

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

Carolina Neves Correia

**Análise *in silico* da Expressão Diferencial de Transcritos
SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar em
Resposta ao Déficit Hídrico**

**Recife
2013**

Carolina Neves Correia

**Análise *in silico* da Expressão Diferencial de Transcritos
SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar em
Resposta ao Déficit Hídrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Ederson Akio Kido

**Recife
2013**

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Correia, Carolina Neves

Análise *in silico* da expressão diferencial de transcritos de SuperSAGE de proteínas quinases em cana-de-açúcar em resposta ao déficit hídrico/ Carolina Neves Correia– Recife: O Autor, 2013.

88 folhas: il., fig., tab.

Orientadores: Ederson Akio Kido

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2013.

Inclui bibliografia

- 1. Transcrição genética 2. Proteína quinase 3. Cana-de-açúcar I. Kido, Ederson Akio (orientador) II. Título**

572.8845

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 314

Carolina Neves Correia

**Análise *in silico* da Expressão Diferencial de Transcritos
SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar em
Resposta ao Déficit Hídrico**

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

Dr. Ederson Akio Kido - Orientador
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Ana Maria Benko-Iseppon
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Valesca Pandolfi
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Paulo Paes de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2013

Dedico à minha mãe e ao meu pai.

Agradecimentos

Agradeço à **minha família**, pelo suporte de sempre e o apoio especial em momentos decisivos;

Aos **meus amigos**, que são parte fundamental das minhas conquistas;

Ao **Prof. Dr. Ederson Akio Kido**, pela oportunidade trabalhar em seu grupo de pesquisa, pela orientação e confiança em todos os anos de trabalho;

À **Dra. Valesca Pandolfi**, por todos os conselhos e toda a ajuda recebida ao longo do meu período no Laboratório de Genética Molecular (LGM);

Aos companheiros do LGM: **M.Sc. Manassés Daniel da Silva**, **M.Sc. Roberta Lane de Oliveira** e **M.Sc. José Ribamar da Costa Ferreira Neto**, por todos os momentos de descontração e auxílio em várias etapas do trabalho;

À **Coordenação** e à **Secretaria da Pós-Graduação em Genética**, por todo o apoio acadêmico prestado;

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq) pela concessão da bolsa de Mestrado;

À **Universidade Federal de Pernambuco**, por meio do **Departamento de Genética**, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao **Centro de Tecnologia Canavieira** e a **Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP)**, pelo apoio técnico e financeiro à realização do projeto.

Do. Or do not. There is no try.

(Mestre Yoda)

Resumo

Estudos de expressão gênica diferencial associados a perfis metabólicos de plantas submetidas a um estresse abso são abordagens valiosas na compreensão da tolerância vegetal. Por sua vez, proteínas quinases são importantes componentes da sinalização celular, catalisando a transferência do grupo fosfato de uma molécula de ATP para um substrato, em processo chamado fosforilação, com participação ativa na aclimação às mudanças ambientais. O presente trabalho teve como objetivo comparar *in silico* perfis de transcrição, de *unitags* SuperSAGE diferencialmente expressas e anotadas como prováveis quinases, de genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico (24 h de supressão de rega). Para tanto, sequências expressas (EST) de gramíneas, de diversos bancos de dados públicos, similares às *unitags* (análises BLASTn), foram caracterizadas em termos de Ontologia Gênica, que conjuntamente com as anotações das EST permitiram identificar e classificar as quinases em famílias. Através dos respectivos números de Classificação Enzimática (EC), mapas metabólicos foram gerados, permitindo comparar os grupos de genótipos contrastantes (tolerantes e sensíveis ao estresse). Foram observadas 539 prováveis quinases, que distribuídas em 41 famílias e em 18 vias metabólicas, quando associadas às *unitags*, permitiram discuti-las com base em oito classes hierárquicas funcionais. Importantes diferenças na expressão desses transcritos mapeados como quinases, entre os grupos de genótipos tolerantes e sensíveis, após 24 h de supressão de rega, foram observadas neste trabalho, contribuindo para um melhor entendimento da percepção do estresse aplicado, podendo ser útil ao melhoramento genético da cana-de-açúcar.

Palavras-chave: quinase; transcrição diferencial; supressão de rega; cana-de-açúcar.

Abstract

Differential gene expression studies, when associated with metabolic profiles of plants under stress, are helpful in plant tolerance understanding. In turn, protein kinases are key components of cellular signaling by catalyzing the transfer of a phosphate group from an ATP molecule to a substrate in a process called phosphorylation with active participation in the plant acclimatization to the environmental changes. This study aimed to analyze the in silico transcription profiles of SuperSAGE unitags differentially expressed and annotated as expected kinases generated by sugarcane tolerant and sensitive bulk of genotypes under water deficit (24 h irrigation suppression). Therefore, expressed sequences (EST) of grasses, from various public databases, similar to unitags (BLASTn analysis), after characterized in terms of Gene Ontology and together with the EST annotations allowed to identify and classify the possible kinases into families. These kinases, through their Enzyme Classification (EC) numbers, supported the metabolic maps allowing the comparison between contrasting bulks (tolerant and sensitive to stress). The 539 putative kinases observed and distributed in 41 families, covering 18 metabolic pathways, when associated with the unitags expressions qualify to treat them based on eight hierarchical functional classes. Important differences observed in this study, in the expression of these transcripts mapped as kinases, among the tolerant and sensitive genotypes bulks, after 24 h suppression irrigation, will contribute to a better understanding of the perception of the applied stress, and may be useful for genetic improvement of sugarcane.

Keywords: kinase; differential transcription; suppression of irrigation; sugarcane.

Lista de Figuras

- FIGURA 1:** REPRESENTAÇÃO DA ÁREA PLANTADA DE CANA-DE-AÇÚCAR NO BRASIL. FONTE: UNICA (2008).....4
- FIGURA 2:** ESQUEMA SIMPLIFICADO DAS ETAPAS DE GERAÇÃO DE TAGS ATRAVÉS DA TÉCNICA DE HT-SUPERSAGE. EXTRAÍDO E ADAPTADO DE MATSUMURA *ET AL.* (2008). 12
- FIGURA 3:** PRINCIPAIS ETAPAS DA METODOLOGIA APLICADA.....20
- FIGURA 4:** DIAGRAMAS DE VENN COM NÚMEROS DE *UNITAGS* [(A) TOTAIS; (B) INDUZIDAS; (C) REPRIMIDAS E (D) NÃO-SIGNIFICATIVAS, AO NÍVEL DE $P \leq 0,05$] RELACIONADAS ÀS EST DE PROVÁVEIS QUINASES, CONSIDERANDO COMPARAÇÕES ENTRE BIBLIOTECAS HT-SUPERSAGE (TE x TC; SE x SC; TE x SE; TC x SC). CRIADO COM O VENNY ([HTTP://BIOINFOGP.CNB.CSIC.ES/TOOLS/VENNY/INDEX.HTML](http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html)).....22
- FIGURA 5:** FAMÍLIAS DE QUINASES E RESPECTIVOS TOTAIS DE *UNITAGS* SUPERSAGE DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H), INDUZIDAS OU REPRIMIDAS ($P \leq 0,05$) NAS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC.29
- FIGURA 6:** DIAGRAMAS DE VENN COM FAMÍLIAS DE QUINASES DAS *UNITAGS* (A) INDUZIDAS, (B) REPRIMIDAS E (C) NÃO-SIGNIFICATIVAS ($P \leq 0,05$) DE COMPARAÇÕES ENTRE BIBLIOTECAS HT-SUPERSAGE DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H (TE x TC E SE x SC).31
- FIGURA 7:** *UNITAGS* DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS ($P \leq 0,05$) DAS COMPARAÇÕES ENTRE BIBLIOTECAS HT-SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H (TE x TC - GENÓTIPOS TOLERANTES SOB ESTRESSE VS RESPECTIVO CONTROLE SEM ESTRESSE; SE x SC - GENÓTIPOS SENSÍVEIS SOB ESTRESSE VS RESPECTIVO CONTROLE SEM ESTRESSE), NAS OITO CLASSES DE HIERARQUIA FUNCIONAL DO KEGG BRITE.....32
- FIGURA 8:** MAPA METABÓLICO DA COMPARAÇÃO TE x TC COM TODAS AS VIAS OBSERVADAS. GERADO COM NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) ATRIBUÍDOS ÀS *UNITAGS* SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, DAS PROVÁVEIS QUINASES. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR *UNITAGS* INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES *UNITAGS* INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS *UNITAGS*. BASEADO NAS INFORMAÇÕES DO KEGG *PATHWAY* ([HTTP://WWW.GENOME.JP/KEGG/PATHWAY.HTML](http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)).....35
- FIGURA 9:** MAPA METABÓLICO DA COMPARAÇÃO SE x SC COM TODAS AS VIAS OBSERVADAS. GERADO COM NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) ATRIBUÍDOS ÀS *UNITAGS* SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, DAS PROVÁVEIS QUINASES. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR *UNITAGS* INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES

UNITAGS INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS UNITAGS. BASEADO NAS INFORMAÇÕES DO KEGG PATHWAY ([HTTP://WWW.GENOME.JP/KEGG/PATHWAY.HTML](http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)).....36

FIGURA 10: SEÇÕES REFERENTES ÀS UNITAGS SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NAS VIAS DO METABOLISMO DE LIPÍDEOS, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, AS VIAS DE GLICEROFOSFOLIPÍDEOS [KEGG 00564] E GLICEROLIPÍDEOS [KEGG 00561]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR UNITAGS INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES UNITAGS INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS UNITAGS.....37

FIGURA 11: SEÇÕES REFERENTES ÀS UNITAGS SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NO METABOLISMO ENERGÉTICO, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, A VIA DO METABOLISMO DE ENXOFRE [KEGG 00920]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR UNITAGS INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES UNITAGS INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS UNITAGS.38

FIGURA 12: SEÇÕES REFERENTES ÀS UNITAGS SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, AS VIAS DE (1) FRUTOSE E MANOSE [KEGG 00051]; (2) PENTOSE-FOSFATO [KEGG 00030]; (3) INOSITOL FOSFATO [KEGG 00562]; (4) GLICÓLISE/GLICONEOGÊNESE [KEGG 00010] E PIRUVATO [KEGG 00620]; (5) CICLO DO ÁCIDO CÍTRICO [KEGG 00020]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR UNITAGS INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES UNITAGS INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS UNITAGS.....41

FIGURA 13: SEÇÕES REFERENTES ÀS UNITAGS SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NO METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, AS VIAS DE (1) PURINAS [KEGG 00230] E (2) PIRIMIDINAS [KEGG 00240]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR UNITAGS INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES UNITAGS INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS UNITAGS.44

FIGURA 14: SEÇÕES REFERENTES ÀS UNITAGS SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, AS VIAS DE (1) GLICINA, SERINA E TREONINA [KEGG 00260]; (2) CISTEÍNA E METIONINA [KEGG 00270]; (3) BIOSÍNTESE DE LISINA [KEGG 00300]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR UNITAGS INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES UNITAGS INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS UNITAGS.46

FIGURA 15: SEÇÕES REFERENTES ÀS UNITAGS SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NO PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES DO MEIO AMBIENTE, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, A VIA

DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS VIA FOSFATIDILINOSITOL [KEGG 04070]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR *UNITAGS* INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES *UNITAGS* INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS *UNITAGS*.48

FIGURA 16: SEÇÕES REFERENTES ÀS *UNITAGS* SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NO METABOLISMO DE COFADORES E VITAMINAS, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, AS VIAS DE (1) PANTOTENATO E BIOSÍNTESE DE COENZIMA A [KEGG 00770]; (2) NICOTINATO E NICOTINAMIDA [KEGG 00760]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR *UNITAGS* INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES *UNITAGS* INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS *UNITAGS*.49

FIGURA 17: SEÇÕES REFERENTES ÀS *UNITAGS* SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H, NOS PROCESSOS CELULARES, PARA AS COMPARAÇÕES (A) TE x TC E (B) SE x SC. EM DESTAQUE, A VIA DE (1) ENDOCITOSE [KEGG 04144]. LINHAS EM VERMELHO SÃO VIAS COMPOSTAS POR *UNITAGS* INDUZIDAS; EM VERDE, REPRIMIDAS; EM AZUL, HÁ O CONFLITO GERADO POR DIFERENTES *UNITAGS* INDUZIDAS E REPRIMIDAS NO MESMO NÚMERO EC; E EM CINZA NÃO FORAM OBSERVADAS *UNITAGS*.50

Lista de Tabelas

TABELA 1: DESCRIÇÃO DAS BIBLIOTECAS HT-SUPERSAGE UTILIZADAS E AS COMPARAÇÕES ANALISADAS.	18
TABELA 2: FAMÍLIAS DE QUINASES VEGETAIS IDENTIFICADAS COM BASE NAS <i>UNITAGS</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H.	24
TABELA 3: PROVÁVEIS QUINASES OBSERVADAS NAS COMPARAÇÕES TE X TC E SE X SC, ORIUNDAS DAS BIBLIOTECAS HT-SUPERSAGE DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DÉFICIT HÍDRICO (24 H).	25
TABELA 4: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) EXCLUÍDOS DAS COMPARAÇÕES TE X TC E SE X SC, ORIUNDAS DAS BIBLIOTECAS HT-SUPERSAGE DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB DÉFICIT HÍDRICO (24 H), POR NÃO EXISTIREM NOS MAPAS DO KEGG <i>PATHWAY</i>	28
TABELA 5: EXPRESSÃO DIFERENCIAL E FAMÍLIAS DAS <i>UNITAGS</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H), ASSOCIADAS AOS NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) UTILIZADOS NOS MAPAS METABÓLICOS DAS COMPARAÇÕES TE X TC E SE X SC.	33
TABELA 6: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NAS VIAS DO METABOLISMO DE LIPÍDEOS E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	38
TABELA 7: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NAS VIAS DO METABOLISMO ENERGÉTICO E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	39
TABELA 8: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NAS VIAS DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	42
TABELA 9: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NAS VIAS DO METABOLISMO DE NUCLEOTÍDEOS E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	45
TABELA 10: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NAS VIAS DO METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> HT-SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	47
TABELA 11: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NO PROCESSAMENTO DE INFORMAÇÕES DO MEIO AMBIENTE E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> HT-SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	48

TABELA 12: NÚMEROS DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADOS NAS VIAS DO METABOLISMO DE COFATORES E VITAMINAS E SUA(S) <i>UNITAG(S)</i> SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	50
TABELA 13: NÚMERO DE CLASSIFICAÇÃO ENZIMÁTICA (EC) OBSERVADO NOS PROCESSOS CELULARES E SUA <i>UNITAG</i> HT-SUPERSAGE, DE CANA-DE-AÇÚCAR SOB SUPRESSÃO DE REGA (24 H).	51

Lista de Abreviaturas e Siglas

- ADK:** Adenilato Quinase (*Adenylate Kinase*)
- AdK:** Adenosina Quinase (*Adenosine Kinase*)
- aPK:** Proteínas Quinases atípicas (*atypical Protein Kinases*)
- AK:** Aspartato Quinase (*Aspartate Kinase*)
- APS:** Adenilil Sulfato Quinase (*Adenylyl-sulfate Kinase*)
- Asp:** Aspartato
- ATP:** Adenosina Trifosfato
- BLAST:** *Basic Local Alignment Tool*
- BLASTn:** BLAST nucleotídico (*Nucleotide BLAST*)
- BLASTx:** BLAST traduzido (*Translated BLAST*)
- CCaMK:** Quinase Dependente de Cálcio-Calmodulina (*Calcium/Calmodulin-dependent Protein Kinase*)
- CDC2:** Quinase Dependente de Ciclina (*Cyclin-dependent Kinase*)
- cDNA:** DNA complementar
- CDPK:** Quinase Dependente de Cálcio (*Calcium-dependent Protein Kinase*)
- CIPK:** Quinase de Interação com Proteína Tipo Calcineurina B [CBL] (*CBL-interacting Protein Kinase*)
- CK1:** Caseína Quinase 1 (*Casein Kinase 1*)
- CK2:** Caseína Quinase 2 (*Casein Kinase 2*)
- CTC:** Centro de Tecnologia Canavieira
- CTR1/EDR1:** Tripla Resposta Constitutiva 1/Resistência à Doença 1 (*Constitutive Triple Response 1/Enhanced Disease Resistance 1*)
- DGK:** Diacilglicerol Quinase (*Diacylglycerol Kinase*)
- DhaK:** Dihidroxiacetona Quinase (*Dihydroxyacetone Kinase*)
- DNA:** Ácido Desoxirribonucléico
- EC:** Classificação Enzimática
- ePK:** Proteínas Quinases eucarióticas (*eukaryotic Protein Kinase*)
- EST:** Etiqueta de Sequência Expressa (*Expressed Sequence Tag*)
- FGGY:** Quinase do Tipo Carboidrato (*carbohydrate kinase*)

GHMP: Galactokinase, Homoserina, Mevalonato e Fosfomevalonato Quinase (*Galactokinase, Homoserine kinase, Mevalonate kinase, and Phosphomevalonate kinase*)

GO: Ontologia Gênica

GSK3/Shaggy: Glicogênio Sintase Quinase-3/Shaggy (*Glycogen Synthase Kinase/Shaggy*)

His: Histidina

HK: Histidina Quinase (*Histidine Kinase*)

HT-SuperSAGE: SuperSAGE de Alto Desempenho (*Highthroughput - SuperSAGE*)

MAP2K: MAP Quinase Quinase (*MAP Kinase Kinase*)

MAP3K: MAP Quinase Quinase Quinase (*MAP Kinase Kinase Kinase*)

MAPK: Quinase Ativada por Mitogênio (*Mitogen Activated Kinase*)

MPSS: Sequenciamento Massivo de Assinatura Paralela (*Massive Parallel Signature Sequencing*)

MTRK: Metilribose Quinase (*Methylthioribose Kinase*)

NADK2: NAD Quinase 2

PanK_long: Pantotenato Quinase (*Pantothenate Kinase*)

PDK/BCKDK: Piruvato Desidrogenase Quinase/Quinase Cetoácido de Desidrogenase de Cadeia Ramificada (*Pyruvate Dehydrogenase Kinase/ Branched Chain Ketoacid Dehydrogenase Kinase*)

PEG: Polietilenoglicol

PEPCK: Fosfoenolpiruvato Carboxiquinase (*Phosphoenolpyruvate carboxykinase*)

PGK: Fosfoglicerato Quinase (*Phosphoglycerate Kinase*)

PIP: Fosfatidilinositol-fosfato Quinase (*Phosphatidylinositol 3-kinase*)

PK: Proteína Quinase (*Protein Kinase*)

RGB: Vermelho, Verde e Azul (*Red, Green and Blue*)

RLK: Quinase Similar a Receptor (*Receptor-like Kinase*)

RNA: Ácido Ribonucléico

RNAi: RNA de interferência

RNAm: RNA mensageiro

RNA-Seq: Sequenciamento de RNA (*RNA Sequencing*)

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio (*Reactive Oxygen Species*)

RSK: Quinase Ribossomal (*Ribosomal Kinase*)

RT-qPCR: PCR Quantitativa em Tempo Real

SAGE: Análise Serial da Expressão Gênica (*Serial Analysis of Gene Expression*)

SC: *bulk* de quatro genótipos Sensíveis sob condições Controle (sem estresse)

SE: *bulk* de quatro genótipos Sensíveis sob Estresse (supressão de rega por 24 h)

Ser: Serina

SK: Chiquimato Quinase (*Shikimate Kinase*)

SNF1: Quinase Relacionada à Não-Fermentação de Sacarose (*Sucrose non-fermenting Kinase*)

SnRK: Quinase Relacionada à SNF1 (*SNF1-related Kinase*)

SPHK: Esfingosina Quinase (*Sphingosine Kinase*)

SSH: Hibridização Subtrativa Supressiva (*Supression Subtractive Hybridization*)

STE20: Serina-Treonina Quinase (*Serine-Threonine Kinase*)

TC: *bulk* de quatro genótipos Tolerantes sob condições Controle (sem estresse)

TE: *bulk* de quatro genótipos Tolerantes sob Estresse (supressão de rega por 24 h)

Thr: Treonina

TK: Timidina Quinase (*Thimidine Kinase*)

TLK: *Tousled-like* Quinase

Tyr: Tirosina

Sumário

Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
Lista de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas	xiii
1. Introdução	1
2. Revisão da Literatura	2
2.1 Taxonomia e Recursos Genéticos da Cana-de-Açúcar	2
2.2 Importância Econômica da Cana-de-Açúcar	3
2.3 Estresses Abióticos.....	4
2.3.1 Déficit hídrico e expressão gênica diferencial	5
2.4 Função das Proteínas Quinases.....	6
2.5 Classificação das Proteínas Quinases.....	8
2.6 Técnicas em Transcriptômica	9
2.6.1 SAGE e Variações	11
2.7 Bancos de Dados Biológicos	13
2.8 Bioinformática	16
3. Objetivos	17
3.1 Geral.....	17
3.2 Específicos	17
4. Material e Métodos	18
5. Resultados	21
6. Discussão	52
7. Conclusões.....	75
8. Referências Bibliográficas	76
Curriculum vitae (Lattes)	85

1. Introdução

Em anos recentes, a preocupação com suprimento e preços dos combustíveis fósseis tem motivado a busca por alternativas renováveis. Com as tecnologias disponíveis e a atual produção, o etanol, obtido da cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) é uma ótima alternativa. A demanda dos mercados interno e externo, para o Brasil, até 2015, é estimada em 50 bilhões de litros.

Uma vez que a incorporação de novas áreas de plantio esbarra na ausência de condições climáticas e de solo adequadas, a melhor saída é o aumento dos níveis de produtividade. Para tanto, o melhoramento convencional dessa cultura vem sendo realizado há décadas, porém, o tempo médio de geração de novas variedades gira em torno de 12 anos, limitando o processo.

Em auxílio ao melhoramento convencional, diversas técnicas em transcriptômica vêm sendo utilizadas. A análise molecular em genótipos sob condições ambientais adversas podem gerar diversas informações úteis sobre a expressão gênica diferencial nesses indivíduos. Logo, a observação de como os genes envolvidos na percepção e transdução de sinais (realizados pelas proteínas quinases) atuam sob condições desfavoráveis, tornado-se fonte valiosa para o entendimento da resposta vegetal.

Este trabalho teve como intuito, comparar perfis de transcrição das proteínas quinases, gerados a partir da técnica de SuperSAGE, de genótipos contrastantes (tolerantes vs sensíveis ao déficit hídrico) de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), sob supressão de rega por 24 h, visando diferenciar as respostas dos mesmos com relação à sinalização molecular nessa condição de estresse.

2. Revisão da Literatura

2.1 Taxonomia e Recursos Genéticos da Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum*, subtribo Saccharinae, tribo Andropogoneae e família Poacea. Esse gênero possui seis principais espécies: *S. officinarum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule*, *S. robustum* e *S. spontaneum*, que sofreram vários eventos de hibridização e, portanto, formam o chamado ‘Complexo *Saccharum*’ (Amalraj & Balasundaram, 2006). Os recursos genéticos dessa cultura podem ser divididos em três categorias: (1) cultivares tradicionais, (2) parentes selvagens e (3) cultivares modernas. As cultivares tradicionais são raramente usadas no cultivo atual, estando algumas presentes em bancos de germoplasma para futuro acesso às suas características genômicas (Dillon *et al.*, 2007).

Duas espécies são reconhecidas como selvagens: *S. spontaneum* ($2n = 36-128$) e *S. robustum* ($2n = 60-170$). Enquanto os híbridos modernos (*Saccharum* spp.), representam um complexo originado de cruzamentos entre *S. officinarum* ($2n = 70-140$) e *S. spontaneum*, *S. barberi* ($2n = 110-120$) ou *S. sinense* ($2n = 81-124$), dependendo da linhagem (Ming *et al.*, 1998; Edmé *et al.*, 2005). A grande maioria dos cruzamentos ocorreu entre *S. officinarum* e *S. spontaneum*, devido à ‘nobreza’ da primeira por seu elevado conteúdo de açúcar, a capacidade de adaptação ambiental e a resistência às pragas da segunda (Dillon *et al.*, 2007).

A maior parte do melhoramento dessa cultura ainda tem se dado através do melhoramento genético tradicional e da geração de mapas genéticos

baseados em marcadores moleculares (Kido, 2003). A primeira abordagem pode levar até 15 anos para gerar uma nova cultivar, sendo que a segunda esbarra na enorme quantidade de cromossomos a serem mapeados, uma vez que as cultivares modernas usadas podem apresentar mais de 100 cromossomos. Portanto, estudos do perfil metabólico associados ao perfil de expressão gênica de plantas submetidas a estresses-alvo são abordagens valiosas para o futuro da indústria canavieira (Menossi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010).

2.2 Importância Econômica da Cana-de-Açúcar

Mais de 100 países são produtores de cana-de-açúcar, uma gramínea tropical que tem sido cultivada por mais de 4.000 anos (Trujillo *et al.*, 2008). Essa produção utiliza uma área de quase 24 milhões de hectares, representando 0,5 % do total de áreas agricultáveis no mundo (FAOSTAT, 2010). A grande importância desta cultura é decorrente da ampla variedade de produtos (consumo *in natura*, açúcar, etanol, aguardente, melaço) e de subprodutos (bagaço, torta de filtro, vinhaça, folhagem) gerados.

A cana-de-açúcar responde por 75 % da produção mundial de açúcar (Wang *et al.*, 2010), sendo o Brasil responsável por quase 50 % do montante produzido (FAOSTAT, 2010). Cerca de 570 milhões de toneladas de cana-de-açúcar foram moídas no país, na safra 2011/2012, resultando em 37 mil toneladas de açúcar e 23 bilhões de litros de etanol (Conab, 2011). A previsão para a safra 2012/2013 é de 602 milhões de toneladas de cana-de-açúcar (Conab, 2012), sendo produzida nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, na qual cerca de 60 % de sua área plantada está concentrada no estado de São Paulo (Figura 1).

