o longo tempo necessário para o lançamento de novas cultivares por meio da seleção genômica.

O RNA-Seq é uma tecnologia transcriptômica que visa o estudo da expressão gênica e que utiliza sequenciamento de alto rendimento para analisar bibliotecas de cDNA de tecidos ou células obtidas por meio de transcrição reversa de RNA total, revelando diretamente a identidade da sequência, crucial para a análise de genes desconhecidos e novas isoformas de transcrição (Que et al. 2014; Hrdlickova et al. 2017).

A partir do sequenciamento em larga-escala do transcriptoma (RNA-seq) de duas cultivares contrastantes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA811175>), realizados a partir de folhas de cana-de-açúcar sob déficit hídrico prolongado, foi avaliado o perfil de transcrição (Belesini et al., 2017; Konrad, 2019) de duas cultivares contrastantes, uma tolerante (SP81-3250) e outra sensível (RB855453) sob déficit hídrico, em resposta ao tempo e severidade do estresse aplicado, possibilitou a identificação de SNPs candidatos exclusivos da cultivar tolerante em genes relacionados com respostas ao estresse hídrico prolongado.

Tullini (2020, dados não publicados) encontrou SNPs candidatos exclusivos da cultivar tolerante em uma gama de proteínas e fatores de transcrição envolvidas na resposta da planta à seca, dentre elas estão o Fator de transcrição MYB, Fator de transcrição de estresse térmico (HSF), Proteína de Choque Térmico (HSP), Fatores de Transcrição Dedos de Zinco (Zinc Finger), Fator de resposta a auxina (ARF),

Glutationa-S-transferase, Fator de Ligação do Elemento Responsivo ao ABA (ABF), as Serinas/Treoninas Quinases e a Proteína Universal do Estresse (USP).

A partir desses resultados, o objetivo do trabalho foi validar a expressão do RNA-seq de 3 transcritos, que possuem SNPs candidatos na cultivar tolerante, através da técnica de PCR em tempo real, tanto na cultivar tolerante quanto na cultivar sensível, em 30, 60 e 90 dias após o tratamento, no nível de estresse severo. Também foi traçado o perfil de expressão gênica dos três genes nas duas cultivares contrastantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar: a planta, o histórico e a economia

A cana-de-açúcar é uma planta pertencente ao grupo conhecido como complexo *Saccharum*, família *Poaceae* sub-família *Panicoideae*, tribo *Andropogoneae*, subtribo *Saccharinae*, grupo *Saccharastrae* e gênero *Saccharum* (Daniels e Roach, 1987) e foi descrita taxonomicamente pela primeira vez por Linnaeus em 1753 no livro “Species Plantarum” (Hitchcock, 1923). A planta possui inflorescência do tipo panícula, colmo composto por nós e entrenós em crescimento cilíndrico, folhas alternadas e opostas, com camadas de sílica nas bordas, bainha foliar aberta e flor hermafrodita (Toppa et al. 2010).

A planta possui metabolismo C4, apresentando alta taxa fotossintética e elevada capacidade de fixação de CO₂, o que a torna eficiente no uso da água, com crescimento expressivo e ausência de fotorrespiração. A cultura apresenta boa adaptação em ambientes com condições adversas, tais como variações bruscas de temperatura, elevada intensidade luminosa e escassez de água (Casagrande e Vasconcelos, 2008; Manhães et al., 2015).

A cana-de-açúcar foi introduzida no Brasil em 1530, por Martin Afonso de Souza. A introdução se deu em São Paulo, porém foi no Nordeste em que começou a ser cultivada para a produção e exportação do açúcar, sendo Pernambuco e Paraíba os principais produtores na época. A cultura se expandiu para o estado de São Paulo após a crise do café de 1929, porém com um modelo mais revolucionário baseado em maiores produções e em maiores propriedades e usinas (Cortez, 2010). Desde então, o Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais tanto da cana, quanto dos produtos originários desta, principalmente açúcar, álcool e cachaça. Além disso, o clima tropical do Brasil, juntamente com a umidade, luz, solo e disposição de nutrientes, favorece o cultivo de plantas de metabolismo C4 como a cana-de-açúcar, contribuindo para que o país seja o maior produtor mundial desta cultura.

Segundo a CONAB (2022), a produção de cana-de-açúcar, na safra 2021/22, totalizou 585,2 milhões de toneladas, o que representa um volume de matéria-prima

10,6% menor em relação ao da safra 2020/21. Essa redução se deve à diminuição de 3,5% na área cultivada e, sobretudo, aos efeitos climáticos adversos da estiagem durante o ciclo produtivo das lavouras e às baixas temperaturas registradas em junho e julho de 2021. A primeira estimativa da CONAB (2022) para a safra 2022/2023 é de que a produção de cana-de-açúcar deverá totalizar 596,1 milhões de toneladas, um aumento de 1,9% na produção de colmos em relação à da safra 2020/21.

Considerando os efeitos climáticos adversos da estiagem durante o ciclo produtivo da cultura, é de suma importância a pesquisa com a cana-de-açúcar abordando a tolerância e os mecanismos ao estresse hídrico, visto que a seca já está afetando e sendo um problema atual para a produção da cultura.

2.2. Mecanismo de resposta das plantas ao déficit hídrico em plantas

Uma combinação de mudanças de longo prazo nos padrões climáticos globais, causadas pelo homem e também naturalmente, como a crescente emissão de gases de efeito estufa e o aquecimento global, podem resultar em grandes problemas ambientais e maiores intensidades de eventos climáticos extremos que afetarão a agricultura (Holm-Nielsen et al. 2006; Zhao e Li, 2015). Prevê-se que as mudanças climáticas resultem em mudanças no nível do mar, na quantidade e no padrão das chuvas e na frequência de eventos extremos de alta e baixa temperatura, secas, dentre outros estresses abióticos (Dhillon & von Wuehlisch, 2013).

O estresse hídrico afeta desde a morfologia até os processos moleculares das plantas e são evidentes em todos os estágios fenológicos, provocando um estado de desidratação celular que leva a estresses secundários como osmótico e oxidativo (Farooq et al, 2009; Ghosh et al, 2021). Algumas das respostas ao déficit hídrico também envolvem o fechamento estomático, forte crescimento e arquitetura de raízes, aumento de proteínas anti-estresse e as respostas são governadas por regulações fito-hormonais que regulam fatores de transcrição e outras proteínas que ajudam as plantas a desenvolver uma estratégia de enfrentamento eficaz contra o estresse hídrico (Chen et al. 2012; Ghosh et al. 2021).

Dentre alguns efeitos morfológicos e moleculares nos quais a seca causa

impacto primário estão a percepção do sinal, a aquisição de nutrientes e fotossíntese, as funções celulares, a redução nas taxas de assimilação de CO₂, de transpiração e de crescimento, redução também no tamanho das células foliares e na abertura estomática (Mittler, 2006; Taiz and Zeiger, 2017; Zandalinas et al., 2018; Sharma et al. 2020).

Uma diminuição progressiva na disponibilidade de água do solo causa a morte prematura das plantas quando estão com déficit hídrico em estágio terminal e a planta em condições de seca intermitente, que geralmente não leva à morte, é afetada durante o crescimento e o desenvolvimento. A tolerância das plantas à seca é um resultado dos esforços da planta para se recuperar do estresse e resistir, fazendo com que elas cresçam e mantenham seus rendimentos, apesar desta estar em condição de déficit hídrico (Bhargava e Sawant, 2012).

A resposta ao déficit hídrico em plantas tem início a partir de uma complexa via de respostas que, após a percepção do estresse, desencadeia um grande número de processos moleculares, resultando em respostas à níveis bioquímicos, metabólicos e fisiológicos e suas alterações podem desempenhar um grande papel na redução do efeito da seca. À medida que as plantas em situação de seca vão ficando sem água, são produzidos hormônios, principalmente o ABA, ocasionando uma série de respostas, impactando a adaptação delas quanto ao estresse. (Blum, 2011; Bhargava e Sawant, 2012). Os fitohormônios estão por trás da execução de vários processos biológicos que ocorrem na planta, influenciando e auxiliando em respostas moleculares dinâmicas, principalmente em relação às adversidades ambientais, desempenhando um papel como os principais reguladores na maquinaria da expressão gênica que prepara a planta para se ajustar a uma situação não anunciada (Salvi et al., 2021).

Um grande número de genes são responsáveis pela tolerância e expressão do fenótipo relacionado ao estresse. Em nível transcricional, a resposta é composta por um grande conjunto de genes que, com o passar do tempo, precisam ser cada vez mais específicos ao estresse que está ocorrendo na planta (Ma e Bohnert 2007). Uma resposta específica ao déficit hídrico representa a combinação de vários eventos moleculares, que são ativados pela percepção do sinal de estresse (Nepomuceno et al., 2001).

Nesse ínterim, é importante entender a função dos genes responsivos ao estresse para compreender como atua a maquinária gênica ligada à ele e, a partir disso, poder desenvolver cultivares tolerantes à estresses abióticos, através da biotecnologia e do melhoramento convencional.

2.3. Estudos fisiológicos, genéticos e moleculares em cana-de-açúcar submetida a prolongada limitação hídrica

Desde 2013 o nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos com duas cultivares de cana-de-açúcar com diferentes padrões de tolerância ao déficit hídrico, com o objetivo de avaliar o comportamento fisiológico ao longo de um período de 90 dias de estresse, no período conhecido como fase de formação da cana-de-açúcar, compreendendo o período mais crítico por demanda de água. A escolha do período foi devido ao fato de que grande parte dos estudos que envolvem o estresse hídrico em cana-de-açúcar e a identificação de genes que possivelmente têm relação à resposta ao déficit hídrico na planta terem sido feitos em um curto período de tempo (Rodrigues et al., 2009; Gupta et al., 2010; Rodrigues et al., 2011). Assim, foram utilizadas duas cultivares, SP81-3250 e RB85-5453 (Pincelli e Silva, 2012), como padrão de tolerância e suscetibilidade ao déficit hídrico, respectivamente. Ambas foram submetidas a três condições diferentes: estresse Severo, estresse Moderado e sem estresse (Controle). As amostragens ocorreram aos 30, 60 e 90 dias após a aplicação dos tratamentos e foram avaliados parâmetros fisiológicos como número de perfilhos, área foliar, concentração interna de CO₂, potencial hídrico foliar, fotossíntese e índice de cor verde da folha. As variáveis fisiológicas analisadas foram eficientes em distinguir as cultivares, devido ao fato de que a cultivar tolerante apresentou menores reduções dos parâmetros avaliados em relação à cultivar sensível (Telles et al., 2019).

O sequenciamento dos genes expressos através da tecnologia de RNA-Seq gerou um total de 177.509 transcritos para a cultivar tolerante (SP81-3250) e 185.153 transcritos para a cultivar sensível (RB85-5453). O alinhamento dos transcritos contra sequências disponibilizadas em bancos públicos permitiu a identificação de genes de

cana-de-açúcar que são correspondentes a outras espécies e também possibilitou identificar novos transcritos que até então não tinham sido anotados (Belesini et al., 2017). A partir de uma montagem de novo do transcriptoma das duas cultivares contrastantes em conjunto (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA811175>), foi avaliado o perfil de transcrição em resposta ao tempo e severidade do estresse aplicado (Konrad, 2019).

Com o resultado dos trabalhos anteriores envolvendo os transcritos diferencialmente expressos e que estão relacionados à tolerância ao déficit hídrico, Tullini (2020) em sua dissertação de Mestrado atribuiu a importância do estudo dos SNPs (single nucleotide polymorphisms) e encontrou 9.797 variações do tipo SNP exclusivas da cultivar sensível, 5.866 variações exclusivas da cultivar tolerante e 10.349 variações em comum para ambas as cultivares.

Alguns dos SNPs exclusivos da cultivar tolerante foram encontrados em genes relacionados com a resposta da planta ao estresse hídrico como os genes anotados como fatores de transcrição “Zinc Finger”, ARF, MYB e ABF, proteínas de choque térmico, proteína universal do estresse (USP), proteínas quinases e Glutathione S-transferase. Os dados observados por Tullini (2020) podem indicar que os polimorfismos específicos dessas regiões estejam associados com a capacidade da cultivar tolerante em lidar com o estresse hídrico, o que ainda necessita de um estudo mais aprofundado sobre o assunto.

Como o transcriptoma da cultivar SP81-3250 em diferentes condições de déficit hídrico e em diferentes épocas gerou uma grande quantidade de dados e milhares de variações de bases na cultivar tolerante, ainda há muito a ser explorado neste acervo do transcriptoma.

