

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

**Manassés Daniel da Silva**

**Análise *in Silico* de Subfamílias de Aquaporinas em Cana-  
de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob Condições de Déficit  
Hídrico via Tecnologia SuperSAGE**

**Recife  
2013**

**Manassés Daniel da Silva**

**Análise *in Silico* de Subfamílias de Aquaporinas em  
Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob Condições de  
Déficit Hídrico via Tecnologia SuperSAGE**

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:** Prof. Dr. Éderson Akio Kido

**Recife**

**2013**

**Manassés Daniel da Silva**

**Análise *in Silico* de Subfamílias de Aquaporinas em Cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) sob Condições de Déficit Hídrico via Tecnologia SuperSAGE**

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora:**

---

**Dr<sup>a</sup>. Ana Maria Benko Iseppon**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr. Mauro Guida dos Santos**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup>. Valesca Pandolfi**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup>. Neide Santos**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

---

**Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Wanderley Nogueira**  
**Universidade Federal de Pernambuco**

**Recife**

**2013**

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente ao meu pai, **Tito Daniel da Silva**, por ter contribuído financeiramente, ter dado todo apoio psicológico e toda motivação necessários para conclusão desta etapa acadêmica.

Agradeço a minha mãe, **Zuleide Daniel da Silva**, pela paciência em me lembrar de todos os compromissos e horários, ajudando-me a ser sempre pontual.

Agradeço aos meus irmãos, **Ceel Daniel da Silva e Lucas Daniel da Silva** pelos incentivos, brincadeiras e estresses, que só os irmãos podem fornecer.

Agradeço ao **Dr. Prof. Éderson Akio Kido**, por me iniciar na ciência, elevar meu pensamento crítico e ter me orientado até o momento da entrega desta dissertação.

Agradeço à **Msc. Roberta Lane de Oliveira**, por ter me ajudado com a padronização das reações de PCR em Tempo Real.

Agradeço ao **Msc. José Ribamar da Costa Ferreira Neto**, pela orientação no desenho de primers e por várias dicas para a defesa desta dissertação.

Agradeço à **Dr<sup>a</sup>. Valesca Pandolfi**, por ter me ajudado na correção da metodologia.

Agradeço à **Carolina Neves Correia**, por ter me ajudado com as formatações desta dissertação e por ter me lembrado das reuniões com a coordenação da pós-graduação de genética.

Agradeço o suporte financeiro oferecido pelas agências de fomento: **CNPq, FINEP e CAPES.**

“A persistência é o menor caminho do êxito.”

(Charles Chaplin)

## Resumo

O presente trabalho, pioneiro em abordar especificamente o tema aquaporinas em transcriptomas de cana-de-açúcar, permitiu detectar representantes das quatro subfamílias de aquaporinas descritas em vegetais superiores (PIP, TIP, SIP e NIP), apresentando 43 isoformas distintas, oriundas de quatro bibliotecas SuperSAGE de raízes de genótipos tolerantes e sensíveis à seca. As subfamílias de aquaporinas com maiores níveis de transcritos em cana-de-açúcar foram PIP e TIP. Já as subfamílias SIP e NIP, além de menos abundantes, foram também menos responsivas ao estresse de supressão de rega (24 h). Ao menos 10 potenciais alvos distintos de isoformas de aquaporinas e suas respectivas *unitags* foram considerados promissores para estudos futuros, com potencial para desenvolvimento de marcadores moleculares para uso no melhoramento genético. Desses, quatro mostraram respostas exclusivas e diferencialmente significativas e divergentes entre os *bulks* de genótipos tolerantes e sensíveis quando comparado nas condições de estresse e controle. Tomando por base a expressão dessas isoformas nos genótipos tolerantes, a maioria foi reprimida sob estresse (SoPIP2-4, SoPIP2-6, OsPIP2-4), com exceção da SsPIP1-1 (induzida). Foi também proposto um protocolo para validar a expressão das *unitags* via RTqPCR, bem como pares de *primers* (5) funcionais como genes de referência, além de dois outros propostos para aquaporinas, tendo-se validado os dados de SuperSAGE para os alvos SsPIP1-1 e SoPIP1-3/PIP1-4, com genótipos pertencentes aos *bulks* tolerante ou sensível ao estresse.

**Palavras-chave:** aquaporinas; cana-de-açúcar; perfil transcricional; SuperSAGE; RTqPCR.

## Abstract

In the present work, a pioneer study was carried out, specifically addressing the aquaporins in sugarcane transcriptomes derived from SuperSAGE transcriptional profiling of roots with tolerant and sensitive genotypes to 24 h irrigation suppression, allowed detection of representatives from the four aquaporin subfamilies described in higher plants (PIP, TIP, SIP and NIP) highlighting 43 distinct isoforms. The aquaporins subfamilies with higher transcription levels in sugarcane were PIP and TIP. The SIP and NIP subfamilies besides being less transcribed, were also less responsive to the irrigation suppression (24 h) stress. At least 10 potential aquaporins distinct isoforms targets and their unitags were considered promising for future studies, with potential to develop molecular markers for use in breeding. Four of these showed unique responses and were differentially significant and divergent among the tolerant and sensitive genotypes bulks when compared under stress and non-stressed control conditions. Based on these isoforms expression in tolerant genotypes, the majority was repressed under stress (SoPIP2-4, SoPIP2-6, OsPIP2-4), except for the overexpressed SsPIP1-1. It was also proposed a protocol to validate the unitags expressions via RTqPCR as well as primer pairs (5) functioning as reference genes, in addition to two other proposed aquaporins, having been validated data for targets SuperSAGE SsPIP1-1 and SoPIP1-3/PIP1-4 with genotypes from bulks tolerant or sensitive to stress.

**Key words:** aquaporins; sugarcane; transcriptional profile; SuperSAGE; RTqPCR.

## Lista de Ilustrações

- Figura 1.** Fluxograma da técnica SuperSAGE. Traduzido de Matsumura *et al.* (2008).....11
- Figura 2.** Topografia geral das aquaporinas (a), demonstrando a formação do poro constituído de dois motivos NPAs de um monômero que forma, com outros três monômeros, um tetrâmero com quatro subunidades assimétricas e quatro canais de água (b). Traduzido de Jung *et al.* (1994)..... 15
- Figura 3.** Localização do filtro ar/R de seletividade das aquaporinas. Traduzido de Wallace e Roberts (2004).....16
- Figura 4.** Árvore filogenética da família de aquaporinas de *Arabidopsis thaliana* apresentando as 35 isoformas de aquaporinas e seu agrupamento em quatro subfamílias. Fonte: Maurel (2007)..... 18
- Figura 5.** Totais e percentuais dos resultados de anotação de *unitags* SuperSAGE de cana-de-açúcar (supressão de rega por 24 h e controle) e de categorização de ESTs, na identificação de prováveis transcritos de aquaporinas, após uso de palavras-chave (“*aquaporin*”, “*tonoplast intrinsic protein*”, “PIP”, “TIP”, “NIP”, “SIP” e “*water transport*”)......35
- Figura 6.** Representatividade (total e percentual) das subfamílias de aquaporinas expressas em cana-de-açúcar durante supressão de rega por 24 h (a, b e c) e em condições normais de rega (d), envolvendo *bulks* de genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse. Bibliotecas SuperSAGE: SD24T (*bulk* tolerante sob estresse; SD24S (*bulk* sensível sob estresse); SDTC (*bulk* tolerante controle); SDSC (*bulk* sensível controle).....45
- Figura 7.** Diagramas de Venn com a distribuição das prováveis isoformas de

aquaporinas expressas em cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h (A, B, e C) ou condições controle (D). Bibliotecas SuperSAGE: SD24T (*bulk* tolerante sob estresse; SD24S (*bulk* sensível sob estresse); SDTC (*bulk* tolerante sob condições controle); SDSC (*bulk* sensível controle).....48

**Figura 8.** Quantificação relativa das prováveis isoformas SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) (A) e SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548) (B), na comparação entre o *bulk* de genótipos tolerantes à seca de cana-de-açúcar estressados (supressão de rega 24 h) com o *bulk* de mesmos genótipos na situação controle, utilizando-se como genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).....54

**Figura 9.** Quantificação relativa das prováveis isoformas SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) (A) e SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548) (B), na comparação entre o *bulk* de genótipos sensíveis à seca de cana-de-açúcar estressados (supressão de rega 24 h) com o *bulk* de mesmos genótipos na situação controle, utilizando-se como genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).....55

**Figura 10.** Quantificações relativas para aquaporina SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) obtidas a partir de cDNAs de genótipos tolerantes à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC6, (B) CTC15, (C) SP83-2847 e (D) SP83-5073] na condição de estresse

(supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%). .....57

**Figura 11.** Quantificações relativas para aquaporina SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548) obtidas a partir de cDNAs de genótipos tolerantes à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC6, (B) CTC15, (C) SP83-2847 e (D) SP83-5073] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).....58

**Figura 12.** Quantificações relativas para aquaporina SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) obtidas a partir de cDNAs de genótipos sensíveis à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC9, (B) CTC13, (D) SP90-1638 e (D) SP90-3414] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%). .....59

**Figura 13.** Quantificações relativas para aquaporina SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag*

SD231548) obtidas a partir de cDNAs de genótipos sensíveis à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC9, (B) CTC13, (D) SP90-1638 e (D) SP90-3414] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).....60

## Lista de Tabelas

- Tabela 1.** Bancos públicos de ESTs de gramíneas utilizados na anotação das *tags* SuperSAGE de aquaporinas – provenientes de genótipos contrastantes (tolerantes e sensíveis a seca) de cana-de-açúcar, sob seca (24 h após supressão de rega) ou não (controle), ordenados pela proximidade taxonômica.....29
- Tabela 2.** Detalhes dos bancos de ESTs (espécie, total de ESTs, anotações envolvendo aquaporinas) usados na anotação de *unitags* SuperSAGE oriundas de *bulks* de genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico (24 h de supressão de rega) e controle, com resultados de alinhamentos BLASTn e totais de *unitags* e ESTs relacionadas após retirada de redundância por banco. .34
- Tabela 3.** Relação das 30 *unitags* de prováveis aquaporinas anotadas mais expressas, por biblioteca SuperSAGE normalizada (1.000.000), em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar em condições de supressão de rega (24 horas) ou controle.....36
- Tabela 4.** Perfil transcricional de *unitags* SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (domínio *MIP superfamily*) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SD24T x SDTC] envolvendo *bulks* de genótipos tolerantes ao déficit hídrico sob estresse (24 h após supressão de rega) e sem estresse, e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da *unitag* na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle)......38
- Tabela 5.** Perfil transcricional de *unitags* SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (domínio *MIP superfamily*) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SD24S x SDSC] envolvendo *bulks* de genótipos sensíveis ao déficit hídrico sob estresse (24 h após supressão de rega) e sem

estresse, e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da <i>unitag</i> na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).....	39
<b>Tabela 6.</b> Perfil transcricional de <i>unitags</i> SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (respectivos domínios conservados) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SD24T x SD24S] envolvendo <i>bulks</i> de genótipos tolerantes <i>versus</i> sensíveis ao déficit hídrico sob estresse (24 h após supressão de rega), e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da <i>unitag</i> na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).....	41
<b>Tabela 7.</b> Perfil transcricional de <i>unitags</i> SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (respectivos domínios conservados) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SDTC x SDSC] envolvendo <i>bulks</i> de genótipos tolerantes <i>versus</i> sensíveis em condições controle (sem supressão de rega) e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da <i>unitag</i> na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).....	43
<b>Tabela 8.</b> <i>Unitags</i> anotadas para aquaporinas com respostas distintas quanto ao nível de expressão entre dois contrastes envolvendo bibliotecas SuperSAGE oriundas de genótipos tolerantes (SD24T vs SDTC) e sensíveis (SD24S vs SDSC) para supressão de rega (após 24 h) em cana-de-açúcar.....	49
<b>Tabela 9.</b> <i>Primers</i> para amplificação via RTqPCR, propostos de ESTs de aquaporinas de cana-de-açúcar, respectivas <i>unitags</i> SuperSAGE associadas e modulações das expressões gênicas (FC) observadas na biblioteca oriunda de genótipos tolerantes (supressão de rega, 24 h) sob estresse em relação ao controle, sem estresse. ....	51
<b>Tabela 10.</b> Teste de eficiência de <i>primers</i> de RTqPCR propostos para genes de cana-de-açúcar visando amplificação de amostras a partir de raízes.....	53

**Tabela 11.** Expressão relativa de duas aquaporinas, SsPIP1-1 (unitag SD264077) e SoPIP1-3/PIP1-4 (unitag SD231548), via técnica SuperSAGE (bibliotecas em *bulks*) e RTqPCR (tanto em *bulks* quanto em genótipos) feita a partir da comparação de cDNAs de genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à seca sob supressão de rega por 24 h com seus respectivos controles. ....56