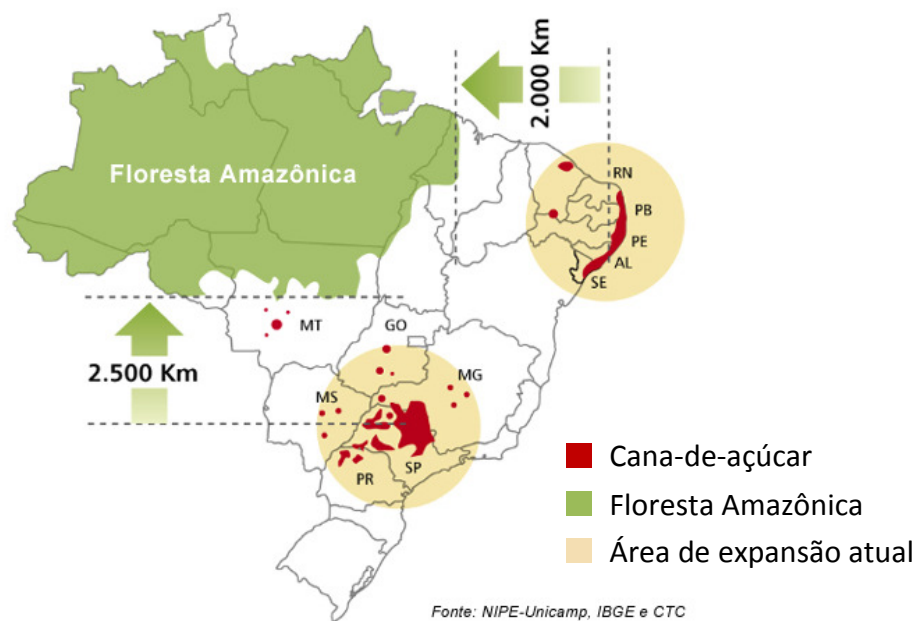


Figura 1: Representação da área plantada de cana-de-açúcar no Brasil. Fonte: UNICA (2008).

2.3 Estresses Abióticos

Os vegetais estão sujeitos a uma gama de estresses abióticos (seca, salinidade, altas e baixas temperaturas, poluição química) que afetam seu desenvolvimento, com árduas consequências à produção agrícola, aos produtores e à economia, sendo a seca e a salinidade os fatores abióticos que mais comumente limitam a produção agrícola ao redor do mundo (Nakashima *et al.*, 2009; Urano *et al.*, 2010; Krasensky & Jonak, 2012). Em gramíneas, como o milho e o trigo, as perdas ocasionadas pelos estresses abióticos podem chegar a 85 % da produção (Rodrigues *et al.*, 2009). Assim, é de grande importância compreender como as plantas respondem aos estresses abióticos, a fim de reduzir as perdas sob tais condições adversas (Urano *et al.*, 2010).

Além dos danos diretos, os estresses abióticos apresentam efeitos sobre várias vias importantes no crescimento e desenvolvimento da planta, causando

efeitos secundários, como é o caso do estresse osmótico e do estresse oxidativo. O primeiro afeta o potencial osmótico da planta, influenciando sua capacidade de absorção de água e nutrientes; o segundo gera uma alta produção de radicais livres (ROS - *Reactive Oxygen Species*), moléculas que podem danificar as estruturas celulares (Krasensky & Jonak, 2012).

2.3.1 Déficit hídrico e expressão gênica diferencial

A adaptação ao déficit hídrico é um mecanismo complexo e os primeiros passos para o processo de aclimação envolvem a percepção do estresse e a posterior indução das respostas fisiológicas e moleculares (Roy *et al.*, 2011).

Sob deficiência hídrica, as gramíneas podem apresentar mudanças morfológicas e fisiológicas, bem como: redução da área foliar, da transpiração, da condutância estomática, da fotossíntese e da condutividade hidráulica das raízes; modificação na atividade das enzimas dos metabolismos de nitrogênio e carbono (Lopes *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2013).

Algumas das respostas apresentadas pelos vegetais à seca são frequentemente espécie- ou genótipo-específicas. A identificação dessas respostas em plantas com metabolismo fotossintético do tipo C4, assim como a cana-de-açúcar, é dificultado pela existência de variados subtipos [enzima málica NADP (NADP-ME), NAD-ME e fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PPDK)] (Carmo-Silva *et al.*, 2007), que exibem diferentes estratégias para adaptação ao estresse. Além disso, as respostas são também influenciadas pela duração e severidade do estresse sofrido e do estágio de desenvolvimento do vegetal (Lopes *et al.*, 2011).

Diversas proteínas e moléculas relacionadas aos estresses abióticos são conhecidas, sendo comumente divididas em dois grandes grupos: aquelas que atuam diretamente na tolerância, funcionando como antioxidantes e osmoprotetores; e as que regulam a sinalização intracelular ligada ao controle da expressão gênica, como as quinases e fosfatases (Yang *et al.*, 2010).

As quinases compõem uma das maiores superfamílias de genes e proteínas enzimáticas em eucariotos, sendo altamente conservadas filogeneticamente e participando de variáveis processos celulares que compreendem desde metabolismo, rearranjo do citoesqueleto, controle do ciclo celular e apoptose, entre outros (Hanks & Hunter, 1995; Manning *et al.*, 2002). Podem se apresentar como proteínas citoplasmáticas ou receptores transmembrana e chegam a representar cerca de 4 % de todos os genes de *Arabidopsis thaliana* (Shiu & Bleecker, 2001a; Chevalier & Walker, 2005).

2.4 Função das Proteínas Quinases

A atividade de diversas proteínas em um organismo é regulada por fosforilação e desfosforilação, através de quinases e fosfatases, respectivamente. Por isso, as quinases são consideradas proteínas regulatórias e utilizam a fosforilação proteica no controle das vias de sinalização celular, podendo propagar ou regular um sinal através da adição de um grupo fosfato ao substrato. A fosforilação proteica compreende um dos principais e mais importantes mecanismos de controle do funcionamento celular, em resposta a sinais externos (Bartels & Sunkar, 2005).

A fosforilação realizada por essas enzimas consiste na transferência covalente do γ -fosfato do ATP (Adenosina Trifosfato) para substratos (proteínas-alvo) específicos e que contenham uma hidroxila livre (-OH), usando grupos alcoólicos ou fenólicos como aceptores (Hanks & Hunter, 1995). Elas possuem um domínio de 250 a 300 aminoácidos, responsável pela reação de transferência do fosfato (Lehti-Shiu & Shiu, 2012). Devido à carga negativa do fosfato, a fosforilação resulta em uma mudança funcional do substrato que interfere em sua atividade enzimática, localização celular e/ou associação com outras proteínas. Essas mudanças podem ser revertidas com a remoção do grupo fosfato, realizada por proteínas fosfatases (Kitchen *et al.*, 2008).

Grande parte das quinases eucarióticas fosforilam resíduos de aminoácidos serina/treonina (Ser/Thr) ou tirosina (Tyr), enquanto outras são específicas para a tirosina e há ainda as que fosforilam os três tipos (Hanks, 2003; Hanks & Hunter, 1995). Além desses, em procariotos, os resíduos de histidina (His) ou aspartato (Asp) também são fosforilados (Tyagi *et al.*, 2010).

A atividade de quinase é altamente regulada, sendo ativada ou desativada por fosforilação (algumas vezes pela própria proteína quinase, por *cis*-fosforilação/autofosforilação), por ativadores ou por inibidores proteicos e ligação a pequenas moléculas. Em plantas, numerosos sensores de cálcio e receptores são cruciais mediadores das respostas aos diversos estímulos endógenos e ambientais (Hey *et al.*, 2010; Gao & Xue, 2012).

Devido à sua importância, a utilização de proteínas quinases, através da regulação de genes em plantas transgênicas, torna-se uma estratégia bastante promissora na obtenção de maior tolerância a estresses abióticos (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

2.5 Classificação das Proteínas Quinases

A primeira tentativa de classificação das proteínas desta superfamília, através da análise filogenética manual dos domínios catalíticos de 65 sequências de quinases disponíveis na época, foi realizada por Hanks *et al.* (1988). Atualmente, a classificação padrão para quinases de humanos, de mosca-das-frutas (*Drosophila melanogaster*), de camundongo (*Mus musculus*) e do verme *Caenorhabditis elegans*, é a de Manning *et al.* (2002), tendo sido baseada no importante trabalho de Hanks e Hunter (1995) e revisada por Miranda-Saavedra & Barton (2007) e Cheek *et al.* (2005). Esta classificação encontra-se atualmente disponível na base de dados *The Kinase Database* (KinBase, <http://kinase.com/kinbase/>).

De acordo com Hanks & Hunter (1995), dois grandes grupos de quinases eucarióticas podem ser identificados: convencional (ePK, *eukariotic Protein Kinases*) e atípico (aPK, *atypical Protein Kinases*). As ePK compreendem o maior grupo e foram classificadas com base na similaridade de seus domínios catalíticos e modos de regulação. As aPK são um grupo pequeno de quinases que não possuem similaridade com as ePK.

Desconsiderando as classificações decorrentes dos estudos individuais de algumas famílias ou grupos de quinases vegetais (Harmon *et al.*, 2001; Shiu & Bleecker, 2001a; Hammargren *et al.*, 2007), após o sequenciamento do genoma de *A. thaliana* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), a primeira classificação específica para as quinases vegetais compreendendo diversas famílias foi apresentada por Gribskov *et al.* (2001) na base de dados *Functional Genomics of Plant Phosphorylation* (PlantsP, <http://plantsp.genomics.purdue.edu/>).

Recentemente, Lehti-Shiu e Shiu (2012) realizaram uma nova classificação desta superfamília, acessando a diversidade e história evolutiva desse grupo sob uma ótica funcional. De acordo com esses pesquisadores, as quinases vegetais divergiram das quinases de levedura e animais há, aproximadamente, um bilhão de anos e um dos resultados dessa divergência é a participação de algumas quinases, e até mesmo de famílias inteiras, em processos específicos das plantas.

Outros autores reforçam o fato das quinases vegetais serem bastante divergentes daquelas encontradas em animais e leveduras (Hrabak *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Chevalier & Walker, 2005). Um bom exemplo refere-se à família de proteínas Quinases Similares a Receptores (RLK, *Receptor-Like Kinases*), exclusiva de plantas e ausente em leveduras, sendo sua homônima em animais diferente do ponto de vista funcional (fosforilam resíduos de Ser/Thr em plantas e de Tyr, em animais) e estrutural (Shiu & Bleecker, 2001b; Chevalier & Walker, 2005). Adicionalmente, a família vegetal de Quinases Relacionadas à SNF1 (SnRK, *SNF1-Related Kinases*) é, como o nome indica, relacionada às SNF1 de leveduras. Entretanto, em *Arabidopsis* essas enzimas apresentam uma estrutura primária diferenciada quando comparadas às de levedura (Hrabak *et al.*, 2003).

2.6 Técnicas em Transcriptômica

Os estudos de expressão gênica fornecem informações sobre a função e o controle exercido pelos genes em determinadas fases celulares. Para tanto, um grande número de metodologias tem sido desenvolvido: Hibridização Subtrativa

Supressiva (SSH, *Supression Subtractive Hybridization*; Diatchenko *et al.*, 1996), Microarranjos de DNA (*Microarrays*, Schena *et al.*, 1995), Sequenciamento Massivo de Assinatura Paralela (MPSS, *Massive Parallel Signature Sequencing*; Brenner *et al.*, 2000), Etiqueta de Sequência Expressa (EST, *Expressed Sequence Tag*; Adams *et al.*, 1991), Análise Serial da Expressão Gênica (SAGE, *Serial Analysis of Gene Expression*; Velculescu *et al.*, 1995), Sequenciamento de RNA em Larga Escala (RNA-Seq, *RNA Sequencing*; Nagalakshmi *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), entre outros.

As técnicas baseadas em hibridização molecular (como SSH e microarranjos) utilizam sondas com sequências complementares às sequências das moléculas de interesse. Essas sondas são marcadas e posteriormente identificadas por meio de *scanner* que captura a intensidade do sinal de hibridação (Pinheiro, 2009). As demais, baseadas em sequenciamento, utilizam a frequência observada de fragmentos dos transcritos expressos na amostra. A abundância de fragmentos encontrados para um determinado gene fornece uma estimativa de sua atividade na amostra estudada, possibilitando a descoberta de novos genes (Matsumura *et al.*, 2005; Urano *et al.*, 2010).

Pesquisas sobre genômica funcional em cana-de-açúcar, relacionadas aos principais fatores de estresse como a seca e a salinidade, ainda provêm principalmente da utilização de técnicas como coleções de EST e microarranjos (Menossi *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2009; Lembke *et al.*, 2012). Entretanto, devido à crescente queda dos custos relacionados ao sequenciamento em larga escala de nucleotídeos, a combinação de técnicas de transcriptômica às novas plataformas de sequenciamento tem se mostrado bastante eficaz nas pesquisas

de expressão gênica diferencial em cana-de-açúcar (Rocha *et al.*, 2007; Rodrigues *et al.*, 2009; Kido *et al.*, 2011, 2012; Silva *et al.*, 2011).

2.6.1 SAGE e Variações

A SAGE e suas variações, LongSAGE (Saha *et al.*, 2002) e SuperSAGE (Matsumura *et al.*, 2003), baseiam-se na suposição de que uma curta e definida sequência nucleotídica de um DNA complementar (cDNA), chamada *tag*, contém a informação necessária para identificar esse cDNA e que a contagem do número de vezes em que uma *tag* ocorre representa a abundância do respectivo RNA mensageiro (RNAm) no transcriptoma.

Os três métodos são bastante similares: o RNA total é extraído do tecido-alvo e o cDNA é sintetizado a partir do RNAm. Esse cDNA é então digerido com uma enzima de ancoragem, que cliva a maior parte dos transcritos ao menos uma vez. A extremidade mais próxima da cauda poli-A do transcrito é, então, selecionada e adaptadores que contêm o sítio de reconhecimento de uma '*tagging enzyme*' são ligados. Após digestão com essa última enzima, as *tags* são geradas, concatenadas e clonadas para posterior sequenciamento (Matsumura *et al.*, 2003, 2008). Atualmente, as etapas de concatenamento e clonagem foram eliminadas devido ao alto desempenho das plataformas de sequenciamento de última geração (Bräutigam & Gowik, 2010) (Figura 2).

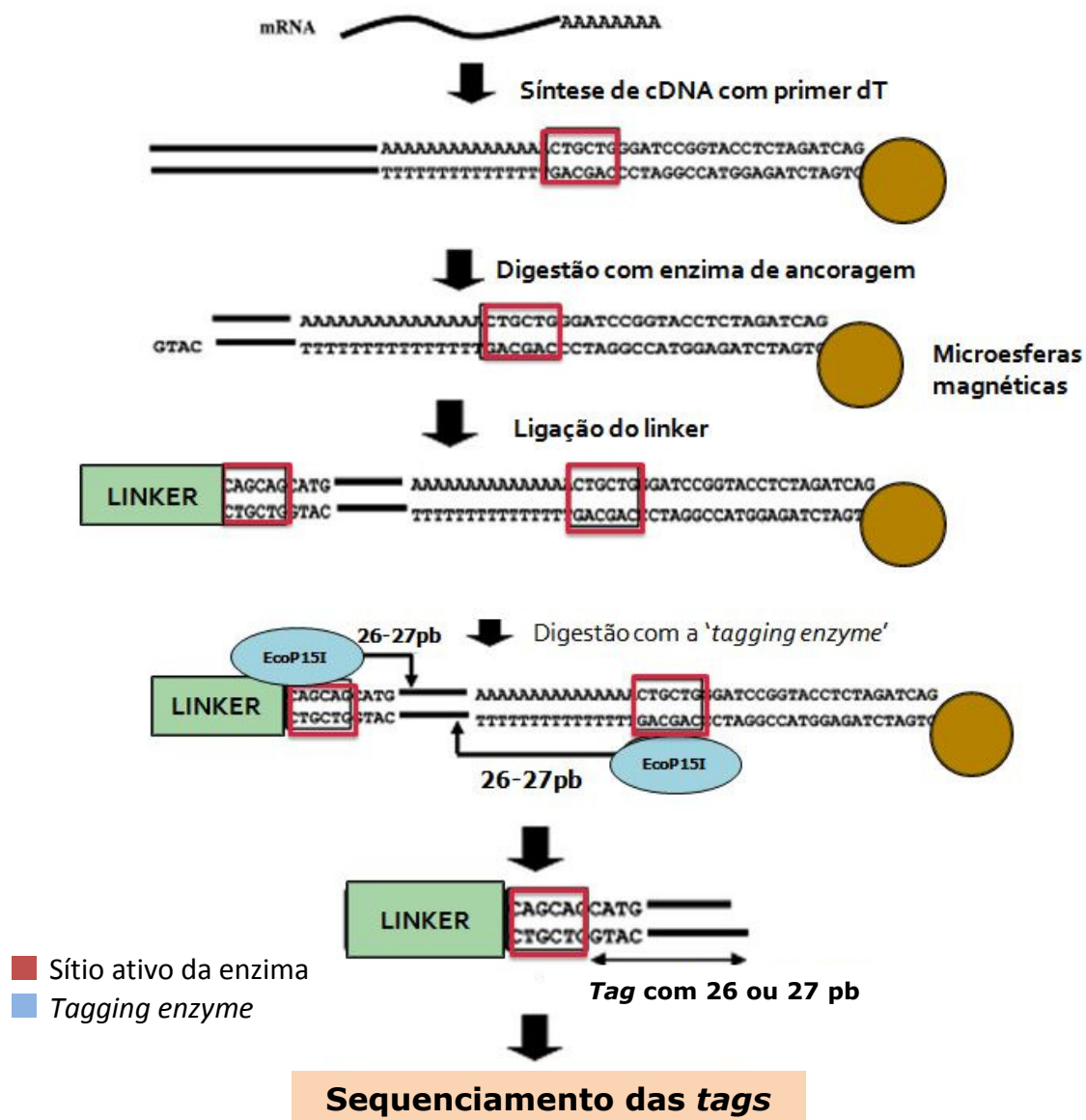


Figura 2: Esquema simplificado das etapas de geração de *tags* através da técnica de HT-SuperSAGE. Extraído e adaptado de Matsumura *et al.* (2008).

O aperfeiçoamento de uma versão da técnica sobre outra, está na modificação da 'tagging enzyme'. Na SAGE é usada a enzima de restrição *BsmFI*, uma endonuclease do Tipo IIS, que reconhece sequências de DNA assimétricas e clivam o DNA fora do sítio de reconhecimento (Pingoud *et al.*, 2005), enquanto que na LongSAGE tal enzima é substituída por outra do Tipo IIS, a *MmeI*. A SuperSAGE, por sua vez, utiliza a *EcoP15I*, uma endonuclease Tipo III (sistema multimérico complexo) com duas subunidades diferentes que reconhecem

sequências de DNA simétricas, orientadas em direções opostas e interrompidas no seu centro de simetria por uma extensão variável (van Aelst *et al.*, 2010).

Tais modificações possibilitaram a geração de *tags* cada vez mais longas (9 -15 pb, SAGE; 18 – 20 pb, LongSAGE; 26 pb, SuperSAGE). Isso porque quando a '*tagging enzyme*' reconhece seu sítio de reconhecimento no adaptador, ela cliva alguns pares de bases à frente, sendo o tamanho da *tag* determinado pela enzima usada (Bräutigam & Gowik, 2010).

Uma técnica SuperSAGE mais eficiente em gerar perfis de transcrição foi designada como HT-SuperSAGE (Matsumura *et al.*, 2010), quando sua metodologia é combinada às plataformas de sequenciamento de alto desempenho [SOLEXA (Illumina[®]) e SOLiD (Applied Biosystems[®])]. Os 26 pb da *tag* SuperSAGE tornam a técnica mais confiável, permitindo que a mesma seja anotada com mais precisão com uso dos bancos de dados públicos. A flexibilidade de uso também se torna uma vantagem, uma vez que a *tag* pode ser utilizada diretamente como *primer* amplificando cDNAs, em experimentos de nocaute gênico através de RNA de interferência (RNAi), em microarranjos e em estudos simultâneos da interação patógeno-hospedeiro durante processos de infecção (Matsumura *et al.*, 2003, 2005).

2.7 Bancos de Dados Biológicos

Um banco de dados é uma coleção organizada de informações em um formato compreensível aos computadores (Lesk, 2008). Bancos de dados biológicos armazenam informações inerentes aos seres vivos, tais como: sequências de DNA, RNA e proteínas; artigos científicos; estruturas

tridimensionais de proteínas e muitas outras informações relacionadas (Kim *et al.*, 2001; Baxevanis, 2011). São classificados em primários e secundários, sendo que tal separação baseia-se na maneira como cada um lida com os dados armazenados. Nos primários, a informação é originalmente agrupada e arquivada. Os dados derivados (recombinados, re-annotados e re-formatados) das bases primárias são armazenados nos bancos secundários (Luscombe *et al.*, 2001).

O GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), o EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/ena/>) e o DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) são os principais bancos de dados primários. Eles representam o conhecimento atual sobre dados biológicos, além de servirem como fontes para vários outros bancos secundários (Lesk, 2008). O UniProtKB/SWISS-Prot (http://web.expasy.org/docs/swiss-prot_guideline.html) e o PIR (*Protein Information Resource*, <http://pir.georgetown.edu/>) são exemplos de bancos secundários, possuindo informações referentes às proteínas, com anotações referentes às funções, estruturas tridimensionais e literatura associada (Lesk, 2008).

Com o aumento do volume de informações geradas, em um espaço de tempo cada vez mais curto, uma distinção precisa entre os dois tipos tornou-se cada vez mais difícil (Lesk, 2008). A avalanche de dados resultou no aparecimento de vários bancos de dados especializados, onde os dados armazenados referem-se a nichos particulares de pesquisa ou organismos específicos (Lesk, 2008; Luscombe *et al.*, 2001).

Os bancos de dados especializados promovem acesso mais rápido e focado às informações de interesse. Em geral, possuem também maior índice de informações curadas e integradas, além de ferramentas e publicações

específicas, quando comparados aos bancos mais generalistas (Martinez, 2011). O PlantsP (*Functional Genomics of Plant Phosphorylation*, <http://plantsp.genomics.purdue.edu/>) e o ProFITS (*Protein Families Involved in the Transduction of Signalling in the Maize Genome*, <http://bioinfo.cau.edu.cn/ProFITS/>) são exemplos de bancos de dados especializados em proteínas quinases vegetais.

O PlantsP combina as informações de sequências genômicas e de experimentos em genômica funcional, focada nas proteínas quinases e fosfatases (Gribskov *et al.*, 2001; Tchieu *et al.*, 2003). A classificação de 1.114 quinases foi baseada na comparação entre sequências via BLAST, estando consistente com trabalhos anteriores, realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, com as famílias CDPK, PEPCK e SNRK (Shiu & Bleecker, 2001a; Shiu & Bleecker, 2001b; Shiu *et al.*, 2004; Lehti-Shiu *et al.*, 2009; Lehti-Shiu & Shiu, 2012). Sua interface simples permite a busca de sequências por palavras-chave, além de alinhamentos contra o banco de dados via BLAST.

O ProFITS compreende informações sobre a identidade e classificação dos genes de proteínas quinases, fosfatases, fatores de transcrição e do sistema ubiquitina-proteassoma, oriundos do sequenciamento do genoma de milho (Ling *et al.*, 2010). Com 1.525 sequências proteicas caracterizadas como prováveis quinases, a metodologia de classificação deste banco de dados foi baseada nas regras utilizadas pelo PlantsP. Usuários podem utilizar a anotação de Ontologia Gênica (GO) nas buscas por palavra-chave.

2.8 Bioinformática

A aplicação de técnicas e recursos computacionais na compreensão, organização e gerenciamento das informações relacionadas a moléculas biológicas tem sido a definição mais usada para o termo bioinformática (Kaminski, 2000; Luscombe *et al.*, 2001).

O rápido acúmulo de dados possibilitado pelas recentes inovações tecnológicas, especialmente no sequenciamento de DNA, obrigou a comunidade científica a mudar consideravelmente a maneira como os dados eram tratados (Luscombe *et al.*, 2001; Lister *et al.*, 2009; Baxevanis, 2011). Durante o processo de solução dos novos problemas trazidos com a mudança de paradigma, as ferramentas de bioinformática mostraram-se fundamentais, especialmente para as pesquisas baseadas nas tecnologias 'ômicas' (Mochida & Shinozaki, 2011). Sem o auxílio dessas, a integração, atualização e compreensão do grande volume de dados gerados seriam impraticáveis, reduzindo drasticamente a eficiência na extração de conhecimento útil em meio a um volume tão grande de informações, que, não obstante, apresenta também altas taxas de redundância (Lister *et al.*, 2009; Shinozaki & Sakakibara, 2009; Mochida & Shinozaki, 2011).

3. Objetivos

3.1 Geral

Comparar, *in silico*, os perfis de transcrição de HT-SuperSAGE envolvendo genes-candidatos codificantes de proteínas quinases diferencialmente expressas em genótipos de cana-de-açúcar, tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico, em condições normais de rega e sob supressão da mesma por 24 h.

3.2 Específicos

1. Identificar genes-candidatos diferencialmente expressos nas principais comparações envolvendo bibliotecas HT-SuperSAGE sob estresse hídrico que representam prováveis proteínas quinases associadas à tolerância ao déficit hídrico;

2. Inferir sobre a diversidade e abundância de transcritos codificantes de proteínas quinases em cana-de-açúcar e sua associação à tolerância ao déficit hídrico;

3. Identificar as vias metabólicas nas quais as prováveis quinases diferencialmente expressas estão inseridas, avaliando a extensão da sinalização celular mediada pelas quinases identificadas.

4. Material e Métodos

O presente trabalho compreende respostas de oito variedades comerciais de cana-de-açúcar (tolerantes: CTC15, CTC6, SP83-2847, SP83-5073; sensíveis: CTC9, CTC13, SP90-3414, SP90-1638) do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC, Piracicaba, Brasil) em decorrência de estresse ocasionado pela supressão de rega (por 24 h), e avaliado através da expressão de *tags* SuperSAGE obtidas por Kido *et al.* (2012).