2.4. Marcadores Moleculares do tipo SNP (*Single Nucleotide Polymorphisms*)

Marcadores moleculares são sequências de DNA que revelam polimorfismos, considerando uma população de indivíduos. Estas sequências que estão distribuídas aleatoriamente ao longo do genoma e podem estar relacionadas a características fenotípicas. Portanto, o estudo dos marcadores moleculares possibilita a identificação

precoce e precisa de indivíduos com uma melhor combinação de alelos favoráveis (Henry, 2012).

A seleção assistida por marcadores moleculares incorpora informações de marcadores na seleção de cultivares superiores e mostra algumas vantagens quando comparada à seleção fenotípica, que é a mais utilizada nos programas de melhoramento. Dentre elas cabe salientar, por exemplo, a seleção de caracteres onde a avaliação fenotípica exige alto investimento, como a resistência ao déficit hídrico (Crouch, 2008). Marcadores moleculares têm sido utilizados em cana-de-açúcar para estudos filogenéticos, de diversidade genética, para seleção genômica, para mapeamento de QTL (Quantitative Trait Loci) e identificação de associações à características de interesse (Gouy et al, 2013; Costa et al, 2016; Yang et al, 2017; Manimekalai et al, 2019)

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são polimorfismos específicos que ocorrem em uma única posição no genoma, em um único nucleotídeo (substituição, deleção ou inserção). Segundo Garcia et al. (2013), marcadores SNPs têm sido utilizados durante as últimas décadas em diversos estudos genéticos, por exemplo em análises de diversidade, mapeamentos genéticos e mapeamento de locus de características quantitativas (QTL).

Os SNPs são o tipo mais frequente de variação encontrada no DNA (Brookes, 1999), sendo distribuídos por todo o genoma (na região de íntrons, éxons, regiões intergênicas, promotores ou enhancers). Um SNP localizado na região codificadora, por exemplo, pode ter impactos profundos na formação da proteína, assim como um SNP no promotor pode influenciar na expressão gênica.

Estudos envolvendo SNPs em cana-de-açúcar começaram a partir da disponibilização de coleções de ESTs nos bancos de dados. Cordeiro et al. (2006) mostraram que os SNPs ocorrem com alta frequência no genoma da cana-de-açúcar, identificando os marcadores em vários genes diferencialmente expressos de colmos maduros e imaturos. Garcia et al. (2013) identificaram SNPs a partir de sequências expressas em cana-de-açúcar, mostrando uma nova modelagem genética estatística e melhor compreensão dos aspectos biológicos dos processos evolutivos e de domesticação. Xu et al., 2018, identificaram SNPs a partir do transcriptoma de seis genótipos de cana-de-açúcar contrastantes envolvidos em resposta a *pokkah boeng*

e a seca.

Segundo Cardoso-Silva et al., 2014, a descoberta de novos SNPs para a cultura da cana-de-açúcar é de fundamental importância para os programas de melhoramento, uma vez que podem diminuir o longo tempo necessário para o lançamento de novas cultivares, através do mapeamento de características de interesse agrônomo por meio da seleção assistida por marcador (MAS).

2.5. Análise do transcriptoma e PCR quantitativa em Tempo Real

A síntese e a maturação de RNAs são rigidamente controladas e moldam redes complexas de expressão de genes que conduzem os processos biológicos. Essas redes precisam ser robustas e adaptáveis para que possam permitir uma adaptação rápida a perturbações ambientais. Essa regulação da expressão gênica é fundamental para ligar genótipos com fenótipos (Marguerat e Bahler, 2009). Grande parte das células em um mesmo organismo possuem todas as informações genéticas necessárias para gerar um organismo inteiro, possuindo o mesmo genoma estrutural. Porém cada célula expressa somente uma parte dessas informações, aquelas necessárias para executar a sua função. Então, todas as células possuem o mesmo DNA, porém apenas os genes específicos da função de cada célula são transcritos e são convertidos em uma molécula de RNA, que posteriormente será traduzido em proteínas (Costa, 2011; Nelson e Cox, 2014). Para verificar a quantidade de transcritos expressos em determinada célula e/ou tecido, é necessário o estudo destes através de técnicas que englobam a transcriptômica, como é o caso do RNA-seq.

O RNA-seq é um método que se baseia no sequenciamento de cDNA, sendo feito o sequenciamento direto de transcritos. A técnica utiliza a tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS), que produz milhões de fragmentos curtos, denominados reads, que são mapeados contra um genoma ou transcriptoma de referência e o número de fragmentos mapeados na região de interesse indica a quantidade da expressão do tecido analisado, encontrando também isoformas do

mesmo (Oshlack et al., 2010; Fu et al., 2009).

A tecnologia do RNA-Seq pode ser aplicada para o estudo de uma variedade bastante ampla de questões biológicas, desde a análise da estrutura do genoma ou de variações de níveis de expressão de transcriptomas, na análise e entendimento de vias metabólicas, bem como para a identificação de SNPs. A partir dos dados do RNA-seq é necessária a validação da expressão dos genes utilizando a técnica da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), pois de acordo com alguns estudos, 15 a 20% dos genes são considerados diferentes quando os resultados obtidos com RNA-seq são comparados aos resultados obtidos com qPCR (Everaert et al., 2017)

A qRT-PCR permite a quantificação precisa de sequências alvos de ácidos nucléicos específicos mesmo que a quantidade inicial de material esteja em uma concentração muito baixa (Fraga et al., 2014). A técnica é realizada a partir do monitoramento da amplificação de uma sequência alvo específica em tempo real utilizando tecnologia fluorescente e a rapidez com que o alvo amplificado atinge um nível de detecção se correlaciona com a quantidade de material de partida (Fraga et al, 2008), então na PCR em tempo real, os transcritos amplificados podem ser mensurados a cada ciclo e este monitoramento é feito durante a fase exponencial de amplificação e, com isso, pode-se determinar a quantidade inicial do alvo com grande precisão.

Existem duas etapas para a realização da técnica: a transcrição reversa de mRNA que leva à produção de cDNA a partir de mRNA e a PCR em tempo real (Ahmed, 2005). A PCR em tempo real baseia-se na utilização de corantes como o SYBR® Green, que se associa aos produtos da amplificação, emitindo fluorescência que aumenta em proporção direta ao número de amplicons gerados, medindo o acúmulo de DNA após um número fixo de ciclos, o que permite informações quantitativas sobre o DNA produzido na fase de platô da reação (Bustin e Nolan, 2004; Wong e Medrano, 2005; Ahmed, 2005).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Experimento em casa de vegetação e material vegetal

Os dados utilizados no presente trabalho foram obtidos de um experimento em casa de vegetação, instalado e conduzido na Universidade Júlio de Mesquita Filho (UNESP/FCAV), em Jaboticabal, São Paulo pelo nosso grupo em 2013. Todos os detalhes do experimento, tais como a obtenção das mudas, instalação, avaliação e coleta e extração de RNA total, foram descritas detalhadamente em estudos anteriores (Belesini et al., 2017; Telles et al., 2019).

Foram utilizadas duas cultivares consideradas potenciais em produtividade: SP81-3250 que foi utilizada como padrão para tolerante e RB855453 que foi utilizada como sensível ao estresse hídrico (Pincelli, Silva, 2012; Telles et al., 2019). As mudas foram cultivadas sem déficit hídrico até completarem 60 dias e após esse período deu-se início à aplicação dos tratamentos com o estresse hídrico do solo: sem déficit hídrico (controle) -0,010 a -0,015 MPa; potencial hídrico moderado -0,050 a -0,055 MPa e potencial hídrico severo -0,075 a -0,080 MPa. Foram coletadas folhas +1 da planta aos 30, 60 e 90 dias após o início dos tratamentos (DAT), totalizando, respectivamente, 90, 120 e 150 dias após o plantio (DAP).

O delineamento experimental foi realizado em blocos casualizados, com esquema fatorial 2 por 3 (duas cultivares x três níveis de potencial hídrico do solo), em três épocas amostrais (30, 60 e 90 dias após o tratamento), totalizando em um total de 18 unidades experimentais e três repetições, obtendo no final 54 parcelas.

3.2. RNA-seq

O RNA mensageiro utilizado na construção das bibliotecas foi isolado e purificado utilizando-se o kit de preparação de amostras TruSeq RNA Sample Preparation v2 (Illumina), a partir de 1,5 ug do RNA total extraído das folhas. As bibliotecas de cDNA foram construídas de acordo com a recomendação do fabricante (Belesini, 2015; Telles, 2016). O sequenciamento dos cDNAs por meio de RNA-Seq foi realizado nas plataformas HiScanSQ System e HiSeq 2500 da Illumina, seguindo

as instruções do fabricante (Belesini, 2015; Telles et al., 2018). As leituras brutas ou "reads" no formato FASTq, geradas no sequenciamento, foram pré-processadas com o programa Trimmomatic (v. 0.36) (Bolger et al., 2014). Uma única montagem reuniu o transcriptoma de ambas as cultivares.

Os transcritos foram quantificados a partir do alinhamento das leituras contra um transcriptoma de referência com o programa Kallisto (v. 0.44.0) (Bray et al., 2016), que gerou contagens brutas na unidade de transcritos por milhão (TPM). Essas contagens foram usadas como entrada no programa DESeq2 (Love et al., 2014) para calcular os transcritos diferencialmente expressos (DEs), obtendo assim o resultado do diferencial de expressão na unidade "log₂FoldChange". Foram considerados diferencialmente expressos apenas os transcritos nos quais a razão de módulo L2FC foi maior que 2 e *p*-valor menor que 0,05.

3.3. Seleção dos transcritos alvos para o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Os transcritos foram selecionados a partir do trabalho de Tullini (2020), no qual foram identificados SNPs candidatos exclusivos da cultivar tolerante, dentro da região codificadora de genes relacionados à resposta ao estresse hídrico para que possam ser avaliados como marcadores moleculares na obtenção de cultivares de cana-de-açúcar tolerantes ao estresse hídrico. Alguns SNPs encontrados na cultivar tolerante podem ser observados na tabela 1. A tabela 2 mostra o resultado da expressão de 3 transcritos através da técnica de RNA-seq nas cultivares sensível e tolerante.

Tabela 1. SNPs candidatos presentes em transcritos envolvidos na resposta da cana-de-açúcar ao estresse hídrico. ID: identificação do gene; POS: posição do SNP na sequência; REF: nucleotídeo de referência; ALT: nucleotídeo alterado; PGSB: Plant Genome and Systems Biology; GENOMA NOVO: genoma monoploide e poliploide de cana-de-açúcar (Garsmeur et al., 2018; Souza et al., 2019). (Adaptado de Tullini, 2020):

ID	POS	REF	ALT	Anotação PGSB	Anotação genoma novo	Expressão diferencial	
40843_c4_g1	817	A	G	CDPK	NA	NA	
34949_c1_g1	1540	C	T	LRR-RPK	NA	NA	
	2462	C	T	LRR-RPK	NA	NA	
36275_c1_g1	1299	C	G	Serina/Treonina quinase	Serina/Treonina quinase	Severo 90d x Controle 90d	
	1500	G	A	Serina/Treonina quinase	Serina/Treonina quinase	Severo 90d x Controle 90d	
	1539	G	A	Serina/Treonina quinase	Serina/Treonina quinase	Severo 90d x Controle 90d	
48440_c6_g2	1385	G	A	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
46100_c3_g1	1250	C	T	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
46278_c3_g1	1355	C	T	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
	1340	G	T	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
	1426	A	G	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
	1431	G	A	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
	1436	T	A	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
	1607	T	C	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
42279_c2_g1	1691	C	G	Serina/Treonina quinase	NA	NA	
	286	A	G	Fator de ligação do elemento responsivo ao ABA (ABF)	Elemento responsivo ao ABA	Moderado 90d x Controle 90d	
	1008	G	C	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	Severo 30d x Controle 30d	
	37325_c0_g1	889	C	T	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	Severo 30d x Controle 30d
		924	G	A	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	Severo 30d x Controle 30d
43317_c2_g1	2144	T	C	Fator de resposta a auxina (ARF)	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	
	2308	A	G	Fator de resposta a auxina (ARF)	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	
	2480	A	T	Fator de resposta a auxina (ARF)	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	
48302_c0_g1	4561	C	A	Fator de resposta a auxina (ARF)	NA	NA	
32452_c0_g1	462	TGT GC	TCT GC	Fator de transcrição MYB	NA	NA	