## Lista de Abreviaturas e Siglas

Item	Definição
ABA	ácido abscísico
ar/R	<i>aromatic / arginine constriction</i> (Constricção arginina / aromática)
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta básica de busca de alinhamento local)
BLASTn	<i>nucleotide BLAST</i> (BLAST de nucleotídeos)
BLASTx	<i>Search protein database using a translated nucleotide BLAST</i> (BLAST com busca por proteínas utilizando nucleotídeos traduzidos em aminoácidos)
cDNA	<i>complementary DNA</i> (DNA complementar)
CHIP28	<i>channel-forming integral protein of 28 kDa</i> (proteína de 28 kilo Daltons formadora de canal)
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
Ct	<i>Threshold Cycle</i> (Ciclo Limiar)
CTC	Centro de Tecnologia Canavieira
Cu <sup>+</sup>	Cátion de cobre
DNA	<i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)
DREB	<i>element-binding factor of dehydration-responsive</i> (elemento de ligação ao fator responsivo à desidratação)
Hv	<i>Hordeum vulgare</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> (Etiquetas de sequências expressas)
Fa	<i>Festuca arundinacea</i>
FC	<i>Fold Change</i> (Modulação da expressão)
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GIP	<i>GlpF-like intrinsic proteins</i> (proteínas GlpF intrínsecas)
GO	<i>Gene Ontology</i> (Ontologia gênica)
HIP	<i>hybrid intrinsic proteins</i> (proteínas intrínsecas híbridas)
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
LEA	<i>Late-Embryogenesis-Abundant</i> (abundantes no final da embriogênese)
MIP	<i>major intrinsic protein</i> (principais proteínas intrínsecas)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
RNAi	<i>interference RNA</i> (RNA de interferência)

mRNA	<i>Messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
*OH	radical hidroxila
Os	<i>Oryza sativa</i>
Pv	<i>Panicum virgatum</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	potencial hidrogeniônico
pI	Ponto isoelétrico
PIP	<i>plasma membrane intrinsic protein</i> (proteínas intrínsecas à membrana plasmática)
NaCl	cloreto de sódio
NIP	<i>nodulin-26-like intrinsic protein</i> (Proteínas de 26 kDa intrínsecas ao nódulo)
RB	RIDESA
RIDESA	Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucoenergético
RTqPCR	<i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reação quantitativa da transcrição reversa em cadeia da polimerase)
So	<i>Saccharum officinarum</i>
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i> (análise serial da expressão gênica)
Ss	<i>Saccharum</i> spp.
SDSC	Biblioteca SuperSAGE do <i>bulk</i> de genótipos sensíveis ao estresse sob condições controle
SD24S	Biblioteca SuperSAGE do <i>bulk</i> de genótipos sensíveis ao estresse sob condições de estresse (supressão de rega de 24 h)
SDTC	Biblioteca SuperSAGE do <i>bulk</i> de genótipos tolerantes ao estresse sob condições controle
SD24T	Biblioteca SuperSAGE do <i>bulk</i> de genótipos tolerantes ao estresse sob condições de estresse (supressão de rega de 24 h)
SIP	<i>small basic intrinsic protein</i> (pequenas proteínas intrínsecas básicas)
SuperSAGE	<i>Super Serial Analysis of Gene Expression</i> (super análise serial da expressão gênica)
TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i> (proteínas intrínsecas ao tonoplasto)
Ta	<i>Triticum aestivum</i>
UNICA	União da Indústria da Cana-de-Açúcar
Zm	<i>Zea mays</i>

## Sumário

Resumo .....	v
Abstract.....	vi
Lista de Ilustrações .....	vii
Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	xiv
1. Introdução.....	1
2. Revisão da Literatura .....	4
2.1 A cultura cana-de-açúcar: taxonomia, utilização e produção. ....	4
2.2. Melhoramento da cana-de-açúcar .....	6
2.3. O déficit hídrico.....	8
2.4. Análises globais da expressão gênica .....	9
2.5. Aquaporinas .....	13
2.5.1. Características moleculares das aquaporinas .....	14
2.5.2. Aquaporinas vegetais .....	16
2.5.2.1. Sub-família PIP .....	19
2.5.2.2. Sub-família TIP .....	19
2.5.2.3. Sub-família NIP .....	20
2.5.2.4. Sub-família SIP .....	21
2.5.3. Mecanismos moleculares de regulação da atividade das aquaporinas vegetais.....	22
3. Objetivos .....	26
3.1. Geral.....	26
3.2. Específicos .....	26

<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>27</b>
<b>4.1. Material vegetal e confecção das bibliotecas SuperSAGE .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2. Análise estatística das <i>unitags</i> SuperSAGE .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3. Anotação e categorização das <i>unitags</i> SuperSAGE associadas às ESTs de aquaporinas .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4. Identificação <i>in silico</i> de prováveis aquaporinas.....</b>	<b>30</b>
<b>4.5. Síntese de cDNA, desenho de <i>primers</i> e reações de RTqPCR .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>33</b>
<b>5.1. Mineração de aquaporinas em <i>unitags</i> SuperSAGE anotadas .....</b>	<b>33</b>
<b>5.2. Perfil transcricional das aquaporinas em cana-de-açúcar.....</b>	<b>36</b>
<b>5.3. <i>Unitags</i> diferencialmente expressas entre os genótipos contrastantes .....</b>	<b>49</b>
<b>5.4. RTqPCR: Desenho de <i>primers</i>, padronização das reações e teste de validação da expressão.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Discussão .....</b>	<b>61</b>
<b>6.1. Aquaporinas em cana-de-açúcar.....</b>	<b>61</b>
<b>6.2. Anotação das <i>tags</i> via BLASTn contra ESTs de bancos públicos de gramíneas.....</b>	<b>61</b>
<b>6.3. A categorização como alternativa para maximizar a identificação de transcritos .....</b>	<b>63</b>
<b>6.4. Perfil Transcricional das Aquaporinas de Cana-de-açúcar .....</b>	<b>63</b>
<b>6.4.1. Abundância das subfamílias de aquaporinas de cana-de-açúcar expressas durante o déficit hídrico e o nível da modulação da transcrição.....</b>	<b>64</b>
<b>6.4.2. Isoformas identificadas no contraste SD24T vs SDTC.....</b>	<b>66</b>

6.4.3. Isoformas identificadas no contraste SD24S vs SDSC.....	68
6.4.4. Isoformas presentes nos contrastes SD24T vs SD24S e SDTC vs SDSC .....	69
6.4.5. Alvos com resposta diferencial entre os genótipos contrastantes .....	71
6.5. Padronização das reações de RTqPCR: testes de primers de aquaporinas e genes de referência .....	73
7. Conclusões .....	77
8. Bibliografia.....	79
9. Curriculum vitae (Lattes) .....	90

## 1. Introdução

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma importante gramínea de propagação vegetativa pertencente ao gênero *Saccharum*, tribo Andropogoneae e família Poaceae. A grande importância econômica dessa cultura é devida as suas múltiplas utilidades: sendo empregada *in natura*, como ração animal; ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente e, principalmente, açúcar e álcool. Seus resíduos também são empregados na agricultura e indústria – o vinhoto é transformado em adubo, e o bagaço em combustível.

A deficiência hídrica é um dos estresses ambientais responsáveis por maiores danos à produção da cana-de-açúcar. A questão é ainda mais grave na região Nordeste do Brasil, que possui baixa precipitação e alto déficit hídrico. Portanto, o desenvolvimento de genótipos de *Saccharum* spp. tolerantes à seca está estritamente relacionado à sustentabilidade e à viabilidade econômica da cultura.

Apesar dos avanços do melhoramento convencional, informações genéticas e moleculares sobre os mecanismos de tolerância à seca e sua herança são ainda limitadas e a integração de ferramentas biotecnológicas aos programas de melhoramento é fundamental para suprir essas limitações. Com o avanço dos estudos de expressão gênica em larga escala (ex.: microarranjo de cDNA) vários genes têm sido identificados e constituem alvos potenciais para engenharia genética. Entre eles estão proteínas com provável função na tolerância a estresse, como as enzimas requeridas para biossíntese de osmólitos, chaperonas, proteínas LEA (*Late-Embryogenesis-Abundant*), proteínas de ligação

a mRNA, transportadores de prolina e açúcares, enzimas de detoxificação e proteases. Também há reguladores de transdução de sinais e expressão gênica, como proteínas quinases, fatores transcricionais e enzimas do metabolismo de fosfolipídeos.

A complexidade das respostas das plantas ao estresse hídrico sugere que um grande número de genes participa das vias de resposta ao estresse, criando a necessidade de tecnologias cada vez mais aprimoradas. Desde que milhares de *tags* de 26 pares de bases (pb) são sequenciados em um mesmo experimento SuperSAGE (*Super Serial Analysis of Gene Expression*), um compreensivo padrão do transcriptoma é gerado. Essa tecnologia possibilita análises qualitativas e quantitativas do transcriptoma de um ou mais genomas de eucariotos, a partir da mudança da frequência de, teoricamente, todo mRNA possuidor de cauda poli-A.

As aquaporinas ou *Major Intrinsic Protein* (MIPs) são canais de água das membranas celulares que desempenham papel crucial no controle do conteúdo hídrico nas células e nos tecidos. Essas proteínas de membrana atuam como componentes centrais nas relações hídricas das plantas, pois facilitam a osmose por formar poros altamente específicos para o transporte bidirecional de água. Além das relações hídricas, estas proteínas também estão envolvidas em muitos outros processos importantes no metabolismo vegetal, incluindo: aquisição de nutrientes, fixação de carbono, sinalização celular e respostas aos diversos estresses. As MIPs também têm a capacidade de transportar pequenas moléculas como glicerol, ureia, CO<sub>2</sub>, amônia, boro, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e até mesmo arsênio. As aquaporinas das plantas superiores estão filogeneticamente subdivididas em quatro principais subfamílias, PIP (*Plasma membrane intrinsic proteins*), TIP

(*Tonoplast intrinsic proteins*), SIP (*Small basic intrinsic proteins*) e NIP (*Nodulin26-like intrinsic proteins*). A extensa presença desses canais nos organismos vivos, incluindo humanos, plantas, bactérias, arqueobactérias, insetos e fungos, é explicada pela função vital da regulação do conteúdo hídrico celular.

O presente trabalho pretende contribuir para um maior entendimento dos processos envolvidos na resposta da cana-de-açúcar à seca através da análise do perfil de transcrição do seu genoma em resposta ao déficit hídrico, visando à identificação de potenciais aquaporinas diferencialmente expressas em genótipos contrastantes, para fins de desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 A cultura cana-de-açúcar: taxonomia, utilização e produção.

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma importante gramínea C4, de propagação vegetativa, com relevante habilidade de acumular elevados níveis de sacarose nos colmos (Welbaum and Meinzer, 1990, Rae *et al.*, 2005, Dillon *et al.*, 2007). Pertencente ao gênero *Saccharum*, da tribo Andropogoneae e da família Poaceae (um dos principais táxons, sob o ponto de vista econômico, do reino vegetal). O complexo *Saccharum* spp. tem sua provável origem na Ásia Oriental apesar de outras pesquisas históricas apontarem as ilhas do oceano Pacífico no Sudeste Asiático como o seu berço (Vertuan, 2003, Dillon *et al.*, 2007, Souza e Lorenzi, 2008).

A cana-de-açúcar apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diploide que varia de 100 a 130 cromossomos, indicando uma alta taxa de poliploidia e aneuploidia, que pode ser explicada pelos cruzamentos interespecíficos entre *Saccharum officinarum*, *S. barbieri*, *S. sinense* e as espécies selvagens *S. spontaneum* e *S. robustum* (D'Hont *et al.*, 1996, Grivet e Arruda, 2002).

Essa cultura apresenta múltiplas utilidades, sendo empregada *in natura*, como ração animal, ou como matéria-prima para a fabricação de rapadura, melado, aguardente, açúcar e álcool. Seus resíduos também são empregados na agricultura e indústria – o vinhoto é transformado em adubo e o bagaço em combustível (Caputo *et al.*, 2008).

A produção dos vinte maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar

gerou no ano de 2011, aproximadamente, 1,7 bilhões de toneladas de matéria prima, resultando em um faturamento bruto de cerca de 52,5 bilhões de dólares (FAO, 2011). O Brasil, maior produtor mundial, processou cerca de 610 milhões de toneladas na safra 2009/2010, resultando em um faturamento bruto de aproximadamente US\$ 28 bilhões, sendo que das 34 milhões de toneladas de açúcar produzidas 61% foram destinadas à exportação, situação inversa à do etanol que reservou apenas 7 %, dos 27 bilhões de litros, para a exportação. No Brasil essa cultura gera aproximadamente 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos ocupando cerca de 7,8 milhões de hectares, representando apenas 3,5% da área agricultável (JORNAL CANA, 2011).

Estimou-se uma expansão de 621.505,5 hectares para a safra 2011/12 que representaria um incremento de quase 32 milhões de toneladas de cana-de-açúcar para o setor sucroenergético. Porém, apesar do crescimento em área cultivada, a lavoura de cana-de-açúcar apresentou nessa safra um desenvolvimento aquém do ideal e 8,3% inferior ao da safra anterior, o que resultou em uma produtividade menor que a estimada inicialmente pelos produtores. O clima foi o principal agente da queda na produtividade, consequência das chuvas escassas de abril até o mês de outubro de 2011 em toda região Sudeste e Centro-Oeste (as duas regiões mais produtoras do país), que também afetaram o final da colheita de 2012 da região Nordeste, reduzindo a brotação e o desenvolvimento da cultura, tanto nas áreas antigas como nas áreas de renovação e expansão (CONAB, 2012).

## **2.2. Melhoramento da cana-de-açúcar**

Devido à sua atuação na economia mundial, a cana-de-açúcar está constantemente inserida em programas de melhoramento que visam à introdução de características de interesse agrônomo, como resistência a pragas e patógenos, tolerância a herbicidas (Cidade *et al.*, 2006), incluindo também aumento no teor de sacarose, adaptabilidade à colheita mecanizada e alta probabilidade de adaptação a regiões nas quais o cultivo esteja em expansão (UNICA, 2012).