A seleção das variedades tolerantes e sensíveis foi realizada pelo CTC, a partir das características contrastantes, ao déficit hídrico, apresentadas pelos genótipos. Plantas com três meses de idade foram utilizadas no ensaio de estresse onde parte foi submetida à supressão de rega por 24 h e as demais foram irrigadas normalmente, compondo o grupo controle. RNA total foi extraído a partir das raízes dos dois grupos e quatro bibliotecas, compostas por *bulks* equimolares de RNAm, foram geradas para todos os tratamentos (Kido *et al.*, 2012) (Tabela 1).

Tabela 1: Descrição das bibliotecas HT-SuperSAGE utilizadas e as comparações analisadas.

Bibliotecas
TE - <i>bulk</i> dos quatro genótipos tolerantes sob supressão de rega por 24 h
TC - mesmo <i>bulk</i> tolerante, sem estresse (controle)
SE - <i>bulk</i> dos quatro genótipos sensíveis sob supressão de rega por 24 h
SC - mesmo <i>bulk</i> sensível, sem estresse (controle)
Comparações
TE x TC - <i>bulk</i> tolerante sob estresse vs respectivo controle sem estresse
SE x SC - <i>bulk</i> sensível sob estresse vs respectivo controle sem estresse
TE x SE - <i>bulk</i> tolerante sob estresse vs <i>bulk</i> sensível sob estresse
TC x SC - <i>bulk</i> tolerante controle vs <i>bulk</i> sensível controle

Com a utilização da técnica de HT-SuperSAGE foram extraídas *tags* (26 pb) de todas as bibliotecas. Aquelas sequenciadas somente uma vez foram excluídas das avaliações posteriores. Sob a ótica de quatro comparações entre as bibliotecas (Tabela 1), a aplicação de testes estatísticos (Audic-Claverie; $p \leq 0,05$) revelou o número de *unitags* expressas (induzidas, reprimidas ou não-significativas) para cada situação. Detalhes sobre a obtenção do material vegetal, ensaio de estresse, sequenciamento das bibliotecas e análise estatística das *tags* obtidas, encontram-se em Kido *et al.* (2012).

Portanto, a partir destas bibliotecas as *unitags* relacionadas a prováveis transcritos de quinases foram selecionadas. Para este estudo, ESTs que resultaram em alinhamentos BLASTn válidos (sequência inicial “CATG” preservada, valor de escore do alinhamento entre 42 e 52, orientação *plus/plus* e presença de descrição na EST referente à função/gene) foram utilizadas como *input* para um BLASTx local, contra o banco de dados de proteínas UniProtKB/Swiss-Prot, usando como valor de corte um *e-value* de e^{-10} . Os resultados foram importados para o aplicativo Blast2GO v.2.4.4 (Conesa *et al.*, 2005) para a obtenção dos termos de Ontologia Gênica (*Gene Ontology*) (The Gene Ontology Consortium, 2000).

Procedendo à retirada de redundância, oriunda da utilização de múltiplos bancos de dados, as prováveis quinases foram selecionadas a partir da presença da palavra-chave “kinase” em sua descrição e/ou nos termos GO. As *unitags* foram então classificadas em famílias de quinases vegetais de acordo com a classificações encontradas nas bases de dados PlantsP (Gribskov *et al.*, 2001) e ProFITS (Ling *et al.*, 2010) através da busca por palavras-chave. Na ausência de correspondência com a descrição procurada, ou de definição da família

correspondente, a classificação se deu com base na literatura pertinente (Cheek *et al.*, 2002, 2005; Hammargren *et al.*, 2007; Ogawa *et al.*, 2009; Lehti-Shiu & Shiu, 2012).

Em paralelo, foram recuperados os números de Classificação Enzimática (EC, *Enzyme Classification*) das prováveis quinases identificadas, com base de informação sistemática sobre enzimas da base de dados BRENDA (Scheer *et al.*, 2011). Os números EC das prováveis quinases relacionadas às *unitags* diferencialmente expressas, dentro das comparações escolhidas [TE x TC e SE x SC] foram importados para o programa *online* iPath2.0 (Yamada *et al.*, 2011), onde cada grupo de genótipo teve um mapa metabólico construído, a partir das seguintes customizações: [1] filtro de espécies definido para *Sorghum bicolor* (identificação taxonômica do NCBI: 4558); [2] seleção de todas as vias: ativo e [3] números EC marcados com notações hexadecimais do sistema RGB (*Red, Green and Blue*) referentes às cores vermelha (#FF0000), para representar as *unitags* induzidas; verde (#6B8E23), para as reprimidas; e azul (#23238E), para as *unitags* tanto induzidas como reprimidas. Um resumo das etapas realizadas encontra-se na Figura 3.



Figura 3: Principais etapas da metodologia aplicada.

5. Resultados

Partindo de resultados do sequenciamento de segunda geração obtidos por Kido *et al.* (2012) [8.787.315 *tags* sequenciadas a partir de quatro bibliotecas HT-SuperSAGE (TE – 2.542.552; TC – 1.909.543; SE – 2.170.998; SC – 2.164.222)], foi utilizado o subconjunto de 205.975 *unitags* (não-redundantes) para as análises *in silico* realizadas no presente trabalho.

Através dos resultados brutos de alinhamentos via BLASTn das *unitags* contra sequências expressas (EST) majoritariamente de gramíneas, de diferentes bancos públicos foi observado que 3.107 *unitags* com alinhamentos válidos dentro dos parâmetros pré-estabelecidos, alinharam com 1.216 diferentes ESTs relacionadas a prováveis quinases.

A análise BLASTx das 1.216 ESTs contra o banco de sequências proteicas UniProtKB/Swiss-Prot permitiu a identificação de 650 EST dentro do valor de corte pré-estabelecido (e^{-10}) as quais foram caracterizadas quanto à Ontologia Gênica. Obtidos os termos GO e retiradas as ESTs redundantes para cada *unitag*, 226 ESTs apresentavam a palavra-chave “kinase” em sua descrição e/ou nos termos GO. Essas ESTs foram associadas a um total de 539 *unitags*, as quais foram utilizadas para classificação e construção dos mapas metabólicos.

A distribuição das 539 *unitags* dentro dos quatro contrastes (TE x TC, SE x SC, TE x SE, TC x SC) (Figura 4) mostrou que nenhuma das *unitags* foi exclusiva para algum dos contrastes, quando avaliadas independente da expressão, ou seja, com todas as *unitags* e sem que a análise estatística da probabilidade de significância ($p \leq 0,05$) fosse considerada (Figura 4 A).

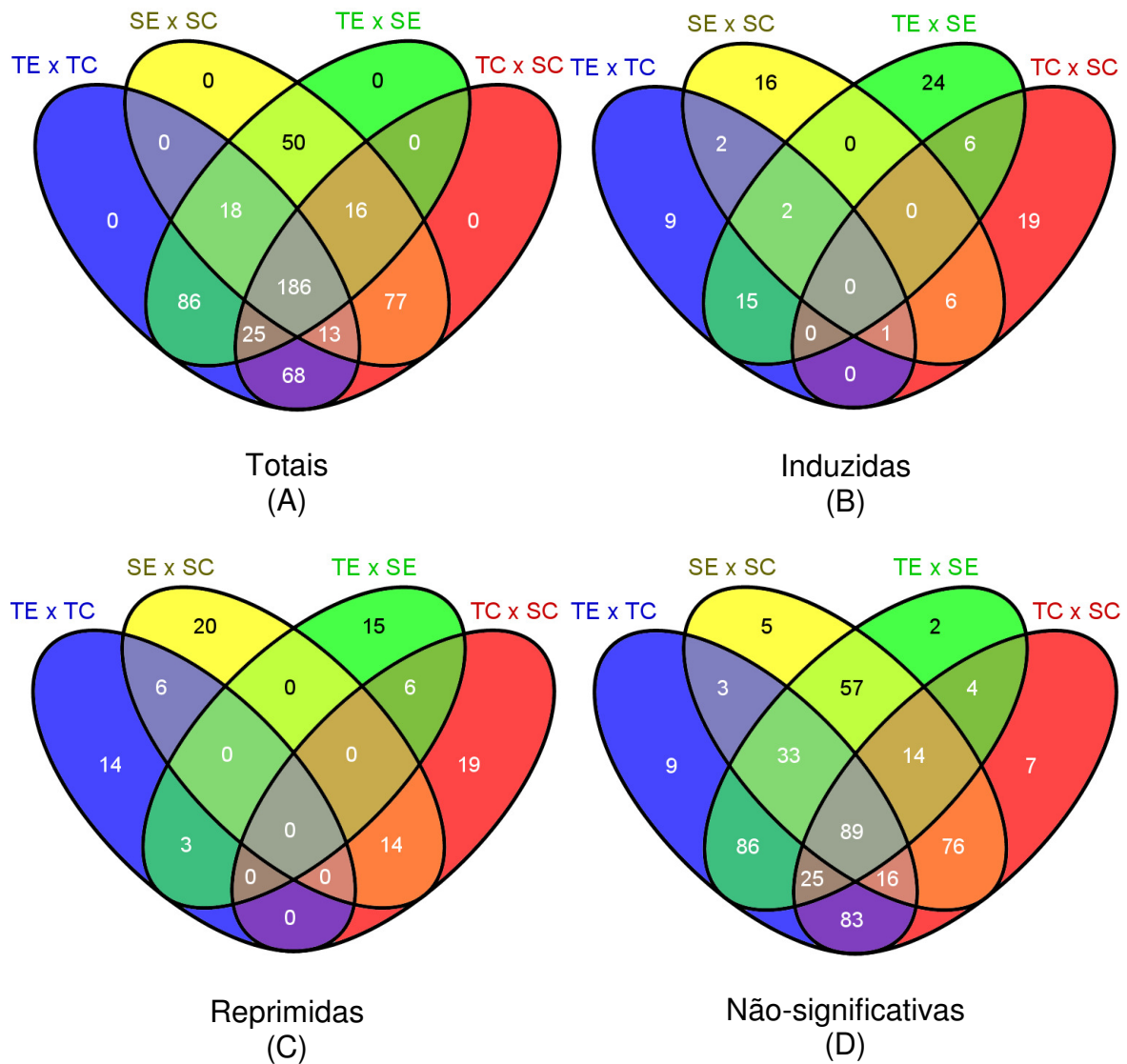


Figura 4: Diagramas de Venn com números de *unitags* [(A) totais; (B) induzidas; (C) reprimidas e (D) não-significativas, ao nível de $p \leq 0,05$] relacionadas às EST de prováveis quinases, considerando comparações entre bibliotecas HT-SuperSAGE (TE x TC; SE x SC; TE x SE; TC x SC). Criado com o Venny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>).

Sob a ótica da análise estatística do valor- p (induzidas, reprimidas e não-significativas), foi possível observar (nas regiões onde não houve interseção de cores) a existência de *unitags* exclusivas em todas as comparações. Os maiores números de *unitags* exclusivas nas comparações foi visto com as *unitags* induzidas e reprimidas (Figura 4 B-C, respectivamente). As não-significativas, ao contrário, foram mais compartilhadas entre os contrastes (Figura 4 D).

Para fins de simplificação na apresentação dos principais resultados, o presente trabalho foi analisado a partir das respostas nas duas comparações principais: TE x TC e SE x SC, por serem as comparações do estresse aplicado nas respostas do mesmo *bulk* de genótipos.

Relacionadas com as 539 *unitags* de prováveis quinases, 41 diferentes famílias de quinases vegetais (Tabela 2) foram identificadas, compreendendo 75 diferentes tipos de proteínas (Tabela 3). Dezoito dessas famílias foram representadas por *unitags* diferencialmente expressas (induzidas ou reprimidas) nos dois contrastes, 14 em ao menos um dos contrastes e apenas nove famílias não apresentaram *unitags* diferencialmente expressas em nenhum destes (Tabela 2).

Tabela 2: Famílias de quinases vegetais identificadas com base nas *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h.

Família Quinase	Expressão no Contraste	
	TE x TC	SE x SC
	I / R / ns	I / R / ns
ADK ³	0 / 0 / 3	0 / 0 / 1
APS ¹	1 / 2 / 4	1 / 0 / 6
Aspartoquinase ¹	1 / 0 / 17	1 / 0 / 11
Atípica ³	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
CCaMK ²	0 / 0 / 3	1 / 0 / 2
CDC2 ²	0 / 0 / 20	2 / 2 / 18
CDPK ¹	4 / 4 / 44	5 / 6 / 34
CIPK ²	1 / 0 / 10	0 / 0 / 9
CK1 ²	0 / 0 / 11	0 / 1 / 7
CK2 ¹	1 / 2 / 14	2 / 1 / 15
CTR1/EDR1 ²	1 / 0 / 1	0 / 0 / 1
DGK ²	0 / 1 / 4	0 / 0 / 4
DhaK ²	0 / 0 / 4	0 / 1 / 1
FGGY ³	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
GHMP ¹	0 / 1 / 4	0 / 1 / 2
GSK3/Shaggy ¹	2 / 1 / 10	1 / 2 / 13
HK ²	1 / 0 / 4	0 / 0 / 2
LAMMER ²	0 / 0 / 4	0 / 1 / 2
MAP2K ¹	0 / 1 / 0	1 / 0 / 0
MAP3K ¹	1 / 0 / 1	1 / 0 / 1
MAPK ³	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
MTRK ³	0 / 0 / 2	0 / 0 / 2
NADK2 ¹	1 / 0 / 1	0 / 2 / 1
NDPK ¹	1 / 2 / 22	0 / 3 / 17
Outras* ²	0 / 0 / 15	0 / 2 / 14
PanK_long ²	0 / 0 / 2	1 / 0 / 0
PDK/BCKDK ²	0 / 1 / 4	0 / 0 / 3
PEPCK ¹	1 / 0 / 3	1 / 0 / 3
pfkB/RK ¹	4 / 0 / 22	1 / 2 / 20
PGK ¹	1 / 0 / 19	3 / 4 / 15
PIP ¹	3 / 0 / 5	2 / 1 / 5
PK ¹	3 / 0 / 27	1 / 3 / 28
Piruvato quinase ¹	0 / 4 / 14	1 / 4 / 16
RLK ²	0 / 0 / 8	0 / 1 / 12
RSK ¹	0 / 2 / 5	0 / 1 / 2
SK ³	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
SnRK ¹	2 / 2 / 28	1 / 2 / 19
SPHK ³	0 / 0 / 1	0 / 0 / 2
STE20 ³	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0
TK ²	0 / 0 / 1	1 / 0 / 0
TLK ³	0 / 0 / 3	0 / 0 / 1
Total	29 / 23 / 344	27 / 40 / 293

I – induzidas / R – reprimidas / ns - não-significativas ($p \leq 0,05$).

* Quinases que não possuem classificação descrita.

¹ *Unitags* diferencialmente expressas (induzidas ou reprimidas) nos dois contrastes.

² Em ao menos um dos contrastes.

³ Em nenhum dos contrastes.

Considerando a Classificação Enzimática (EC) correspondente a cada um dos 75 tipos de prováveis quinases, de acordo com a base de dados BRENDA, apenas 13 tipos não apresentaram um número EC associado, ao passo que 44 números EC distintos foram encontrados (Tabela 3).

Tabela 3: Prováveis quinases observadas nas comparações TE x TC e SE x SC, oriundas das bibliotecas HT-SuperSAGE de cana-de-açúcar sob déficit hídrico (24 h).

Descrição das prováveis proteínas quinases encontradas	Família correspondente	Número EC	Expressão no contraste	
			TE x TC	SE x SC
			I / R / ns	I / R / ns
<i>3-phosphoinositide dependent protein kinase</i>	PIP	EC 2.7.11.1	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0
<i>4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol kinase</i>	GHMP	EC 2.7.1.148	0 / 0 / 2	0 / 0 / 1
<i>6-phosphofructo-2-kinase</i>	pfkB/RK	EC 2.7.1.105	1 / 0 / 1	0 / 0 / 2
<i>Adenosine kinase</i>	pfkB/RK	EC 2.7.1.20	2 / 0 / 9	1 / 1 / 3
<i>Adenylate kinase A</i>	ADK	EC 2.7.4.3	0 / 0 / 3	0 / 0 / 1
<i>Adenylyl-sulfate kinase</i>	APS	EC 2.7.1.25	1 / 2 / 4	0 / 0 / 6
<i>Alpha-glucan water dikinase 1</i>	Outras	EC 2.7.9.4	0 / 0 / 1	1 / 0 / 0
<i>Aspartokinase</i>	Aspartoquinase	EC 2.7.2.4	1 / 0 / 17	1 / 0 / 11
<i>Barren inflorescence protein kinase 2</i>	Outras	-	0 / 0 / 1	0 / 1 / 0
<i>Calcium/calmodulin-dependent protein kinase</i>	CCaMK	EC 2.7.11.17	0 / 0 / 3	1 / 0 / 2
<i>Calcium-dependent calmodulin-independent protein kinase</i>	CDPK	EC 2.7.11.1	2 / 1 / 4	1 / 2 / 4
<i>Calcium-dependent protein kinase</i>	CDPK	EC 2.7.11.1	2 / 1 / 39	4 / 4 / 27
<i>Carbohydrate kinase-like</i>	FGGY	-	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0
<i>Casein kinase I</i>	CK1	EC 2.7.11.1	0 / 0 / 11	0 / 1 / 7
<i>Casein kinase II</i>	CK2	EC 2.7.11.1	1 / 2 / 14	2 / 1 / 15
<i>CBL-interacting protein kinase</i>	CIPK	EC 2.7.11.1	1 / 0 / 10	0 / 0 / 9
<i>CDK-activating kinase</i>	CDPK	EC 2.7.11.22	0 / 2 / 1	0 / 0 / 3
<i>Cell-division-cycle-2 kinase</i>	CDC2	EC 2.7.11.1	0 / 0 / 6	0 / 0 / 7
<i>Choline kinase</i>	Outras	EC 2.7.1.32	0 / 0 / 3	0 / 0 / 3
<i>CTR1-like protein kinase</i>	CTR1/EDR1	EC 2.7.11.1	1 / 0 / 1	0 / 0 / 1
<i>Cyclin G-associated kinase-like</i>	CDC2	EC 2.7.11.1	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0
<i>Cyclin-dependent kinase</i>	CDC2	EC 2.7.11.22	0 / 0 / 13	2 / 2 / 11
<i>DCK/dGK-like deoxyribonucleoside kinase</i>	Outras	-	0 / 0 / 2	0 / 1 / 2

<i>Diacylglycerol kinase</i>	DGK	EC 2.7.1.107	0 / 1 / 4	0 / 0 / 4
<i>Dihydroxyacetone kinase-like</i>	DhaK	EC 2.7.1.29	0 / 0 / 4	0 / 1 / 1
<i>FERONIA receptor-like kinase</i>	RLK	EC 2.7.11.1	0 / 1 / 1	0 / 0 / 3
<i>Fructokinase</i>	pfkB/RK	EC 2.7.1.4	0 / 0 / 2	0 / 0 / 3
<i>FYVE finger-containing phosphoinositide kinase-like</i>	PIP	-	1 / 0 / 1	1 / 0 / 2
<i>Galactokinase</i>	GHMP	EC 2.7.1.6	0 / 1 / 1	0 / 1 / 0
<i>GCK-like kinase</i>	STE20	-	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0
<i>GHMP kinase-like</i>	GHMP	-	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
<i>Glycerol kinase-like</i>	FGGY	EC 2.7.1.30	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
<i>Glycogen synthase kinase</i>	GSK3/Shaggy	EC 2.4.1.11	0 / 0 / 0	0 / 0 / 2
<i>GSK-like kinase</i>	GSK3/Shaggy	-	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
<i>Histidine kinase</i>	HK	EC 2.7.13.3	0 / 0 / 4	0 / 0 / 2
<i>Inositol 1,3,4,5,6-pentakisphosphate 2-kinase</i>	PIP	EC 2.7.1.158	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
<i>Inositol phosphate kinase</i>	PIP	EC 2.7.1.158	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
<i>Inositol-polyphosphate multikinase</i>	PIP	EC 2.7.1.151	1 / 0 / 0	0 / 0 / 1
<i>Lammer-type protein kinase</i>	LAMMER	-	1 / 0 / 4	0 / 0 / 2
<i>LysM receptor-like kinase</i>	RLK	-	0 / 0 / 4	0 / 1 / 5
<i>MAPK1</i>	MAPK	EC 2.7.11.24	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
<i>MAPK2</i>	MAP2K	EC 2.7.11.24	0 / 1 / 0	1 / 0 / 0
<i>MAPK3</i>	MAP3K	EC 2.7.11.24	1 / 0 / 1	1 / 0 / 1
<i>Methylthioribose kinase</i>	MTRK	EC 2.7.1.100	0 / 0 / 2	0 / 0 / 2
<i>NAD⁺ kinase 2</i>	NADK2	EC 2.7.1.23	1 / 0 / 1	0 / 2 / 1
<i>Nucleoside diphosphate kinase 1</i>	NDPK	EC 2.7.4.6	1 / 2 / 22	0 / 3 / 17
<i>Pantothenate kinase</i>	PanK_long	EC 2.7.1.33	0 / 0 / 2	1 / 0 / 0
<i>Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 2</i>	PIP	EC 2.7.1.68	1 / 0 / 1	1 / 0 / 0
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase</i>	PEPCK	EC 4.1.1.49	1 / 0 / 3	1 / 0 / 3
<i>Phosphoglycerate kinase</i>	PGK	EC 2.7.2.3	1 / 0 / 19	3 / 4 / 15
<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>	PIP	EC 2.7.1.137	0 / 0 / 1	0 / 1 / 0
<i>Phosphomethylpyrimidine kinase</i>	pfkB/RK	EC 2.7.4.7	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
<i>Phosphopantetheine adenylyl transferase dephospho CoA kinase-like protein</i>	Outras	EC 2.7.7.3	0 / 0 / 1	0 / 0 / 2
<i>Phytol kinase 3</i>	Outras	-	0 / 0 / 2	0 / 0 / 2
<i>Protein kinase</i>	PK	-	3 / 0 / 27	1 / 3 / 28

<i>Protein kinase AKINbetagamma</i>	SnRK	-	1 / 0 / 1	0 / 0 / 2
<i>Pyridoxal kinase</i>	Outras	EC 2.7.1.35	0 / 0 / 4	0 / 0 / 5
<i>Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase</i>	pfkB/RK	EC 2.7.1.90	1 / 0 / 4	0 / 0 / 9
<i>Pyruvate dehydrogenase kinase</i>	PDK/BCKDK	EC 2.7.11.2	0 / 1 / 4	0 / 0 / 3
<i>Pyruvate kinase</i>	Piruvato quinase	EC 2.7.1.40	0 / 4 / 14	1 / 4 / 16
<i>Pyruvate orthophosphate dikinase</i>	SnRK	EC 2.7.9.1	0 / 0 / 9	1 / 0 / 6
<i>Pyruvate phosphate dikinase</i>	SnRK	EC 2.7.9.1	0 / 0 / 0	0 / 0 / 1
<i>Receptor-like kinase</i>	RLK	-	0 / 0 / 3	0 / 0 / 5
<i>Ribokinase-like</i>	pfkB/RK	EC 2.7.1.15	0 / 0 / 3	0 / 1 / 0
<i>Ribose-phosphate pyrophosphokinase 3</i>	pfkB/RK	EC 2.7.6.1	0 / 0 / 2	0 / 0 / 1
<i>Ribosomal protein S6 kinase</i>	RSK	EC 2.7.11.1	0 / 1 / 5	0 / 1 / 2
<i>RIO kinase</i>	Atípica	EC 2.7.11.1	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
<i>Salt-inducible protein kinase</i>	SnRK	EC 2.7.11.1	0 / 1 / 8	0 / 0 / 2
<i>Shaggy-like kinase</i>	GSK3/Shaggy	EC 2.7.11.26	2 / 1 / 10	1 / 2 / 10
<i>Shikimate kinase</i>	SK	EC 2.7.1.71	0 / 0 / 1	0 / 0 / 1
<i>SNF1-related protein kinase</i>	SnRK	EC 2.7.11.1	1 / 1 / 10	0 / 2 / 8
<i>Sphingoid long-chain bases kinase</i>	SPHK	EC 2.7.1.91	0 / 0 / 1	0 / 0 / 2
<i>Thiamin pyrophosphokinase</i>	Outras	EC 2.7.6.2	0 / 0 / 1	0 / 0 / 0
<i>Thymidine kinase</i>	TK	EC 2.7.1.21	0 / 0 / 1	1 / 0 / 0
<i>Tousled-like kinase</i>	TLK	EC 2.7.10.2	0 / 0 / 3	0 / 0 / 1

I – induzidas / R – reprimidas / ns - não-significativas ($p \leq 0,05$).

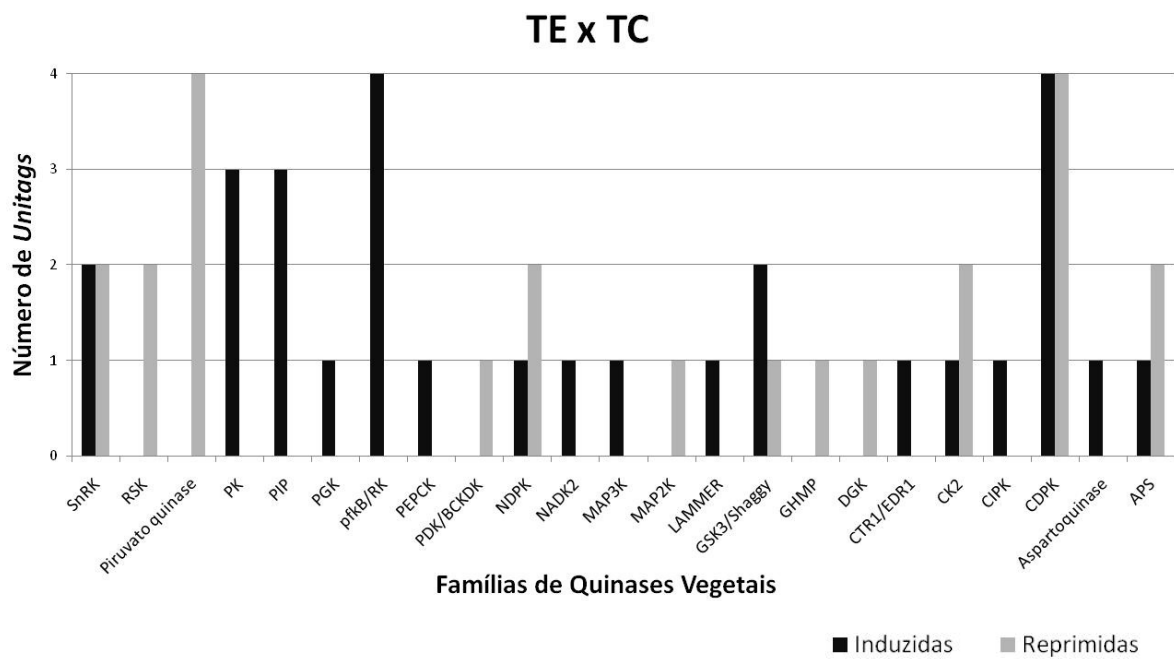
Dos 44 distintos números EC, 17 formados apenas por *unitags* não-significativas (ao nível de $p \leq 0,05$) nas duas comparações em estudo não foram utilizados no mapeamento de vias metabólicas pelo programa iPath2.0, ao passo que oito foram excluídas automaticamente pelo programa (Tabela 4).