ID	POS	REF	ALT	Anotação PGSB	Anotação genoma novo	Expressão diferencial
47341_c0_g1	87	G	A	Fator de transcrição MYB	MYB	NA
	1690	T	A	Fator de transcrição MYB	MYB	Severo 30d x Controle 30d
	1756	A	G	Fator de transcrição MYB	MYB	Severo 30d x Controle 30d
	1888	G	A	Fator de transcrição MYB	MYB	Severo 30d x Controle 30d
36247_c2_g1	1921	A	G	Fator de transcrição MYB	MYB	Severo 30d x Controle 30d
	2072	G	T	Fator de transcrição MYB	MYB	Severo 30d x Controle 30d
	2144	A	C	Fator de transcrição MYB	MYB	Severo 30d x Controle 30d
39011_c2_g1	502	C	G	Fator de transcrição MYB	NA	NA
48115_c0_g2	670	A	G	Fator de transcrição MYB	MYB	NA
45438_c1_g3	192	G	A	Fatores de Transcrição Dedos de Zinco (Zinc Finger)	Dedos de Zinco (Zinc Finger)	NA
	1029	CG CC	CG CT	Proteína de Choque Térmico (HSP)	Proteína de Choque Térmico (HSP)	NA
45824_c2_g1	1140	C	T	Proteína de Choque Térmico (HSP)	Proteína de Choque Térmico (HSP)	NA
	606	C	T	Proteína de Choque Térmico (HSP)	Proteína de Choque Térmico (HSP)	NA
	2641	A	G	Fator de transcrição de estresse térmico (HSF)	Fator de transcrição de estresse térmico (HSF)	Severo 90d x Controle 90d
43402_c0_g1	3106	C	T	Fator de transcrição de estresse térmico (HSF)	Fator de transcrição de estresse térmico (HSF)	Severo 90d x Controle 90d
33867_c2_g1	659	C	G	Fator de transcrição de estresse térmico (HSF)	NA	NA
45604_c3_g2	1504	C	T	Glutaciona S-transferase (GST)	NA	NA
	689	T	G	NA	Glutaciona S-transferase (GST)	NA
35415_c1_g1	364	C	A	NA	Glutaciona S-transferase (GST)	NA
	442	G	T	NA	Glutaciona S-transferase (GST)	NA
29783_c0_g1	339	A	G	NA	Glutaciona S-transferase (GST)	NA
	350	G	A	Proteína Universal de Estresse (USP)	NA	Moderado 90d x Controle 90d
46450_c0_g2	360	G	T	Proteína Universal de Estresse (USP)	NA	Moderado 90d x Controle 90d

Tabela 2. Resultado da expressão gênica em Log2Fold Change pela técnica de RNA-seq dos 3 transcritos nos quais foram encontrados SNPs na cultivar tolerante.

ID	Transcrito	SS30xSN30	SS60xSN60	SS90xSN90	TS30xTN30	TS60xTN60	TS90xTN90
36275_c1_g1_i1	Ser/treonina quinase	-0,8418	-0,1906	-0,2803	-0,4063	-0,4955	0,6200
41837_c1_g2_i1	ABF	0,2915	0,0722	0,7959	0,8366	-0,9942	0,3867
46450_c0_g2_i2	USP	-0,7425	0,0917	0,4687	-0,3830	-0,3052	0,2558

As cultivares de cana-de-açúcar SP81-3250/tolerante (T) e RB855453/sensível (S), submetidas a três potenciais hídricos do solo: controle-sem estresse (N), déficit hídrico moderado (M) e déficit hídrico severo(S), em três tempos de tratamento 30 dias, 60 dias e 90 dias.

3.4. Obtenção dos RNAs e Síntese de cDNA

Para validação dos níveis de expressão dos transcritos escolhidos por qRT-PCR, o RNA total da folha +1 foi extraído utilizando-se o kit comercial Purelink RNA Mini Kit (Life Technologies Corporation) de acordo com as recomendações do fabricante. O RNA purificado foi ressuspensionado em 50 µl de água ultra pura e armazenado a -80°C. As amostras de RNA total extraídas foram avaliadas quanto a qualidade, quantidade e integridade, utilizando os equipamentos Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), Qubit R 2.0 (Invitrogen) e Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, USA).

A síntese do cDNA foi feita com o kit SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix qRT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante. 1 µg de RNA total, 2µL de RT “enzime mix” contendo “SuperScript III RT” e “RNaseOut”, 10µL de 2X RT “Reaction Mix”, contendo “primer oligo(dT)20” (2,5 µM), “random hexamers” (2,5ng/ µL), 10 mM MgCl₂ e dNTPs e água ultra pura para completar o volume para 20µL. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 50°C por 30 minutos, 85°C por 5 minutos e transferidas para um recipiente com gelo por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado 1 µL da enzima *E. coli* “RNase H” em cada amostra e estas foram incubadas a 37°C por 20 minutos.

A quantificação dos cDNAs foi determinada no espectrofotômetro NanoDrop

ND-1000 ("Thermo Fisher Scientific Inc.") onde todas as amostras apresentaram boa quantidade e qualidade do material.

3.5. Desenho de iniciadores para os transcritos alvos

O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi realizado utilizando o programa "Primer Express" versão 3.0 ("Applied Biosystems", Foster, CA, USA). As sequências dos genes endógenos (β -Tubulina, Actina e proteína 14-3-3) foram obtidas através do trabalho de Vantini et al. (2015), que analisou a expressão gênica diferencial em raízes de cana tolerantes à seca.

Os primers dos genes alvos foram desenhados a partir das sequências FASTA disponibilizadas do transcriptoma da cana-de-açúcar, seguindo as regras para desenhos de primers para a PCR em tempo real como o tamanho entre 20 e 25 pares de bases, a temperatura de anelamento entre 55°C e 60°C e concentração GC superior a 50%. Antes de desenhar os primers no programa, as sequências FASTA passaram por uma análise de bioinformática, utilizando o programa Repeat Masker (www.repeatmasker.org/) que mascara as sequências adicionando um N nas regiões que são homólogas com partes do genoma.

Os melhores primers foram escolhidos e submetidos a uma análise de *PCR in silico* contra a montagem de novo para que fosse validada a especificidade dos primers. A tabela 3 mostra os genes endógenos e os transcritos escolhidos juntamente com as sequência dos seus respectivos primers.

Tabela 3. Sequência dos primers para quantificação da abundância dos transcritos avaliados nas amostras de RNA extraído de folhas de cana de açúcar da cultivar tolerante e sensível ao estresse hídrico prolongado.

Proteína	Iniciador	Sequência
* β -Tubulina	β -Tubulina_F	5' GGAGGAGTACCCTGACAGAATGA 3'
	β -Tubulina_R	5' CAGTATCGGAAACCTTTGGTG 3'
*Actina	ACT_F	5' ATGGAGGCTGCTGGAATCC 3'
	ACT_R	5' ATCCACGTCGCACTTCATGA 3'
*Proteína 14-3-3	14-3-3_F	5' GAGCCAGATCAGCAAGAGCAAT 3'
	14-3-3_R	5' GCGGAGAGCACCATGAATG 3'
Serina/Treonina Quinase	Ser/Treonina_F	5' GCAGTCCAGACTCACACAGAAG 3'
	Ser/Treonina_R	5' TTGGACTCAGCCACAGGACT 3'
ABF	ABF_F	5' AGCCACCAGCTATGGAGAAG 3'
	ABF_R	5' ACTCCCGGTTCTTGATCATC 3'
USP	USP_F	5' CAGCACTGCTATTAGCGAAGAC 3'
	USP_R	5' GCTCGCAAACCTGTTCTGTG 3'

*: utilizados como normalizadores (Vantini et al., 2015).

3.6. Titulação dos oligonucleotídeos iniciadores

Para a PCR em tempo real, é necessário que haja uma série de padronizações para que as reações ocorram com alta eficiência. A primeira delas é a titulação dos primers, que é feita com o intuito de escolher a concentração mais adequada de iniciadores para que a reação ocorra da melhor maneira possível e sem a formação de dímeros e com maior eficiência.

Foi realizado a titulação com amostra de DNA genômico com 50ng/ μ L, variando a concentração dos primers a 100/100 nM, 300/300 nM e 600/600 nM (F/R, respectivamente). O experimento foi realizado em triplicata para cada primer com cada concentração. Além disso, também foi feito o controle negativo com água ao invés de DNA genômico, seguindo as mesmas concentrações dos iniciadores. A reação consistiu em 6,5 μ L de Syber Green; 1,25 μ L de oligonucleotídeo Forward, 1,25 μ L de oligonucleotídeo Reverse; 2 μ L do DNA genômico (100 ng) e água ultra pura para um volume final de 12,5 μ L. Os parâmetros utilizados nas amplificações foram: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

3.7. Eficiência de Amplificação da PCR

Após verificar a melhor concentração dos primers, foi feito o segundo tipo de padronização que tem como função verificar a eficiência de amplificação da reação através da construção de uma curva padrão. Essa eficiência de amplificação é a taxa no qual um amplicon de PCR é gerado, se esse amplicon dobrar a quantidade durante a fase geométrica da amplificação, então essa PCR apresentou 100% de eficiência. O *slope* da curva é usado para medir a eficiência de uma reação, onde um valor de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência e slopes mais negativos que esse valendo indicam reações com menor eficiência e mais positivos podem indicar má qualidade da amostra ou problema de pipetagem. Uma boa reação deve ter uma eficiência entre 90% e 110%, o que corresponde a uma inclinação (*slope*) entre -3,58 e -3,10 e um coeficiente de correlação, que reflete a linearidade da curva padrão, idealmente igual à 1, embora 0,999 seja um valor aceito (Thermo Fisher Scientific, 2014).

A partir de um *pool* de cDNA de todas as amostras foi feita uma diluição seriada de 2:1, a partir de 100ng com 7 pontos (100ng, 50ng, 25ng, 12,5ng, 6,25ng, 3,12ng e 1,56 ng) para a construção da curva padrão. Foram determinados 7 pontos para que tenha uma margem de segurança, sendo que são necessários pelo menos 5 para que a eficiência seja calculada. As reações foram montadas em triplicatas com controle negativo, também em triplicata e foram utilizadas as melhores concentrações de primers escolhidas na titulação. Os resultados foram analisados no programa Applied Biosystems 7500 real-time PCR e depois de verificadas as melhores eficiências para cada gene alvo e de referência, foram definidas as melhores concentrações de cDNA.

3.8. Quantificação Relativa da Expressão Gênica pelo Método do CT Comparativo ($\Delta\Delta$ Ct)

Para as análises do Δ Ct, foi utilizada uma placa de 96 poços para cada um dos genes alvos e endógenos, onde em cada placa as reações para cada amostra foram feitas em triplicatas biológicas e triplicatas técnicas. A reação consistiu em 6,5 μ L de SYBR Green; 1,25 μ L de oligonucleotídeo Forward, 1,25 μ L de oligonucleotídeo Reverse; 2 μ L de cDNA referente a amostra analisa (50 ng) e água ultra pura para um

volume final de 12,5 μ L. Os parâmetros utilizados nas amplificações foram os mesmos que já foram citados acima. Em todas as placas foram feitas reações com água ao invés de cDNA para controle negativo em triplicata e também um pool das amostras de cDNA para controle positivo. Os dados obtidos ao final da análise do software foram gerados na forma de valores de Ct ("Cycle threshold"), que representam o ciclo de início da detecção do produto amplificado dos genes.

3.9. Análise Estatística

Após o término das reações, os resultados e a determinação dos níveis de expressão relativa dos genes alvos e as análises estatísticas (teste de hipótese P (H1)) foram calculados utilizando o software REST com 2000 interações. O modelo matemático utilizado nesse software é baseado nas eficiências de PCR e no desvio médio do ponto de cruzamento entre a amostra e o grupo controle que são testados quanto à significância por um teste de randomização (Pfaffl, et al., 2002). Os genes foram considerados significativamente diferencialmente expressos quando $P < 0,001$ (***) ; $P < 0,01$ (**) e $P < 0,05$ (*).

4. RESULTADOS

4.1. Seleção dos transcritos alvos para o PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Foram encontrados SNPs candidatos na cultivar tolerante em transcritos relacionados com a resposta da planta ao estresse hídrico, como fatores de transcrição ABF (Fator de ligação do elemento responsivo ao ABA), ARF (Fator de resposta a auxina), MYB e “Zinc Finger”, proteínas quinases, proteínas de choque térmico, proteína universal do estresse (Tullini, 2020). A partir da tabela de transcritos encontrados com possíveis SNPs (tabela 1) e da tabela 2, foram escolhidos 3 transcritos levando em consideração aqueles que estão relacionados à resposta da planta ao déficit hídrico, que foram diferencialmente expressos e que possuem SNPs para traçar o perfil transcricional: Serina/Treonina Quinase (36275_c1_g1), ABF (41837_c1_g2) e USP (46450_c0_g2).

4.2. Titulação dos Oligonucleotídeos

A titulação dos oligonucleotídeos iniciadores, mostrou-se mais eficiente para determinadas concentrações dos primers. Os dados foram obtidos através dos gráficos gerados das curvas de dissociação (curva de melting ou “melt curve”) para as variadas concentrações analisadas e assim foi determinado qual a melhor para cada um dos iniciadores para cada um dos transcritos (figuras 1 e 2). Além disso, também foi verificado a ausência de dímeros e hairpins, ocorrendo apenas um pico bem definido referente ao gene alvo.