Os programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar são desenvolvidos em diferentes países, por instituições públicas e privadas, ou em cooperativas formadas por produtores. Atualmente existem no Brasil quatro grandes programas de melhoramento genético de cana-de-açúcar: (I) Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroalcooleiro (RIDESA, sigla RB), constituída de um convênio entre nove universidades federais (UFPR, UFSCar, UFV, UFRRJ, UFS, UFAL, UFRPE, UFG e UFMT), trata-se do maior programa de melhoramento da cana-de-açúcar brasileiro, sendo responsável por 58% das variedades cultivadas no país (RIDESA, 2012); (II) Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), fundado em 1969, em uma iniciativa de um grupo de usinas da região de Piracicaba, SP, com o objetivo de investir no desenvolvimento de variedades mais produtivas e agregar qualidade à produção de açúcar e álcool. Reestruturado em 2004, com o objetivo de se tornar o principal centro mundial de desenvolvimento e integração de tecnologias da indústria sucroenergética, tornando-se capaz de dobrar a taxa de inovação do setor. Novas variedades desenvolvidas pelo CTC possibilitaram a expansão dos canaviais brasileiros por

novos três milhões de hectares (CTC, 2012); (III) Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), precursor da pesquisa agrícola no Brasil, iniciou suas atividades em 1892, com Franz W. Dafert, cientista austríaco que desenvolveu o primeiro estudo envolvendo 42 variedades de canas nobres (*Saccharum officinarum*) em duas condições de cultivo. Nas décadas de 40 e 50, foram avaliados os primeiros genótipos desenvolvidos em Campos e Piracicaba, que resultaram nas primeiras variedades criadas no Brasil. Hoje o Centro conta com pesquisadores atuando nas diversas áreas do melhoramento genético, como a biotecnologia e áreas fitotécnicas (IAC, 2012) e (IV) CanaVialis (CV), empresa privada fundada em 2003 por meio de uma parceria entre a Votorantim Novos Negócios e um grupo de cientistas com mais de 30 anos de experiência no desenvolvimento de variedades da cana-de-açúcar. A CV tem contratos com 46 usinas de cana-de-açúcar, cuja área de produção soma 1,1 milhão de hectares, ou aproximadamente 15% do mercado. Após sua venda, em 2008 para a multinacional norte-americana de biotecnologia Monsanto, a CV continuou mantendo o cronograma de pesquisa, lançando, até o momento, três novas variedades no mercado (INOVA UNICAMP, 2012, CanaVialis, 2012).

O melhoramento genético da cana-de-açúcar demanda investimentos dispendiosos, com resultados obtidos em longo prazo, sendo necessários de 12 a 15 anos para o lançamento comercial de uma nova variedade (Landell *et al.*, 1999, Kimbeng e Cox, 2003). A complexidade genética e o baixo rendimento do laborioso melhoramento genético convencional torna a cana-de-açúcar um bom candidato para o melhoramento através da engenharia genética (Ingelbrecht, Irvine e Mirkov, 1999). Portanto, a identificação de genes responsáveis por características de interesse agrônomo e posterior manipulação utilizando

técnicas de biologia molecular podem proporcionar a obtenção de variedades superiores, reduzindo significativamente as perdas na agricultura, fornecendo maior produtividade, além de permitir a expansão do cultivo em solos até então não utilizáveis (Nogueira, 2004).

Apesar do sucesso de produção obtido em variedades de cana-de-açúcar advindas de programas de melhoramento genético convencional, o uso da engenharia genética se mostra como uma excelente oportunidade de obtenção de uma agricultura mais eficiente e com resultados obtidos em curto prazo.

### **2.3. O déficit hídrico**

Os estresses abióticos podem reduzir o potencial de produção das plantas cultivadas em até 70% e, dentre esses estresses, a seca é considerada como o mais prejudicial (Gosal *et al.*, 2009). A deficiência hídrica, devido à sua capacidade de afetar simultaneamente um número variado de características morfológicas e funcionais nas plantas, acaba se tornando uma limitação importante para a produção agrícola sustentável em todo o mundo (Silva *et al.*, 2008).

A redução de conteúdo hídrico celular em plantas provoca um complexo conjunto de respostas moleculares, que partem da percepção do estresse – culminando em cascatas de transdução de sinais – e se manifestam como alterações aos níveis celular, fisiológico e morfológico (Bray, 1993). Essas alterações incluem: fechamento dos estômatos, a repressão do crescimento celular e fotossíntese, além da ativação da respiração celular. As plantas em condições de seca ainda respondem e se aclimatam acumulando osmólitos e

proteínas especificamente envolvidas na tolerância ao estresse (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Os genes expressos durante a seca podem ser classificados em dois grupos funcionais, o primeiro grupo codifica proteínas que aumentam a tolerância da planta ao estresse. Codificando proteínas formadoras de canais de água (aquaporinas), transportadoras, proteinases e enzimas de detoxificação, todas com função protetora nas células. Esse grupo ainda contém as enzimas requeridas na biossíntese de osmólitos, como aminoácidos derivados, açúcares e muitas proteínas LEA (*Late-Embryogenesis-Abundant*). O segundo grupo inclui várias proteínas que possuem uma via regulatória, como fatores de transcrição, proteínas quinases, fosfatases, enzimas envolvidas no metabolismo de fosfolípidios e na biossíntese do ABA (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

#### **2.4. Análises globais da expressão gênica**

O sequenciamento total de um genoma não esclarece quais os mecanismos moleculares complexos envolvidos na regulação da expressão gênica. Essa etapa, conhecida como genômica estrutural, é apenas o início de um processo que visa compreender a função das estruturas ativas dos genomas. A segunda etapa, genômica funcional, consiste em utilizar as informações providas pela genômica estrutural para o desenvolvimento de abordagens metodológicas aplicadas na caracterização das funções gênicas (Hieter e Boguski, 1997).

Entre as tecnologias mais utilizadas para análises de expressão gênica, destacam-se os métodos baseados em hibridação – por exemplo: *complementary DNA (cDNA) microarrays* (Saha *et al.*, 1995) – e, especialmente, os métodos

baseados em sequenciamento – *Expressed Sequence Tag* (EST) (Adams *et al.*, 1991), *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) (Velculescu *et al.*, 1995) e suas versões aprimoradas a *Long Serial Analysis of Gene Expression* (LongSAGE) (Saha *et al.*, 2002) e a *Super Serial Analysis of Gene Expression* (SuperSAGE) (Matsumura *et al.*, 2003) e mais recentemente RNA-seq (Mortazavi, 2008).

As técnicas baseadas em sequenciamento utilizam a frequência observada de fragmentos dos transcritos expressos na amostra, obtidos a partir de clones de cDNA, que devem ser sequenciados, agrupados, contados e identificados. A abundância de fragmentos encontrados para um determinado gene pode fornecer uma estimativa de sua atividade na amostra estudada, além de possibilitar a descoberta de novos genes (Harbers e Carninci, 2005). Essas técnicas são consideradas técnicas de “plataforma aberta”, ou seja, permitem ter uma visão geral de quais são os genes que estão sendo expressos, sem a necessidade de seleção prévia que existe nos métodos baseados em hibridação (Pinheiro, 2009).

A SuperSAGE tem se destacado, dentre as técnicas de transcriptômicas baseadas em sequenciamento, por sua eficiência em gerar perfis de alta definição da transcrição. Nesta metodologia, é sintetizado cDNA a partir de um *primer* / adaptador dT. Após a digestão com a enzima, de corte frequente, *NlaIII* um segundo adaptador é ligado ao final do cDNA clivado. Posteriormente, os fragmentos com os adaptadores são digeridos pela *EcoP15I* (enzima de restrição do tipo III de corte a 26-27 pb da extremidade 3' do local de reconhecimento), e purificados via eletroforese de gel de poliacrilamida para posterior sequenciamento (Matsumura *et al.*, 2008) (Figura 1).

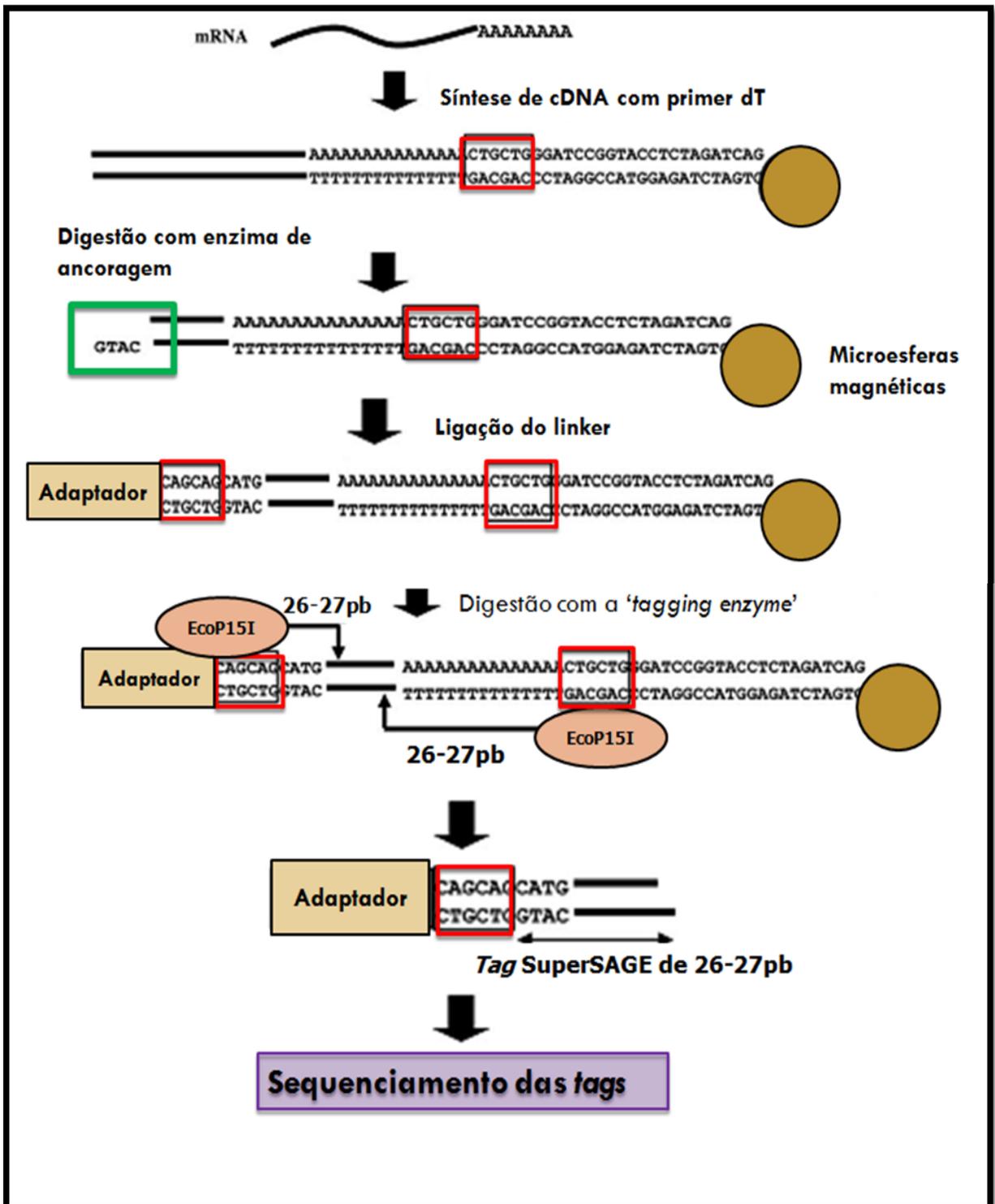


Figura 1. Fluxograma da técnica SuperSAGE. Traduzido de Matsumura *et al.* (2008).

Essa tecnologia possibilita análises qualitativas e quantitativas de padrões de transcrição de um ou mais genomas de eucariotos a partir da mudança da

frequência de, teoricamente, todo mRNA possuidor de cauda poliA (Matsumura *et al.*, 2004). O princípio dessa metodologia é baseado no pressuposto de que cada um de seus fragmentos (*tag*) contém informação suficiente para identificar univocamente um gene, considerando que essa *tag* é obtida de um único local do transcrito. A principal modificação da SuperSAGE em relação a SAGE é o tamanho do fragmento gerado, 14 pares de bases em SAGE e 26pb em SuperSAGE (Velculescu *et al.*, 1995; Matsumura *et al.*, 2003). O aumento para 26 pb no tamanho da *tag* melhora drasticamente a eficiência da identificação dos genes correspondentes às *tags* (Matsumura *et al.*, 2008), proporcionando novas aplicações à SuperSAGE, dentre as quais estão a observação simultânea de perfis da expressão gênica de duas ou mais espécies que estão interagindo (como por exemplo as interações de parasita e hospedeiro descritas por Matsumura *et al.*, 2003), a utilização dessas *tags* para produção de RNA de interferência *iRNA* (Matsumura *et al.*, 2004), o emprego de *tags* como *primers* para 3'RACE PCR (Matsumura *et al.*, 2003; 2004 e 2008) e para confecção de *chips microarray* que podem ser utilizados, assim como a RT-PCR, para validação do perfil gerado pela SuperSAGE (Matsumura *et al.*, 2004; Matsumura *et al.*, 2008).

A técnica SuperSAGE vem sendo aplicada com sucesso em muitas espécies vegetais, tais como, arroz (Matsumura *et al.*, 2003), banana (Coemans *et al.*, 2005), grão-de-bico (Molina *et al.*, 2008), feijão-caupi (Kido *et al.*, 2011) e cana-de-açúcar (Kido *et al.*, 2012).

## 2.5. Aquaporinas

As aquaporinas ou MIPs (*Major Intrinsic Protein* / principais proteínas intrínsecas) são canais de água das membranas celulares que desempenham papel crucial no controle do conteúdo hídrico celular e histológico (Fouquet *et al.*, 2008). Essas proteínas de membrana atuam como componentes centrais nas relações hídricas das plantas, pois facilitam a osmose por formar poros para o rápido transporte bidirecional de água (Tyerman *et al.*, 2002; Agre *et al.*, 2002). Além das relações hídricas, estas proteínas também estão envolvidas em muitos outros processos importantes no metabolismo vegetal, incluindo: aquisição de nutrientes, crescimento celular, fixação de carbono, sinalização celular e respostas aos diversos estresses (Maurel, 2007, Besse *et al.*, 2011).