Tabela 4: Números de Classificação Enzimática (EC) excluídos das comparações TE x TC e SE x SC, oriundas das bibliotecas HT-SuperSAGE de cana-de-açúcar sob déficit hídrico (24 h), por não existirem nos mapas do KEGG *Pathway*.

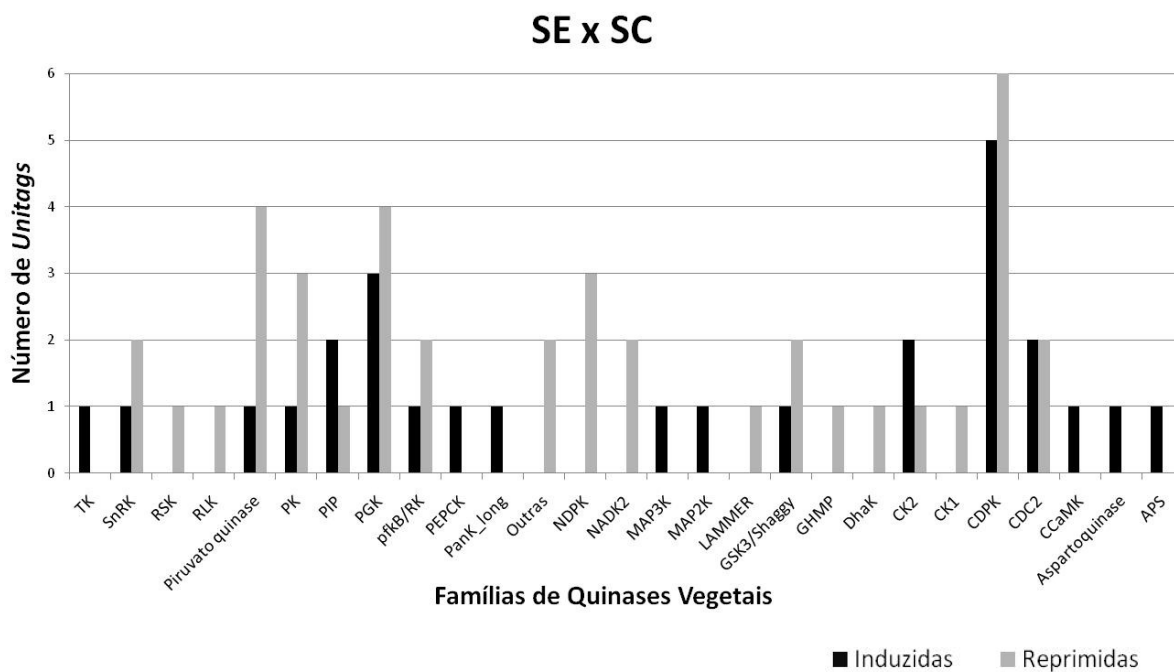
Número EC	Famílias	Total de <i>unitags</i>
2.7.11.1*	PIP, CDPK, CK1, CK2, CIPK, CDC2, CTR1/EDR1, RLK, RSK, Atypical, SnRK	33
2.7.11.22*	CDPK, CDC2	4
2.7.11.24	MAPK, MAP2K, MAP3K	4
2.7.11.26	GSK3/Shaggy	6
2.7.11.2	PDK/BCKDK	1
2.7.11.17	CCaMK	1
2.7.1.6	GHMP	1
2.7.9.4	Outras	1

* Estão presentes em mapas que não são de organismos vegetais.

Na análise das *unitags* diferencialmente expressas nas duas comparações observou-se que em TE x TC, 52 *unitags* (29 induzidas + 23 reprimidas, Tabela 2) representaram 23 distintas famílias de quinases vegetais (Figura 5 A), enquanto que em SE x SC foram 67 *unitags* (27 induzidas + 40 reprimidas, Tabela 2) representando 27 famílias (Figura 5 B).



(A)



(B)

Figura 5: Famílias de quinases e respectivos totais de *unitags* SuperSAGE de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h), induzidas ou reprimidas ($p \leq 0,05$) nas comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC.

Comuns às duas comparações, *unitags* diferencialmente expressas representantes de 12 famílias (APS, Aspartoquinase, CDPK, CK2, GSK3/Shaggy, MAP3K, PEPCK, pfkB/RK, PGK, PIP, PK e SnRK) foram induzidas (Figura 6 A); e de oito famílias (CDPK, CK2, GHMP, GSK3/Shaggy, NDPK, Piruvato quinase, RSK e SnRK) foram reprimidas (Figura 6 B).

As *unitags* induzidas somente na comparação TE x TC, por sua vez, representaram cinco famílias: CIPK, CTR1/EDR1, LAMMER, NADK2 e NDPK, enquanto para SE x SC, foram seis famílias: CCaMK, CDC2, MAP2K, PanK_long, Piruvato quinase e TK (Figura 6 A).

Com relação às *unitags* reprimidas, quatro famílias (APS, DGK, MAP2K e PDK/BCKDK), tiveram esse comportamento apenas em TE x TC; e onze (CDC2, CK1, DhaK, LAMMER, NADK2, Outras, pfkB/RK, PGK, PIP, PK e RLK), apenas em SE x SC (Figura 6 B).

Somente uma das 41 famílias não foi representada por *unitags* não-significativas em nenhum dos dois contrastes: MAP2K. Por sua vez, as famílias PanK_long, STE20 e TK possuíram *unitags* não-significativas apenas em TE x TC; enquanto a família MAPK, apenas em SE x SC (Figura 6 C).

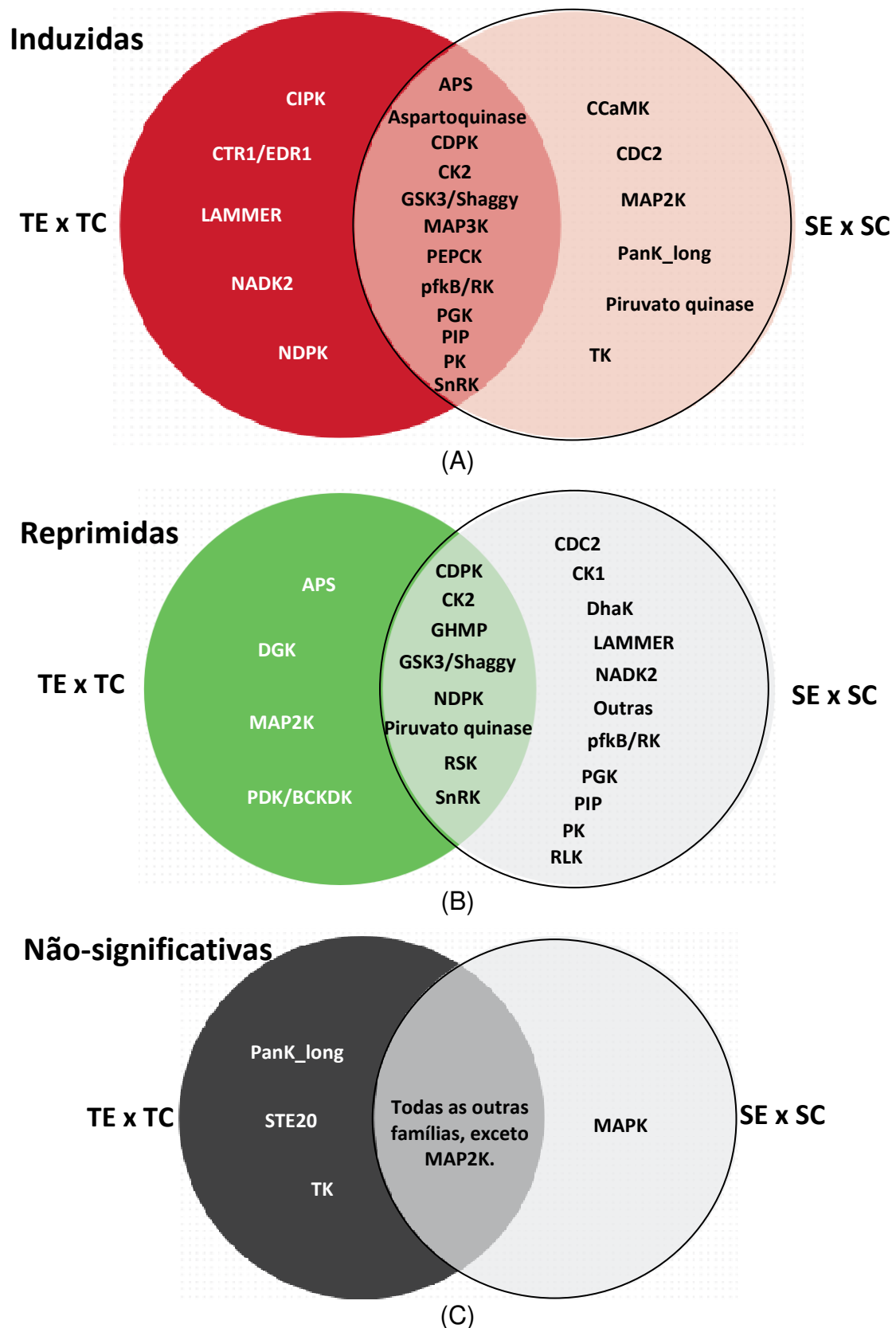


Figura 6: Diagramas de Venn com famílias de quinases das *unitags* (A) induzidas, (B) reprimidas e (C) não-significativas ($p \leq 0,05$) de comparações entre bibliotecas HT-SuperSAGE de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h (TE x TC e SE x SC).

A análise com base nos os números EC das *unitags* diferencialmente expressas (induzidas ou reprimidas, $p \leq 0,05$), resultaram em oito classes de hierarquia funcional do KEGG BRITE, cujo número de representantes está ilustrado na Figura 7.

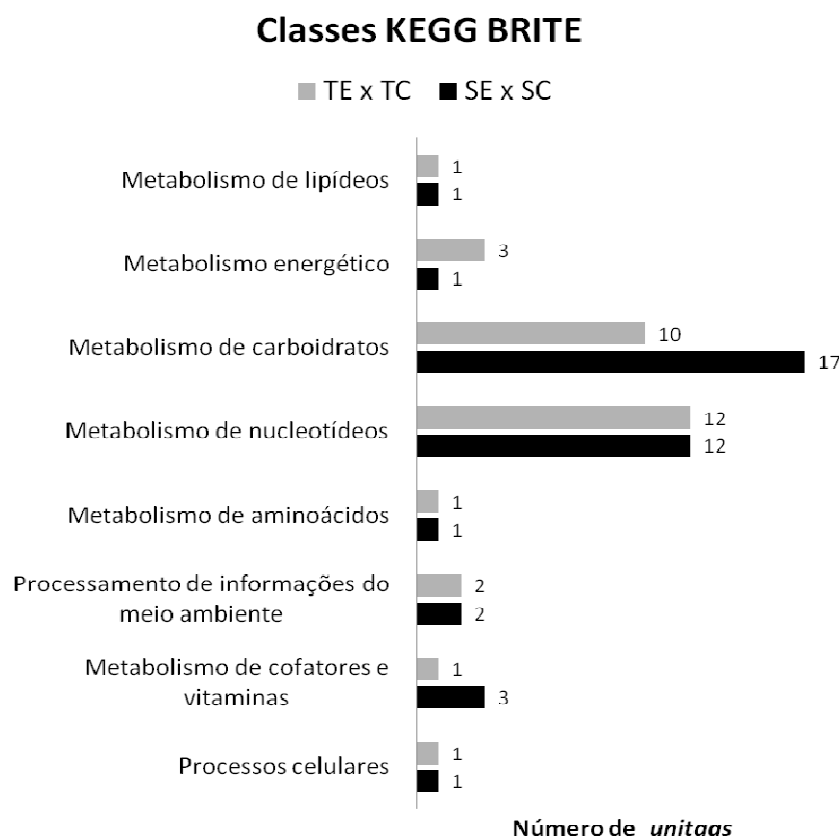


Figura 7: *Unitags* diferencialmente expressas ($p \leq 0,05$) das comparações entre bibliotecas HT-SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h (TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse; SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse), nas oito classes de hierarquia funcional do KEGG BRITE.

Os mapas metabólicos (baseados *Sorghum bicolor*) de cada comparação tiveram a seleção de todas as vias ativada (Figuras 8 e 9). Dessa maneira, todo o percurso (linhas) das vias que contêm um determinado número EC foi marcado, e não apenas o ponto onde o composto correspondente ao número EC atua. Além disso, diferentes cores de linhas foram utilizadas nos mapas a fim de que três condições fossem destacadas: (1) vermelha, representando números EC compostos apenas por *unitags* induzidas; (2) verde, representando números EC

compostos por *unitags* reprimidas; e (3) azul, representando *unitags* induzidas e reprimidas em um mesmo número EC.

O mapa metabólico de TE x TC aparentemente apresentou um menor número de vias induzidas (Figura 8, linhas em vermelho), quando comparado ao de SE x SC (Figura 9). Porém, ao se considerar a presença de *unitags* induzidas em números EC que apresentaram também *unitags* reprimidas (linhas azuis), um maior número de vias induzidas em TE x TC ficou evidenciado. Ao se analisar a regulação associada aos números EC efetivamente utilizados nesses mapas (Tabela 5), um maior número de vias induzidas se confirmou para a comparação TE x TC.

Tabela 5: Expressão diferencial e famílias das *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h), associadas aos números de Classificação Enzimática (EC) utilizados nos mapas metabólicos das comparações TE x TC e SE x SC.

Número EC	Regulação das <i>unitags</i>	Famílias	Número EC	Regulação das <i>unitags</i>	Famílias
TE x TC			SE x SC		
2.7.1.40	R	Piruvato Quinase	2.7.1.40	I + R	Piruvato Quinase
2.7.2.3	I	PGK	2.7.2.3	I + R	PGK
4.1.1.49	I	PEPCK	4.1.1.49	I	PEPCK
2.7.1.25	I + R	APS	2.7.1.25	I	APS
2.7.1.68	I	PIP	2.7.1.68	I	PIP
2.7.1.20	I	pfbB/RK	2.7.1.20	I + R	pfbB/RK
2.7.4.6	I + R	NDPK	2.7.4.6	R	NDPK
2.7.2.4	I	Aspartoquinase	2.7.2.4	I	Aspartoquinase
2.7.1.23	I	NADK2	2.7.1.23	R	NADK2
2.7.1.107	R	DGK	2.7.1.21	I	TK
2.7.1.105	I	pfbB/RK	2.7.1.33	I	PanK_long
2.7.1.90	I	pfbB/RK	2.7.1.29	R	DhaK
2.7.1.151	I	PIP	2.7.9.1	I	SnRK
			2.7.1.15	R	pfbB/RK
			2.7.1.137	R	PIP

I – induzida / R – reprimida ($p \leq 0,05$).

Expressão diferencial entre os contrastes foram observadas em várias seções dos mapas, portanto, as principais vias metabólicas foram agrupadas de

acordo com a classe correspondente no KEGG BRITE: aquelas pertencentes ao metabolismo de lipídeos (Figura 10 e Tabela 6); metabolismo energético (Figura 11 e Tabela 7); metabolismo de carboidratos (Figura 12 e Tabela 8); metabolismo de nucleotídeos (Figura 13 e Tabela 9); metabolismo de aminoácidos (Figura 14 e Tabela 10); processamento de informações do meio ambiente (Figura 15 e Tabela 11); metabolismo de cofatores e vitaminas (Figura 16 e Tabela 12) e processos celulares (Figura 17 e Tabela 13).

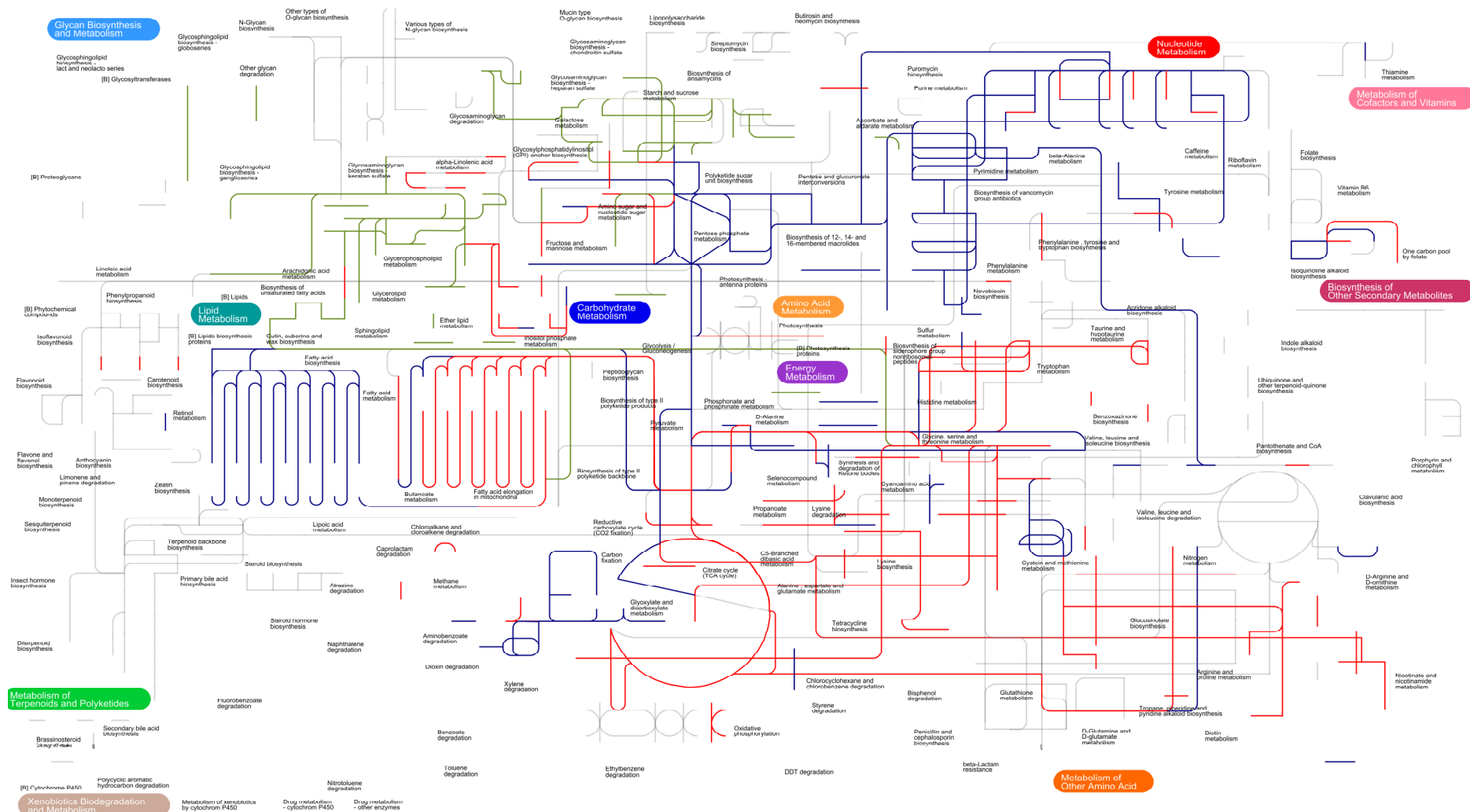


Figura 8: Mapa metabólico da comparação TE x TC com todas as vias observadas. Gerado com números de Classificação Enzimática (EC) atribuídos às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, das prováveis quinases. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*. Baseado nas informações do KEGG Pathway (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>).

Metabolismo de lipídeos

Nesta classe, duas vias foram observadas, envolvendo: glicerofosfolipídeos (KEGG 00564) e glicerolipídeos (KEGG 00561). O esperado para estas seções dos mapas eram somente linhas verdes (Figura 10 A-B), uma vez que ambas as comparações foram representadas por números EC de *unitags* reprimidas. Entretanto, trechos em vermelho foram observados, em decorrência de dois fatores: ativação de todas as vias e sobreposição das mesmas. O primeiro foi responsável por atribuir uma cor, todas as linhas que representem a via na qual o número EC está inserido, e o segundo, consequência da redundância natural de proteínas sinalizadoras em diversas vias.

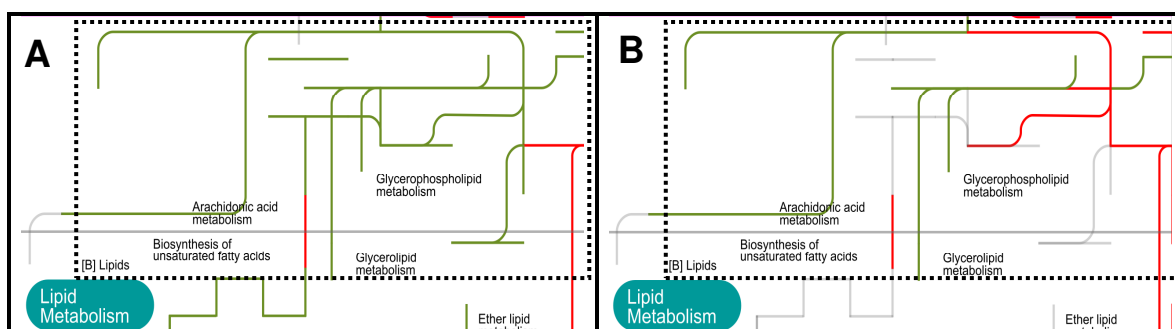


Figura 10: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, nas vias do metabolismo de lipídeos, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, as vias de glicerofosfolipídeos [KEGG 00564] e glicerolipídeos [KEGG 00561]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Dois números EC foram observados nas vias lipídicas, um em cada comparação (Tabela 6). A família Diacilglicerol Quinase (DGK) teve uma *unitag* reprimida em TE x TC e nenhuma diferencialmente expressa em SE x SC (Tabela 2). Em ambos os casos, a comparação envolvendo genótipos tolerantes apresentou o maior número de *unitags* (incluindo as não-significativas).

Tabela 6: Números de Classificação Enzimática (EC) observados nas vias do metabolismo de lipídeos e sua(s) *unitag(s)* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.107					
	CTC_SD170836	R	-3,28	DGK	Glicerofosfolipídeos (00564)
	CTC_SD170836	R	-3,28	DGK	Glicerolipídeos (00561)
SE x SC					
2.7.1.29					
	CTC_SD161303	R	-3,19	DhaK	Glicerolipídeos (00561)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

R - reprimida ($p \leq 0,05$).

Metabolismo energético

As vias de enxofre (KEGG 00920) e fixação de carbono em organismos fotossintéticos (KEGG 00710) foram observadas nesta classe hierárquica. Visto que a segunda via ocorre somente nos cloroplastos, e o tecido radicular foi o utilizado nas bibliotecas, essa via não foi abordada, mas as *unitags* nela observadas foram também encontradas em outras vias, onde foram discutidas.

Na via do metabolismo de enxofre, na comparação TE x TC (Figura 11 A), foi observado indução e repressão em um mesmo número EC (linhas azuis) e somente indução (vermelhas). Em SE x SC, predominaram as linhas vermelhas (Figura 11 B).

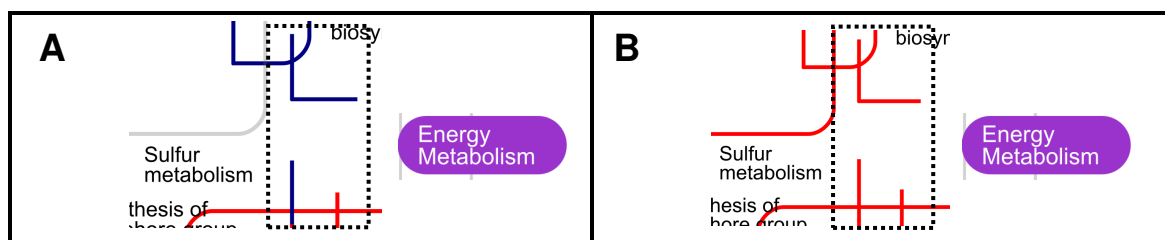


Figura 11: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, no metabolismo energético, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, a via do metabolismo de enxofre [KEGG 00920]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Apenas a família APS foi observada no metabolismo de enxofre (EC 2.7.1.25; Tabela 7), e as duas comparações entre bibliotecas tiveram o mesmo total de *unitags* (Tabela 2), diferindo apenas nas *unitags* reprimidas apresentadas por TE x TC.

Tabela 7: Números de Classificação Enzimática (EC) observados nas vias do metabolismo energético e sua(s) *unitag*(s) SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.25					
	CTC_SD133916	I	3,58	APS	Enxofre (00920)
	CTC_SD65053	R	-2,75	APS	Enxofre (00920)
	CTC_SD65046	R	-2,81	APS	Enxofre (00920)
SE x SC					
2.7.1.25					
	CTC_SD92950	I	2,01	APS	Enxofre (00920)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida / R - reprimida ($p \leq 0,05$).

Metabolismo de carboidratos

Seis vias foram observadas nesta classe: frutose e manose (KEGG 00051), pentoses-fosfato (KEGG 00030), inositol fosfato (KEGG 00562), glicólise/gliconeogênese (KEGG 00010), piruvato (KEGG 00620) e ciclo do ácido cítrico (KEGG 00020) (Figura 12). As vias do metabolismo de carboidratos foram as que apresentaram maior sobreposição e influência de outras vias, causando divergências entre os resultados vistos com as *unitags* e os mapas.