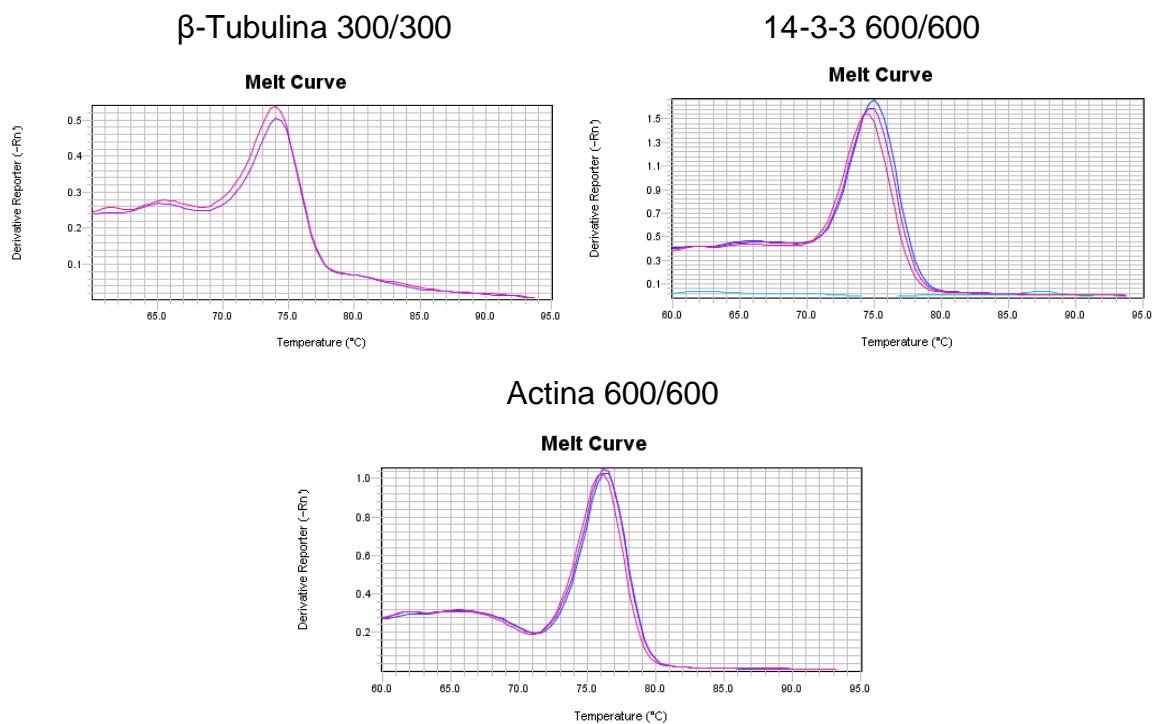


Figura 1: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes de referência β -Tubulina, 14-3-3 e actina com as respectivas concentrações escolhidas para os primers Foward/Reverse (F/R).

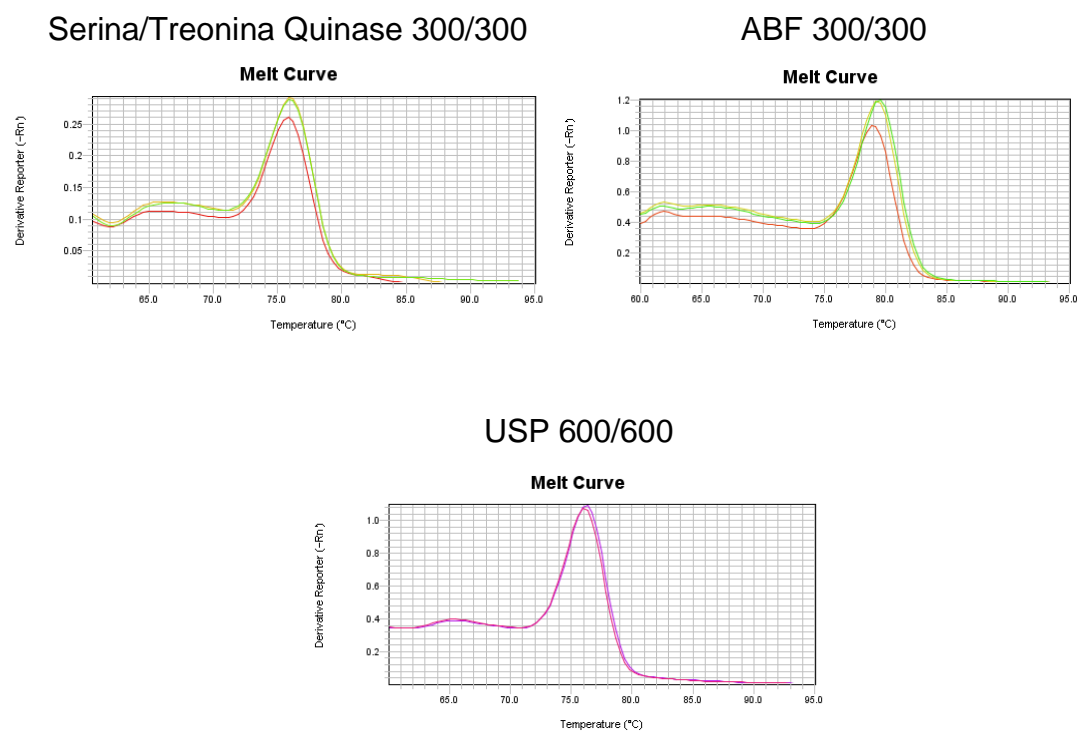
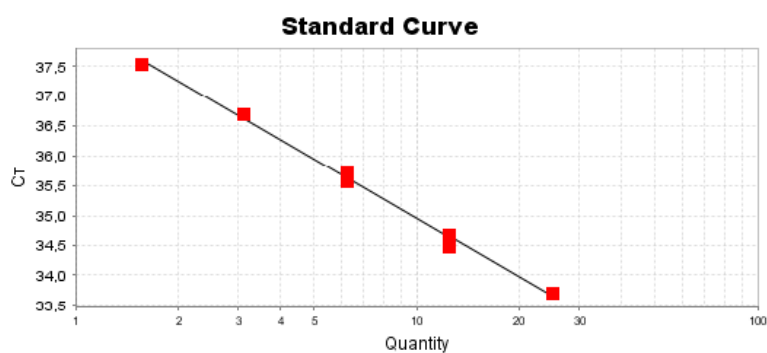


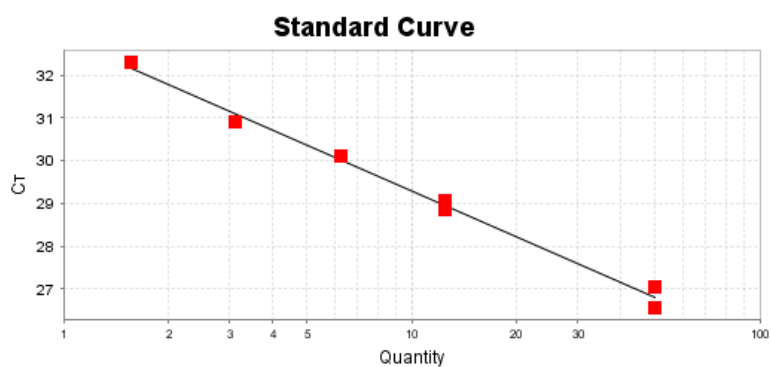
Figura 2: Curva de desnaturação, em triplicata, para os genes alvo Serina/Treonina Quinase, ABF e USP com as respectivas concentrações escolhidas para os primers Foward/Reverse (F/R).

4.3. Curva Padrão

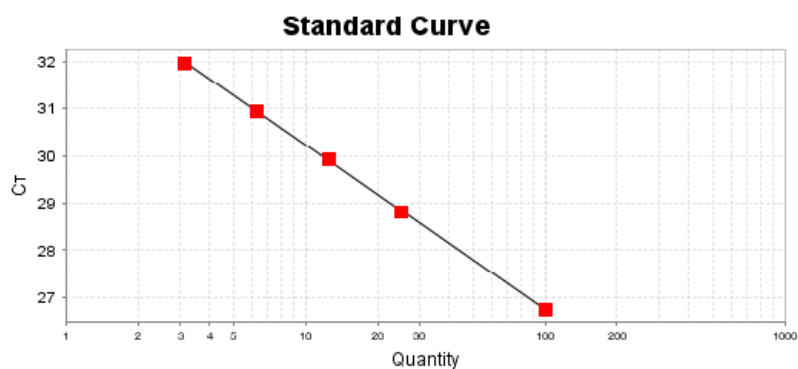
A qualidade da molécula alvo, sequência e concentração dos iniciadores e tamanho do amplicon (fragmentos menores, de até 150 pb, geralmente geram eficiências maiores) são alguns dos fatores que influenciam na eficiência da amplificação (Fonseca, 2013). Os coeficientes R2 apresentaram valores maiores que 0,99, além das reações estarem com a eficiência entre 90% e 110% (Thermo Fisher Scientific, 2014), como pode ser observado nas figuras 3 e 4.



Target: tub Slope: -3,276 Y-Inter: 38,229 R^2 : 0,995 Eff%: 101,962

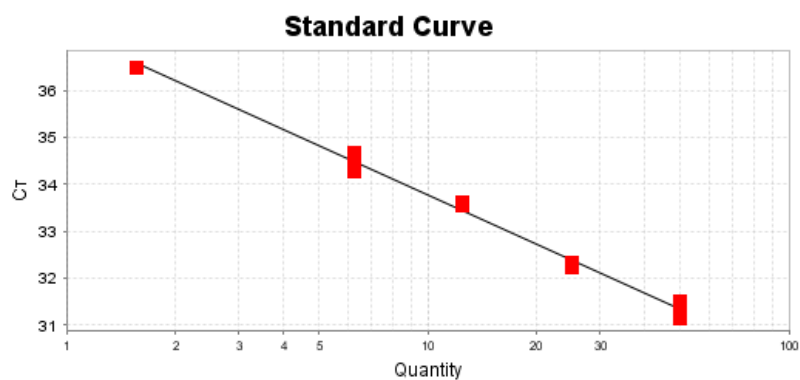


Target: 14 Slope: -3,562 Y-Inter: 32,863 R^2 : 0,992 Eff%: 90,854

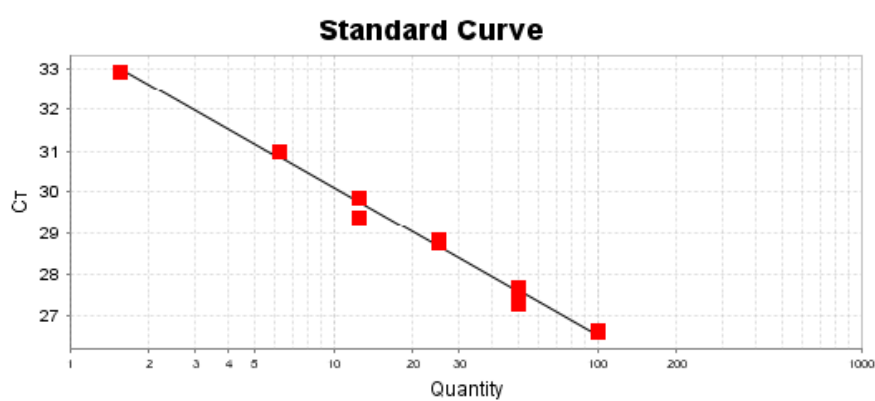


Target: actina Slope: -3,477 Y-Inter: 33,695 R^2 : 1 Eff%: 93,915

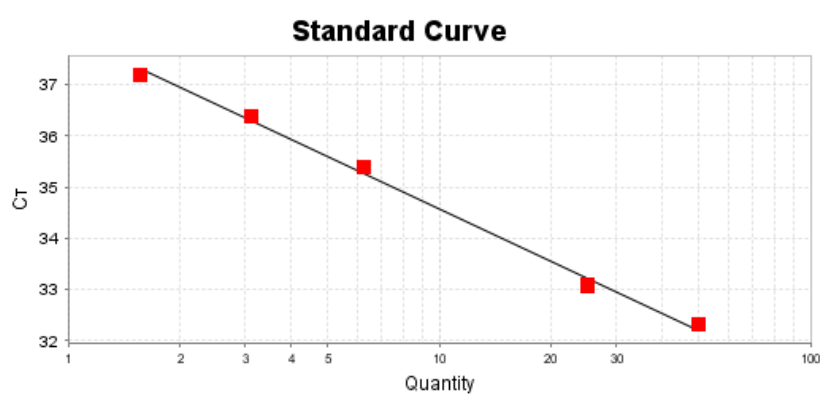
Figura 3: Curva Padrão, inclinação da reta (slope), coeficiente r^2 , e eficiência de amplificação (eff%) gerados para o gene de referência Beta Tubulina (tub), 14-3-3 (14) e Actina.