As aquaporinas também transportam (além de água) pequenas moléculas como glicerol (Gerbeau *et al.*, 1999, Bienert *et al.*, 2011), ureia (Liu *et al.*, 2003), CO<sub>2</sub> (Uehlein *et al.*, 2003), amônia (Loqué *et al.*, 2005), boro (Dordas, Chrispeels e Brown, 2000, Takano *et al.*, 2006), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Henzler e Steudle, 2000, Dynowski *et al.*, 2008) e até mesmo arsênio (Bienert *et al.*, 2008).

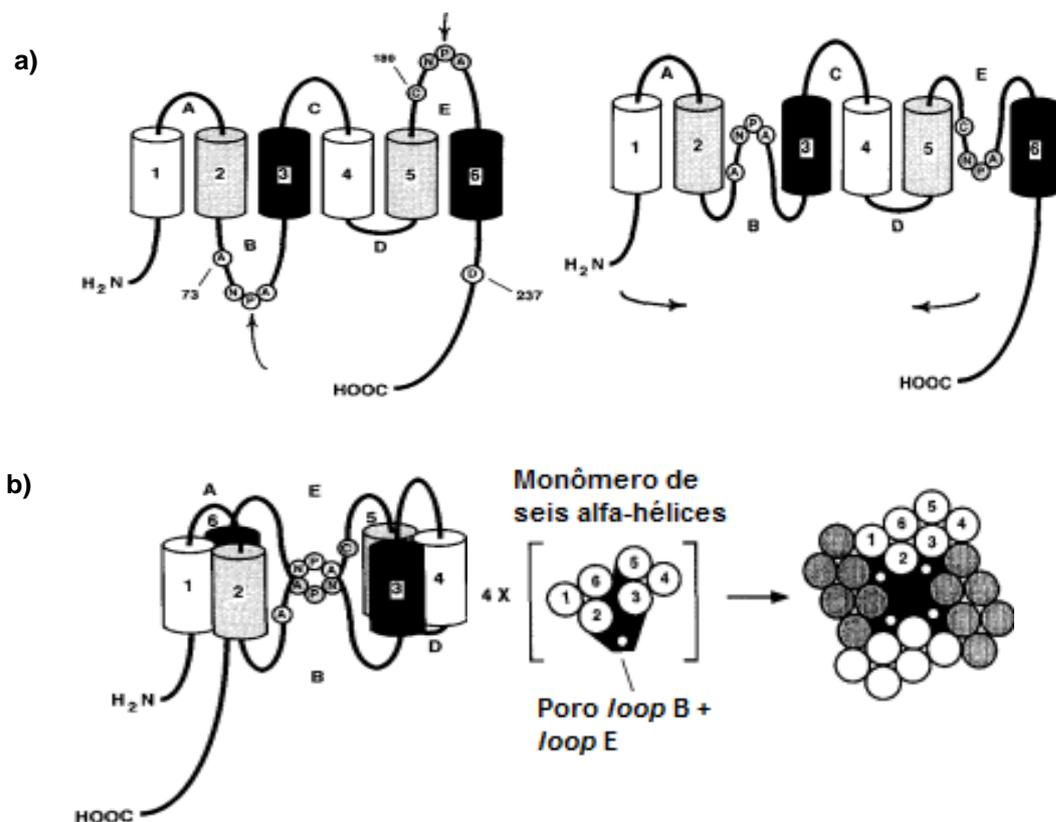
Essas proteínas foram primeiramente encontradas em bovinos, cujo nome da sequência do cDNA clonado (*Major Intrinsic Protein* - MIP) acabou nomeando a família das aquaporinas e, nessa época, os autores já especulavam que MIP poderia participar da formação de um canal aquoso (Gorin *et al.*, 1984). Posteriormente outros trabalhos identificaram membros da família MIP (uma proteína transmembranar (nod 26) presente na membrana peribacterióide de nódulos simbióticos de *Bradyrhizobium japonicum* com soja (Fortin *et al.*, 1987) uma proteína facilitadora da entrada de glicerol em *Escherichia coli* (Muramatsu e

Mizuno, 1989). Por sua vez, Smith & Agre (1991) identificaram, em humanos, uma proteína de 28 kDa como sendo da mesma família MIP. Faltava apenas, naquele momento, a comprovação da função dessas proteínas integrais à membrana, que se concretizaria em 1992, com a comprovação das aquaporinas como canais com especificidade para o transporte de água muito mais eficiente que a simples difusão pela membrana, através da expressão de *channel-forming integral protein of 28 kDa* (CHIP28) em oócitos de *Xenopus laevis* e o bloqueio reversível do transporte de água com cloreto de mercúrio, já conhecido na época como inibidor do transporte de água (Preston *et al.*, 1992). Essa descoberta surpreendente – que renderia posteriormente o prêmio Nobel a Peter Agre em 2003 (Agre, 2004) – incentivou várias pesquisas para descoberta deste canal nos três domínios da vida, incluindo plantas (Maurel *et al.*, 1993), bactérias (Calamita *et al.*, 1995), insetos (Le Cahérec *et al.*, 1996), fungos (Bonhivers *et al.*, 1998) e Archaea (Kozono *et al.*, 2003). Diversas outras pesquisas resultaram na ampliação do número de membros (subfamílias e suas isoformas) da família MIP (Johanson e Gustavsson, 2002, Zardoya, 2005, Bienert *et al.*, 2008, Grégoire *et al.*, 2012, von Bulow *et al.*, 2012).

### **2.5.1. Características moleculares das aquaporinas**

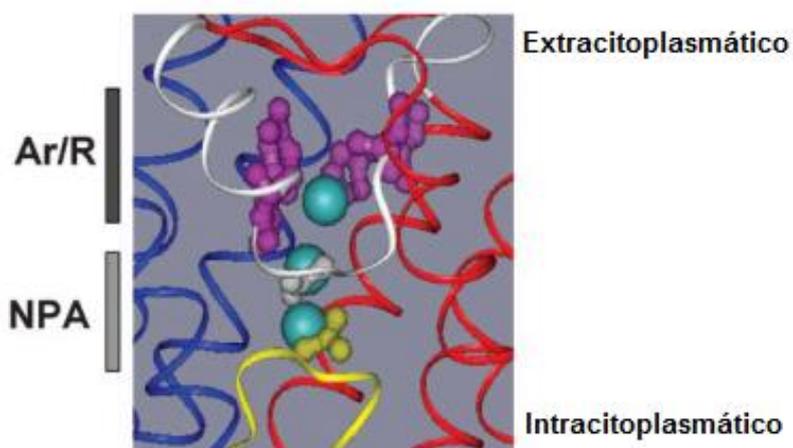
A superfamília MIP é constituída de proteínas com peso molecular entre 23 a 31 kDa, apresentando peptídeos constituídos de 250 a 300 aminoácidos. São proteínas hidrofóbicas e integrais às membranas, com extremidades amino- e carboxi-terminais voltadas para o lado citoplasmático membranar. Possuem seis  $\alpha$ -hélices transmembranares (1-6) unidas por cinco *loops* – A, C e E no lado

extracitoplasmático e no B e D lado intracitoplasmático (Figura 2a) (Chaumont *et al.*, 2001, Tyerman *et al.*, 2002, Maurel *et al.*, 2008). A maioria das aquaporinas constitui tetrâmeros em suas membranas nativas (Walz *et al.*, 1994, Daniels *et al.*, 1999, Fotiadis *et al.*, 2001). Cada subunidade desse tetrâmero forma um poro aquoso através do *loop* B (citoplasmático) e o *loop* E (extracelular). Esses dois *loops* apresentam um motivo NPA (*asparagine-proline-alanine*) em suas sequências, que, quando estão juntos, formam esse poro (figura 2b) (Jung *et al.*, 1994). Outras variantes do motivo NPA do *loop* B podem ser encontradas na subfamília de aquaporinas vegetais SIP: NPC e NPT e NPL (Ishikawa *et al.*, 2005, Maeshima e Ishikawa, 2008).



**Figura 2.** Topografia geral das aquaporinas (a), demonstrando a formação do poro constituído de dois motivos NPAs de um monômero que forma, com outros três monômeros, um tetrâmero com quatro subunidades assimétricas e quatro canais de água (b). Traduzido de Jung *et al.* (1994).

Um filtro de seletividade, conhecido como constrição ar/R (*aromatic / arginine*) ou filtro ar/R, localizado 8 Å acima (mais próximo ao lado extramembranar) do poro de NPAs (Figura 3), e muito mais estreito (aproximadamente 3,4 Å), é o principal ponto de seletividade para a permeabilidade de solutos – tornando as aquaporinas impermeáveis a prótons (devido à repulsão eletrostática, que também existe no poro de NPAs) e a moléculas de tamanhos superiores a 3,4 Å. Essa constrição é formada por dois resíduos hidrofóbicos H2 (Fenilalanina-56 da alfa-hélice 2) e H5 (Histidina -180 na alfa-hélice 5) e dois resíduos do *loop* E (L2, geralmente uma Cisteína-189, e L5, Arginina-195) (Fu *et al.*, 2000, Wallace e Roberts, 2004, Beitz *et al.*, 2006, Hub e de Groot, 2008, Gomes *et al.*, 2009).



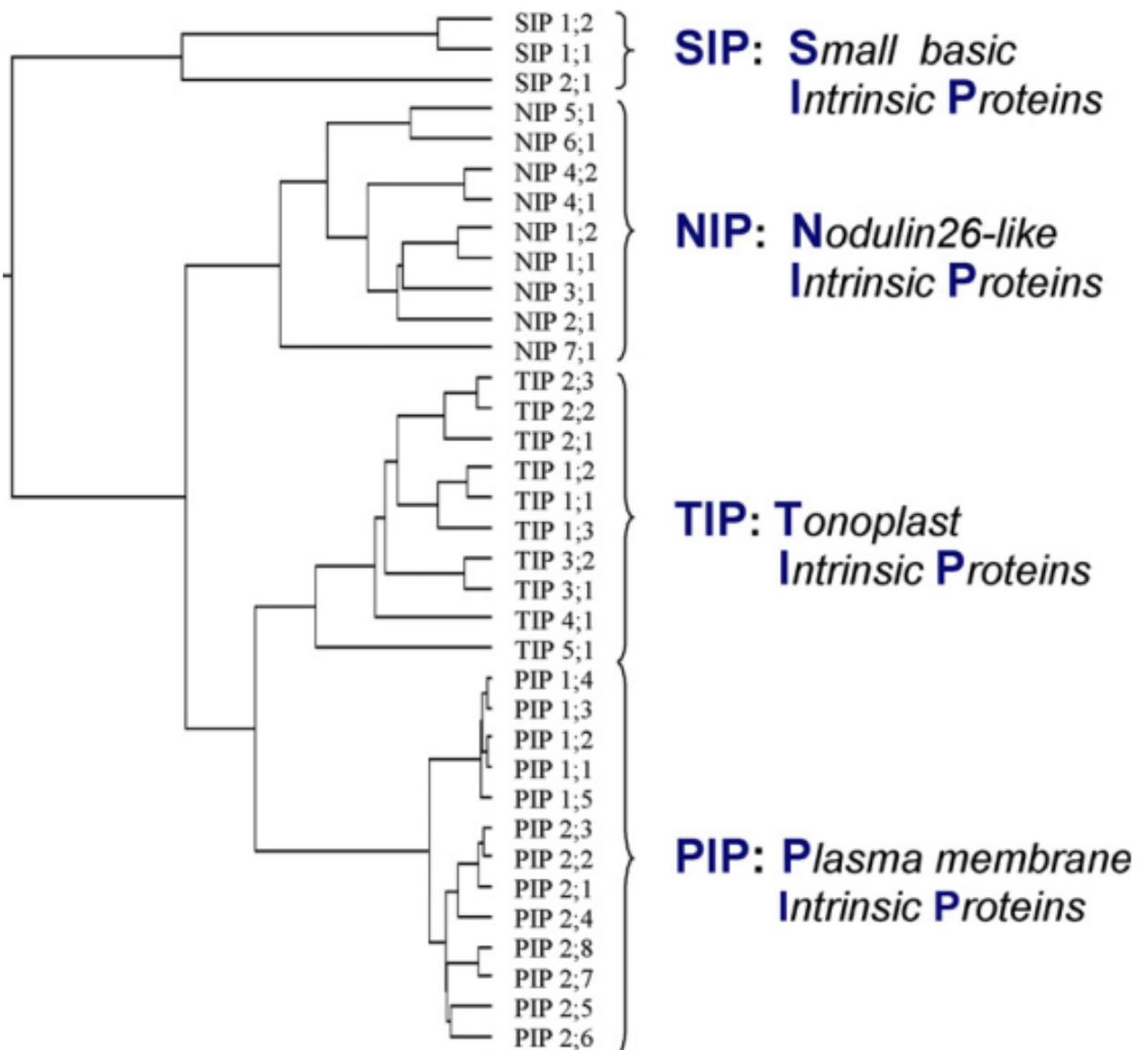
**Figura 3.** Localização do filtro ar/R de seletividade das aquaporinas. Traduzido de Wallace e Roberts (2004).

### 2.5.2. Aquaporinas vegetais

Por serem organismos sésseis, as plantas necessitam de uma resposta fisiológica ágil para suportar diversas mudanças nas condições ambientais – conduzindo ajustes mais sofisticados em seu balanço hídrico. Isso é demonstrado

na grande quantidade de isoformas de aquaporinas vegetais [entre 31 no milho (Chaumont *et al.*, 2001, Bansal & Sankararamakrishnan, 2007) e 35 na *Arabidopsis thaliana* (Jang *et al.*, 2004) a 39 isoformas no arroz (Bansal & Sankararamakrishnan, 2007) e 71 no algodão (Park *et al.*, 2010)], número muito maior que o presente nos vertebrados (de 11 a 13) (Zardoya, 2005, Magni *et al.*, 2006).