No geral, foi observado um balanço entre linhas azuis e vermelhas em TE x TC (Figura 12 A), e entre verdes e vermelhas em SE x SC (Figura 12 B), evidenciando uma melhor eficiência para o metabolismo de carboidratos pelos genótipos tolerantes.

Analisando as vias separadamente, verificaram-se para frutose e manose linhas das três cores nas duas comparações (Figura 12 A-B, área 1). Entretanto, a via foi induzida em TE x TC e não foram observadas *unitags* para esta via em SE x SC (Tabela 8).

A via das pentoses-fosfato (Figura 12 A-B, área 2) teve resultado inverso ao observado na via anterior; não apresentou *unitags* em TE x TC e foi reprimida em SE x SC (Tabela 8).

Em inositol fosfato (Figura 12 A-B, área 3), as áreas do mapa foram semelhantes para as duas comparações, exibindo maior número de linhas vermelhas. Das *unitags*, houve indução em TE x TC e ambas regulações, indução e repressão, em SE x SC (Tabela 8).

As vias de glicólise/gliconeogênese e piruvato, mostraram um equilíbrio entre linhas azuis e vermelhas em TE x TC (Figura 12 A, área 4), e entre verdes e vermelhas em SE x SC (Figura 12 B, área 4), exibindo maior eficiência pelos genótipos tolerantes. O que se observou nos mapas não ficou distante do que foi encontrado com as *unitags*: em TE x TC, essas vias tiveram *unitags* induzidas e reprimidas; e SE x SC, muito mais *unitags* reprimidas (Tabela 8).

No ciclo do ácido cítrico, a grande porção em vermelho (Figura 12 A-B, área 5) mostrou a indução observada nas *unitags* das duas comparações (Tabela 8). Assim, para SE x SC algumas partes apresentaram-se reprimidas (linhas verdes) enquanto que para TE x TC, essas foram azuis.

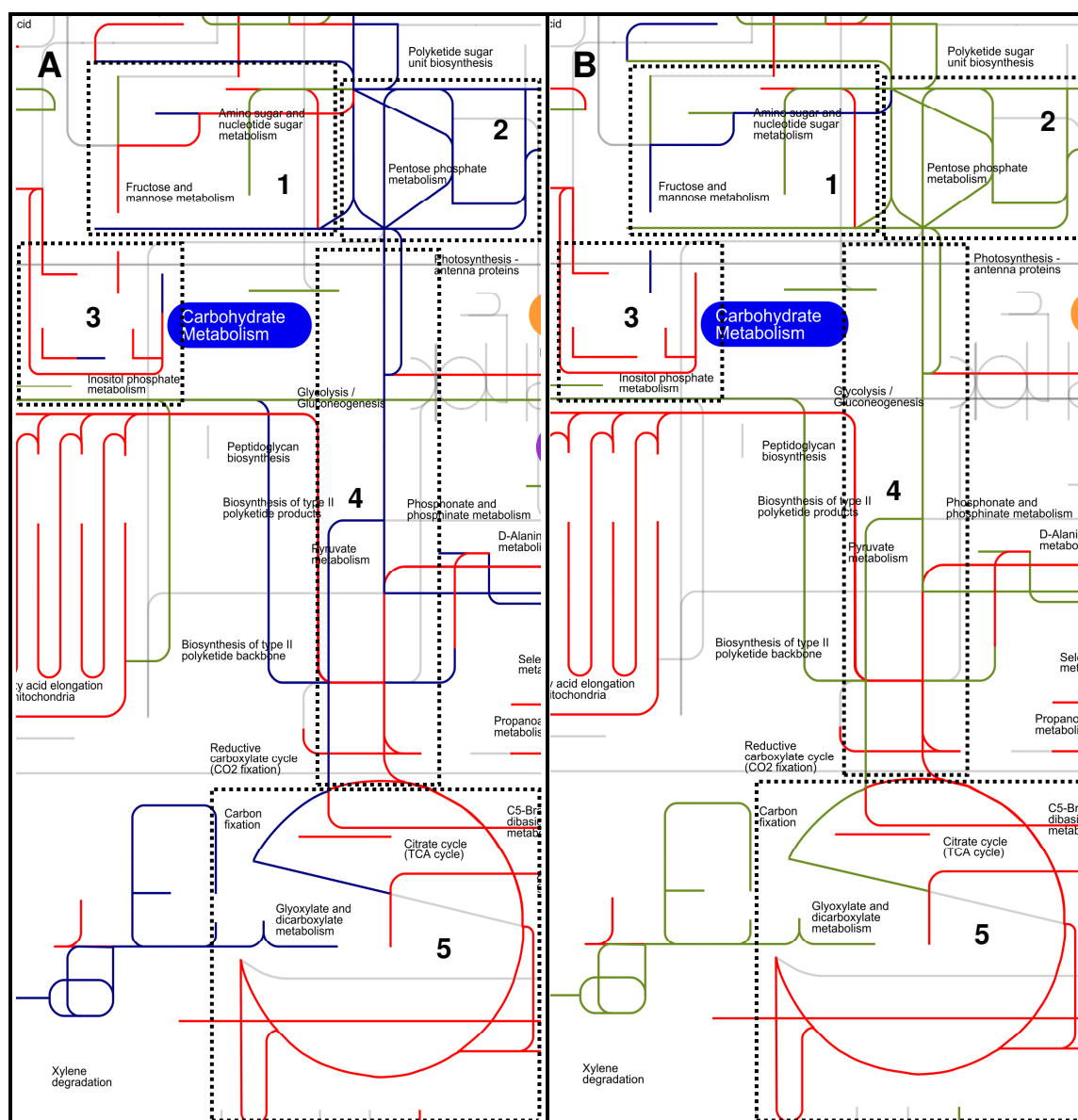


Figura 12: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, no metabolismo de carboidratos, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, as vias de (1) frutose e manose [KEGG 00051]; (2) pentoses-fosfato [KEGG 00030]; (3) inositol fosfato [KEGG 00562]; (4) glicólise/gliconeogênese [KEGG 00010] e piruvato [KEGG 00620]; (5) ciclo do ácido cítrico [KEGG 00020]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Ao analisar as famílias do metabolismo de carboidratos, cinco foram observadas em TE x TC, com a Piruvato Quinase sendo a mais representada (4 *unitags*). Em SE x SC, foram seis famílias e aquela com maior número de *unitags* (7) foi a PGK (Tabela 8). Para as duas comparações, a família PEPCK teve uma *unitag* compartilhada por três vias: glicólise/gliconeogênese, piruvato e ciclo do

ácido cítrico, mostrando as múltiplas interações e a complexidade do sistema de resposta fisiológica a um estímulo.

Tabela 8: Números de Classificação Enzimática (EC) observados nas vias do metabolismo de carboidratos e sua(s) *unitag(s)* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.105	CTC_SD139216	I	3,82	pfkB/RK	Frutose e manose (00051)
2.7.1.90	CTC_SD143069	I	5,09	pfkB/RK	Frutose e manose (00051)
2.7.1.40	CTC_SD107948*	R	-3,30	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD286029	R	-1,87	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD77825	R	-2,34	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD118394*	R	-1,87	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD107948*	R	-3,30	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD286029	R	-1,87	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD77825	R	-2,34	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD118394*	R	-1,87	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
4.1.1.49	CTC_SD151783	I	3,18	PEPCK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD151783	I	3,18	PEPCK	Piruvato (00620)
	CTC_SD151783	I	3,18	PEPCK	Ciclo do ácido cítrico (00020)
2.7.1.151	CTC_SD24840	I	2,38	PIP	Inositol fosfato (00562)
2.7.1.68	CTC_SD196690*	I	3,59	PIP	Inositol fosfato (00562)
2.7.2.3	CTC_SD162830	I	4,07	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
SE x SC					
2.7.1.15	CTC_SD94656	R	-2,13	pfkB/RK	Pentoses-fosfato (00030)
2.7.1.40	CTC_SD107948*	R	-2,13	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD187801	R	-2,13	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD177853	R	-2,66	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)

	CTC_SD118394*	R	-5,12	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD93134	I	2,34	Piruvato quinase	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD107948*	R	-2,13	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD187801	R	-2,13	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD177853	R	-2,66	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD118394*	R	-5,12	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
	CTC_SD93134	I	2,34	Piruvato quinase	Piruvato (00620)
2.7.9.1					
4.1.1.49	CTC_SD226350	I	4,67	SnRK	Piruvato (00620)
	CTC_SD88900	I	2,34	PEPCK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD88900	I	2,34	PEPCK	Piruvato (00620)
	CTC_SD88900	I	2,34	PEPCK	Ciclo do ácido cítrico (00020)
2.7.1.137					
	CTC_SD29827	R	-2,66	PIP	Inositol fosfato (00562)
2.7.1.68					
	CTC_SD196690*	I	1,99	PIP	Inositol fosfato (00562)
2.7.2.3					
	CTC_SD159973	I	2,34	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD39368	R	-6,92	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD159347	R	-5,01	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD162226	I	3,73	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD159974	R	-2,13	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD85545	I	3,27	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)
	CTC_SD86526	R	-4,26	PGK	Glicólise/Glicogênese (00010)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida / R - reprimida ($p \leq 0,05$).

(*) *Unitags* encontradas nas duas comparações entre bibliotecas, com valores de *Fold Change* diferentes em cada uma.

Metabolismo de nucleotídeos

Para a via representada pelas purinas (KEGG 00230), os mapas metabólicos mostraram indução e repressão nas duas comparações (Figura 13 A-B, área 1), porém, a presença de ambas as regulações dentro de números EC

ficou evidenciada somente em TE x TC, com presença basicamente de repressão (linhas verdes) em SE x SC.

A via de pirimidinas (KEGG 00240) exibiu indução e repressão na comparação entre tolerantes (Figura 13 A, área 2), e apenas indução na contrapartida sensível (Figura 13 B, área 2). Entretanto, em SE x SC foi observada somente uma *unitag* induzida nessa via (Tabela 9), mas pertencente a uma família (TK) diferente daquela observada nos tolerantes para a mesma via (NDPK).

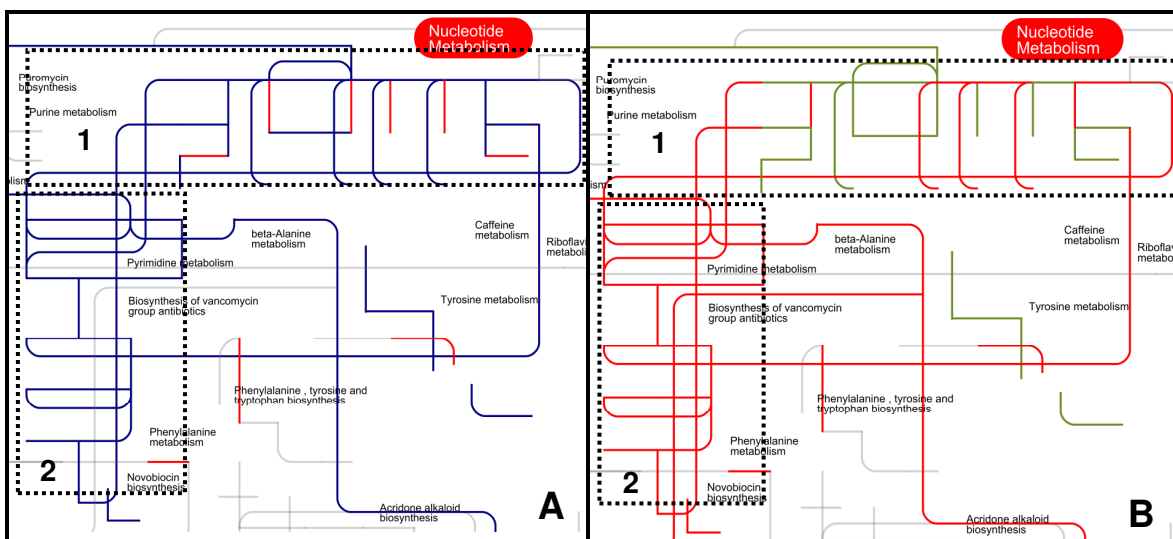


Figura 13: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, no metabolismo de nucleotídeos, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, as vias de (1) purinas [KEGG 00230] e (2) pirimidinas [KEGG 00240]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Com relação às famílias do metabolismo de nucleotídeos, na via de purinas, as mesmas foram observadas para as duas comparações; nas pirimidinas, estas contaram apenas com a família NDPK em TE x SC e, além dessa, a TK em SE x SC (Tabela 9).

As *unitags* diferencialmente expressas (Tabela 9) mostraram que a relação entre induzidas e reprimidas foi similar nas duas comparações, sendo que

não foram observadas grandes diferenças nas não-significativas, em relação às famílias encontradas (Tabela 2).

Tabela 9: Números de Classificação Enzimática (EC) observados nas vias do metabolismo de nucleotídeos e sua(s) *unitag(s)* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.20	CTC_SD65303*	I	2,11	pfbB/RK	Purinas (00230)
	CTC_SD65294	I	2,38	pfbB/RK	Purinas (00230)
2.7.1.25	CTC_SD133916	I	3,58	APS	Purinas (00230)
	CTC_SD65053	R	-2,75	APS	Purinas (00230)
	CTC_SD65046	R	-2,81	APS	Purinas (00230)
2.7.1.40	CTC_SD107948*	R	-3,30	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD286029	R	-1,87	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD77825	R	-2,34	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD118394*	R	-1,87	Piruvato quinase	Purinas (00230)
2.7.4.6	CTC_SD125419	R	-2,09	NDPK	Purinas (00230)
	CTC_SD81489	R	-3,30	NDPK	Purinas (00230)
	CTC_SD83856	I	2,46	NDPK	Purinas (00230)
	CTC_SD125419	R	-2,09	NDPK	Pirimidinas (00240)
	CTC_SD81489	R	-3,30	NDPK	Pirimidinas (00240)
	CTC_SD83856	I	2,46	NDPK	Pirimidinas (00240)
SE x SC					
2.7.1.20	CTC_SD65303*	I	1,92	pfbB/RK	Purinas (00230)
	CTC_SD65276	R	-2,28	pfbB/RK	Purinas (00230)
2.7.1.25	CTC_SD92950	I	2,01	APS	Purinas (00230)
2.7.1.40	CTC_SD107948*	R	-2,13	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD187801	R	-2,13	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD177853	R	-2,66	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD118394*	R	-5,12	Piruvato quinase	Purinas (00230)
	CTC_SD93134	I	2,34	Piruvato quinase	Purinas (00230)
2.7.4.6	CTC_SD81896	R	-1,63	NDPK	Purinas (00230)
	CTC_SD193686	R	-3,73	NDPK	Purinas (00230)
	CTC_SD36330	R	-3,32	NDPK	Purinas (00230)
	CTC_SD81896	R	-1,63	NDPK	Pirimidinas (00240)
	CTC_SD193686	R	-3,73	NDPK	Pirimidinas (00240)
	CTC_SD36330	R	-3,32	NDPK	Pirimidinas (00240)
2.7.1.21	CTC_SD22055	I	2,34	TK	Pirimidinas (00240)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse / SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida / R – reprimida ($p \leq 0,05$).

(*) *Unitags* encontradas nas duas comparações entre bibliotecas, com valores de *Fold Change* diferentes.

Metabolismo de aminoácidos

Nas duas comparações entre bibliotecas, as três vias observadas neste metabolismo foram induzidas. As linhas não observadas em vermelho nas vias de glicina, serina e treonina (KEGG 00260) (Figura 14 A-B, área 1) e cisteína e metionina (KEGG 00270) (Figura 14 A, área 2), foram resultados da influência e/ou sobreposição com números EC de outras vias. A biossíntese de lisina (KEGG 00300) exibiu a indução completa nas duas comparações (Figura 14 A-B, área 3).

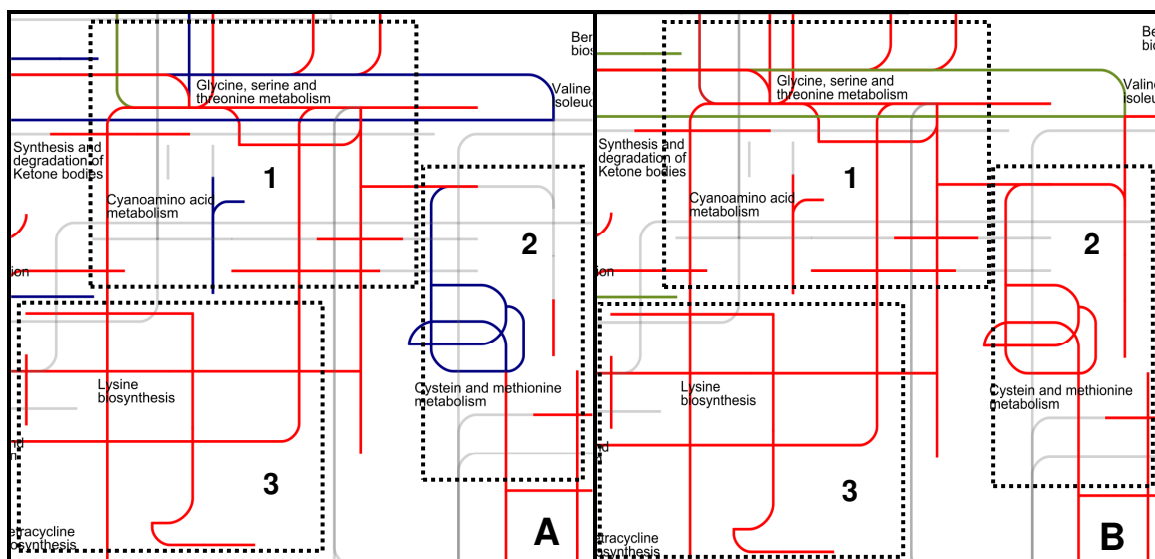


Figura 14: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, no metabolismo de aminoácidos, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, as vias de (1) glicina, serina e treonina [KEGG 00260]; (2) cisteína e metionina [KEGG 00270]; (3) biossíntese de lisina [KEGG 00300]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Somente um único número EC 2.7.2.4 foi observado nas duas comparações, mas referente a *unitags* distintas em TE x TC (CTC_SD21533) e SE x SC (CTC_SD77893), relativo à família Aspartoquinase (Tabela 10), observada nas três vias do metabolismo de aminoácidos.

Tabela 10: Números de Classificação Enzimática (EC) observados nas vias do metabolismo de aminoácidos e sua(s) *unitag(s)* HT-SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.2.4					
	CTC_SD21533	I	3,58	Aspartoquinase	Glicina, serina e treonina (00260)
	CTC_SD21533	I	3,58	Aspartoquinase	Cisteína e metionina (00270)
	CTC_SD21533	I	3,58	Aspartoquinase	Biossíntese de lisina (00300)
SE x SC					
2.7.2.4					
	CTC_SD77893	I	5,80	Aspartoquinase	Glicina, serina e treonina (00260)
	CTC_SD77893	I	5,80	Aspartoquinase	Cisteína e metionina (00270)
	CTC_SD77893	I	5,80	Aspartoquinase	Biossíntese de lisina (00300)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida ($p \leq 0,05$).

Processamento de informações do meio ambiente

Somente a via de transdução de sinais envolvendo fosfatidilinositol (KEGG 04070) foi observada neste metabolismo. No mapa metabólico, ela foi sobreposta a outras vias e as linhas azuis, representando ambas as regulações para as *unitags* presentes foram ressaltadas nas duas comparações (Figura 15). Mas, no geral, o mapa referente a TE x TC apresentou menor repressão (linhas verdes).

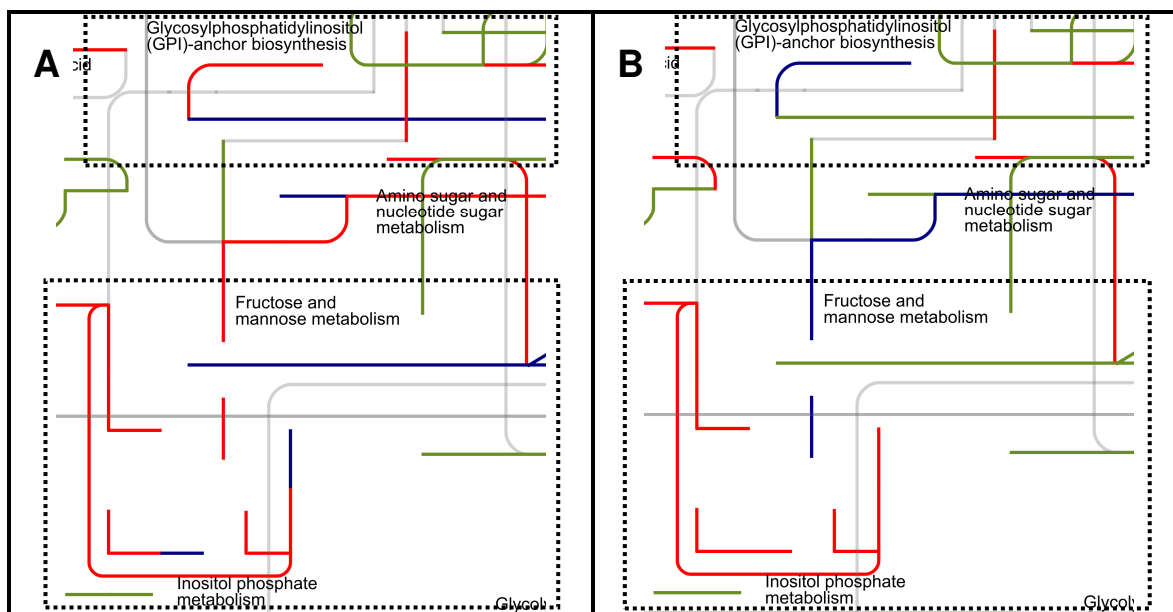


Figura 15: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, no processamento de informações do meio ambiente, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, a via de transdução de sinais via fosfatidilinositol [KEGG 04070]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Na comparação entre genótipos tolerantes, duas famílias foram observadas: DGK (reprimida) e PIP (induzida). Em SE x SC, apenas a PIP esteve presente, com uma *unitag* induzida e outra reprimida (Tabela 11).

Tabela 11: Números de Classificação Enzimática (EC) observados no processamento de informações do meio ambiente e sua(s) *unitag*(s) HT-SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.107	CTC_SD170836	R	-3,28	DGK	Transdução de sinais via fosfatidilinositol (04070)
2.7.1.68	CTC_SD196690*	I	3,59	PIP	Transdução de sinais via fosfatidilinositol (04070)
SE x SC					
2.7.1.68	CTC_SD196690*	I	1,99	PIP	Transdução de sinais via fosfatidilinositol (04070)
2.7.1.137	CTC_SD29827	R	-2,66	PIP	Transdução de sinais via fosfatidilinositol (04070)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida / R - reprimida ($p \leq 0,05$).

(*) *Unitags* encontradas nas duas comparações entre bibliotecas, com valores de *Fold Change* diferentes em cada uma.

Metabolismo de cofatores e vitaminas

Apesar da via de pantotenato e biossíntese de coenzima A (KEGG 00770) apresentar linhas coloridas em TE x TC (Figura 16 A, área 1), nenhuma *unitag* dessa via foi observada nesta comparação (Tabela 12), sendo influência da sobreposição com outras vias. Em SE x SC, o mapa mostrou a indução ocorrida (Figura 16 B, área 1).

Diferença na regulação de *unitags* foi observada na via de nicotinato e nicotinamida (KEGG 00760), que foi induzida (Figura 16 A, área 2) em TE x TC e reprimida em SE x SC (Figura 16 B, área 2). Assim, a *unitag* CTC_SD196222, pertencente à família NADK2 (via de nicotinato e nicotinamida), foi induzida em TE x TC, com FC de 2,16, e reprimida em SE x SC, com FC de -2,74 (Tabela 12).

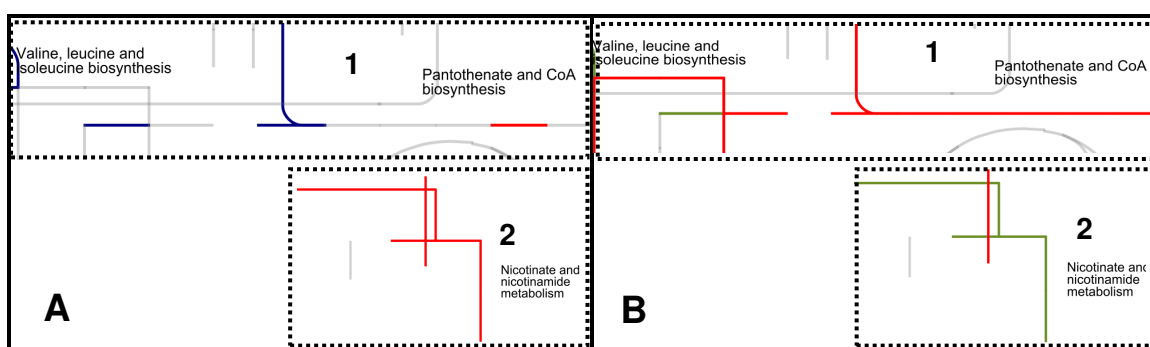


Figura 16: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, no metabolismo de cofatores e vitaminas, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, as vias de (1) pantotenato e biossíntese de coenzima A [KEGG 00770]; (2) nicotinato e nicotinamida [KEGG 00760]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Tabela 12: Números de Classificação Enzimática (EC) observados nas vias do metabolismo de cofatores e vitaminas e sua(s) *unitag*(s) SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.23	CTC_SD196222*	I	2,16	NADK2	Nicotinato e nicotinamida (00760)
SE x SC					
2.7.1.23	CTC_SD196222*	R	-2,74	NADK2	Nicotinato e nicotinamida (00760)
	CTC_SD196220	R	-2,13	NADK2	Nicotinato e nicotinamida (00760)
2.7.1.33	CTC_SD157641	I	5,14	PanK_long	Pantotenato e biossíntese de coenzima A (00770)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse / SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida / R - reprimida ($p \leq 0,05$).

(*) *Unitags* encontradas nas duas comparações entre bibliotecas, com valores de Fold Change diferentes em cada uma.