Target: serina **Slope:** -3,475 **Y-Inter:** 37,24 **R²:** 0,992 **Eff%:** 93,997



Target: abf **Slope:** -3,58 **Y-Inter:** 33,668 **R²:** 0,993 **Eff%:** 90,259



Target: usp **Slope:** -3,394 **Y-Inter:** 37,961 **R²:** 0,995 **Eff%:** 97,094

Figura 4: Curva Padrão, inclinação da reta (slope), coeficiente r2, e eficiência de amplificação (eff%) gerados para os genes alvos Serina/Treonina Quinase, ABF e USP.

4.4. Análise da Expressão Relativa

A Tabela 4 indica os valores da expressão em log2fold Change dos transcritos com SNPs analisados, juntamente com o desvio padrão e o *p*-valor (P(H1)), considerado significativo quando $P < 0,001$ (***) ; $P < 0,01$ (**) e $P < 0,05$ (*).

Tabela 4. Expressão dos genes pela técnica PCR em tempo real

Gene	Dias	Cultivar Tolerante				Cultivar Sensível			
		Expressão	Std. Error	P(H1)	Resultado	Expressão	Std. Error	P(H1)	Resultado
SER	30	1,318	$\pm 0,53199$	0,024	UP	1,037	$\pm 0,4674$	0,913	
SER	60	-1,266	$\pm 0,41907$	0,28		1,369	$\pm 0,79987$	0,03	UP
SER	90	2,831	$\pm 1,63522$	0,001	UP	3,076	$\pm 1,33764$	0,02	UP
ABF	30	-1,161	$\pm 0,2923$	0,141		1,177	$\pm 0,50609$	0,692	
ABF	60	-2,015	$\pm 0,26677$	0,002	DOWN	1,148	$\pm 0,66737$	0,727	
ABF	90	1,424	$\pm 0,84275$	0,001	UP	1,654	$\pm 0,70464$	0,038	UP
USP	30	-1,114	$\pm 0,56501$	0,815		1,291	$\pm 0,71976$	0,473	
USP	60	-1,382	$\pm 0,40036$	0,542		1,028	$\pm 0,91068$	0,956	
USP	90	2,132	$\pm 1,29287$	0,005	UP	-1,143	$\pm 0,35641$	0,611	

Expressão dos transcritos em Log2Fold Change pela técnica qRT-PCR na cultivar sensível e na tolerante, sob estresse severo, em três tempos de tratamento 30 dias, 60 dias e 90 dias.

SER – Serina/Treonina Quinase; ABF - Fator de ligação do elemento responsivo ao ABA; USP – proteína universal do estresse; Std. Error – Desvio padrão; P(H1) – *p*-valor;

4.4.1. Serina/Treonina Quinase

As Figuras 5 e 6 referem-se às comparações dos resultados entre as duas técnicas: RNA-seq e PCR em tempo real para as duas cultivares. A Figura 3, referente a cultivar tolerante para o transcrito Serina/Treonina Quinase, mostra que este foi reprimido em 30 dias na análise do RNA-seq ao contrário do RT-PCR que foi induzido nesse mesmo tempo. Em 60 e 90 dias ambas as técnicas se mostraram similares. Quando referimos a cultivar sensível, verifica-se que no RNA-seq o gene foi reprimido enquanto que no RT-qPCR o gene foi induzido (Figura 5).

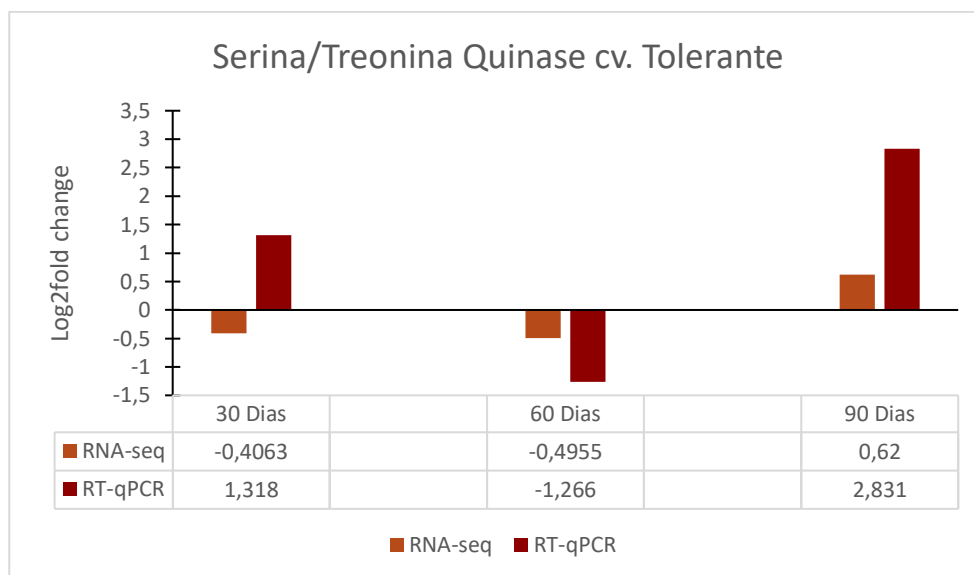


Figura 5. Comparação dos resultados da análise de expressão entre as técnicas RNA-seq e RT-qPCR do transcrito que codifica um gene Serina/Treonina quinase (36275_c1_g1) na cultivar tolerante com SNPs, sob estresse severo.

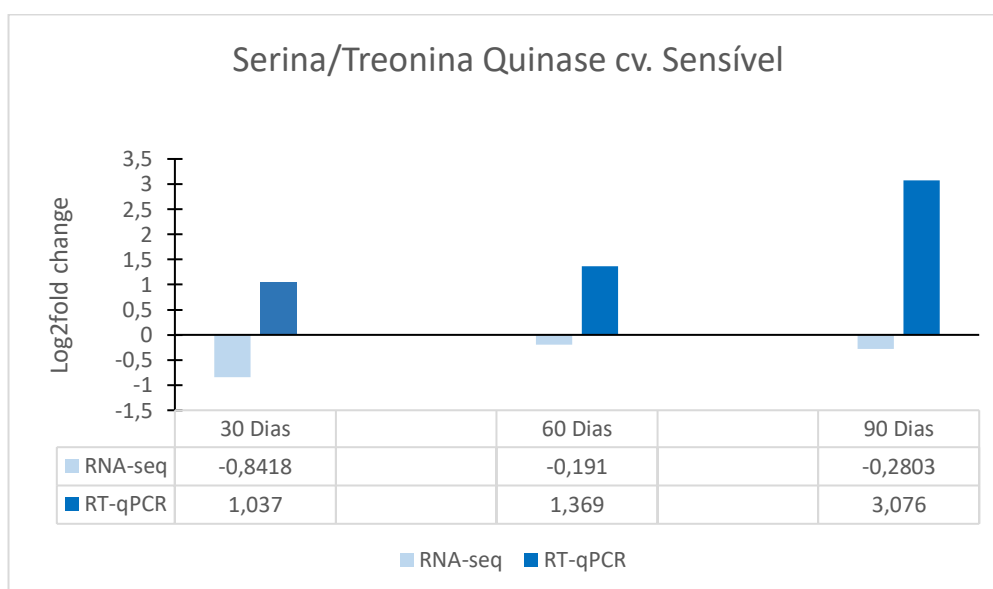


Figura 6. Comparação dos resultados da análise de expressão entre as técnicas RNA-seq e RT-qPCR do transcrito que codifica o gene Serina/Treonina quinase (36275_c1_g1) na cultivar sensível sem SNPs, sob estresse severo.

De acordo com a figura 7, quando comparamos as duas cultivares pode-se observar que o transcrito Serina/Treonina Quinase na cultivar tolerante quando exposto ao estresse de 30 dias foi expresso, porém em 60 dias é reprimido, voltando a ser expresso em 90 dias, onde há o pico de indução deste. Na cultivar sensível o gene apresenta uma expressão crescente de acordo com o tempo em que a planta foi exposta ao estresse. Podemos concluir que o gene foi induzido igualmente tanto na cultivar tolerante quanto na cultivar sensível aos 90 dias, onde em ambas as cultivares os genes foram diferencialmente expressos estatisticamente.

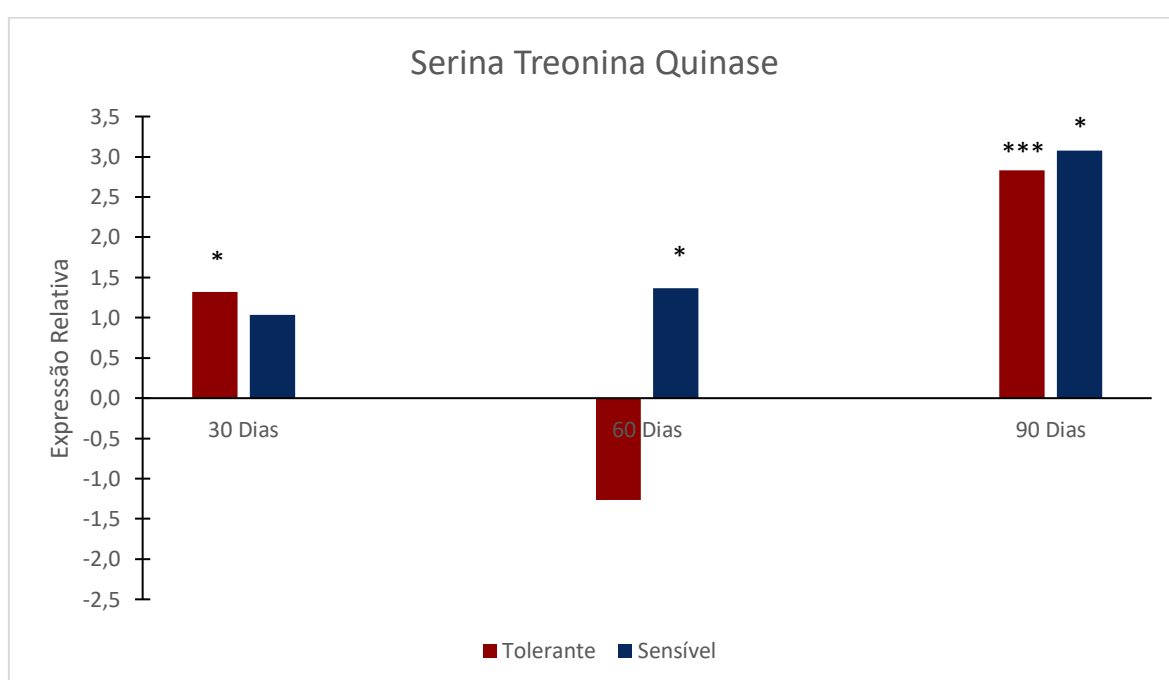


Figura 7. Expressão relativa do transcrito que codifica uma Serina/Treonina Quinase (36275_c1_g1) das cultivares tolerante com SNP e sensível sem SNP, em 30, 60 e 90 dias, sob estresse severo, pelo qRT-PCR.

Barra vermelha: expressão da cultivar tolerante.

Barra azul: expressão da cultivar sensível.

Significativo comparado ao controle quando: $P < 0,001$ (***) ; $P < 0,01$ (**) e $P < 0,05$ (*).

4.4.2. ABF

Nas figuras abaixo, podemos observar a expressão do fator de transcrição ABF. Na Figura 8, pode-se observar a partir da comparação entre as técnicas na cultivar tolerante, que os resultados foram divergentes entre as técnicas apenas no tempo de 30 dias, a qual o gene foi reprimido na técnica do RNA-seq mas pouco expressa no RT-qPCR. Para a cultivar sensível (Figura 9), os resultados foram semelhantes para ambas as técnicas em todos os dias de estresse analisados.