De acordo com as análises filogenéticas de Johanson e Gustavsson (2002), as aquaporinas vegetais são classificadas em quatro principais subfamílias, largamente distribuídas entre as plantas superiores: PIP (proteínas intrínsecas à membrana plasmática), TIP (proteínas intrínsecas ao tonoplasto), SIP (pequenas proteínas intrínsecas básicas) e NIP (Proteína de 26 kDa intrínsecas ao nódulo) (Figura 4). Existem outras subfamílias, como as encontradas em um musgo não vascular *Physcomitrella patens* por Danielson e Johanson (2008): GIPs *GlpF-like intrinsic proteins*, HIPs *hybrid intrinsic proteins* e XIPs, *X intrinsic proteins*, mas elas não foram encontradas em gramíneas e apenas a XIP é distribuída em plantas superiores – porém, apenas nas eudicotiledôneas (Bienert *et al.*, 2011).



**Figura 4.** Árvore filogenética da família de aquaporinas de *Arabidopsis thaliana* apresentando as 35 isoformas de aquaporinas e seu agrupamento em quatro subfamílias. Fonte: Maurel (2007).

Apesar de uma extensa presença das quatro subfamílias de aquaporinas entre as plantas superiores, não é possível se obter uma identificação espécie-específica por diferenças dentro de cada uma destas subclasses, pois os eventos genéticos ocorreram muito recentemente durante a evolução (Maurel, 2007).

### **2.5.2.1. Sub-família PIP**

As aquaporinas da subfamília PIP representam o maior grupo de aquaporinas e todos os membros dessa subfamília compartilham uma identidade muito elevada (possuindo 142 aminoácidos conservados, que abrange cerca de 50% das sequências peptídicas). Foram concentrados em apenas dois principais subgrupos evolutivos (*clusters*): PIP1 e PIP2 (Chaumont *et al.*, 2001). Apresentando peso molecular aproximado de 30 kDa e um ponto isoelétrico de 9.0, que pode ser explicado, em parte, devido à presença de vários aminoácidos básicos na extremidade C-terminal (Gomes *et al.*, 2009).

Junto com as TIP, as PIP foram nomeadas de acordo com suas localizações celulares predominantes (Johanson e Gustavsson, 2002, Maurel *et al.*, 2009). As isoformas dessa subfamília são localizadas na membrana plasmática e apresentam dois aspectos marcantes: (1) a capacidade de controlar praticamente todo o potencial de permeabilidade da membrana plasmática através da expressão concomitante de ambos os grupos (PIP1 e PIP2) e (2) a redução da permeabilidade de água pós-acidificação citoplasmática, devido ao fechamento de seus poros (Bellati *et al.*, 2010). As PIP ainda podem transportar, além de água, vários outros substratos, tais como: glicerol (Biela *et al.*, 1999), ácido bórico (Dordas, Chrispeels e Brown, 2000), ureia (Gaspar *et al.*, 2003) e peróxido de hidrogênio (Dynowski *et al.*, 2008).

### **2.5.2.2. Sub-família TIP**

Localizadas predominantemente no tonoplasto, organela de alta permeabilidade à água e que apresenta atividade de aquaporinas muito

superiores às observadas na membrana plasmática (Maurel *et al.*, 1997, Maurel 2008), as TIP diferem da subfamília PIP pela ausência de 20 a 38 aminoácidos nas caudas N-terminais dessas aquaporinas de tonoplasto (Chaumont *et al.*, 2001). Os membros da sub-família TIP possuem um peso molecular entre 25 e 28 kDa e um ponto isoelétrico que varia de 4.0 a 6.7 (Johanson e Gustavsson, 2002). Além do tonoplasto, algumas isoformas podem ser localizadas em vacúolos especializados em estocagem proteica, vacúolos líticos e pequenos vacúolos (Jauh *et al.*, 1998). As aquaporinas TIP podem ser agrupadas em cinco grupos de isoformas (Chaumont *et al.*, 2001, Gomes *et al.*, 2009).

Além da alta capacidade no transporte de água (Maurel *et al.*, 1997), muitas isoformas TIP transportam pequenas moléculas, principalmente: glicerol (Gerbeau *et al.*, 1999), CO<sub>2</sub> (Uehlein *et al.*, 2003), ureia (Liu *et al.*, 2003), NH<sub>3</sub> (Loqué *et al.*, 2005).

### **2.5.2.3. Sub-família NIP**

Essa subfamília NIP representa um grupo de aquaporinas multifuncionais que foram nomeadas de acordo com as similaridades de suas sequências com uma proteína de 26 kDa de nódulos da soja (Fortin *et al.*, 1987, Wallace *et al.*, 2006). As NIPs foram localizadas na membrana plasmática e no retículo endoplasmático (Maeshima e Ishikawa, 2008). Estima-se que as NIP foram adquiridas de um único evento de transferência horizontal, a partir de bactérias, na origem das plantas terrestres (Zardoya *et al.*, 2002).

Essas proteínas são subdivididas em dois subgrupos, de acordo com a arquitetura do filtro de seletividade ar/R. Esses dois subgrupos apresentam

aquaporinas com capacidade multifuncional de transporte, com pouca ou nenhuma permeabilidade à água e habilidade para transportar vários solutos neutros que podem variar em tamanho, dependendo da composição do filtro ar/R (Wallace *et al.*, 2006). Essas proteínas apresentam baixos níveis de expressão, quando comparadas com as largamente expressas subfamílias TIP e PIP (Alexandersson *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2005), estando envolvidas com assimilação de boro (Takano *et al.*, 2006), ácido silícico (Mitani-Ueno *et al.*, 2011) e na detoxificação de plantas através de transporte bidirecional do arsenito [As(III)] e de composto de antimônio [Sb(III)] (Bienert *et al.*, 2008).

#### **2.5.2.4. Sub-família SIP**

Apesar da nomenclatura, de pequenas proteínas intrínsecas básicas, as SIP não apresentam tamanho inferior ao das TIP e levam essa designação, principalmente, por apresentarem a região N-terminal citosólica mais curta das aquaporinas vegetais, até então encontrada, no reino vegetal (Johanson e Gustavsson, 2002). Entre as quatro principais subfamílias de aquaporinas vegetais, SIP apresenta a mais divergente sequência de aminoácidos, compartilhando apenas 16 a 28% de identidade com os outros três grupos de aquaporinas vegetais (Chaumont *et al.*, 2001). Não apenas pela divergência sobre a sequência inteira, mas foi observado que existe uma ausência quase absoluta de conservação na pequena hélice do loop B, nos motivos NPA (Chaumont *et al.*, 2001, Maeshima e Ishikawa, 2008). Possuem o pH mais básico das aquaporinas e ponto isoelétrico (pI) elevado (Chaumont *et al.*, 2001, Johanson e Gustavsson, 2002). Esse alto índice no pI pode ser causado pela série de lisinas em suas

regiões C-terminais (Johanson e Gustavsson, 2002). As SIP podem ser separadas estruturalmente em dois subgrupos: SIP1 e SIP2 (Ishibashi, 2006).

Todas as isoformas SIP foram localizadas no retículo endoplasmático (Maeshima e Ishikawa, 2008) e, apesar de já demonstrada a atividade de transporte de água (Ishikawa *et al.*, 2005), a função fisiológica das SIPs ainda encontra-se indefinida.

### **2.5.3. Mecanismos moleculares de regulação da atividade das aquaporinas vegetais**

As plantas terrestres evoluíram para lidar com as rápidas mudanças na disponibilidade de água, resultando em uma complexa regulação da permeabilidade das membranas vegetais (Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006, Gomes *et al.*, 2009). De modo geral, essa regulação pode ocorrer por mecanismos rápidos de controle, que afetam diretamente a atividade das aquaporinas, ou ainda por respostas mais lentas de aclimatação, ao nível da expressão gênica dessas proteínas (Gomes *et al.*, 2009).

O mecanismo de fechamento / abertura do canal das aquaporinas (*aquaporin gating*) pode ser controlado através de diversos fatores, principalmente: pH citoplasmático (protonação de uma histidina altamente conservada na posição 193 do peptídeo), que resulta em fechamento do canal (Tournaire-Roux *et al.*, 2003, Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006, Bellati 2010); fosforilação de resíduos serina, principalmente serina 7, abrindo os canais (Johansson *et al.*, 2000, Daniels e Yeager, 2005, Horie *et al.*, 2011) e desfosforilação de resíduos serina 115 e 274, que causa fechamento do poro

(Törnroth-Horsefield *et al.*, 2006); cátion  $\text{Ca}^{++}$ , que age como inibidor da atividade de transporte de água em aquaporinas vegetais (Allewa *et al.*, 2006); radicais livres, cujos  $\cdot\text{OH}$  podem ser produzidos através de reações do peróxido de hidrogênio com metais de transição (como  $\text{Fe}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^+$ ), provocando o fechamento total e reversível dos canais de água (Henzler, Ye e Steudle, 2004); mercúrio, inibidor da condução de água, ligando-se à cisteína na posição 189 do peptídeo (Preston *et al.*, 1993, Murata *et al.*, 2000); ácido abscísico (ABA), que mantém a conformação dos canais já abertos e provocando rápida abertura dos poros das aquaporinas que estiverem fechadas. Especula-se que ABA pode atuar tanto se ligando às aquaporinas quanto aos lipídeos que circundam esses transportadores (Wan, Steudle e Hartung 2004, Ye e Steudle, 2006).

Muitos genes de aquaporinas são constitutivamente expressos (com número elevado de transcritos), outros genes de isoformas desses canais são conhecidos por serem temporal e espacialmente regulados durante o desenvolvimento e em respostas a estresses (Kjellbom *et al.*, 1999). Além disso, a expressão de uma mesma isoforma, sob diversos estresses abióticos, pode variar drasticamente em diferentes tecidos, como exemplo, em arroz, a aquaporina OsAQP (idêntica à OsTIP1;1) é superexpressa nas folhas, durante a seca, salinidade e baixas temperaturas, mas é concomitantemente reprimida nas raízes (Liang *et al.*, 2012).

Os principais fatores de modulação da expressão gênica das MIPs vegetais relatadas são:

- a) o déficit hídrico, cuja desidratação provoca a repressão da expressão gênica da maioria das aquaporinas em *A. thaliana* (Alexandersson *et al.*, 2005);

- b) o estresse salino, apresentando resposta semelhante – em raízes de *Arabidopsis*, todas as isoformas das subfamílias PIP e TIP, que apresentaram níveis altos de expressão gênica em condições normais, reprimiram, em poucas horas, a transcrição gênica após exposição dessas raízes a 100 mM de NaCl (Boursiac *et al.*, 2005);
- c) o estresse de resfriamento, que causa uma repressão marcante, duas a quatro vezes, na transcrição da grande parte dos genes da subfamília PIP, em raízes de arroz milho e *Arabidopsis* (Maurel *et al.*, 2008);
- d) a variação da luminosidade durante o dia, que provoca flutuações na condutividade hidráulica e na pressão radicular das plantas, as quais foram correlacionadas com a variação na expressão de algumas isoformas PIP em raízes (Henzler *et al.*, 1999, Lopez *et al.*, 2003);
- e) a ação de fitorreguladores, sendo observado que a giberelina acentua a expressão de  $\gamma$ -TIP em *A. thaliana* e de RWC3 (PIP) em arroz (Phillips e Huttly 1994, Mei-Hao *et al.*, 2004), enquanto que a aplicação exógena de 1  $\mu$ M de ácido abscísico (ABA) em plantas de milho induz, rapidamente, a expressão de algumas isoformas de PIP, porém, aplicação de 100  $\mu$ M leva a uma completa repressão de todas as isoformas de PIP e TIP detectadas (Zhu *et al.*, 2005), com ressalvas de ser a auxina indutora da repressão global da expressão das aquaporinas (Péret *et al.*, 2012);
- f) a ação de genes específicos - os genes duplicados RAP2.4B e RAP2.4, pertencentes à categoria gênica dos fatores de transcrição DREB (*element-binding factor of dehydration-responsive*) controlam a expressão de oito genes de aquaporinas de *A. thaliana* – AtPIP1;2; AtPIP2;1, AtPIP2;2, AtPIP2;3, AtPIP1;1, AtTIP1;1, AtTIP2;2, e AtTIP2;3 (Rae, Lao e Kavanagh, 2011);

- g) a simbiose entre plantas e fungos micorrízicos arbusculares, provocando a indução da expressão de aquaporinas das subfamílias TIP, PIP, NIP e XIP (Uehlein *et al.*, 2006, Giovannetti *et al.*, 2012);
- h) a ocorrência de infecções por nematoides – sequências regulatórias TobRB7, que respondem especificadamente a esses parasitas, foram encontradas em um promotor de uma isoforma TIP do tabaco (Opperman, Taylor e Conkling, 1994).

Outro mecanismo de controle, menos esclarecido nas plantas, da atividade das aquaporinas, é o controle da alocação / retenção desses canais para certas membranas celulares, sinalizado por modificações pós-traducionais (Chaumont, Moshelion e Daniels 2005, Maurel *et al.*, 2009). Entre os exemplos desse tipo de controle, encontrados em aquaporinas vegetais, estão: modulação de transporte via ubiquitinação, cuja ação da Rma1H1 (uma ubiquitina ligase) inibe o transporte de PIP2-1 do retículo endoplasmático para a membrana plasmática e conduz subsequentemente essas aquaporinas para degradação proteossomal em resposta à seca em plantas transgênicas de *Arabidopsis* (Lee *et al.*, 1999); a redistribuição de TIP1;2 da *Mesembryanthemum crystallinum* para os compartimentos endossomais, em resposta ao estresse osmótico, que utiliza glicosilação como mecanismo de sinalização para a via da degradação de TIP1;2 (Vera-Estrella *et al.*, 2004) e realocação de isoformas do *cluster* PIP1 retidas no retículo endoplasmático, realocadas para a membrana plasmática, quando expressadas concomitantemente com isoformas do agrupamento PIP2 (Zelazny *et al.*, 2007).