Processos celulares

Neste metabolismo, a via de endocitose (KEGG 04144) foi a única observada, tendo também apresentado influência e sobreposição de outras vias. As linhas vermelhas representaram a indução ocorrida nas duas comparações (Figura 17). O único número EC (2.7.1.68) observado nas duas comparações se referiu a uma mesma *unitag* (CTC_SD196690) da família PIP (Tabela 13), com maior modulação de expressão nos genótipos tolerantes.

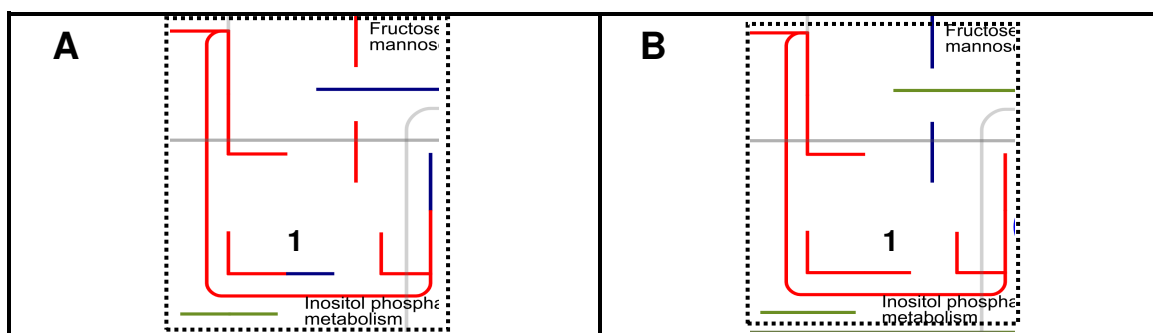


Figura 17: Seções referentes às *unitags* SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h, nos processos celulares, para as comparações (A) TE x TC e (B) SE x SC. Em destaque, a via de (1) endocitose [KEGG 04144]. Linhas em vermelho são vias compostas por *unitags* induzidas; em verde, reprimidas; em azul, há o conflito gerado por diferentes *unitags* induzidas e reprimidas no mesmo número EC; e em cinza não foram observadas *unitags*.

Tabela 13: Número de Classificação Enzimática (EC) observado nos processos celulares e sua *unitag* HT-SuperSAGE, de cana-de-açúcar sob supressão de rega (24 h).

Comparação / Número EC	Identificação da <i>unitag</i>	Regulação da <i>unitag</i>	<i>Fold Change</i> (FC)	Família quinase	Via metabólica no KEGG <i>Pathway</i>
TE x TC					
2.7.1.68	CTC_SD196690*	I	3,59	PIP	Endocitose (04144)
SE x SC					
2.7.1.68	CTC_SD196690*	I	1,99	PIP	Endocitose (04144)

TE x TC - genótipos tolerantes sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

SE x SC - genótipos sensíveis sob estresse vs respectivo controle sem estresse.

I – induzida ($p \leq 0,05$).

(*) *Unitags* encontradas nas duas comparações entre bibliotecas, com valores de *Fold Change* diferentes em cada uma.

6. Discussão

A abordagem de identificação de transcritos de possíveis proteínas quinases tem sido pesquisada conforme visto em publicações recentes (Kido *et al.*, 2011, 2012; Silva *et al.*, 2011).

Lehti-Shiu e Shiu (2012), apontam que as plantas fanerógamas possuem um quinoma variando entre 600 e 2.500 proteínas. Esse número é devido à redundâncias ocasionadas pelos comuns eventos de poliploidia em vegetais, que resultam em grandes multifamílias gênicas (Ding *et al.*, 2009).

No presente trabalho 3.107 *unitags* foram identificadas como relacionadas às quinases vegetais e para 539 foi possível classificá-las em famílias. O número de *unitags* aqui identificadas corresponde a cerca de três vezes àquele obtido pelo Projeto SUCAST (*Sugarcane Signal Transduction*, Rocha *et al.*, 2007), projeto brasileiro no qual foram identificadas 1.031 quinases, sendo 527 classificadas, a partir de EST oriundas de seis órgãos de cana-de-açúcar (raiz, flor, folha, gema lateral, primeiro e quarto entrenós), sujeitas ou não a algum estímulo [tratamento com fitormônios: ácido abscísico e metil jasmonato; seca (sem maiores detalhes experimentais); interação com bactérias diazotróficas endofíticas; ataque por *Diatraea saccharalis* e deficiência em fosfato].

O fato do Catálogo do SUCAST ser composto de genótipos brasileiros de cana-de-açúcar, como neste trabalho, e de que até o presente momento não há na literatura um valor definido para o número de quinases nesta cultura, sugere-se que o número de prováveis quinases identificadas nas quatro bibliotecas HT-SuperSAGE (aplicando um mesmo estresse em um mesmo órgão: raiz) foi

eficiente para a visualização de um painel de quinases, em processos metabólicos, após a supressão de rega por 24 h.

Quinases vegetais apresentam diferenças das encontradas em animais e microorganismos (Hrabak *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003; Chevalier & Walker, 2005; Lehti-Shiu & Shiu, 2012), portanto, os principais bancos de dados especializados em quinases vegetais (*Rice Kinase Database*; *ProFITS Maize*; *Arabidopsis thaliana Kinase Database*) utilizam a classificação em famílias presente no PlantsP, o qual foi escolhido para a presente análise e permitiu classificar a quase totalidade das prováveis quinases encontradas nas bibliotecas HT-SuperSAGE. Uma vez que a última classificação do PlantsP remonta a 2001, quinases das famílias APS, Aspartoquinase, FGGY, PanK_long, PDK/BCKDK, pfkB/RK e Piruvato Quinase, não possuíam correspondência nesta base de dados, sendo uma das limitações superadas com ajuda de literatura especializada (Cheek *et al.*, 2005; Ge *et al.*, 2012; Schramp *et al.*, 2012).

A fim de enfatizar as diferenças genotípicas no uso das vias metabólicas envolvendo as prováveis quinases, duas comparações foram detalhadas, TE x TC e SE x SC, por serem compostas de bibliotecas com mesmo *bulk* de genótipos, permitindo o uso dos termos indução e repressão. Para as comparações restantes, TE x SE e TC x SC, que são contrastes com bibliotecas de *bulks* de genótipos distintos, isso não seria possível.

A classificação das prováveis quinases através da descrição encontrada na anotação via BLASTx em 41 diferentes famílias (Tabela 2), a partir de 539 prováveis quinases, mostrou-se tão produtiva quanto outra pesquisa realizada comparando-se sequências proteicas: 39 famílias em 527 quinases (Rocha *et al.*, 2007).

As primeiras diferenças entre os grupos de genótipos tolerantes e sensíveis foram percebidas na análise dos totais de *unitags* observadas. Em TE x TC viu-se o maior número. Para as *unitags* diferencialmente expressas ($p \leq 0,05$), o total de induzidas foi semelhante nos dois grupos de genótipos. Diferenças também foram encontradas para as reprimidas e não-significativas, que exibiram maior repressão em SE x SC e mais *unitags* consideradas constitutivas em TE x TC. Pressupõe-se que esse maior repertório, de prováveis quinases, observado nos genótipos tolerantes possa conferir mais vantagens na percepção e sinalização inicial da supressão de rega.

A análise dos 75 tipos de quinases observadas mostrou que a proteína quinase dependente de cálcio (*calcium-dependent protein kinase*, família CDPK) apresentou o maior número de *unitags* nas duas comparações, com mais *unitags* diferencialmente expressas em SE x SC. Sua transcrição é comumente induzida em plantas submetidas a estresses abióticos (Das & Pandey, 2010). Em milho, seu maior nível de indução foi observado 5 horas após o início do estresse por desidratação (< 50 % de umidade disponível no solo) e caiu pela metade ao completar 24 h (Wang & Shao, 2013). Assim, o grande número de *unitags* constitutivas presentes em TE x TC (39) não necessariamente indicaria deixar de participar na sinalização inicial à supressão de rega aplicada. Por sua vez, as proteínas caseína quinase I (*casein kinase I*, família CK1) e quinase dependente de ciclina (*cyclin-dependent kinase*, família CDC2), atuam na divisão e diferenciação celular, sendo afetadas negativamente pelos estresses abióticos e, portanto, contribuindo para a redução do crescimento vegetal (Kitsios & Doonan, 2011; Wang *et al.*, 2011). De fato, elas foram totalmente constitutivas nos genótipos tolerantes e apresentaram poucas *unitags* diferencialmente expressas

nos sensíveis, indicando que, provavelmente, durante a repressão de rega (24 h), essas quinases se expressaram majoritariamente como parte do metabolismo basal.

Com relação às 41 famílias observadas, SE x SC apresentou maior diversidade (27 famílias), provavelmente decorrente da variabilidade genética dos genótipos envolvidos. Entretanto, TE x TC revelou uma regulação mais direcionada, onde a maioria das famílias foi composta por *unitags* induzidas. A presença de ambas as regulações foi observada em muitas famílias de SE x SC, ao passo que um pequeno número de famílias diferencialmente expressas foi exclusivo nos genótipos tolerantes. Como parte desse pequeno grupo, tem-se a família CIPK, que participa de *crosstalk* (resposta cruzada) entre diversos estresses abióticos (seca, indução por ABA e estresse osmótico) estudados em arroz, tendo sido um gene (*OsCIPK12*), induzido sob seca (supressão de rega por uma semana), indicado como responsável pela tolerância a esse estresse (Xiang *et al.*, 2007).

A metodologia empregada para a geração dos mapas metabólicos (programa *online* iPath2.0) requereu números de Classificação Enzimática. O uso da base de dados enzimáticos BRENDA permitiu fácil recuperação dessa informação através de buscas por palavras-chave, tendo sido encontrados números EC de 62 (82,7 %) tipos distintos de quinases. Infelizmente, alguns números EC não se encontravam mapeados nos mapas do KEGG *Pathway*, ao menos para *Sorghum bicolor*, organismo taxonomicamente mais próximo da cana-de-açúcar, ou mesmo para outras plantas. Ao se avaliar as famílias de quinases vegetais mapeadas foi surpreendente ver que números EC de famílias extensivamente estudadas, tais como CDPK, CCaMK, MAPK, MAP2K e MAP3K,

não estivessem mapeadas nas vias metabólicas de plantas do KEGG *Pathway*, demonstrando certa limitação.

A informação contida na base de dados KEGG BRITE – coleção de ontologias que representam hierarquias funcionais de diversos aspectos dos sistemas biológicos – permitiu abordar os principais metabolismos envolvendo os genótipos contrastantes de cana-de-açúcar. Dentre eles, destacaram-se, devido ao número de *unitags* diferencialmente expressas, os de carboidratos e nucleotídeos. A comparação entre genótipos sensíveis apresentou mais *unitags* (17) no metabolismo de carboidratos. Em geral, o acúmulo de carboidratos ou a utilização dos mesmos como moléculas sinalizadoras, são estratégias associadas ao aumento da tolerância vegetal a estresses (Els *et al.*, 2013). Por sua vez, o metabolismo de nucleotídeos apresentou o mesmo número de *unitags* nas duas comparações. Em *Lotus japonicus*, a transcrição de alguns genes desse metabolismo foi alterada em decorrência da supressão de rega, mas aos 35 dias após o início do estresse (Betti *et al.*, 2012).

Os processos metabólicos dos organismos vivos são notadamente complexos e interligados, apresentando diversos pontos de sobreposição onde proteínas, cofatores e várias outras moléculas são compartilhadas (Nelson & Cox, 2008). A complexidade aumenta quando existem vias alternativas que podem ser utilizadas de acordo com a necessidade temporal do organismo, fornecendo opções de resolução do problema por ele enfrentado (Taiz & Zeiger, 2004; Nelson & Cox, 2008). Portanto, a redundância de prováveis quinases vista em algumas vias metabólicas é perfeitamente justificável.

Isso explica algumas linhas coloridas representadas nos mapas gerados pelo iPath2.0, sem a devida contrapartida da expressão de *unitags*, e que foram

detalhadas em cada classe hierárquica funcional. De qualquer forma, os mapas representaram uma boa versão resumida para a compreensão do metabolismo global de um organismo, baseado na informação curada dos 172 mapas do KEGG *Pathway* (Yamada *et al.*, 2011). Muitas das linhas vistas nos mapas servem de representação para mais de dez vias metabólicas, com pontos de interseção entre várias enzimas. Uma vez que proteínas quinases estão associadas a etapas específicas em algumas vias, e que somente essa classe de proteínas foi utilizada na confecção dos mapas, a utilização da opção de 'seleção de todas as vias' permitiu uma visualização mais abrangente das vias nas quais a quinase está envolvida.

Os mapas metabólicos mostraram diferenças no padrão de expressão das prováveis quinases nas comparações entre genótipos tolerantes e sensíveis. Em TE x TC foi vista uma maior diversidade na regulação das *unitags*, devido à presença de mais linhas azuis (indução e repressão), também em decorrência da variabilidade genética dos genótipos que compuseram o *bulk* tolerante. Essa flexibilidade pode estar relacionada a uma maior eficiência metabólica e, ao mesmo tempo, pode indicar um potencial no aproveitamento individual de cada genótipo, a partir das complementações de suas informações genéticas.

Visando nortear a discussão sobre as prováveis quinases observadas em cada comparação e as expressões de suas *unitags* correspondentes, as oito classes de hierarquia funcional do KEGG BRITE foram tomadas por base.

Metabolismo de lipídeos

Uma das duas famílias encontradas no metabolismo de lipídeos foi a Diacilglicerol Quinase (DGK; EC 2.7.1.107). Essa é uma família de enzimas que

catalisa a conversão do diacilglicerol (DAG) em ácido fosfatídico (PA), o qual atua como segundo mensageiro lipídico em plantas (Méri­da *et al.*, 2008; Arisz *et al.*, 2009; Ge *et al.*, 2012). Para essa família, *unitags* SuperSAGE foram observadas basicamente constitutivas nos dois grupos de genótipos. Em TE x TC foi observada uma única *unitag* diferencialmente expressa (reprimida). Resultados encontrados por Ge *et al.* (2012), com silenciamento de genes da família DGK via RNAi, em protoplastos de arroz sob estresse salino (50 mM NaCl por 6h), apontam a indução da expressão de genes dessa família na resposta eficiente ao estresse. Entretanto, de acordo com as revisões feitas por Arisz *et al.* (2009) e Mérida *et al.* (2008), apesar de alta salinidade e seca serem estresses que desencadeiam respostas fisiológicas semelhantes, a resposta à seca via ácido fosfatídico é menos intensa em plantas, e deve ser, principalmente, quando comparada àquela ocasionada pelo estresse salino percebido por protoplastos, utilizado no ensaio de Ge *et al.* (2012). Essa pode ser uma razão para, após 24 h de supressão de rega, a expressão dos poucos membros encontrados na família DGK não ter se alterado expressivamente.

A outra família presente foi a Dihidroxiacetona Quinase (DhaK), que compreende basicamente dois tipos de enzimas: as Dha quinases propriamente ditas (EC 2.7.1.29) e as glicerol quinases (EC 2.7.1.30) (Erni *et al.*, 2006).

Dha quinases fosforilam a dihidroxiacetona e o D-gliceraldeído, carboidratos simples que estão envolvidos na glicólise/gliconeogênese (Nelson & Cox, 2008), vias abordadas no metabolismo de carboidratos. As glicerol quinases fosforilam, além dos monossacarídeos já citados, também o glicerol (Erni *et al.*, 2006). A expressão da família DhaK em TE x TC foi basicamente constitutiva, ao passo que em SE x SC uma *unitag* foi reprimida.

Indução na expressão do gene *Dhak*, que codifica a Dha quinase, em plântulas de arroz tolerantes a altas temperaturas ($38 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), também um estresse abiótico, quando os níveis celulares de dihidroxiacetona foram altos, foi observada por Liao *et al.* (2012) através da técnica de cDNA-AFLP.

Por sua vez, na comparação envolvendo genótipos tolerantes, nenhuma *unitag* foi associada a glicerol quinase e somente uma *unitag* (não-significativa) foi observada na comparação envolvendo os genótipos sensíveis. Em mutantes de *Arabidopsis thaliana* (Eastmond, 2004), a ausência de atividade da glicerol quinase em sementes foi associada à tolerância das mesmas, durante o período germinativo, a diversos estresses abióticos, incluindo dessecação (6 h). A ausência ou presença da glicerol quinase e seu envolvimento na resposta ao estímulo aplicado necessita ser melhor investigado.

Apesar de todas as *unitags* diferencialmente expressas do metabolismo de lipídeos terem sido reprimidas, os mapas metabólicos mostraram trechos de indução (linhas vermelhas), provenientes da interação global entre os compostos de todas as vias nas diferentes comparações, ampliando a visão geral das respostas dos grupos de genótipos para além das *unitags* geradas.

Metabolismo energético

Na via de enxofre, a família observada nas comparações entre genótipos foi a APS Quinase, representada pela enzima adenosina 5'- fosfosulfato quinase (APK; 2.7.1.25).

A APK faz parte de uma rota alternativa na redução do sulfato (SO_4^{-2}), que é menos utilizada em plantas superiores (Leustek & Saito, 1999), e sua relação com os estresses ambientais em vegetais é mencionada nos estudos de

herbivoria e defesa contra patógenos, onde essa via é responsável pela produção de metabólitos secundários sulfatados (Leustek & Saito, 1999; Lillig *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2011). Enquanto a principal leva à produção do aminoácido cisteína, na alternativa, a enzima catalisa a fosforilação da adenosina 5'-fosfosulfato (APS) em adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato (PAPS), que é o doador de sulfato para a geração de metabólitos secundários sulfatados (Mugford *et al.*, 2009; Ravilious *et al.*, 2012).

O resultado encontrado na comparação entre genótipos tolerantes (TE x TC), de três *unitags* correspondentes à APK (duas reprimidas e uma induzida), encontra ressonância na suposição feita por Ravilious *et al.* (2012, 2013), de que a atividade enzimática da APK seria reduzida na via alternativa, para que a via principal produzisse mais cisteínas, e nos estudos de crescimento feitos por Mugford *et al.* (2009), em *A. thaliana*, onde mutantes de APK apresentaram baixos níveis de assimilação de enxofre e tiveram problemas no crescimento vegetativo. Viu-se, *in silico*, portanto, a supressão parcial da via alternativa na redução do sulfato, sem que a produção dos compostos gerados pela mesma fosse interrompida, em princípio. Na comparação entre os genótipos sensíveis, uma *unitag* induzida foi associada à APK. Essa divergência entre os genótipos tolerantes e sensíveis pode ser importante para respostas a estresses abióticos, necessitando estudos adicionais.

Metabolismo de carboidratos

Em plantas, o metabolismo de carboidratos é extremamente versátil e deve-se muito à sua natureza sésil, que exige adaptação às diversas condições ambientais que enfrentam, possuindo um papel central nos requisitos estruturais e

energéticos exigidos por esses organismos (Nelson & Cox, 2008). Seis vias foram observadas nesta classe e estão abordadas separadamente para facilitar a compreensão de suas funções, porém, muitas delas compartilham as mesmas *unitags* devido aos vários pontos de interação entre as mesmas.

Frutose e manose

A família pfkB/RK foi a única associada a essa via, tendo sido representada pelas enzimas fosfofrutoquinase 2 (PFK2; EC 2.7.1.105) e pirofosfato fosfofrutoquinase (PPi-PFK; EC 2.7.1.90). Em plantas, essas enzimas controlam a razão entre assimilação de CO₂ e partição de carbono para produção de sacarose e amido, funcionando como ponto de regulação da glicólise (Hopkins & Norman, 2008; Nelson & Cox, 2008).

Draborg *et al.* (2001) observaram uma correlação entre a redução da atividade de PFK2 e um aumento significativo (duas a três vezes) na produção de sacarose e amido em folhas de *A. thaliana* transgênica, durante o período luminoso, quando comparada aos genótipos selvagens. Além disso, através de genômica comparativa entre *Sorghum bicolor* e três espécies de *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. robustum* e *S. spontaneum*), Zhu *et al.* (2013) inferiram a existência de 10 genes que codificariam diversas PFK, sendo o perfil de expressão desses genes bastante complexo e, muitas vezes, redundante.

Por outro lado, aumento no acúmulo de sacarose, especialmente nos entrenós imaturos de colmo de cana-de-açúcar transgênica, foi correlacionado com baixa atividade da PPi-PFK (Van der Merwe *et al.*, 2010), e em arroz infectado com *Rhizoctonia solani*, supõe-se que o aumento na atividade das vias glicolíticas tenha sido mais influenciado pela alteração nas taxas do fluxo

metabólico das PPI-PFK pré-existent na célula, do que pela indução na expressão das mesmas (Mutuku & Nose, 2012).

A expressão de transcritos para as enzimas PFK2 e PPI-PFK foi considerada constitutiva nos genótipos sensíveis e induzida, mas com poucas *unitags*, nos tolerantes. Os mapas metabólicos mostraram essas diferenças entre genótipos, com certa repressão nos sensíveis, em decorrência da interação de compostos e vias. De certo modo, esses mapas apontariam para um favorecimento no aumento na produção de sacarose nas duas comparações.

Pentoses-fosfato

Nessa via, a família pfkB/RK foi novamente a única observada. Porém, uma enzima diferente das anteriormente abordadas esteve presente, a riboquinase (EC 2.7.1.15). Em eucariotos, essa quinase catalisa a fosforilação da ribose em ribose-5-fosfato (Park & Gupta, 2008).

A transcrição das *unitags* SuperSAGE de riboquinase foi constitutiva em TE x TC e reprimida, com somente uma *unitag*, em SE x SC. Novamente, os mapas metabólicos mostraram essas diferenças entre genótipos, inclusive com repressão nos genótipos sensíveis.

Em um dos poucos trabalhos com plantas (Mastrangelo *et al.*, 2005), um gene precocemente regulado pelo frio (*e-cor*, *early cold regulated*; induzido nas primeiras 4 h de exposição) que codifica uma provável riboquinase foi identificado, em um experimento de SSH, a partir de trigo de grão duro (*Triticum durum*) sob baixas temperaturas (3°C por até 24 h). A análise dos transcritos desse gene revelou alta retenção de íntrons, de maneira que os produtos seriam peptídeos não-funcionais, reduzindo a disponibilidade de ribose-5-fosfato para a síntese de

nucleotídeos. Para os autores, a retenção está relacionada a uma resposta do spliceossoma a fatores ambientais, com o acúmulo de açúcares fazendo parte da sinalização ao estresse. No caso do presente trabalho, para saber se transcritos desse gene estariam retendo íntrons faz-se necessário sequenciamento dos respectivos cDNA, amplificados a partir de *primers* específicos.

Inositol fosfato

Os fosfoinositídeos são um grupo que varia de mono- a poli-inositóis fosforilados (IP a IP₆) e participa da regulação de variadas funções celulares, tais como: crescimento, apoptose, endocitose e sinalização sob estresses (Irvine & Schell, 2001; König *et al.*, 2007; Ischebeck & Heilmann, 2010).

Das enzimas envolvidas na via de inositol fosfato, a enzima inositol polifosfato multiquinase (IPMK ou IPK2; EC 2.7.1.151), foi exclusivamente induzida na comparação entre tolerantes, TE x TC. Essa enzima faz parte do chamado 'IP multiquinases', composto pelas PIP quinases que fosforilam vários inositol fosfatos (Irvine & Schell, 2001; Endo-streeter, 2009; Shears, 2009). O aumento na atividade da IPMK resulta em maiores concentrações de inositol fosfatos altamente fosforilados, que são usados na biossíntese do ácido fítico (PA ou IP₆), composto usado pelas plantas principalmente para o armazenamento de fósforo nas sementes (Raboy & Bowen, 2006; Ye *et al.*, 2013). A expressão do gene *ThIPK2* de *Thellungiella halophila* (planta halófito modelo, relacionada com *A. thaliana*), que codifica uma IPMK, foi responsável pelo aumento da tolerância aos estresses salino (200 mM de NaCl por um mês) e de desidratação (supressão de rega por uma semana) em plantas transgênicas de *Brassica napus* (Zhu *et al.*, 2009).

Por sua vez, a PI3K fosforila os inositóis possuidores de lipídeos, formando o $I(1,4,5)P_3$ (Irvine & Schell, 2001). Essa reação pode ser revertida pela proteína 5-fosfatase, estando a atividade das duas enzimas associada à transdução de sinais através dos níveis de $I(1,4,5)P_3$, que também participa como segundo mensageiro na sinalização de estresses abióticos (Munnik *et al.*, 1998). Uma *unitag* (CTC_SD29827) correspondente a essa enzima foi observada na comparação entre tolerantes, mas foi considerada reprimida.

Em raízes de *A. thaliana*, a enzima PI3K contribui para a tolerância à salinidade através da endocitose, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) dentro dos endossomos, que funcionam como os primeiros sinalizadores do estresse (Munnik *et al.*, 1998).

Outra *unitag* (CTC_SD196690), compartilhada entre as comparações TE x TC e SE x SC, correspondeu à fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase (PIP5K, PI4P5K ou PIPK; EC 2.7.1.68), a qual diz respeito a uma enzima-chave na catalisação da síntese dos fosfolipídeos de membrana, participando ativamente no controle do crescimento de pêlos radiculares em resposta a estresses osmóticos (Lou *et al.*, 2007; Munnik & Nielsen, 2011). Essa *unitag* foi considerada induzida nas duas comparações entre bibliotecas, sendo a modulação de sua expressão (valor FC) em TE x TC (3,59) quase o dobro daquele em SE x SC (1,99), reforçando a previsão de Munnik & Nielsen (2011), sobre o acúmulo de membros desta família quinase em situações de estresse osmótico nas plantas. Esse foi um caso em que os dois grupos se utilizaram de mesma estratégia para responder ao estímulo empregado, sendo diferenciadas pelas suas modulações das expressões. Apesar de presente nos dois grupos, esse alvo molecular

merece ter suas expressões validadas (RT-qPCR), tendo em vista o potencial para aproveitamento futuro em programas de melhoramento.

Glicólise/Gliconeogênese

A glicólise é uma via catabólica que atende duas demandas: (1) gera ATP através da oxidação de hexoses, agentes redutores e piruvato; e (2) produz os compostos básicos que serão usados no anabolismo. A gliconeogênese é a contrapartida anabólica que, em organismos fotossintéticos, promove a conversão dos produtos da fotossíntese em glicose, que será posteriormente armazenada como sacarose ou amido (Nelson & Cox, 2008).