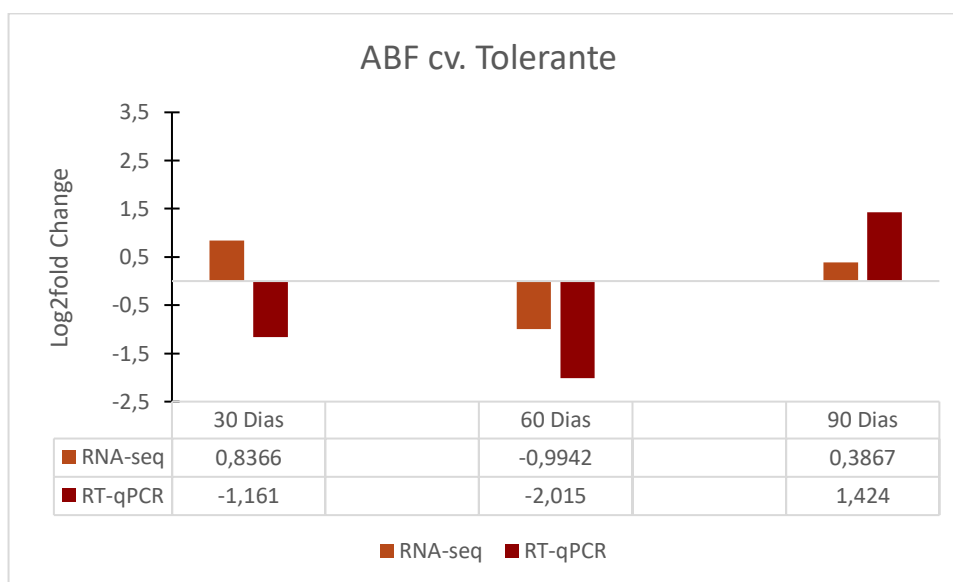


Figura 8. Comparação dos resultados da análise de expressão entre as técnicas RNA-seq e RT-qPCR do transcrito que codifica um fator de transcrição ABF (41837_c1_g2) na cultivar tolerante com SNPs, sob estresse severo.

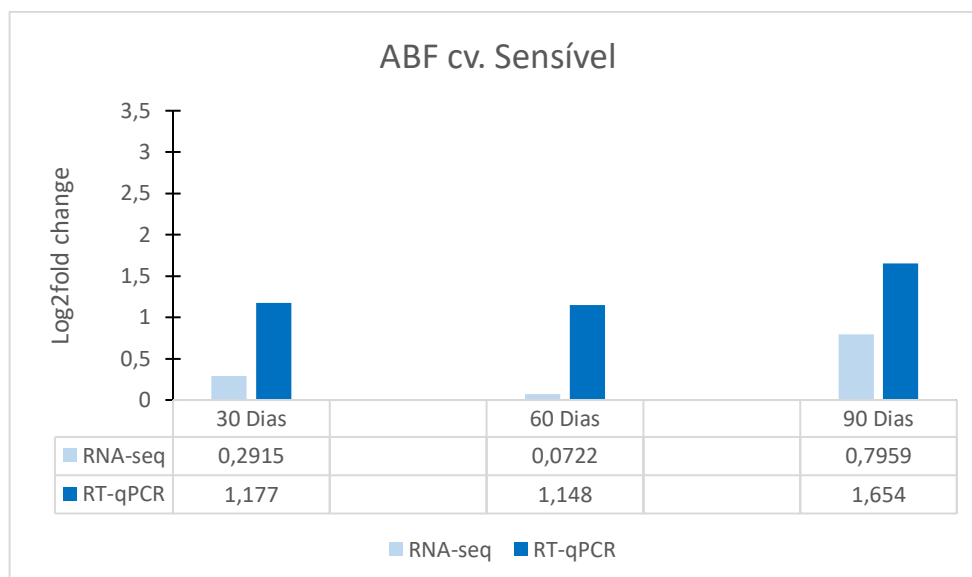


Figura 9. Comparação dos resultados da análise de expressão entre as técnicas RNA-seq e RT-qPCR do transcrito que codifica um fator de transcrição ABF (41837_c1_g2) na cultivar sensível sem SNPs, sob estresse severo.

Em comparação com a expressão entre as duas cultivares (Figura 10) o transcrito anotado como fator de ligação do elemento responsivo ao ABA (ABF) na cultivar tolerante foi reprimido tanto em 30 dias, quanto em 60 dias de estresse e induzido em 90 dias. Pode ser observado também que a expressão do gene na cultivar sensível não se altera significativamente ao decorrer dos tempos, porém aos 90 dias de estresse severo o gene foi diferencialmente expresso em relação ao controle.

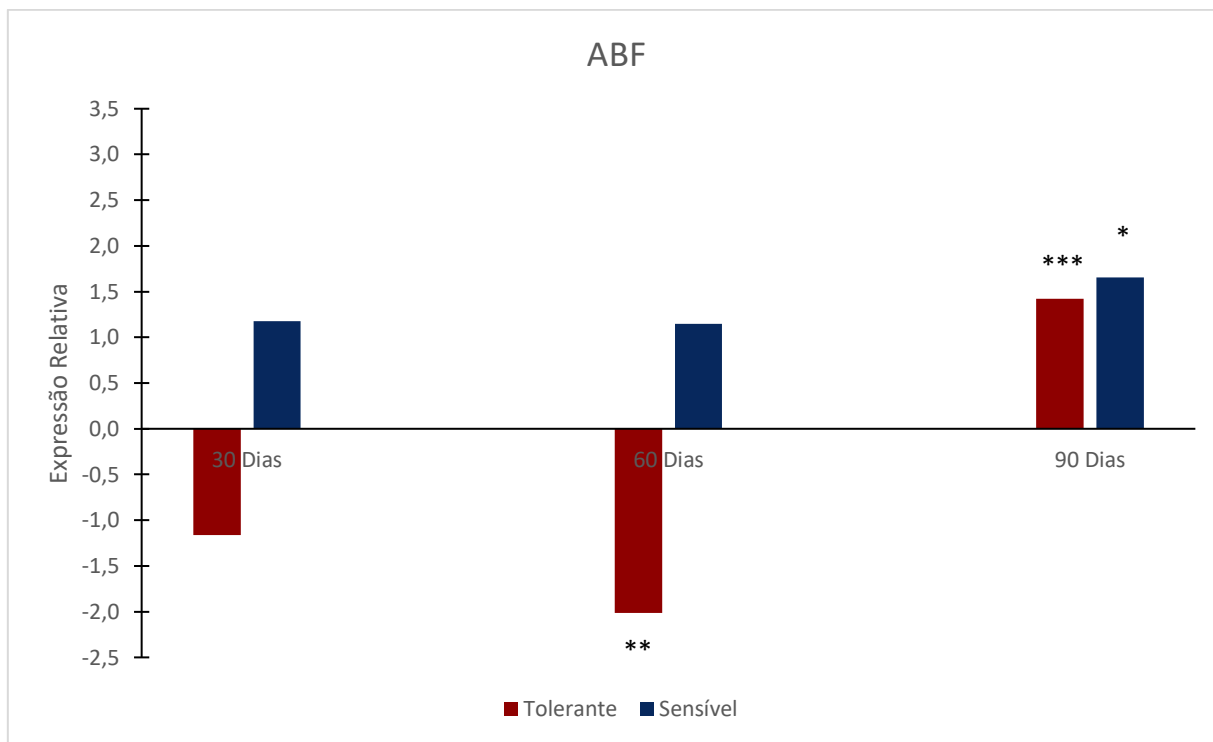


Figura 10. Expressão relativa do transcrito que codifica um ABF (41837_c1_g2) das cultivares tolerante com SNP e sensível sem SNP, em 30, 60 e 90 dias, sob estresse severo, pelo qRT-PCR.

Barra vermelha: expressão da cultivar tolerante.

Barra azul: expressão da cultivar sensível.

Significativo comparado ao controle quando: $P < 0,001$ (***) ; $P < 0,01$ (**) e $P < 0,05$ (*).

4.4.3 Universal Stress Protein (USP)

Na Figura 11, referente à expressão do gene que codifica uma proteína universal do estresse (USP) na cultivar tolerante, a comparação entre as técnicas se mostrou semelhante em todos os tempos analisados, porém aos 90 dias houve uma maior divergência de valores entre as técnicas. Em relação a cultivar sensível, Figura 10, houve divergência de resultados nos tempos de 30 e 90 dias. Aos 30 dias o gene foi reprimido no RNA-seq e induzido no RT-qPCR e aos 90 dias foi induzido no RNA-seq e reprimido no PCR em tempo real.

Quando comparado a expressão entre a cultivar sensível e a tolerante (Figura 11), pode-se observar que o gene foi reprimido em 30 e 60 dias na cultivar tolerante e induzido apenas em 90 dias, sendo neste tempo diferencialmente expresso em relação ao controle. Na cultivar sensível ele foi levemente induzido nos tempos iniciais e reprimido aos 90 dias. Como foi observado a expressão na cultivar tolerante é maior quando a planta é submetida a mais tempo de exposição ao estresse hídrico e houve uma elevada expressão em relação aos 90 dias na cultivar tolerante e uma queda de expressão no mesmo período para a cultivar sensível.

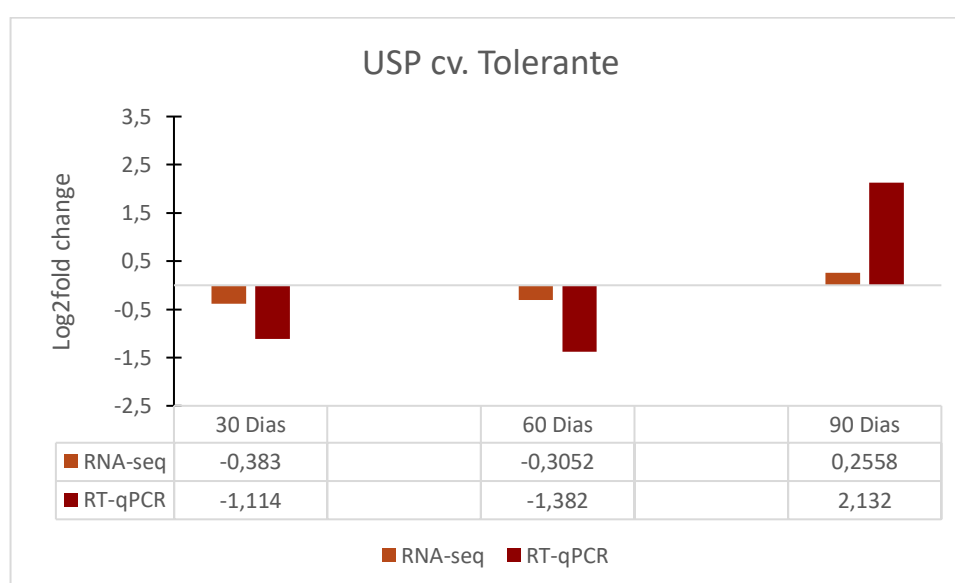


Figura 11. Comparação dos resultados da análise de expressão entre as técnicas RNA-seq e RT-qPCR do transcrito que codifica uma proteína USP (46450_c0_g2) na cultivar tolerante com SNPs, sob estresse severo

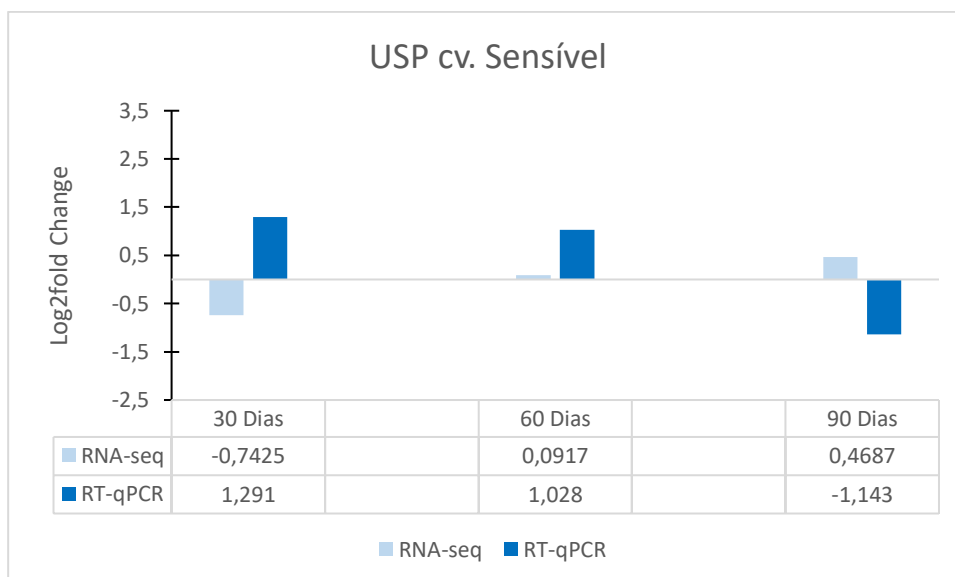


Figura 12. Comparação dos resultados da análise de expressão entre as técnicas RNA-seq e RT-Qpcr do transcrito que codifica uma proteína USP (46450_c0_g2) na cultivar sensível sem SNPs, sob estresse severo.