### 3. Objetivos

#### 3.1. Geral

Analisar o perfil de transcrição do genoma de cana-de-açúcar em resposta ao déficit hídrico, visando à identificação de potenciais aquaporinas diferencialmente expressas em genótipos contrastantes, para fins de desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais.

#### 3.2. Específicos

- A. Identificar, a partir de bibliotecas SuperSAGE, etiquetas de cDNA (*unitags*) diferencialmente transcritas, utilizando-se de métodos estatísticos ( $p < 0,05$ );
- B. Analisar *in silico* o perfil transcricional das quatro subfamílias vegetais de aquaporinas, em cana-de-açúcar, através da análise estatística de *unitags* anotadas e caracterizadas das diferentes bibliotecas SuperSAGE;
- C. Criar um protocolo, específico para padronizar as reações de quantificação de transcritos, com amostras de cDNAs extraídas dos mesmos tecidos utilizados para a construção das bibliotecas SuperSAGE, com *primers* específicos, desenhados para reação de RTqPCR.

## **4. Material e Métodos**

As atividades descritas nos tópicos 4.1 e 4.2 foram realizadas parcialmente por outros parceiros do projeto ao qual este trabalho está vinculado, mas estão descritas aqui para efeito de melhor entendimento sobre as amostras empregadas na geração e análise inicial das bibliotecas SuperSAGE.

### **4.1. Material vegetal e confecção das bibliotecas SuperSAGE**

O ensaio (20 variedades x quatro tratamentos x três repetições) foi estabelecido em janeiro de 2008 e conduzido pelo Centro de Tecnologia Canaveira – CTC, Piracicaba, SP. As variedades foram selecionadas com base em históricos quanto à tolerância ao déficit hídrico. Mini-toletes de cada variedade foram plantados em vasos de 40 litros, contendo o substrato comercial Plantmax<sup>®</sup>. Sessenta dias após o plantio foram realizados ensaios para a identificação dos genótipos mais contrastantes (de maior e menor tolerância à seca), seguindo-se os tratamentos: T1: planta permanentemente irrigada; T2: supressão de rega por três dias; T3: supressão de rega por 10 dias e T4: supressão de rega por 20 dias. Com base nas análises estatísticas dos dados fisiológicos (medidas de taxa fotossintética, condutividade estomática, taxa respiratória, conteúdo de prolina, conteúdo de clorofila, análise da fluorescência da clorofila, conteúdo relativo de água, altura da parte aérea, comprimento das raízes, massa seca da parte aérea (65°C) e massa seca do sistema radicular) foram identificados os genótipos CTC6, CTC15, SP83-2847, SP83-5073 como tolerantes e CTC9, CTC13, SP90-3414, SP90-1638 como sensíveis a supressão de rega. Estes genótipos foram

utilizados em novo ensaio para coleta das raízes e para a extração de RNA total [de acordo com o protocolo do reagente Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen)], nas mesmas condições do ensaio anterior (exceto para o tempo de supressão de rega – alterado para 24 h). A partir destas amostras de RNA, procedeu-se a confecção das bibliotecas SuperSAGE.

Quatro bibliotecas SuperSAGE: SD24T: tolerantes estressadas; SDTC: tolerantes controle; SD24S: sensíveis estressadas; SDSC: sensíveis controle foram geradas na empresa GenXPro (Frankfurt, Alemanha), a partir de dois *pools* de genótipos (tolerantes e sensíveis, em separado), nas duas condições [estresse (24 h após supressão de rega) e controle (sem estresse)], conforme metodologia descrita em Matsumura *et al.* (2003), com modificações, que incluem a amplificação de *tags* (26 pb) via PCR e posterior sequenciamento via SOLEXA<sup>®</sup> (illumina).

#### **4.2. Análise estatística das *unitags* SuperSAGE**

Após sequenciamento, as *tags* foram avaliadas (exclusão de *singlets*) e análises quantitativas e qualitativas foram realizadas a partir do aplicativo DiscoverySpace 4.0 (Robertson *et al.*, 2007). Significâncias estatísticas das variações nas frequências das diferentes *tags* (*unitags*) – também foram mensuradas a partir do *software* DiscoverySpace 4.0 – considerando os contrastes entre duas bibliotecas, foram determinadas pelos valores *p* (teste de significância de Audic e Claverie (1997)) ao nível de 5% de probabilidade, para definição daquelas diferentemente expressas, sendo classificadas em superexpressas (induzidas) ou reprimidas. Após a normalização para um milhão

de *tags*, foram calculados os valores de modulação da expressão (*Fold Change*, FC), que representaram quantas vezes uma *unitag* foi mais ou menos expressa em uma biblioteca em relação à outra.

### 4.3. Anotação e categorização das *unitags* SuperSAGE associadas às ESTs de aquaporinas

Para as análises de bioinformática deste trabalho foram disponibilizadas 8.787.315 *tags* (etiquetas) SuperSAGE, das quais: 2.542.552 foram extraídas da biblioteca tolerante estressada (SD24T), 1.909.543 da biblioteca tolerante controle (SDTC), 2.170.998 da biblioteca sensível estressada (SD24S) e 2.164.222 da biblioteca sensível controle (SDSC), conforme Kido *et al.* (2012). As etiquetas SuperSAGE foram alinhadas via BLASTn contra sequências expressas (EST) de nove bancos públicos de ESTs de gramíneas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Bancos públicos de ESTs de gramíneas utilizados na anotação das *tags* SuperSAGE de aquaporinas – provenientes de genótipos contrastantes (tolerantes e sensíveis a seca) de cana-de-açúcar, sob seca (24 h após supressão de rega) ou não (controle), ordenados pela proximidade taxonômica.

Banco	Gramínea	Versão	Endereço eletrônico
dbEST_NCBI	<i>Saccharum</i> spp.	Release_120701	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest</a>
SoGI	<i>Saccharum officinarum</i> (L.)	Release_3	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=s_officinarum">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=s_officinarum</a>
SbGI	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	Release_9	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=sorghum">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=sorghum</a>
ZmGI	<i>Zea mays</i> (L.)	Release_19	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=maize">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=maize</a>
OsGI	<i>Oryza sativa</i> (L.)	Release_18	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=rice">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=rice</a>
PaviGI	<i>Panicum virgatum</i> (L.)	Release_1	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=switchgrass">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=switchgrass</a>
TaGI	<i>Triticum aestivum</i> (L.)	Release_12	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=wheat">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=wheat</a>
HvGI	<i>Hordeum vulgare</i> (L.)	Release_11	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=barley">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=barley</a>
FaGI	<i>Festuca arundinacea</i> (S.)	Release_3	<a href="http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=f_arundinacea">http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=f_arundinacea</a>

Para a anotação foram considerados *hits* (alinhamentos significativos, ao nível de 5%) os alinhamentos *unitag-EST plus-plus* (positivo-positivo), com escore mínimo de 42 (correspondendo ao alinhamento de 21 bases – equivalente a uma *tag* LongSAGE (Saha *et al.*, 2002) - em 26 bases da *tag* SuperSAGE, incluindo o CATG íntegro no início da *tag*).

Procedeu-se, então, a escolha dos melhores alinhamentos (*hits*) com base nos resultados de BLASTn (escores maiores com ESTs portando descrições informativas de gene / função nas anotações), dando-se prioridade às sequências de cana-de-açúcar ou de espécies da família Poaceae mais próximas taxonomicamente. Todas as ESTs (com ou sem anotação), que alinharam significativamente (*hits*) com as *unitags*, foram categorizadas via ontologia gênica (GO, *gene ontology*), cujos termos GO foram obtidos através do software Blast2GO® (disponível em: <http://www.blast2go.org/>).

#### **4.4. Identificação *in silico* de prováveis aquaporinas**

As potenciais aquaporinas foram identificadas através de palavras-chave específicas para genes da superfamília MIP – “*aquaporin*”, “*major intrinsic protein*”, “*PIP*”, “*TIP*”, “*NIP*”, “*SIP*”, “*plasma membrane intrinsic protein*”, “*tonoplast intrinsic protein*”, “*nodulin-26–like intrinsic protein*” e “*small basic intrinsic protein*” para as anotações das ESTs e “*water transporter*” nos termos GO obtidos. Essas ESTs foram analisadas *in silico* visando confirmar a identidade de domínios conservados (banco *Conserved Domain Database* da base de dados NCBI, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Structure/cdd/cdd.shtml](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml)) e classificadas de acordo

com sua similaridade às subfamílias de aquaporinas de vegetais (TIP, NIP, SIP, PIP).

#### 4.5. Síntese de cDNA, desenho de *primers* e reações de RTqPCR

As amostras de RNA total de cada genótipo dos quatro *bulks* (tolerante estressado, tolerante controle, sensível extrassado e sensível controle) foram isoladas dos mesmos tecidos utilizados para a construção das bibliotecas SuperSAGE, através do Kit *RNAeasy Plus Micro Kit* (Quiagen®) com posterior tratamento com DNase. A reação de síntese de cDNA foi realizada através do kit *Super Script First Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen®), de acordo com as orientações do fabricante, a partir de 1 ng de RNA provenientes de amostras quantificadas via fluorômetro Qubit® (Invitrogen®).

Os *primers* foram desenhados com pequenas modificações nos parâmetros padrões do programa *Primer 3* (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) que envolviam o tamanho do *amplicom* – entre 70 a 100 pares de bases, a temperatura (°C) de dissociação (TM) do *primer* – mínima de 40, ótima de 50 e máxima 60 e o conteúdo GC variando de 45 a 55 %. Foram utilizadas como *input* para o programa as sequências ESTs que alinharam com *unitags*, possuindo no máximo um *mismatch* (divergência entre bases no alinhamento *tag*-EST) e cujas *unitags* apresentaram expressões divergentes nas comparações entre bibliotecas e foram consideradas promissoras para estudos futuros.

As reações RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 10 µL, sendo: 1 µL de cDNA [utilizando-se a melhor diluição pelo teste de eficiência obtido pelas cinco diluições por *bulk* de cDNA: concentrado; 1:10; 1:100; 1:1.000

ou 1:10.000 (v:v)], 1 µL de cada *primer* (direto e reverso) gene-específico (0,2 a 0,5 µM), 5 µL de *HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix 2X<sup>®</sup>* (usb<sup>®</sup>), 0,2 de fluoróforo passivo ROX (USB<sup>®</sup>) e 1,8 µL de água ultrapura estéril. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Fluorescent Quantitative Quantification System* (BIOER<sup>®</sup>) utilizando-se a seguinte programação: desnaturação inicial de 95°C/ 2 min seguidos de 40 ciclos de 95°C/ 30 s e 58°C/ 30 s, com uma extensão 72°C/ 30 s, sendo a detecção do sinal da fluorescência ao final de cada etapa de extensão. Para cada par de *primer* foi avaliada a curva de dissociação do produto amplificado (curva de *melting*), com o intuito de verificar possíveis contaminações das três repetições de cada amplificação, além de controle negativo (amostra sem cDNA). Os valores de Ct (ciclo limiar – *threshold cycle*), as concentrações mais eficientes dos *primers* (faixa de 0,2 a 0,5 µM), as temperaturas de *melting* e as quantificações absolutas foram estimados com o software, LineGene 9600 (versão 1.1.10), que acompanha o termociclador, Line Gene 9600 (Bioer<sup>®</sup>). As análises de quantificação relativa, utilizando como genes de referência o 25S rRNA e o GAPDH (*D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), foram analisadas pelo o software REST (*Relative Expression Software Tool*) versão 2.0.13 (Pfaffl, Horgan e Dempfle, 2002).

## 5. Resultados

### 5.1. Mineração de aquaporinas em *unitags* SuperSAGE anotadas

As quatro bibliotecas disponibilizadas, que somadas constituíram um universo de 8.787.315 *tags* de 26 pb, cuja exclusão das *singlets* (*tags* sequenciadas apenas uma vez) representaram 205.975 *tags* diferentes ou *unitags* (Kido *et al.*, 2012), permitiram identificar, via anotação e categorização, 1.579 alinhamentos BLASTn significativos ( $42 \leq \text{score} \leq 52$ ) de *unitags* SuperSAGE com ESTs de aquaporinas, presentes em nove bancos públicos de gramíneas (Tabela 2). Detalhes desta totalização, por banco de dados, incluindo: espécie, tamanho do banco de dados, prováveis aquaporinas por subfamília, alinhamentos envolvidos (perfeitos e com *mismatch*), *unitags* e ESTs envolvidos, bem como ESTs categorizadas via GO podem ser vistos em mesma Tabela 2. Em resumo, estes alinhamentos envolveram 289 *unitags*, as quais foram ancoradas em 484 ESTs distintas, dos diferentes bancos de dados.