A piruvato quinase (EC 2.7.1.40), pertencente à família de mesmo nome, catalisa a etapa final da glicólise, convertendo ADP e fosfoenolpiruvato (PEP) em ATP e piruvato (Plaxton, 1996; Nelson & Cox, 2008). Quatro *unitags* (CTC_SD107948, CTC_SD286029, CTC_SD77825 e CTC_SD118394) identificadas como piruvato quinase na comparação TE x TC foram consideradas reprimidas. Entretanto, na comparação SE x SC, apesar do resultado semelhante, uma (CTC_SD93134) das cinco *unitags* foi considerada induzida. Estudo com variedades brasileiras de cana-de-açúcar, tolerantes e sensíveis à seca, identificou um transcrito (cDNA) de piruvato quinase, o qual foi induzido seis vezes mais em folhas de plantas sob supressão de rega por oito dias (cerca de 40 % de umidade relativa no substrato), quando comparadas às plantas controle. Para os autores (Rodrigues *et al.*, 2009), a piruvato quinase foi essencial na regulação da glicólise. Deve ser ressaltado, que durante o estresse hídrico, a glicólise é reduzida, juntamente com a atividade da piruvato quinase (Atkin & Macherel, 2009). Em contrapartida, a gliconeogênese torna-se mais ativa, levando

à indução da fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK; EC 4.1.1.49), que é responsável por descarboxilar o oxaloacetato e formar o fosfoenolpiruvato que será convertido em glicose nesta via (Hopkins & Norman, 2008; Nelson & Cox, 2008). Corroborando com essa afirmação, as *unitags* (CTC_SD151783 e CTC_SD88900) associadas à PEPCK foram induzidas nas duas comparações.

Sob altas temperaturas ($38 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, 3 a 72 h) foi observada indução precoce, através de cDNA-AFLP, do gene de PEPCK em plântulas de arroz tolerantes (após 9 h de tratamento), quando comparadas às sensíveis (após 24 h) ao estresse imposto. Para os autores, esse resultado mostrou que o metabolismo de carboidratos foi ativado mais rapidamente, em decorrência do estímulo aplicado, nas plântulas tolerantes (Liao *et al.*, 2012).

Nos mapas metabólicos, a glicólise/gliconeogênese compartilha, para o metabolismo de carboidratos, sua área com a via do piruvato. De modo geral, a eficiência dessas vias foi maior nos genótipos tolerantes, uma vez que as induções foram também maiores [linhas vermelhas (induzidas) e azuis (induzidas e reprimidas)].

Por sua vez, a maior parte das *unitags* (TE x TC: 19; SE x SC: 15) mapeadas para a enzima fosfoglicerato quinase (PGK; EC 2.7.2.3, família homônima), nas duas comparações analisadas (TE x TC: 20; SE x SC: 22), foram constitutivas. Analisando as diferencialmente expressas (TE x TC: 1; SE x SC: 7), apenas uma foi observada em TE x TC (induzida). Para SE x SC, a relação entre induzidas e reprimidas (três e quatro, respectivamente) foi balanceada. De modo geral, e levando em conta a interação entre as vias, os mapas metabólicos mostraram diferenças entre os grupos de genótipos (maior repressão no grupo dos sensíveis).

Após aplicação de estresse hídrico moderado (16 % PEG 6000 por 8 h), em plântulas de milho, Tai *et al.* (2011) observaram, através de eletroforese bidimensional, um grande acúmulo de PGK nas folhas das plântulas submetidas ao estresse, em comparação ao controle.

Piruvato

Das três famílias encontradas nesse metabolismo, as *unitags* associadas à Piruvato Quinase e à PEPCK foram previamente discutidas na via de glicólise/gliconeogênese, sendo mais um caso de sobreposição de vias relacionadas ao metabolismo de carboidratos.

A família de Quinases Relacionadas à SNF1 (SnRK), por sua vez, foi diferencialmente expressa somente neste metabolismo, com uma *unitag* (CTC_SD226350) induzida na comparação SE x SC, relativa a piruvato ortofosfato diquinase (PPDK; EC 2.7.9.1). Abundante em folhas de plantas que possuem metabolismo fotossintético do tipo C₄, a PPDK catalisa a regeneração do fosfoenolpiruvato, a partir de fosfato inorgânico (Pi) e piruvato, no estroma dos cloroplastos (Lunn, 2007; Chastain *et al.*, 2011). Em arroz, uma planta do tipo C₃, foi observada a indução da expressão de PPDK nas raízes, sob supressão gradual de rega e estresses osmótico, salino e de baixas temperaturas. Os autores (Moons *et al.*, 1998) sugeriram que, apesar de ser uma enzima tipicamente envolvida com a fotossíntese de plantas do tipo C₄, como a cana-de-açúcar, evolutivamente, a PPDK esteve envolvida na fixação não-fotossintética de CO₂. Por isso, seu papel atual, em tecidos não-fotossintéticos de plantas C₃ e C₄, estaria relacionado com a resposta metabólica durante períodos com baixos níveis de oxigênio e água, em variedades de arroz tolerantes à hipóxia.

Ciclo do ácido cítrico

Nesta via, apenas a família PEPCCK foi observada, tendo sido já discutida na glicólise/gliconeogênese, onde apresentou uma *unitag* induzida. As linhas azuis (induzidas e reprimidas) e verdes (reprimidas) observadas nos mapas metabólicos desta via são, na verdade, trechos participantes da via de fixação de carbono.

Metabolismo de nucleotídeos

Quatro das cinco famílias de quinases vegetais observadas nesta classe funcional foram observadas na via de purinas (pfbB/RK, APS, Piruvato Quinase e NDPK), enquanto que somente duas (NDPK e TK) foram associadas à de pirimidinas. Uma vez que as mesmas *unitags* estão presentes nos dois metabolismos, e ambos são similares, esta discussão foi enfocada nas enzimas e suas respectivas famílias, sem fortes distinções entre as vias.

Considerando a família pfbB/RK, somente transcritos da enzima adenosina quinase (AdK; EC 2.7.1.20) foram observados, nas duas comparações. Essa enzima é tipicamente constitutiva e catalisa, em eucariotos, a fosforilação da adenosina em adenosina monofosfato (AMP) (Moffatt *et al.*, 2000; Park & Gupta, 2008). A maior parte das *unitags* de AdK foi, de fato, constitutiva nas duas comparações, mas com relação às diferencialmente expressas, duas foram induzidas em TE x TC, enquanto que em SE x SC, uma foi induzida e outra reprimida.

A enzima APK (família APS Quinase) foi abordada em detalhes na seção referente ao metabolismo de enxofre (metabolismo energético). Seu posicionamento no metabolismo de purinas deve-se à composição de seu sítio de

ligação ao ATP: uma sequência conservada de purinas entre plantas e microorganismos (Arz *et al.*, 1994; Ravilious *et al.*, 2012). De mesma forma, a enzima piruvato quinase (de família homônima) foi previamente abordada. Sua relação com a via de purinas está relacionada à ação peculiar dessa quinase que, ao invés de transferir um grupo fosfato de um ATP para uma molécula aceptora, realiza uma reação quase inversa, onde a molécula aceptora é um ADP. Em alguns pontos da via, a piruvato quinase é utilizada com esse propósito.

A família NDPK, por sua vez, está entre as responsáveis pela regulação da transdução de sinais durante estresses oxidativos (Hammargren *et al.*, 2007). Nessa família, a enzima nucleosídeo difosfato quinase 1 (NDK1; EC 2.7.4.6) foi observada nas vias de purinas e pirimidinas com uma *unitag* induzida e duas reprimidas na comparação entre genótipos tolerantes, e três reprimidas para os sensíveis. Estudos de expressão gênica diferencial em raízes de milho sob estresse hídrico (solução de polietilenoglicol -0,7 MPa), e de arroz sob estresse salino (150 mM NaCl), relatam aumento significativo da expressão de NDK1 até a primeira hora de aplicação dos estresses, em variedades tolerantes. Essa indução decresce após a terceira hora, e torna-se negativa em 24 h de tratamento (Kawasaki *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2013).

Na comparação entre genótipos sensíveis, a repressão de NDK1 apresenta resultado similar ao encontrado em uma variedade nacional de cana-de-açúcar (SP90-1638, também utilizada neste trabalho), onde a expressão do cDNA de NDK1 foi reprimida durante estresse hídrico moderado (40,9 % de umidade relativa no solo, após supressão gradual de rega por oito dias) (Rodrigues *et al.*, 2009). A compreensão de como essa expressão ocorre logo nos primeiros momentos da percepção do estresse carece de maiores estudos.

A via de pirimidinas, no entanto, apresentou uma quinase exclusiva da comparação SE x SC (timidina quinase; EC 2.7.1.21) que foi induzida. Pertencente à família TK, sua atividade está relacionada à reciclagem celular de desoxiribonucleosídeos. Detalhes dessa via de salvamento ainda não estão claros em plantas (Deng & Ives, 1972; Clausen *et al.*, 2012). Entretanto, alguns resultados sugerem seu possível envolvimento na resposta a estresses abióticos. Kido *et al.* (2011) reportaram uma *unitag* SuperSAGE em feijão-caupi anotada para TK, a qual foi expressa em genótipo tolerante a salinidade (100 mM de NaCl) com FC de 11,2, em relação ao controle sem estresse. Apesar do período de supressão de rega aplicado não ter sido longo (24 h), no presente trabalho, tomando como base a atividade primária dessa enzima, o resultado parece sugerir um acúmulo de desoxiribonucleosídeos para formação de novas moléculas de DNA, podendo a replicação do material genético estar relacionada com um crescimento celular em raízes, durante períodos de déficit hídrico.

Em termos gerais, assim como para outras vias já discutidas, os mapas metabólicos de purinas e pirimidinas mostraram maior indução (linhas vermelhas e azuis) nos genótipos tolerantes.

Metabolismo de aminoácidos

As vias de glicina, serina e treonina (KEGG 00260), cisteína e metionina (KEGG 00270) e biossíntese de lisina (KEGG 00300), encontradas nesse metabolismo, foram representadas pela aspartato quinase (AK; EC 2.7.2.4, família Aspartoquinase), com uma *unitag* em cada comparação, sendo as duas induzidas.

Nos tecidos dos vegetais superiores em condições normais, a AK é encontrada em baixos níveis (Ferreira *et al.*, 2005). Uma vez que a biossíntese de aminoácidos faz parte do metabolismo basal da célula, não é surpresa que a expressão da *unitag* correspondente a essa enzima tenha sido induzida tanto na comparação entre genótipos tolerantes, quanto entre sensíveis.

Em plantas superiores, são conhecidos ao menos três diferentes tipos de aspartato quinase (Sikdar & Kim, 2010; Sauter *et al.*, 2013). Os aminoácidos lisina, treonina, isoleucina e metionina possuem a mesma etapa inicial de formação: fosforilação do aspartato pela AK e sua conversão em β -aspartil fosfato (Sikdar & Kim, 2010). Duas isoenzimas da AK em *A. thaliana* e milho são bem caracterizadas e a complexidade encontrada nessa família gênica é um reflexo da regulação que ocorre nesta via (Sikdar & Kim, 2010; Sauter *et al.*, 2013).

Considerando que a AK é inibida pelo aumento dos níveis celulares desses aminoácidos e as *unitags* correspondentes a enzima foram induzidas nas duas comparações (e ainda mais induzida em TE x TC, quando analisados os mapas metabólicos), pode-se deduzir que a produção desses aminoácidos estaria sendo direcionada para um aumento na produção de proteínas, possivelmente necessárias para as demandas ocasionadas durante o estresse percebido e imposto.

Processamento de informações do meio ambiente

Nesta classe de hierarquia funcional situa-se uma das vias mais importantes na regulação da resposta dos organismos eucarióticos a estresses abióticos: a via de transdução de sinais via fosfatidilinositol (KEGG 04070) (Heilmann, 2009; Schramp *et al.*, 2012). Duas famílias de quinases vegetais foram

identificadas nesta via (DGK e PIP), tendo sido já discutidas em outros metabolismos (lipídeos e carboidratos, respectivamente). Apesar de o total de *unitags* induzidas e reprimidas ter sido o mesmo para as comparações TE x TC e SE x SC, os mapas metabólicos mostraram diferenças na expressão dos grupos de genótipos, com o grupo de genótipos sensíveis apresentando maior repressão. Mais uma vez, essas diferenças foram relacionadas com a sobreposição de vias e a maneira como os diversos compostos presentes são influenciados na análise global dos metabolismos.

A sinalização via fosfatidilinositóis é um sistema complexo e exclusivo de eucariotos (Irvine & Schell, 2001; Munnik & Nielsen, 2011). A família PIP quinase é parte central desse sistema, possibilitando a produção de moléculas fosforiladas que participam da regulação do sistema (Endo-streeter, 2009). Para König *et al.* (2007) plantas que aumentam gradualmente a quantidade celular de fosfoinositóis durante períodos de estresse osmótico utilizam muito mais esse contingente no uso de respostas fisiológicas do que aquelas que não estão submetidas à mesma situação. Os mapas metabólicos mostraram que a indução dessa via de sinalização foi mais acentuada na comparação entre os genótipos tolerantes.

Metabolismo de cofatores e vitaminas

Os cofatores são substâncias orgânicas ou inorgânicas que auxiliam o bom funcionamento das enzimas. Se um cofator for orgânico, normalmente ele é chamado de coenzima, sendo as vitaminas as principais coenzimas conhecidas (Nelson & Cox, 2008).

Na via de pantotenato e biossíntese de coenzima A (KEGG 00770), a enzima pantotenato quinase (EC 2.7.1.33) catalisa a conversão do pantotenato

para ácido 4-fosfopantotênico (Leonardi *et al.*, 2005). Essa enzima, induzida durante a germinação de sementes de espinafre (*Spinacia oleracea*) teve um papel importante na utilização dos lipídeos (Falk & Guerra, 1993). Apesar de TE x TC ter apresentado apenas *unitags* consideradas constitutivas e, em SE x SC, uma ter sido induzida, os mapas metabólicos mostram que, devido às influências de outras vias, os genótipos tolerantes foram mais induzidos do que os sensíveis.

Os principais elementos relacionados à resposta a estresses da segunda via deste metabolismo, nicotinato e nicotinamida (KEGG 00760), são nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD; NAD⁺, em sua forma oxidada e NADH, quando reduzido) e seu análogo, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADP; NADP⁺, em sua forma oxidada e NADPH, quando reduzido) (Nelson & Cox, 2008). A principal enzima reguladora do balanço entre NAD⁺(H)/NADP⁺(H) é a NAD quinase 2 (NADK2; EC 2.7.1.23), pertencente à família homônima, que catalisa a fosforilação do NAD em NADP, na presença de ATP (Hashida *et al.*, 2010). Takahara *et al.* (2010) analisaram a resposta de plântulas transgênicas de arroz (*O. sativa* 'Nipponbare') ao superexpressarem o gene *NADK2* de *A. thaliana*, que codifica uma NADK2. Os resultados mostraram efeitos pleiotrópicos desse gene no metabolismo primário. Parte das folhas de plântulas transformadas com o gene *AtNADK2* foi tratada com metil viologênio (MV), herbicida que induz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em cloroplastos, e essas apresentaram maior tolerância ao estresse oxidativo, quando comparadas com as folhas do grupo controle. Esta etapa foi considerada pelos autores como crucial na regulação do estresse oxidativo.

Percebendo a importância do NADP para a resposta celular ao estresse oxidativo, que também é ocasionado pela supressão de rega, o resultado

encontrado neste trabalho referente à enzima quinase NADK2 (mesma *unitag* induzida no tolerante e reprimida no sensível), mostrou-se como uma importante diferenciação entre as respostas geradas pelos diferentes genótipos estudados após o período (24 h) de supressão de rega submetido. A enzima NAD quinase é um alvo bastante interessante para o melhoramento genético, uma vez que a alteração no balanço entre NAD e NADP afeta fortemente a homeostase de antioxidantes (Hashida *et al.*, 2009; Takahara *et al.*, 2010).

Processos celulares

A endocitose (KEGG 04144), via encontrada nesta classe, é um mecanismo celular onde nutrientes, lipídeos e proteínas podem ser removidos da superfície celular e transportados para o interior da célula (Samaj *et al.*, 2005).

A *unitag* CTC_SD196690, observada em ambas as comparações, correspondeu a fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase (PIP5K, PI4P5K ou PIPK; EC 2.7.1.68). Essa quinase estimula o processo de endocitose, aumentando a formação de endossomos nas células eucariotas (Rubbo & Russinova, 2012).

Sabendo que os fosfatidilinositóis são constituintes minoritários das membranas eucarióticas e que estão envolvidos em uma grande variedade de processos celulares basais (Samaj *et al.*, 2005; Delage *et al.*, 2013), a indução da expressão encontrada nas duas comparações era esperada. Nos mapas metabólicos, porém, foram observadas diferenças na expressão entre os genótipos, onde os tolerantes mostraram, em geral, maior indução do que os sensíveis.

7. Conclusões

1. A comparação entre genótipos tolerantes apresentou maior número de *unitags* constitutivas e menor número de reprimidas;
2. O *Fold Change* (FC) das *unitags* avaliadas foi em geral negativo, indicando necessidade de abertura dos *bulks* de genótipos tolerantes e sensíveis em futuras validações por RT-qPCR;
3. As divergências entre o resultado esperado nos mapas metabólicos e o observado indicam possíveis interações desconhecidas proveniente da sobreposição natural de vias;
4. Para o metabolismo considerado mais importante, o de carboidratos, a comparação entre os genótipos tolerantes apresentou melhor eficiência geral;
5. Os resultados obtidos para o metabolismo de carboidratos apontam o acúmulo de açúcares em ambas as comparações analisadas;
6. As *unitags* relacionadas ao metabolismo de aminoácidos indicam aumento da disponibilidade de aminoácidos;
7. Os melhores alvos para validação em RT-qPCR incluem as *unitags* identificadas como pertencentes às famílias NADK2, APS, pfkB/RK e PIP.

8. Referências Bibliográficas

- Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, et al. (1991) Complementary DNA Sequencing: Expressed Sequence Tags and Human Genome Project. *Science* 252:1651–1656.
- Van Aelst K, Tóth J, Ramanathan SP, et al. (2010) Type III restriction enzymes cleave DNA by long-range interaction between sites in both head-to-head and tail-to-tail inverted repeat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:9123–8. doi: 10.1073/pnas.1001637107
- Amalraj VA, Balasundaram N (2006) On the Taxonomy of the Members of “Saccharum Complex”. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:35–41. doi: 10.1007/s10722-004-0581-1
- Arisz SA, Testerink C, Munnik T (2009) Plant PA signaling via diacylglycerol kinase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791:869–875. doi: 10.1016/j.bbalip.2009.04.006
- Arz HE, Gisselmann G, Schiffmann S, Schwenn JD (1994) A cDNA for adenylyl sulphate (APS)-kinase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1218:447–452.
- Atkin OK, Macherel D (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. *Annals of botany* 103:581–597. doi: 10.1093/aob/mcn094
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:23–58. doi: 10.1080/07352680590910410
- Baxevanis AD (2011) The importance of biological databases in biological discovery. *Current Protocols in Bioinformatics*. doi: 10.1002/0471250953.bi0101s34
- Betti M, Pérez-Delgado C, García-Calderón M, et al. (2012) Cellular Stress Following Water Deprivation in the Model Legume *Lotus japonicus*. *Cells* 1:1089–1106. doi: 10.3390/cells1041089
- Bräutigam a, Gowik U (2010) What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant biology (Stuttgart, Germany)* 12:831–41. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00373.x
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, et al. (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature biotechnology* 18:630–4. doi: 10.1038/76469
- Carmo-Silva AE, Soares AS, Marques da Silva J, Bernardes da Silva A, Keys AJ, Arrabaça MC (2007) Photosynthetic responses of three C₄ grasses of different metabolic subtypes to water deficit. *Func. Plant Biol.* 34:204–213
- Chastain CJ, Failing CJ, Manandhar L, et al. (2011) Functional evolution of C₄ pyruvate, orthophosphate dikinase. *Journal of experimental botany* 62:3083–3091. doi: 10.1093/jxb/err058
- Cheek S, Ginalski K, Zhang H, Grishin N V (2005) A comprehensive update of the sequence and structure classification of kinases. *BMC Structural Biology* 5:6. doi: 10.1186/1472-6807-5-6
- Cheek S, Zhang H, Grishin N V (2002) Sequence and Structure Classification of Kinases. *Journal of Molecular Biology* 320:855–881. doi: 10.1016/S0022-2836(02)00538-7
- Chevalier D, Walker JC (2005) Functional genomics of protein kinases in plants. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 3:362–371.

- Clausen AR, Girandon L, Ali A, et al. (2012) Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. *The FEBS journal* 279:3889–3897. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08747.x
- Conab (2012) Acompanhamento de safra brasileira: cana-de-açúcar, primeiro levantamento, abril/2012. 19.
- Conesa A, Götz S, García-Gómez JM, et al. (2005) Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* (Oxford, England) 21:3674–6. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610
- Das R, Pandey GK (2010) Expressional analysis and role of calcium regulated kinases in abiotic stress signaling. *Current Genomics* 11:2–13. doi: 10.2174/138920210790217981
- Delage E, Puyaubert J, Zachowski A, Ruelland E (2013) Signal transduction pathways involving phosphatidylinositol 4-phosphate and phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate: Convergences and divergences among eukaryotic kingdoms. *Progress in Lipid Research* 52:1–14. doi: 10.1016/j.plipres.2012.08.003
- Deng Q, Ives DH (1972) Modes of nucleoside phosphorylation in plants: studies on the apparent thymidine kinase and true uridine kinase of seedlings. *Biochimica et biophysica acta* 277:235–244.
- Diatchenko L, Lau Y-FC, Campbell AP, et al. (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:6025–6030.
- Dillon SL, Shapter FM, Henry RJ, et al. (2007) Domestication to crop improvement: genetic resources for *Sorghum* and *Saccharum* (Andropogoneae). *Annals of botany* 100:975–989. doi: 10.1093/aob/mcm192
- Ding X, Richter T, Chen M, et al. (2009) A rice kinase-protein interaction map. *Plant physiology* 149:1478–92. doi: 10.1104/pp.108.128298
- Draborg H, Villadsen D, Nielsen TH (2001) Transgenic *Arabidopsis* Plants with Decreased Activity of Fructose-6-Phosphate,2-Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase Have Altered Carbon Partitioning. *Plant physiology* 126:750–758.
- Eastmond PJ (2004) Glycerol-insensitive *Arabidopsis* mutants: *gli1* seedlings lack glycerol kinase, accumulate glycerol and are more resistant to abiotic stress. *The Plant Journal* 37:617–625. doi: 10.1111/j.1365-313X.2003.01989.x
- Edmé SJ, Miller JD, Glaz B, et al. (2005) Genetic Contribution to Yield Gains in the Florida Sugarcane Industry across 33 Years. *Crop Science* 45:92–97.
- Els K, Darin P, Vangronsveld J, et al. (2013) Plant sugars are crucial players in the oxidative challenge during abiotic stress: extending the traditional concept. *Plant, cell & environment* 1–49. doi: 10.1111/pce.12061
- Endo-streeter ST (2009) Structural Studies of *Arabidopsis thaliana* Inositol Polyphosphate Multi-Kinase. 143.
- Erni B, Siebold C, Christen S, et al. (2006) Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:890–900. doi: 10.1007/s00018-005-5518-0
- Falk KL, Guerra DJ (1993) Coenzyme A Biosynthesis in Plants: Partial Purification and Characterization of Pantothenate Kinase from Spinach. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301:424–430.

- Ferreira RR, Vendemiatti A, Gratão PL, et al. (2005) Determination of Aspartate Kinase Activity in Maize Tissues. *Scientia Agricola* 62:184–189.
- Gao L-L, Xue H-W (2012) Global analysis of expression profiles of rice receptor-like kinase genes. *Molecular Plant* 5:143–153. doi: 10.1093/mp/ssr062
- Ge H, Chen C, Jing W, et al. (2012) The rice diacylglycerol kinase family: functional analysis using transient RNA interference. *Frontiers in Plant Science* 3:Article 60. doi: 10.3389/fpls.2012.00060
- Gribskov M, Fana F, Harper J, et al. (2001) PlantsP: a functional genomics database for plant phosphorylation. *Nucleic Acids Research* 29:111–113.
- Hammargren J, Sundström J, Johansson M, et al. (2007) On the phylogeny, expression and targeting of plant nucleoside diphosphate kinases. *Physiologia Plantarum* 129:79–89. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00794.x
- Hanks SK (2003) Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biology* 4:111.
- Hanks SK, Hunter T (1995a) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* 9:576–596.
- Hanks SK, Hunter T (1995b) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal* 9:576–596.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The Protein Kinase Family: Conserved Features and Deduced Phylogeny of the Catalytic Domains. *Science* 241:42–52.
- Harmon AC, Gribskov M, Gubrium E, Harper JF (2001) The CDPK superfamily of protein kinases. *New Phytologist* 151:175–183. doi: 10.1046/j.1469-8137.2001.00171.x
- Hashida S, Itami T, Takahashi H, et al. (2010) Nicotinate/nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase-mediated regulation of NAD biosynthesis protects guard cells from reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal movement in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 61:3813–3825. doi: 10.1093/jxb/erq190
- Hashida S, Takahashi H, Uchimiya H (2009) The role of NAD biosynthesis in plant development and stress responses. *Annals of Botany* 103:819–824. doi: 10.1093/aob/mcp019
- Heilmann I (2009) Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends in Plant Science* 14:171–179. doi: 10.1016/j.tplants.2008.12.002
- Hey SJ, Byrne E, Halford NG (2010) The interface between metabolic and stress signalling. *Annals of Botany* 105:197–203. doi: 10.1093/aob/mcp285
- Hrabak EM, Chan CWM, Gribskov M, et al. (2003) The *Arabidopsis* CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. *Plant Physiology* 132:666–680. doi: 10.1104/pp.102.011999.666
- Irvine RF, Schell MJ (2001) Back in the Water: The Return of The Inositol Phosphates. *Nature reviews Molecular cell biology* 2:327–338.
- Ischebeck T, Heilmann I (2010) PIP-Kinases as Key Regulators of Plant Function. In: Munnik T (ed) *Lipid Signaling in Plants*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 79–93
- Kaminski N (2000) Bioinformatics: A User's Perspective. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:705–711.
- Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, et al. (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *The Plant cell* 13:889–905.