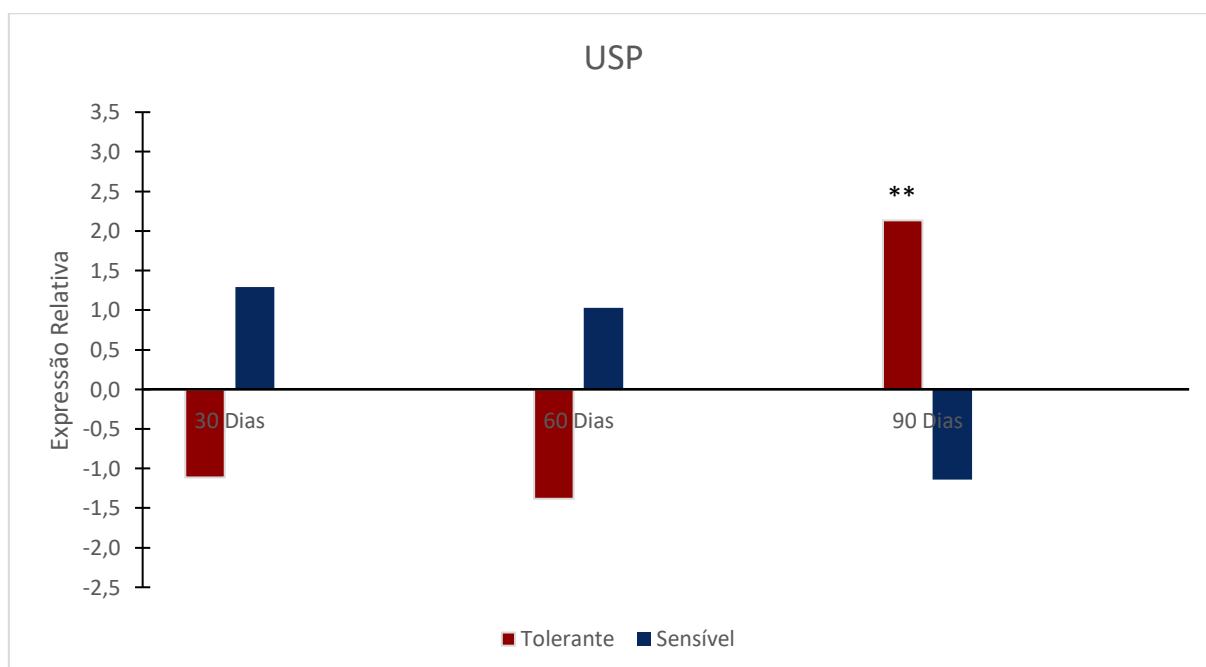


Figura 13. Expressão relativa do transcrito que codifica uma Proteína Universal do Estresse (46450_c0_g2) das cultivares tolerante com SNP e sensível sem SNP, em 30, 60 e 90 dias, sob estresse severo, pelo qRT-PCR.

Barra vermelha: expressão da cultivar tolerante.

Barra azul expressão da cultivar sensível.

Significativo comparado ao controle quando: $P < 0,001$ (***) ; $P < 0,01$ (**) e $P < 0,05$ (*).

5. DISCUSSÃO

O aumento da população mundial tem desafiado a agroindústria e a comunidade científica a suprirem a crescente demanda por segurança alimentar (Bailey-Serres et al., 2019). Adicionalmente, a iminente ameaça das mudanças climáticas intensifica esse desafio devido à redução da produtividade de cultivares diante de ambientes cada vez mais hostis (Bailey-Serres et al., 2019). Uma maneira de manter a alta produtividade na cultura da cana-de-açúcar é desenvolver cultivares mais tolerantes à seca. Os marcadores tipo SNPs vem sendo amplamente utilizados, inclusive para verificar possíveis SNPs em genes que conferem tolerância ao estresse hídrico para que, através da utilização de marcadores moleculares, o tempo dos programas de melhoramento genético para as culturas possa ser reduzido.

Trenti et al. (2021), trabalhando com espécies de *Vitis* encontraram um SNP (chr17_10,497,222_C_T) associado ao fechamento estomático em condições de estresse hídrico, onde genótipos heterozigotos (CT) apresentaram menor condutância estomática em comparação com genótipos homozigotos (CC ou TT). Sallam et al. (2022) encontraram um marcador SNP (S2B_26494801) e observaram que o mesmo estava associado a características de recuperação da planta após o estresse hídrico em populações de trigo.

O transcrito que codifica uma Serina/treonina quinase (36275_c1_g1_i1) da cultivar tolerante possui três SNPs em diferentes posições: em 1299 (C→G), em 1500 (G→A) e em 1539 (G→A), onde apenas o SNP que se encontra na posição 1299 do transcriptoma ocasionou a troca de aminoácido (serina por arginina) (Tullini, 2020). Este transcrito na cultivar tolerante sob estresse severo foi induzido em 30 dias, ao contrário da sensível que não mostrou expressão diferencial para o mesmo tempo (figura 7). Anteriormente, Telles et al. (2019), ao analisar dados fisiológicos e morfológicos das mesmas cultivares e sob os mesmos padrões de estresse, verificaram que as plantas da cultivar tolerante se mantiveram mais hidratadas que as da cultivar sensível ao longo de todos os tratamentos.

O fechamento estomático é um importante fator de curto prazo em resposta à seca (Lim et al., 2015). Alguns estudos demonstraram que as proteínas quinases estão intimamente ligadas à regulação da abertura estomática, devido a transdução

de sinais de ABA e Ca^{2+} na regulação desta (Zou et al, 2010). A regulação da abertura estomática está relacionada à OST1 (Open Stomata 1), que é um tipo de proteína Serina/Treonina Quinase. Quando o ABA está presente na célula, ele é reconhecido por uma série de proteínas que liberam e ativam a OST1, que quando ativada fosforila os fatores de transcrição bZIP, ABFs/ABREs, para controlar a expressão gênica no núcleo o que resulta em uma resposta ao ABA, afetando as respostas a vários estresses abióticos e bióticos (Furihata et al., 2006; Zhang et al., 2014; Shang et al., 2021).

Na literatura, várias proteínas quinases têm sido descritas como transdutores de sinal sob estresse hídrico devido a ativação de cascatas de fosforilação das proteínas, o que é considerado um fator chave na resposta precoce ao estresse (Marshall et al., 2012). A proteína quinase MAPKK (MAPKKK), por exemplo, é ativada através da fosforilação de resíduos de treonina e/ou serina conservados, onde a quinase é capaz de ativar genes através da fosforilação de fatores de transcrição, podendo mediar a sinalização de um estímulo extracelular e provocar respostas específicas (Bartels e Sunkar, 2005; Xu e Zhang, 2015).

Ramegowda et al. (2014), observaram que um gene da família receptor-quinase é induzível à seca e com o silenciamento deste, houve uma redução do crescimento das plantas e na produtividade de grãos com as plantas induzidas ao estresse hídrico. Um estudo com plantas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) superexpressando um gene MAPKK mostrou que as plantas transgênicas promoveram o fechamento estomático induzido por ABA fazendo com que a taxa de perda de água das folhas transgênicas fosse menor, e, assim, tornando as plantas mais resistentes à seca (Wang, 2016).

Comparando os dados acima descritos com os resultados obtidos no presente trabalho, podemos inferir que a planta tolerante, através da indução da expressão do gene que codifica a Serina/Treonina Quinase, pode ter reconhecido a falta de água precocemente (30 dias) e ativado a maquinaria gênica responsável pelo fechamento dos estômatos para evitar a perda de água via transpiração. O mesmo não foi observado na cultivar sensível onde o mesmo transcrito foi induzido somente aos 60 dias.

Como pode ser observado, as proteínas da família das serinas/treoninas quinases estão relacionadas à vários aspectos biológicos envolvendo defesa da planta à vários tipos de resposta ao estresse, principalmente relacionadas ao fechamento de estômatos, respostas a sensores de Ca^{2+} , resposta ao ABA e ativação de fatores de transcrição, indicando que o gene atua em conjunto com uma cascata de sinalização em resposta ao caráter de tolerância à seca, inclusive com o fator de transcrição ABF.

Um outro transcrito estudado codifica um ABF (41837_c1_g2) e possui um SNP na posição 286 do gene (Tabela 1), trocando uma Adenina por uma Guanina e resultando em um aminoácido diferente, Glutamato ao invés de Lisina (Tullini, 2020). O transcrito ABF na cultivar tolerante foi reprimido aos 60 dias e induzido aos 90 dias tanto na cultivar tolerante, quanto na sensível (Figura 8).

Ao analisar a expressão gênica de um elemento ABRE na cana – de – açúcar, Devi et al. (2019) observaram um aumento na expressão durante o estresse inicial, que foi diminuindo gradualmente na maioria dos genótipos analisados. Zandkarimi et al. (2015), ao analisar diferentes ABFs em diferentes cultivares de uva, observaram que cada um possui um padrão de expressão. A diferença nos níveis de expressão em resposta a diferentes condições de estresse pode estar relacionada ao papel de cada ABF e ao gene no qual ele irá se ligar (Kim et al, 2005; Yoshida et al, 2009). Choi et al. (1999) também observaram que cada ABF pode ser regulado de uma maneira, dependendo do estresse ambiental em que foi exposto, funcionando assim, em diferentes vias de sinalização de estresse dependentes de ABA. Segundo Javed et al. (2020), alguns fatores de transcrição podem desempenhar um papel significativo sob diversas condições de estresse em plantas por regulação negativa da transcrição dos genes

Análises de superexpressão de alguns fatores de transcrição de AREB/ABF como AREB1/ABF2, AREB2/ABF4 ou ABF3 em plantas transgênicas de *Arabidopsis* mostraram que eles estão envolvidos na sinalização de ABA em resposta a estresses abióticos (Kang et al., 2002; Kim et al., 2004, Abdeen et al., 2010). Furihata et al. (2006), em um estudo com plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando um AREB1 fosforilado, observaram a regulação positiva de muitos genes induzíveis por ABA na ausência de aplicação de ABA exógeno, propondo que AREB/ABF são

ativados por fosforilação dependente de ABA. Cheng et al. (2022), demonstraram que através da fosforilação de dois fatores ABF (BnaABF3 e BnaABF4) a partir de uma proteína quinase, aumentaram suas atividades transcricionais para o gene Responsive to Dehydration (RD) 29B, que é um marcador de estresse por seca, demonstrando a importância deste fator de transcrição como um modulador de resposta ao estresse hídrico. Alguns promotores de genes relacionados ao estresse contêm um elemento responsivo ao ABA (ABRE) que contém domínios altamente conservados (Fujita et al., 2005). A partir de estudos de Busk e Pages (1998) realizados com *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), foi demonstrado que regiões promotoras de genes induzíveis à seca contêm um ABRE que possui a sequência central ACGTG. Estes fatores se ligam ao elemento ABRE, através da sinalização do ABA, resultando na ativação de genes responsivos ao ABA quando as plantas passam por algum tipo de estresse, incluindo a seca (Uno et al., 2000).

De acordo com Cingolani et al. (2012), a troca de aminoácidos pode ter efeitos com os seguintes graus de impacto: alto, moderado, baixo e modificador. Os efeitos moderados produzem variação de baixo impacto na sequência codante e/ou deleções ou inserções sem maiores consequências, simples alteração e excisão de regiões de ligação de fatores de transcrição. No estudo feito por Tullini (2020), foi indentificado um transcrito que codifica uma proteína do tipo USP que apresentou duas variações de impacto moderado do tipo SNP localizadas na posição 350 e 360 do transcrito, onde ambas as variações provocaram alteração de aminoácidos (Alanina → Valina; Prolina → Treonina, respectivamente).

Na análise de expressão gênica, o transcrito foi induzido apenas na cultivar tolerante e em 90 dias no estresse severo (Figura 13). No estudo de Yang et al. (2019) foi demonstrado que plantas transgênicas superexpressando o gene MsUspA aumentaram a capacidade de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) via enzimas antioxidantes sob estresse hídrico em comparação com plantas controle, provando assim que as plantas que super expressam o gene possuem uma maior tolerância ao estresse hídrico ao ativarem o sistema enzimático antioxidante protetor sob condições de estresse hídrico.

O gene que codifica a proteína USP pode participar de vários mecanismos em resposta ao estresse como o acúmulo de prolina e outras substâncias de ajuste

osmótico (Verslues et al., 2014; Gou et al., 2020). Essa proteína também está envolvida com metabólitos secundários, além da interação com outras proteínas de resposta ao estresse, na regulação da síntese de hormônios e na diminuição da taxa de abertura dos estômatos, aumentando o conteúdo de ABA endógeno e também mostra semelhança com genes responsivos ao etileno (Kerk et al., 2003; Loukehaich et al., 2012; Yang et al., 2019).

Jung et al. (2015), descreveram o gene USP como uma chaperona molecular cuja atividade é regulada de maneira redox-dependente, acompanhada por mudanças reversíveis em sua estrutura proteica. De acordo com os autores, plantas super expressando o gene mostraram forte resistência ao calor e ao estresse oxidativo.