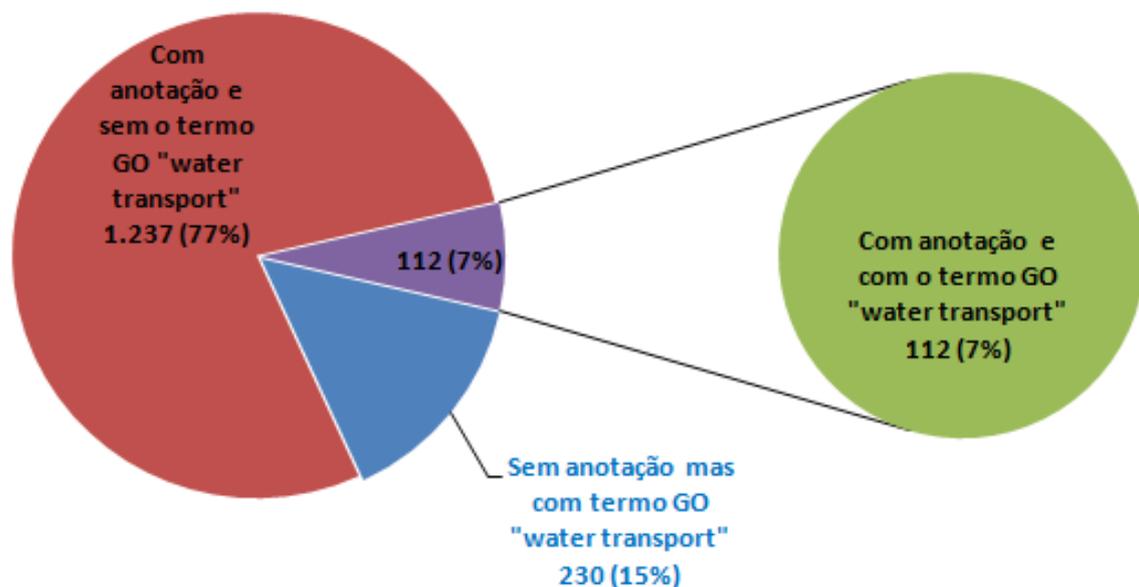
**Tabela 2.** Detalhes dos bancos de ESTs (espécie, total de ESTs, anotações envolvendo aquaporinas) usados na anotação de *unitags* SuperSAGE oriundas de *bulks* de genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis ao déficit hídrico (24 h de supressão de rega) e controle, com resultados de alinhamentos BLASTn e totais de *unitags* e ESTs relacionadas após retirada de redundância por banco.

Gramínea	Banco	Total de ESTs	Anotações genéricas*	PIP	TIP	NIP	SIP	Alinhamentos	Alinhamentos Perfeitos	Alinhamentos com <i>mismatch</i>	<i>Unitags</i>	ESTs distintas****	<i>Unitags</i> com GO**
<i>Saccharum</i> spp.	dbEST_NCBI	256.636	24	0	0	0	0	154	41	105	43	34	23
<i>Saccharum officinarum</i>	SoGI	121.370	265	157	85	21	11	683	158	425	260	127	50
<i>Sorghum bicolor</i>	SbGI	46.043	68	34	23	5	6	74	11	63	19	7	74
<i>Zea mays</i>	ZmGI	315.134	347	142	154	35	19	49	7	29	13	15	20
<i>Oryza sativa</i>	OsGI	201.22	283	121	95	33	7	119	26	72	20	86	3
<i>Panicum virgatum</i>	PaviGI	85.244	147	58	45	28	6	174	31	116	22	57	0
<i>Triticum aestivum</i>	TaGI	222.152	542	138	128	32	14	253	20	197	23	123	5
<i>Hordeum vulgare</i>	HvGI	83.101	110	32	33	12	9	34	2	30	16	21	7
<i>Festuca arundinacea</i>	FaGI	30.244	27	5	1	1	1	39	10	27	17	14	5
Total	Nove Bancos	1.361.144	1.813	687	564	167	73	1.579	306	1.064	289***	484	45***

\*aquaporin, tonoplast intrinsic protein e major intrinsic protein, membrane integral protein (podendo acompanhar anotações específicas, PIP, TIP, NIP e SIP); \*\*\*"water transporter";

\*\*\*número sem redundância entre os nove bancos; \*\*\*\*número sem redundância de ESTs de prováveis aquaporinas que ancoraram em *unitags*.

Considerando as estratégias de anotação e categorização GO, as pesquisas pelas palavras-chave “*aquaporin*”, “*tonoplast intrinsic protein*”, “PIP”, “TIP”, “NIP” e “SIP” no banco de *unitags* anotadas dos diferentes bancos de EST de gramíneas, permitiram visualizar 1.347 alinhamentos *unitags* / ESTs (escores 42 – 52), enquanto que a busca do termo GO “*water transport*” (no banco de termos de ontologia gênica, que contém sequências de peptídeos curadas do Uniprot-SwissProt) foram observados 342 alinhamentos, cujas ESTs continham ou não anotação (Figura 5). Esse universo foi considerado para análise dos perfis transcricionais.



**Figura 5.** Totais e percentuais dos resultados de anotação de *unitags* SuperSAGE de cana-de-açúcar (supressão de rega por 24 h e controle) e de categorização de ESTs, na identificação de prováveis transcritos de aquaporinas, após uso de palavras-chave (“*aquaporin*”, “*tonoplast intrinsic protein*”, “PIP”, “TIP”, “NIP”, “SIP” e “*water transport*”).

## 5.2. Perfil transcricional das aquaporinas em cana-de-açúcar

As 30 *unitags* mais transcritas (frequências normalizadas) nas quatro bibliotecas SuperSAGE e prováveis anotações para aquaporinas das subfamílias PIP (15), TIP (10), SIP (3) e NIP (2) estão listadas na Tabela 3. Segundo Kjellbom *et al.* (1999) muitos genes de aquaporinas são constitutivamente expressos, com elevado número de transcritos (como visto, por exemplo, na *unitag* SD80612 desta tabela), enquanto outros são temporal e espacialmente regulados durante o desenvolvimento e em respostas a estresses (como parece ser, por exemplo, o caso da *unitag* SD173276, Tabela 3).

**Tabela 3.** Relação das 30 *unitags* de prováveis aquaporinas anotadas mais expressas, por biblioteca SuperSAGE normalizada (1.000.000), em genótipos contrastantes de cana-de-açúcar em condições de supressão de rega (24 horas) ou controle.

	Tag id	Aquaporina	Nº de tags normalizado			
			SD24T	SDTC	SD24S	SDSC
1	SD173282	SoTIP2-2	1096	3784	1643	1816
2	SD231437	SoPIP1-3/PIP1-4	819	1551	1140	990
3	SD87583	SoPIP1-3/PIP1-4	964	956	1186	520
4	SD119746	SoTIP2-3*	1162	1041	771	530
5	SD173276	SoTIP2-2	564	1879	496	0
6	SD182865	SoTIP2-2	535	876	501	674
7	SD87593	SoPIP1-3 /PIP1-4	579	601	750	377
8	SD80613	SoTIP1-1	318	234	775	571
9	SD80612	SoTIP1-1	437	393	423	453
10	SD250744	SoPIP2-1	321	577	265	508
11	SD19004	HvTIP1-1**	422	395	411	210
12	SD176669	SoPIP2-6	275	591	310	183
13	SD243880	SoPIP2-1	176	326	334	496
14	SD28080	SoPIP2-4	406	329	224	312
15	SD176663	SoPIP2-6	135	340	227	136
16	SD241279	SoPIP1-5	151	184	257	107
17	SD84960	SsTIP1-1***	202	216	29	136
18	SD243849	SoPIP2-1	108	123	113	40
19	SD54852	SoPIP2-1	107	143	22	52
20	SD96918	SoSIP1-2	106	66	96	49

						Cont.
	Tag id	Aquaporina	SD24T	SDTC	SD24S	SDSC
21	SD96922	SoSIP1-2	89	43	114	49
22	SD202395	PvNIP1-1****	39	53	40	98
23	SD243867	SoPIP2-1	37	42	79	43
24	SD87586	SoPIP1-3 /PIP1-4	31	54	28	55
25	SD250859	SoPIP2-1	39	96	0	32
26	SD198883	SoPIP2-5	39	27	30	37
27	SD21811	SoSIP1-1	26	16	26	26
28	SD84958	SsTIP1-1	29	15	9	17
29	SD217703	SoNIP3-1	29	15	13	13
30	SD36243	HvTIP2-2	31	9	12	9

\*Isoformas precedidas da sigla do nome da espécie (*Hv* - *Hordeum vulgare*; *Pv* - *Panicum virgatum*; *So* - *Saccharum officinarum* e *Ss* - *Saccharum* sp.). Bibliotecas SuperSAGE: SD24T (*bulk* de genótipos tolerantes sob estresse; SD24S (*bulk* de genótipos sensíveis sob estresse); SDTC (*bulk* de genótipos tolerantes sob condições controle); SDSC (*bulk* de genótipos sensíveis sob condições controle).

A expressão por biblioteca não permite revelar os perfis transcricionais das prováveis aquaporinas expressas pelos *bulks* de genótipos tolerantes e sensíveis em resposta ao estresse estudado. Desta forma, foram identificadas as *unitags* associadas às prováveis aquaporinas e suas modulações de expressão, conforme os contrastes entre bibliotecas, comparando um mesmo *bulk* de genótipos em condições diferentes ou *bulks* de genótipos diferentes em mesmas condições. Assim, após a retirada das sequências repetidas (em relação a uma *tag* ancorando em ESTs de diversos bancos) e feita a escolha prioritária das ESTs representativas dos transcritos, em relação à proximidade taxonômica com a cana-de-açúcar, observou-se um total de 44 prováveis isoformas de aquaporinas presentes nos quatro contrastes. Essas aquaporinas, confirmadas pelos domínios conservados, conjuntamente com seus respectivos valores de modulação de expressão gênica (*Fold Change*; FC), para cada contraste, estão identificadas nas Tabelas 4, 5, 6 e 7 (contrastos SD24T vs SDTC, SD24S vs SDSC, SD24T vs SD24S, SDTC vs SDSC, respectivamente).

**Tabela 4.** Perfil transcricional de *unitags* SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (domínio *MIP superfamily*) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SD24T x SDTC] envolvendo *bulks* de genótipos tolerantes ao déficit hídrico sob estresse (24 h após supressão de rega) e sem estresse, e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da *unitag* na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou Cluster*	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD243866	SOGI_TC119187	SoPIP2-1	Indução	13,51
SD119963	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Indução	5,56
SD279924	SOGI_TC120416	SoTIP2-2	Indução	4,37
SD264077	NCBI_gij35203438	SsPIP1-1	Indução	3,58
SD36243	HVGI_TC214858	HvTIP2-2	Indução	3,53
SD231548	SOGI_TC127588	SoPIP1-3/PIP1-4	Indução	3,18
SD241667	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	Indução	2,38
SD217703	SOGI_TC118424	SoNIP3-1	Indução	1,93
SD21811	SOGI_TC118552	SoSIP1-1	Indução	1,65
SD96918	SOGI_TC135800	SoSIP1-2	Indução	1,61
SD198883	SOGI_TC124089	SoPIP2-5	Indução	1,46
SD80613	NCBI_gij35984968	SsTIP1-1	Indução	1,36
SD28080	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Indução	1,23
SD80612	SOGI_TC137091	SoTIP1-1	Indução	1,11
SD84969	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Repressão	-17,81
SD194890	SOGI_TC118424	SoNIP3-1	Repressão	-16,91
SD94306	SOGI_TC149516	SoTIP1-1	Repressão	-6,09
SD84616	SOGI_TC124089	SoPIP2-5	Repressão	-4,42
SD283542	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Repressão	-3,75
SD173276	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	Repressão	-3,33
SD7939	SOGI_TC143602	SoTIP1-1	Repressão	-2,95
SD80616	NCBI_gij35204947	SsTIP1-1	Repressão	-2,81
SD176950	PAVIGI_TC38513	PvPIP2-2	Repressão	-2,34
SD176669	SOGI_TC114788	SoPIP2-6	Repressão	-2,15
SD231437	SOGI_TC127588	SoPIP1-3/PIP1-4	Repressão	-1,89
SD176664	TAGI_TC441357	TaPIP2-1	Repressão	-1,73
SD202395	PAVIGI_TC17927	PvNIP1-1	Repressão	-1,36
SD241279	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	Repressão	-1,22
SD172662	PAVIGI_FL885039	PvPIP1-1	ns	1,38
SD184025	SOGI_TC151979	SoPIP1-3/PIP1-4	ns	1,99
SD208105	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	ns	-1,38
SD235379	SOGI_CA260922	SoPIP2-1	ns	-2,36
SD146617	OGI_TC418960	OsPIP2-3	ns	1,07
SD150707	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	ns	-1,68
SD52731	OGI_TC443567	OsPIP1-3/PIP1-4	ns	-1,26
SD148107	SOGI_CA107998	SoPIP2-6	ns	1,19

Cont.

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou <i>Cluster</i> *	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD13557	ZMGI_FL050875	<i>ZmTIP1-1</i>	ns	-1,26
SD138471	TAGI_TC379633	<i>TaTIP1-1</i>	ns	-1,65
SD149552	NCBI_gij35200939	<i>SsTIP1-1</i>	ns	2,37
SD239051	SBGI_TC112507	<i>SbTIP1-1</i>	ns	1,07
SD19004	HVGI_TC231886	<i>HvTIP1-1</i>	ns	1,07
SD107796	SOGI_CA258556	<i>SoTIP2-2</i>	ns	1,06
SD37000	HVGI_TC214858	<i>HvTIP2-2</i>	ns	1,19
SD4247	SOGI_TC141059	<i>SoTIP2-3</i>	ns	-1,28
SD46132	SOGI_TC122939	<i>SoTIP4-2</i>	ns	-1,41
SD21809	SOGI_TC118552	<i>SoSIP1-1</i>	ns	-1,26
SD110293	SOGI_TC154548	<i>SoSIP1-2</i>	ns	1,29
SD91605	SOGI_TC131971	<i>SoNIP3-1</i>	ns	1,27

\*Banco [ NCBI (dbEST), Gene Index (OGI, PAVIGI, SBGI, SOGI, TAGI e ZMGI)] seguida do identificador da EST;  
 \*\*Isoformas precedidas das iniciais da espécie (*Os* - *Oryza sativa* ; *Pv* - *Panicum virgatum*; *Sb* - *Sorghum bicolor* ; *So* - *Saccharum officinarum*; *Ss* - *Saccharum* sp.; *Ta* - *Triticum aestivum* e *Zm* - *Zea mays*); \*\*\*  $p < 0,05$  (ns: não significativo).