- Kido EA, Barbosa PKDA, Neto JRCF, et al. (2011) Identification of plant protein kinases in response to abiotic and biotic stresses using SuperSAGE. *Current protein & peptide science* 12:643–56.
- Kido ÉA, Ferreira Neto JRC, Silva RLDO, et al. (2012) New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by superSAGE. *The Scientific World Journal* 2012:ID 821062. doi: 10.1100/2012/821062
- Kim T-H, Ryu G-M, Koh I, Park J (2001) Toward an Ontological Classification and Mapping of Bioinformatics Fields. *Genome Informatics* 12:475–477.
- Kitchen J, Saunders RE, Warwicker J (2008) Charge environments around phosphorylation sites in proteins. *BMC Structural bBology* 8:19. doi: 10.1186/1472-6807-8-19
- Kitsios G, Doonan JH (2011) Cyclin dependent protein kinases and stress responses in plants. *Plant signaling & behavior* 6:204–209. doi: 10.4161/psb.6.2.14385
- König S, Mosblech A, Heilmann I (2007) Stress-inducible and constitutive phosphoinositide pools have distinctive fatty acid patterns in *Arabidopsis thaliana*. *The FASEB Journal* 21:1958–1967. doi: 10.1096/fj.06-7887com
- Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* 63:1593–1608. doi: 10.1093/jxb/err460
- Lehti-Shiu MD, Shiu S-H (2012) Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical transactions of the Royal Society of London B* 367:2619–2639. doi: 10.1098/rstb.2012.0003
- Lehti-Shiu MD, Zou C, Hanada K, Shiu S-H (2009) Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiology* 150:12–26. doi: 10.1104/pp.108.134353
- Lembke CG, Nishiyama MY, Sato PM, et al. (2012) Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. *Plant molecular biology* 79:461–77. doi: 10.1007/s11103-012-9922-1
- Leonardi R, Zhang Y-M, Rock CO, Jackowski S (2005) Coenzyme A: Back in Action. *Progress in Lipid Research* 44:125–153. doi: 10.1016/j.plipres.2005.04.001
- Leustek T, Saito K (1999) Sulfate Transport and Assimilation in Plants. *Plant Physiology* 120:637–643.
- Liao J-L, Zhang H-Y, Liu J-B, et al. (2012) Identification of candidate genes related to rice grain weight under high-temperature stress. *Plant Science* 196:32–43. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.07.013
- Lillig C, Schiffmann S, Berndt C, et al. (2001) Molecular and catalytic properties of *Arabidopsis thaliana* adenylyl sulfate (APS)-kinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 392:303–310. doi: 10.1006/abbi.2001.2453
- Ling Y, Du Z, Zhang Z, Su Z (2010) ProFITS of maize: a database of protein families involved in the transduction of signalling in the maize genome. *BMC Genomics* 11:580. doi: 10.1186/1471-2164-11-580
- Lister R, Gregory BD, Ecker JR (2009) Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes, and beyond. *Current Opinion in Plant Biology* 12:107–118. doi: 10.1016/j.pbi.2008.11.004
- Liu T, Zhang L, Yuan Z, et al. (2013) Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. *Acta Physiol Plant* 35:501–513. doi: 10.1007/s11738-012-1092-x

- Lopes MS, Araus JL, Van Heerden PDR, Foyer CH (2011) Enhancing drought tolerance in C(4) crops. *J. Exp. Bot.* 62:3135–53.
- Lou Y, Gou J, Xue H (2007) PIP5K9, an Arabidopsis Phosphatidylinositol Monophosphate Kinase, Interacts with a Cytosolic Invertase to Negatively Regulate Sugar-Mediated Root Growth. *The Plant Cell* 19:163–181. doi: 10.1105/tpc.106.045658
- Lunn JE (2007) Compartmentation in plant metabolism. *Journal of experimental botany* 58:35–47. doi: 10.1093/jxb/erl134
- Luscombe NM, Greenbaum D, Gerstein M (2001) What is bioinformatics? An introduction and overview. *Yearbook of Medical Informatics* 83–100.
- Machado DFSP, Lagôa AMMA, Ribeiro RV, et al. (2013) Baixa temperatura noturna e deficiência hídrica na fotossíntese de cana-de-açúcar. *Pesq. Agropec. Bras.* 48:487–495.
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S (2002a) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *TRENDS in Biochemical Sciences* 27:514–520.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. (2002b) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912–1934. doi: 10.1126/science.1075762
- Martinez M (2011) Plant protein-coding gene families: emerging bioinformatics approaches. *Trends in Plant Science* 16:558–567. doi: 10.1016/j.tplants.2011.06.003
- Mastrangelo AM, Belloni S, Barilli S, et al. (2005) Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. *Planta* 221:705–715. doi: 10.1007/s00425-004-1475-3
- Matsumura H, Ito A, Saitoh H, et al. (2005) SuperSAGE. *Cellular Microbiology* 7:11–18. doi: 10.1111/j.1462-5822.2004.00478.x
- Matsumura H, Reich S, Ito A, et al. (2003) Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:15718–23. doi: 10.1073/pnas.2536670100
- Matsumura H, Yoshida K, Luo S, et al. (2010) High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. *PloS one* 5:e12010. doi: 10.1371/journal.pone.0012010
- Menossi M, Silva-Filho MC, Vincentz M, et al. (2008) Sugarcane Functional Genomics: Gene Discovery for Agronomic Trait Development. *International Journal of Plant Genomics*. doi: 10.1155/2008/458732
- Mérida I, Avila-Flores A, Merino E (2008) Diacylglycerol kinases: at the hub of cell signalling. *Biochemical Journal* 409:1–18. doi: 10.1042/BJ20071040
- Van der Merwe MJ, Groenewald J-H, Stitt M, et al. (2010) Downregulation of pyrophosphate: D-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase activity in sugarcane culms enhances sucrose accumulation due to elevated hexose-phosphate levels. *Planta* 231:595–608. doi: 10.1007/s00425-009-1069-1
- Ming R, Liu SC, Lin YR, et al. (1998) Detailed alignment of Saccharum and Sorghum chromosomes: comparative organization of closely related diploid and polyploid genomes. *Genetics* 150:1663–1682.
- Miranda-Saavedra D, Barton GJ (2007) Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins* 68:893–914. doi: 10.1002/prot

- Mochida K, Shinozaki K (2011) Advances in Omics and Bioinformatics Tools for Systems Analyses of Plant Functions. *Plant & Cell Physiology* 52:2017–2038. doi: 10.1093/pcp/pcr153
- Moffatt B a, Wang L, Allen MS, et al. (2000) Adenosine kinase of Arabidopsis. Kinetic properties and gene expression. *Plant physiology* 124:1775–1785.
- Moons a, Valcke R, Van Montagu M (1998) Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C3 plant. *The Plant Journal* 15:89–98.
- Mugford SG, Yoshimoto N, Reichelt M, et al. (2009) Disruption of adenosine-5'-phosphosulfate kinase in Arabidopsis reduces levels of sulfated secondary metabolites. *The Plant Cell* 21:910–927. doi: 10.1105/tpc.109.065581
- Munnik T, Irvine RF, Musgrave A (1998) Phospholipid signalling in plants. *Biochimica et biophysica acta* 1389:222–272.
- Munnik T, Nielsen E (2011) Green light for polyphosphoinositide signals in plants. *Current opinion in plant biology* 14:489–97. doi: 10.1016/j.pbi.2011.06.007
- Mutuku JM, Nose A (2012) Changes in the contents of metabolites and enzyme activities in rice plants responding to *Rhizoctonia solani* Kuhn infection: activation of glycolysis and connection to phenylpropanoid pathway. *Plant & cell physiology* 53:1017–1032. doi: 10.1093/pcp/pcs047
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, et al. (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* 320:1344–9. doi: 10.1126/science.1158441
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. *Plant Physiology* 149:88–95. doi: 10.1104/pp.108.129791
- Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 5th ed. 1100.
- Ogawa T, Nishimura K, Aoki T, et al. (2009) A Phosphofructokinase B-Type Carbohydrate Kinase Family Protein, NARA5, for Massive Expressions of Plastid-Encoded Photosynthetic Genes in Arabidopsis. *Plant Physiology* 151:114–128. doi: 10.1104/pp.109.139683
- Oliveros, JC (2007) VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. <<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>>
- Park J, Gupta RS (2008) Adenosine kinase and ribokinase - the RK family of proteins. *Cell Mol Life Sci* 65:2875–2896. doi: 10.1007/s00018-008-8123-1
- Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W (2005) Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences* 62:685–707. doi: 10.1007/s00018-004-4513-1
- Pinheiro DG (2009) Desenvolvimento de uma Plataforma Integrativa para Depuração e Análise de Dados de Expressão Gênica. 125.
- Plaxton WC (1996) the Organization and Regulation of Plant Glycolysis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47:185–214. doi: 10.1146/annurev.arplant.47.1.185
- Raboy V, Bowen D (2006) Genetics of Inositol Polyphosphates. In: Majumder AL, Biswas BB (eds) *Biology of Inositols and Phosphoinositides*. pp 71–102
- Ravilious GE, Nguyen A, Francois JA, Jez JM (2012) Structural basis and evolution of redox regulation in plant adenosine-5'-phosphosulfate kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109:309–314. doi: 10.1073/pnas.1115772108

- Ravilious GE, Westfall CS, Jez JM (2013) Redox-linked gating of nucleotide binding by the N-terminal domain of adenosine 5'-phosphosulfate kinase. *The Journal of biological chemistry* 288:6107–15. doi: 10.1074/jbc.M112.439414
- Rocha FR, Papini-Terzi FS, Nishiyama Jr MY, et al. (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. *BMC genomics* 8:71. doi: 10.1186/1471-2164-8-71
- Rodrigues FA, Laia ML de, Zingaretti SM (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science* 176:286–302. doi: 10.1016/j.plantsci.2008.11.007
- Roy SJ, Tucker EJ, Tester M (2011) Genetic analysis of abiotic stress tolerance in crops. *Current Opinion in Plant Biology* 14:232–239. doi: 10.1016/j.pbi.2011.03.002
- Rubbo S Di, Russinova E (2012) Receptor-Mediated Endocytosis in Plants. In: Šamaj J (ed) *Endocytosis in Plants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 151–164
- Saha S, Sparks AB, Rago C, et al. (2002) Using the transcriptome to annotate the genome. *Nature biotechnology* 20:508–12. doi: 10.1038/nbt0502-508
- Samaj J, Read ND, Volkmann D, et al. (2005) The endocytic network in plants. *TRENDS in Cell Biology* 15:425–433. doi: 10.1016/j.tcb.2005.06.006
- Sauter M, Moffatt B, Saechao MC, et al. (2013) Methionine salvage and S-adenosylmethionine: essential links between sulfur, ethylene and polyamine biosynthesis. *The Biochemical Journal* 451:145–154. doi: 10.1042/BJ20121744
- Scheer M, Grote A, Chang A, et al. (2011) BRENDA, the enzyme information system in 2011. *Nucleic Acids Research* 39:D670–D676. doi: 10.1093/nar/gkq1089
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* 270:467–470.
- Schrapf M, Hedman A, Li W, et al. (2012) PIP Kinases from the Cell Membrane to the Nucleus. In: Balla T, Wymann M, York JD (eds) *Phosphoinositides I: Enzymes of Synthesis and Degradation*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 25–59
- Shears SB (2009) Diphosphoinositol Polyphosphates: Metabolic Messengers? *Molecular Pharmacology* 76:236–252. doi: 10.1124/mol.109.055897.interactions.
- Shinozaki K, Sakakibara H (2009) Omics and bioinformatics: an essential toolbox for systems analyses of plant functions beyond 2010. *Plant & cell physiology* 50:1177–1180. doi: 10.1093/pcp/pcp085
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *Journal of experimental botany* 58:221–227. doi: 10.1093/jxb/erl164
- Shiu S, Karlowski WM, Pan R, et al. (2004) Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in Arabidopsis and Rice. *The Plant Cell* 16:1220–1234. doi: 10.1105/tpc.020834.1
- Shiu SH, Bleecker a B (2001a) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98:10763–10768. doi: 10.1073/pnas.181141598

- Shiu SH, Bleecker a B (2001b) Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. *Science's STKE* re22. doi: 10.1126/stke.2001.113.re22
- Sikdar MSI, Kim J-S (2010) Functional analysis of a gene encoding threonine synthase from rice. *African Journal of Biotechnology* 9:1122–1129.
- Silva R, Neto JF, Pandolfi V, et al. (2011) Transcriptomics of Sugarcane Osmoprotectants Under Drought. In: Vasanthaiah DH (ed) *Plants and Enviroment*. InTech, pp 89–114
- Tai FJ, Yuan ZL, Wu XL, et al. (2011) Identification of membrane proteins in maize leaves, altered in expression under drought stress through polyethylene glycol treatment. *Plant Omics Journal* 4:250–256.
- Takahara K, Kasajima I, Takahashi H, et al. (2010) Metabolome and photochemical analysis of rice plants overexpressing Arabidopsis NAD kinase gene. *Plant Physiology* 152:1863–1873. doi: 10.1104/pp.110.153098
- Takahashi H, Kopriva S, Giordano M, et al. (2011) Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annual Review of Plant Biology* 62:157–184. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103921
- Tchieu JH, Fana F, Fink JL, et al. (2003) The PlantsP and PlantsT Functional Genomics Databases. *Nucleic Acids Research* 31:342–344. doi: 10.1093/nar/gkg023
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815. doi: 10.1038/35048692
- The Gene Ontology Consortium (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25:25–29.
- Trujillo LE, Sotolongo M, Menéndez C, et al. (2008) SodERF3, a Novel Sugarcane Ethylene Responsive Factor (ERF), Enhances Salt and Drought Tolerance when Overexpressed in Tobacco Plants. *Plant Cell Physiology* 49:512–525. doi: 10.1093/pcp/pcn025
- Tyagi N, Anamika K, Srinivasan N (2010) A framework for classification of prokaryotic protein kinases. *PloS one* 5:e10608. doi: 10.1371/journal.pone.0010608
- Urano K, Kurihara Y, Seki M, Shinozaki K (2010) “Omics” analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 13:132–138. doi: 10.1016/j.pbi.2009.12.006
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial Analysis of Gene Expression. *Science* 270:484–487.
- Wang C-T, Shao J-M (2013) Characterization of the ZmCK1 Gene Encoding a Calcium-Dependent Protein Kinase Responsive to Multiple Abiotic Stresses in Maize. *Plant Mol Biol Rep* 31:222–230. doi: 10.1007/s11105-012-0496-5
- Wang D, Harper JF, Gribskov M (2003) Systematic Trans-Genomic Comparison of Protein Kinases between *Arabidopsis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology* 132:2152–2165. doi: 10.1104/pp.103.021485.ferentiated
- Wang J, Roe B, Macmil S, et al. (2010) Microcollinearity between autopolyploid sugarcane and diploid sorghum genomes. *BMC Genomics* 11:261.
- Wang M, Yu D, Guo X, et al. (2011) Casein kinase 1-Like 3 is required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *African Journal of Biotechnology* 10:13219–13229. doi: 10.5897/AJB11.2086

- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews Genetics* 10:57–63. doi: 10.1038/nrg2484
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L (2007) Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiology* 144:1416–1428. doi: 10.1104/pp.107.101295
- Yamada T, Letunic I, Okuda S, et al. (2011) iPath2.0: interactive pathway explorer. *Nucleic Acids Research* 39:W412–W415. doi: 10.1093/nar/gkr313
- Yang S, Vanderbeld B, Wan J, Huang Y (2010) Narrowing down the targets: towards successful genetic engineering of drought-tolerant crops. *Mol. Plant* 3:469–490.
- Ye H, Li C, Bellgard M, et al. (2013) Genes Controlling Low Phytic Acid in Plants: Identifying Targets for Barley Breeding. In: Zhang G, Li C, Liu X (eds) *Advance in Barley Sciences: Proceedings of 11th International Barley Genetics Symposium*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 185–198
- Zhu J-Q, Zhang J-T, Tang R-J, et al. (2009) Molecular characterization of ThIPK2, an inositol polyphosphate kinase gene homolog from *Thellungiella halophila*, and its heterologous expression to improve abiotic stress tolerance in *Brassica napus*. *Physiologia plantarum* 136:407–425. doi: 10.1111/j.1399-3054.2009.01235.x
- Zhu L, Zhang J, Chen Y, et al. (2013) Identification and genes expression analysis of ATP-dependent phosphofructokinase family members among three *Saccharum* species. *Functional Plant Biology* 40:369–378. doi: 10.1071/FP12182

Curriculum vitae (Lattes)

Período: Março 2010 – Junho 2013

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3656040859428048>

Formação acadêmica/titulação

2011 - 2013 Mestrado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Análise Comparativa in Silico da Expressão Diferencial de Transcritos SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar, em Resposta ao Déficit Hídrico.
Orientador: Ederson Akio Kido
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Formação complementar

2013 - 2013 Learn to Program: Crafting Quality Code.
Coursera / University of Toronto (Online), COURSERA.ORG, Estados Unidos
Palavras-chave: Python

2012 - 2012 Learn to Program: The Fundamentals.
Coursera / University of Toronto (Online), COURSERA.ORG, Estados Unidos
Palavras-chave: Python, Linguagem de programação

2012 - 2012 Ferramentas de Bioinformática CBAB/CABBIO 2012.
Laboratório Nacional de Computação Científica, LNCC, Petrópolis, Brasil
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Palavras-chave: ferramentas de bioinformática, metagenômica, transcriptômica

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

Vínculo institucional

2011 - Atual	Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Mestranda , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
2008 - 2011	Vínculo: Estudante , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 20, Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Genética Molecular Vegetal
2. Melhoramento de plantas
3. Fisiologia Vegetal

Projetos

2011 - Atual Análise Comparativa In Silico da Expressão Diferencial de Transcritos SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar, em Resposta ao Déficit Hídrico

Descrição: Comparação in silico dos perfis de transcrição de potenciais quinases diferencialmente expressas em genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico (24 h de supressão de rega).

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Carolina Neves Correia (Responsável); Ederson Akio Kido.

2008 - 2011 Identificação de Genes de Cana-de-Açúcar Diferencialmente Expressos em Condições de Estresse Hídrico

Descrição: O projeto CTC - UFRJ - UFPE: visa traçar o perfil transcricional da cana-de-açúcar em resposta ao estresse hídrico, a partir de duas abordagens complementares: análise da expressão diferencial através da tecnologia SuperSAGE e estudo da regulação gênica por meio de microRNAs. Sub-projeto UFPE (coord: Kido, EA): aplicação da tecnologia SuperSAGE para a investigação proposta

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (1);

Integrantes: Carolina Neves Correia; Laureen Michelle Houllou Kido; Valesca Pandolfi; Ana Maria Benko Iseppon; Ederson Akio Kido; Günter Kahl; Tercilio Calsa Junior; Sérgio Crovella; Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira; Adriana Silva Hemerly; Sabrina Moutinho Chabregas; William Burnquist (Responsável); Maria Cristina Falco.

Financiadores: CTC - Centro de Tecnologia Canavieira-CTC, Financiadora de Estudos e Projetos-FINEP, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

2007 - 2011 Aumento da produtividade da cana-de-açúcar através da promoção do crescimento vegetal, resistência a estresses bióticos e abióticos e fixação biológica de nitrogênio

Descrição: Trata-se de projeto multiinstitucional que visa aumentar a produtividade da cultura da cana-de-açúcar em diversas regiões do Brasil utilizando-se de tecnologias de vanguarda para promover o crescimento vegetal, bem como aumentar a resistência a estresses bióticos e abióticos, otimizar a fixação biológica de nitrogênio e, possivelmente, a eficiência fotossintética e o conteúdo em sacarose. Visa também estabelecer colaborações entre Usinas e grupos de pesquisa detentores de conhecimentos multidisciplinares para aplicação biotecnológica na cultura. UFPE: Desenvolvimento, sequenciamento e bioinformática de bibliotecas SuperSAGE visando o estudo ao estresse salino (coord: Kido, EA).

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (2); Doutorado (10);

Integrantes: Carolina Neves Correia; Laureen Michelle Houllou Kido; Ana Maria Benko Iseppon; Ederson Akio Kido; Günter Kahl; Tercilio Calsa Junior; Sérgio Crovella; Paulo Cavalcanti Gomes Ferreira; Adriana Silva Hemerly; José Ivo Baldani (Responsável); Mauro Guida dos Santos; Manassés Daniel da Silva

Financiadores: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária-EMBRAPA, Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária-FEPAGRO, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro-UENF, Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ, Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS

2004 - 2011 Genômica Funcional, Estrutural e Comparativa de Feijão-caupi

Descrição: O projeto visa organizar uma rede de laboratórios da região nordeste do Brasil para efetuar uma análise genômica funcional e estrutural no feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) procurando identificar genes candidatos úteis para o melhoramento da cultura. Principais objetivos: 1. Construir bibliotecas de cDNA e sequenciar seqüências expressas (ESTs, Expressed Sequence Tags e SAGE, Serial Analysis of Gene Expression) a partir de bibliotecas contrastantes

para características de estresses bióticos (vírus, nematóides e caruncho) e abióticos (salinidade, seca, altas temperaturas); 2. Estruturar um banco de dados anotados das seqüências, bem como ferramentas para análise; 3. Estruturar uma rede de bioinformática que permita a análise detalhada das seqüências geradas, incluindo reconhecimento de domínios e padrões (motifs), análise de ORFs, alinhamento múltiplo, clusterização hierárquica, expressão in silico, etc; 4. Desenvolver mapa genético de alta resolução visando estudos de QTL; 5. Efetuar mapeamento fino e seqüenciamento direcionado às regiões genômicas relacionadas com a resistência aos vírus limitantes da produção no nordeste (vírus do mosaico severo e potyvírus); 6. Estabelecer protocolos de regeneração in vitro para posterior transformação genética para o feijão-de-corda. Vice-coordenador geral: Kido, EA.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (8); Mestrado acadêmico (2);

Integrantes: Carolina Neves Correia; Laureen Michelle Houllou Kido; Semiramis Jamil Hadad do Monte; Ana Maria Benko Iseppon (Responsável); Ederson Akio Kido; Antonio Vargas de Oliveira Figueira; Paulo Paes de Andrade; Luis Eduardo Aranha Camargo; Semiramis Rabelo Ramalho Ramos; Thalles Barbosa Grangeiro; Demetrius Antonio Machado de Araújo; Carlos Antonio Fernandes Santos; Francisco José Lima Aragão; Eliete Cavalcanti da Silva; Reginaldo de Carvalho; Cynthia Rayol

Financiadores: Banco do Nordeste do Brasil-BNB, Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP-CENA / USP, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-ESALQ/USP, Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco-FACEPE, Universidade Federal da Paraíba-UFPB, Universidade Federal do Ceará-UFC, Universidade Federal do Piauí-UFPI

Idiomas

Inglês	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem
Espanhol	Compreende Razoavelmente, Fala Pouco, Escreve Pouco, Lê Razoavelmente
Português	Compreende Bem, Fala Bem, Escreve Bem, Lê Bem

Prêmios e títulos

2011	Primeiro lugar do Prêmio MSc. Cybelle Cristina da Rocha Carvalho, I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE
-------------	--

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (completo)

1. SILVA, M. D., Silva, R. L. O., FERREIRA NETO, J. R. C., **CORREIA, C. N.** et al. ANÁLISE IN SILICO DE SUBFAMÍLIAS DE AQUAPORINAS EM CANA-DE- AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO VIA TECNOLOGIA SUPERSAGE In: II Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2012, Recife.
Anais da II Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE. , 2012.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MOURA, D. A. P., CARVALHO, M. W. P., SILVA, M. D. et al. Desenvolvimento de marcadores SSR para mapeamento genético do feijão-caupi In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, 2012, Petrolina.
Anais do XIX Encontro de Genética do Nordeste. , 2012.
2. **CORREIA, C. N.**, KIDO, E. A. Análise Comparativa In Silico da Expressão Diferencial de Transcritos SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar, em Resposta ao Déficit Hídrico In: I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011, Recife.
Anais da I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE. , 2011.

3. **CORREIA, C. N.**, SILVA, M. D., DANTAS, F. A. et al.
Identificação de Transcritos SuperSAGE, Relacionados a Proteínas Quinases, em Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*) Submetida a Condições de Seca In: XL Congresso Argentino de Genética, 2011, Corrientes.

Anais do XL Congresso Argentino de Genética. , 2011.

4. SILVA, M. D., **CORREIA, C. N.**, DANTAS, F. A. et al.
IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE TAGS SUPERSAGE DE AQUAPORINAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO In: XL Congresso Argentino de Genética, 2011, Corrientes.

Anais do XL Congresso Argentino de Genética. , 2011.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **CORREIA, C. N.**, KIDO, E. A.
Análise Comparativa In Silico da Expressão Diferencial de Transcritos SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar, em Resposta ao Déficit Hídrico., 2011. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Educação e Popularização de C&T

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras e olimpíadas

1. BALBINO, V. Q., BISPO, A. V. S., **CORREIA, C. N.**, BARROS, J. E. X. S. et al.
II Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2012. (Outro, Organização de evento)

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster / Painel na **I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE**, 2011. (Outra)
Análise Comparativa In Silico da Expressão Diferencial de Transcritos SuperSAGE de Proteínas Quinases em Cana-de-Açúcar, em Resposta ao Déficit Hídrico.

2. Apresentação de Pôster / Painel no **XL Congresso Argentino de Genética**, 2011. (Congresso)
Identificação de Transcritos SuperSAGE, Relacionados a Proteínas Quinases, em Cana-de-Açúcar (*Saccharum spp.*) Submetida a Condições de Seca.

Totais de produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos..... 5

Apresentações de trabalhos (Congresso)..... 1

Produção técnica

Outra produção técnica..... 1

Eventos

Participações em eventos (congresso)..... 2

Organização de evento (outro)..... 1