Em um estudo com plantas transgênicas de algodão (*Gossypium hirsutum*), em que o gene USP sofreu mutação na sua estrutura, Hassan et al. (2021) observaram que o teor de água relativo da folha, assimilação de CO₂, condutância estomática, e teor de prolina foram significativamente aumentados em comparação ao controle com plantas não transgênicas. Além disso, também foi observado que a expressão gênica do USP em plantas transgênicas estressadas foi muito maior que em não transgênicas.

Loukehaich et al. (2012) descreveram em seus estudos sobre o gene USP no tomate (*Solanum pennellii*) que o gene sob estresse hídrico foi mais expresso após 6 horas, diminuindo depois de 12 horas e quando estressadas por calor aumentou a expressão após 6 h e estabilizou após 12 horas, concluindo que os estresses por seca geram efeitos mais fortes na expressão do gene.

6. CONCLUSÕES

Foi observado que os transcritos que codificam uma Serina/Treonina Quinase, uma proteína USP e o fator de transcrição ABF possuem uma expressão diferencial entre as cultivares de cana-de-açúcar tolerante com SNPs comparados com a sensível sem SNPs, o que pode sugerir que os SNPs presentes nos transcritos da cultivar tolerante podem estar envolvidos na resposta da planta ao estresse hídrico. No entanto, são necessários estudos mais aprofundados para se comprovar tal afirmação.

Os resultados obtidos para os transcritos estudados (Serina/treonina quinase, ABF e USP) podem ajudar em estudos futuros sobre marcadores moleculares candidatos em programas de melhoramento da cana-de-açúcar para rastrear genótipos resistentes e/ou suscetíveis à seca.

7. REFERÊNCIAS

AHMED, F. E. Quantitative real-time RT-PCR: application to carcinogenesis. *Cancer genomics & proteomics*, v. 2, n. 6, p. 317–332, 2005.

AUDE, M. I. Da s. Estádios de desenvolvimento da cana-de-açúcar e suas relações com a produtividade. *Ciência rural*, v. 23, n. 2, p. 241–248, ago. 1993.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in plant sciences*, v. 24, n. 1, p. 23–58, 23 fev. 2005.

BHARGAVA, S.; SAWANT, K. Drought stress adaptation: metabolic adjustment and regulation of gene expression. *Plant Breeding*, v. 132, n. 1, p. 21–32, fev. 2013.

BELESINI, A. A. et al. De novo transcriptome assembly of sugarcane leaves submitted to prolonged water-deficit stress. *Genetics and Molecular Research*, v. 16, n. 2, 2017.

BLUM, A. *Plant Water Relations, Plant Stress and Plant Production*. Em: BLUM, A. (Ed.). *Plant Breeding for Water-Limited Environments*. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 11–52.

BRAY, E. A. Molecular Responses to Water Deficit. *Plant Physiology*, v. 103, n. 4, p. 1035–1040, dez. 1993.

BRAY, N. L. et al. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nature Biotechnology*, v. 34, n. 5, p. 525–527, maio 2016.

CARDOSO-SILVA, C. B. et al. De Novo Assembly and Transcriptome Analysis of Contrasting Sugarcane Varieties. *PLoS ONE*, v. 9, n. 2, p. e88462, 11 fev. 2014.

CASAGRANDE, A. A.; VASCONCELOS, C. M. Fisiologia da parte aérea. In: Dinardo-Miranda, L.L.; Vasconcelos, A. C. M.; Landell, M. G. de A. (Eds.). *Cana-de-açúcar*. 1 ed. Campinas: Instituto Agrônômico, 2008. v. 1, p. 57-78.

CHENG, H. et al. Calcium-dependent Protein Kinase 5 (CPK5) positively modulates drought tolerance through phosphorylating ABA-Responsive Element Binding Factors in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Plant Science*, v. 315, p. 111-125, fev. 2022.

CHENG, S.-H. et al. Calcium Signaling through Protein Kinases. The Arabidopsis Calcium-Dependent Protein Kinase Gene Family. *Plant Physiology*, v. 129, n. 2, p. 469–485, 1 jun. 2002.

CINGOLANI, P. et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w 1118 ; iso-2; iso-3. *Fly*, v. 6, n. 2, p. 80–92, abr. 2012.

CONAB - Boletim Da Safra De Cana-De-Açúcar. [S. l.], 19 ago. 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. Acesso em: 6 set. 2022.

CONAB - Histórico da área de cultivo de cana-de-açúcar, moagem e produção de açúcar e etanol. *In*: histórico da área de cultivo de cana-de-açúcar, moagem e produção de açúcar e etanol. [S. l.], 12 dez. 2021. Disponível em: <https://observatoriodacana.com.br/listagem.php?idMn=4>. Acesso em: 4 mar. 2022.

CORDEIRO, G. M. et al. Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 113, n. 2, p. 331–343, jul. 2006.

DEFALCO, T. A.; BENDER, K. W.; SNEDDEN, W. A. Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochemical Journal*, v. 425, n. 1, p. 27–40, 1 jan. 2010.

DEVI, K. et al. Gene Expression Profiling in Sugarcane Genotypes During Drought Stress and Rehydration. *Sugar Tech*, v. 21, n. 5, p. 717–733, out. 2019.

DHILLON, R. S.; VON WUEHLISCH, G. Mitigation of global warming through renewable biomass. *Biomass and Bioenergy*, v. 48, p. 75–89, jan. 2013.

FAROOQ, M. et al. Plant Drought Stress: Effects, Mechanisms and Management. Em: Lichtfouse, E. et al. (Eds.). *Sustainable Agriculture*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. p. 153–188.

FUJITA, Y. et al. AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, v. 17, n. 12, p. 3470–3488, 1 dez. 2005.

FURIHATA, T. et al. Abscisic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 6, p. 1988–1993, 7 fev. 2006.

GARCIA, A. A. F. et al. SNP genotyping allows an in-depth characterisation of the genome of sugarcane and other complex autoployploids. *Scientific Reports*, v. 3, n. 1, p. 3399, dez. 2013.

HASSAN, S. et al. Genetic modification of *Gossypium arboreum* universal stress protein (GUSP1) improves drought tolerance in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, v. 27, n. 8, p. 1779–1794, ago. 2021.

HRABAK, E. M. et al. The Arabidopsis CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiology*, v. 132, n. 2, p. 666–680, 1 jun. 2003.

HITCHCOCK, A. S. Type Species Of The First 100 Genera Of Linnaeus' Species Plantarum. *American Journal of Botany*, v. 10, n. 9, p. 510–514, nov. 1923.

INGRAM, J.; BARTELS, D. The Molecular Basis Of Dehydration Tolerance In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 377–403, jun. 1996.

KIM, D. J. et al. Crystal structure of the protein A t3g01520, a eukaryotic universal stress protein-like protein from *arabidopsis thaliana* in complex with AMP. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 83, n. 7, p. 1368–1373, jul. 2015.

LUDWIG, A. A. CDPK-mediated signalling pathways: specificity and cross-talk. *Journal of Experimental Botany*, v. 55, n. 395, p. 181–188, 17 nov. 2003.

MA, S.; BOHNERT, H. J. Integration of *Arabidopsis thaliana* stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology*, v. 8, n. 4, p. R49, 2007.

MANHÃES, C. M. C. et al. Factors that affect sprouting and tillering of sugar cane. *Revista Vértices*, v. 17, n. 1, p. 163–181, 2015.

MARDIS, E. R. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 9, n. 1, p. 387–402, 1 set. 2008.

MARSHALL, A. et al. Tackling Drought Stress: RECEPTOR-LIKE KINASES Present New Approaches. *The Plant Cell*, v. 24, n. 6, p. 2262–2278, jun. 2012.

MITTLER, R. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science*, v. 11, n. 1, p. 15–19, jan. 2006.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress: Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment*, v. 25, n. 2, p. 239–250, fev. 2002.

JUNG, Y. J. et al. Universal Stress Protein Exhibits a Redox-Dependent Chaperone Function in *Arabidopsis* and Enhances Plant Tolerance to Heat Shock and Oxidative Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 21 dez. 2015.

LOUKEHAICH, R. et al. SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. *Journal of Experimental Botany*, v. 63, n. 15, p. 5593–5606, set. 2012.

NEPOMUCENO AL, Neumaier N, Farias JRB, Oya T (2001) Tolerância à seca em plantas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 23:12-18.

PARTHASARATHY, N. Origin of Noble Sugar-Canes (*Saccharum officinarum*). *Nature*, v. 161, n. 4094, p. 608–608, abr. 1948.

PFAFFL, M. W. Relative expression software tool (REST(C)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, v. 30, n. 9, p. 36e–336, 1 maio 2002.

RAMEGOWDA, V. et al. Rice GROWTH UNDER DROUGHT KINASE Is Required for Drought Tolerance and Grain Yield under Normal and Drought Stress Conditions. *Plant Physiology*, v. 166, n. 3, p. 1634–1645, 1 nov. 2014.

ROMEIS, T.; PIEDRAS, P.; JONES, J. D. G. Resistance Gene-Dependent Activation of a Calcium-Dependent Protein Kinase in the Plant Defense Response. *The Plant Cell*, v. 12, n. 5, p. 803–815, maio 2000.

SALVI, P. et al. Phytohormone signaling and crosstalk in regulating drought stress response in plants. *Plant Cell Reports*, v. 40, n. 8, p. 1305–1329, ago. 2021.

SANTOS, D. dos. *Ecofisiologia da cana-de-açúcar. Recomendações técnicas para cultura da cana-de-açúcar no estado do Paraná*. Londrina: Instituto Agrônomo, 1977.

SHANG, Y. et al. Open stomata 1 exhibits dual serine/threonine and tyrosine kinase activity in regulating abscisic acid signaling. *Journal of Experimental Botany*, v. 72, n. 15, p. 5494–5507, 28 jul. 2021.

SHARMA, A. et al. Photosynthetic Response of Plants Under Different Abiotic Stresses: A Review. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 39, n. 2, p. 509–531, jun. 2020.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of Experimental Botany*, v. 58, n. 2, p. 221–227, 6 nov. 2006.

SINHA, P. et al. Identification and Validation of Selected Universal Stress Protein Domain Containing Drought-Responsive Genes in Pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Frontiers in Plant Science*, v. 6, 6 jan. 2016.

SIRICHANDRA, C. et al. Phosphorylation of the Arabidopsis AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Letters*, v. 583, n. 18, p. 2982–2986, 17 set. 2009.

SZCZEGIELNIAK, J. et al. A Wound-Responsive and Phospholipid-Regulated Maize Calcium-Dependent Protein Kinase. *Plant Physiology*, v. 139, n. 4, p. 1970–1983, 1 dez. 2005.

- TEN HOVE, C. A. et al. Probing the roles of LRR RLK genes in *Arabidopsis thaliana* roots using a custom T-DNA insertion set. *Plant Molecular Biology*, v. 76, n. 1–2, p. 69–83, maio 2011.
- VAHISALU, T. et al. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, v. 452, n. 7186, p. 487–491, mar. 2008.
- VANTINI, J. S. et al. Differential gene expression in drought-tolerant sugarcane roots. *Genetics and Molecular Research*, v. 14, n. 2, p. 7196–7207, 2015.
- XU, J. et al. AtCPK6, a functionally redundant and positive regulator involved in salt/drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Planta*, v. 231, n. 6, p. 1251–1260, maio 2010.
- XU, J.; ZHANG, S. Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science*, v. 20, n. 1, p. 56–64, jan. 2015.
- YANG, M. et al. Universal stress protein in *Malus sieversii* confers enhanced drought tolerance. *Journal of Plant Research*, v. 132, n. 6, p. 825–837, nov. 2019.
- WANG, C. et al. The Cotton *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3* Functions in Drought Tolerance by Regulating Stomatal Responses and Root Growth. *Plant and Cell Physiology*, v. 57, n. 8, p. 1629–1642, ago. 2016.
- WANG, Y.-H. et al. DcABF3, an ABF transcription factor from carrot, alters stomatal density and reduces ABA sensitivity in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science*, v. 302, p. 110699, jan. 2021.
- WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.
- ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. *Physiologia Plantarum*, v. 162, n. 1, p. 2–12, jan. 2018.
- ZANDKARIMI, H. et al. Analyzing the Expression Profile of AREB/ABF and DREB/CBF Genes under Drought and Salinity Stresses in Grape (*Vitis vinifera* L.). *PLOS ONE*, v. 10, n. 7, p. e0134288, 31 jul. 2015.
- ZHANG, T.; CHEN, S.; HARMON, A. C. Protein phosphorylation in stomatal movement. *Plant Signaling & Behavior*, v. 9, n. 11, p. e972845, 2 nov. 2014.
- ZHAO, D.; LI, Y.-R. Climate Change and Sugarcane Production: Potential Impact and Mitigation Strategies. *International Journal of Agronomy*, v. 2015, p. 1–10, 2015.