**Tabela 5.** Perfil transcricional de *unitags* SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (domínio *MIP superfamily*) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SD24S x SDSC] envolvendo *bulks* de genótipos sensíveis ao déficit hídrico sob estresse (24 h após supressão de rega) e sem estresse, e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da *unitag* na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou <i>Cluster</i> *	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD173276	SOGI_CA258556	<i>SoTIP2-2</i>	Indução	496,29
SD176665	PAVIGI_TC38513	<i>PvPIP2-2</i>	Indução	4,83
SD80915	SOGI_TC149516	<i>SoTIP1-1</i>	Indução	3,27
SD150707	SOGI_TC143544	<i>SoPIP2-4</i>	Indução	2,80
SD21809	SOGI_TC118552	<i>SoSIP1-1</i>	Indução	2,80
SD243849	SOGI_TC119187	<i>SoPIP2-1</i>	Indução	2,80
SD241279	SOGI_TC117457	<i>SoPIP1-5</i>	Indução	2,40
SD87583	SOGI_TC127858	<i>SoPIP1-3/PIP1-4</i>	Indução	2,28
SD19004	HVGI_TC231886	<i>HvTIP1-1</i>	Indução	1,96
SD96918	SOGI_TC135800	<i>SoSIP1-2</i>	Indução	1,96
SD176669	SOGI_TC114788	<i>SoPIP2-6</i>	Indução	1,70

Cont.

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou Cluster*	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD176663	OGI_TC448129	OsPIP2-4	Indução	1,66
SD119746	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Indução	1,46
SD80613	NCBI_gij35984968	SsTIP1-1	Indução	1,36
SD119834	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Repressão	-9,58
SD182891	SOGI_TC120416	SoTIP2-2	Repressão	-5,85
SD231422	SOGI_TC127588	SoPIP1-3/PIP1-4	Repressão	-4,79
SD264077	NCBI_gij35282126	SsPIP1-1	Repressão	-4,56
SD194890	SOGI_TC118424	SoNIP3-1	Repressão	-3,61
SD80614	SOGI_TC141442	SoTIP1-1	Repressão	-3,19
SD224474	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Repressão	-3,19
SD235379	SOGI_CA260922	SoPIP2-1	Repressão	-2,85
SD138471	TAGI_TC379633	TaTIP1-1	Repressão	-2,51
SD202395	PAVIGI_TC17927	PaNIP1-1	Repressão	-2,44
SD96924	SOGI_TC135800	SoSIP1-2	Repressão	-2,13
SD84958	NCBI_gij35204947	SsTIP1-1	Repressão	-1,82
SD208105	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	ns	1,76
SD172661	SOGI_TC137502	SoPIP2-1	ns	1,87
SD172662	PAVIGI_TC32996	PvPIP2-1	ns	1,17
SD176667	TAGI_CA620545	TaPIP2-1	ns	-1,07
SD65894	OGI_TC418923	OsPIP2-2	ns	-1,06
SD146617	OGI_TC418960	OsPIP2-3	ns	1,40
SD176664	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	ns	1,02
SD84616	SOGI_TC124089	SoPIP2-5	ns	1,32
SD172663	TAGI_TC442144	TaPIP2-6	ns	-2,28
SD202396	PAVIGI_TC17927	PvNIP1-1	ns	-1,07
SD265228	SOGI_CA146434	SoNIP1-2	ns	1,40
SD80612	SOGI_TC137091	SoTIP1-1	ns	-1,07
SD149552	NCBI_gij35200939	SsTIP1-1	ns	-1,06
SD36243	HVGI_TC214858	HvTIP2-2	ns	-1,02
SD107796	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	ns	-1,52
SD7988	PAVIGI_TC25289	PvTIP2-2	ns	1,87
SD119963	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	ns	1,93
SD21811	SOGI_TC118552	SoSIP1-1	ns	1,02
SD110293	SOGI_TC154548	SoSIP1-2	ns	-1,20
SD192786	SOGI_TC118424	SoNIP3-1	ns	1,36

\*Banco [ NCBI (dbEST), Gene Index (OGI, PAVIGI, SBGI, SOGI, TAGI e ZMGI)] seguida do identificador da EST;  
 \*\*Isoformas precedidas das iniciais da espécie (*Os* - *Oryza sativa*; *Pv* - *Panicum virgatum*; *Sb* - *Sorghum bicolor*; *So* - *Saccharum officinarum*; *Ss* - *Saccharum* sp.; *Ta* - *Triticum aestivum* e *Zm* - *Zea mays*); \*\*\*  $p < 0,05$  (ns: não significativo).

**Tabela 6.** Perfil transcricional de *unitags* SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (respectivos domínios conservados) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SD24T x SD24S] envolvendo *bulks* de genótipos tolerantes *versus* sensíveis ao déficit hídrico sob estresse (24 h após supressão de rega), e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da *unitag* na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou Cluster*	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD84960	NCBI_gij35204947	SsTIP1-1	Maior transcrição	6,98
SD149552	SOGI_TC132934	SoTIP1-1	Maior transcrição	5,56
SD176664	PAVIGI_TC1107	PvPIP2-4	Maior transcrição	3,64
SD91605	SOGI_TC131971	SoNIP3-1	Maior transcrição	3,19
SD36243	HVGI_TC214858	HvTIP2-2	Maior transcrição	2,58
SD187874	SOGI_TC127588	SoPIP1-3/PIP1-4	Maior transcrição	1,99
SD241281	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	Maior transcrição	1,99
SD256729	SOGI_TC135800	SoSIP1-2	Maior transcrição	1,99
SD182878	SOGI_TC141709	SoTIP2-2	Maior transcrição	1,99
SD28080	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Maior transcrição	1,81
SD119746	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Maior transcrição	1,51
SD250744	SOGI_TC123249	SoPIP2-1	Maior transcrição	1,21
SD173276	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	Maior transcrição	1,14
SD91837	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Menor transcrição	-12,62
SD235379	SOGI_CA260922	SoPIP2-1	Menor transcrição	-5,88
SD20530	SOGI_TC154548	SoSIP1-2	Menor transcrição	-4,21
SD80613	NCBI_gij35984968	SsTIP1-1	Menor transcrição	-2,44
SD80616	NCBI_gij35204947	SsTIP1-1	Menor transcrição	-2,34
SD107793	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	Menor transcrição	-1,78
SD241279	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	Menor transcrição	-1,70
SD4247	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Menor transcrição	-1,70
SD176663	SOGI_TC114788	SoPIP2-6	Menor transcrição	-1,68
SD231437	SOGI_TC127588	SoPIP1-3/PIP1-4	Menor transcrição	-1,39
SD176669	OGI_TC412402	OsPIP2-1	Menor transcrição	-1,13
SD264077	NCBI_gij35282126	SsPIP1-1	ns	3,83
SD241667	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	ns	-1,76
SD124481	PAVIGI_TC1063	PvPIP1-5	ns	-1,18
SD172662	SOGI_CA206141	SoPIP2-1	ns	1,38
SD172960	PAVIGI_TC32996	PvPIP2-1	ns	-1,26
SD176665	TAGI_CA620545	TaPIP2-1	ns	-2,16
SD150707	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	ns	1,98
SD172661	FAGI_TC19152	FaPIP2-4	ns	1,91

Cont.

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou Cluster*	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD198883	SOGI_TC124089	SoPIP2-5	ns	1,30
SD52731	TAGI_CA683725	TaPIP2-5	ns	1,26
SD148107	SOGI_CA107998	SoPIP2-6	ns	1,07
SD80612	SOGI_TC149516	SoTIP1-1	ns	1,03
SD138471	TAGI_TC379633	TaTIP1-1	ns	-1,18
SD149554	NCBI_gij35064519	SsTIP1-1	ns	-1,26
SD19004	HVGI_TC231886	HvTIP1-1	ns	1,03
SD107796	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	ns	1,42
SD37000	HVGI_TC214858	HvTIP2-2	ns	1,19
SD7988	PAVIGI_TC25289	PvTIP2-2	ns	1,87
SD119751	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	ns	-1,18
SD7987	PAVIGI_TC3325	PvTIP2-3	ns	1,87
SD21811	SOGI_TC118552	SoSIP1-1	ns	1,02
SD96918	SOGI_TC135800	SoSIP1-2	ns	1,11
SD202395	TC17927_PAVIGI	PvNIP1-1	ns	-1,03
SD265228	SOGI_CA102300	SoNIP1-2	ns	1,40
SD192786	SOGI_TC118424	SoNIP3-1	ns	1,35

\*Sigla do banco ( HVGI, NCBI, PAVIGI, SOGI e TAGI) seguida do identificador da EST; \*\*Isoformas precedidas da sigla do nome da espécie ( *Hv* - *Hordeum vulgare*; *Pv* - *Panicum virgatum*; *So* - *Saccharum officinarum*; *Ss* - *Saccharum* sp. e *Ta* - *Triticum aestivum*); \*\*\* Nível de expressão significativa ou não (ns), ao nível de 5% de probabilidade.

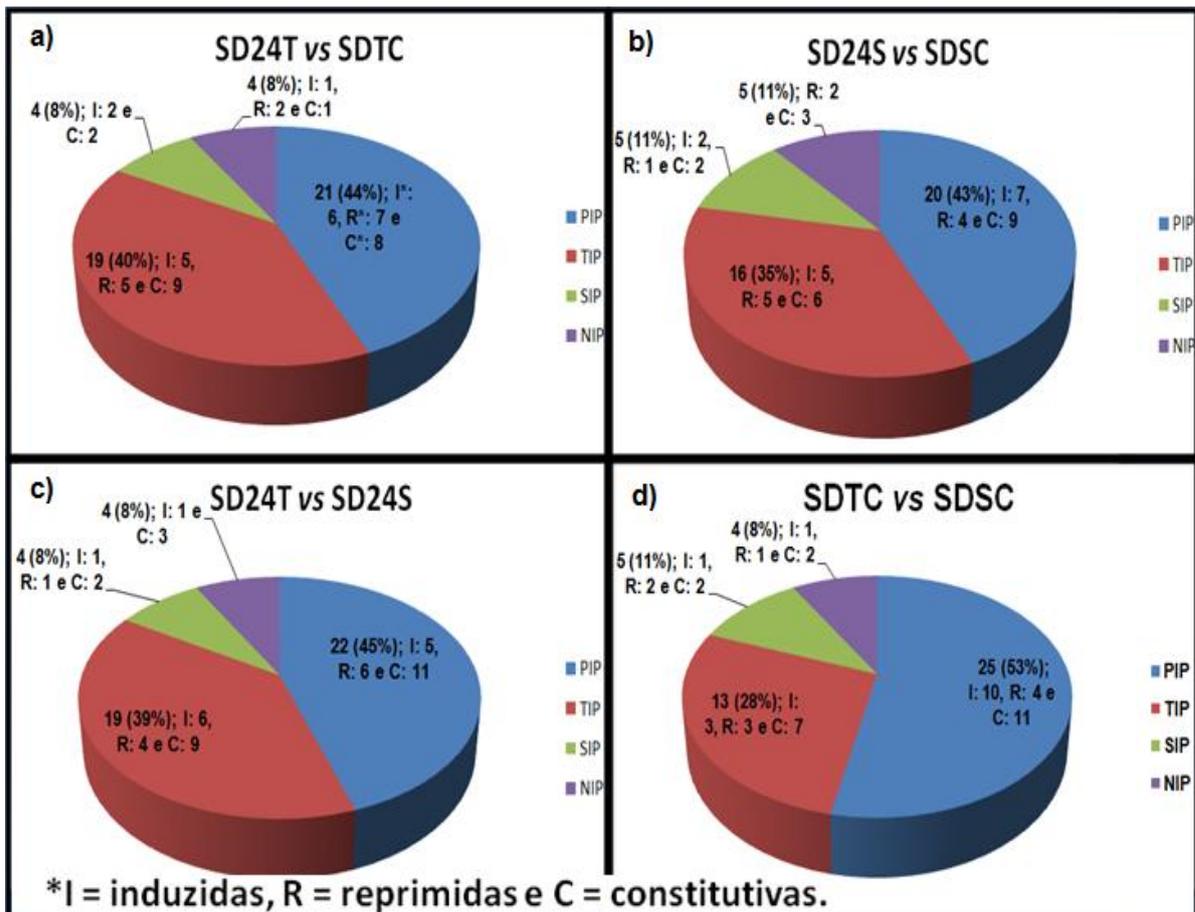
**Tabela 7.** Perfil transcricional de *unitags* SuperSAGE anotadas para prováveis isoformas de aquaporinas (respectivos domínios conservados) expressas em cana-de-açúcar para o contraste [SDTC x SDSC] envolvendo *bulks* de genótipos tolerantes *versus* sensíveis em condições controle (sem supressão de rega) e seus valores de modulação da expressão (FC: razão entre frequências da *unitag* na biblioteca tolerante sob estresse em relação ao controle).

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou Cluster*	Anotação**	Nível de expressão***	FC
SD173276	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	Maior transcrição	1879,46
SD150707	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Maior transcrição	9,37
SD92576	SOGI_TC146696	SoPIP1-2 <sup>#</sup>	Maior transcrição	8,44
SD176664	PAVIGI_FL885039	PvPIP2-1	Maior transcrição	6,46
SD7990	NCBI_gij35204947	SsTIP1-1	Maior transcrição	6,16
SD176665	ZMGI_CO457652	ZmPIP2-1	Maior transcrição	4,40
SD172661	SOGI_TC137502	SoPIP2-1	Maior transcrição	3,75
SD176669	SOGI_TC149764	SoPIP2-6	Maior transcrição	3,24
SD91605	SOGI_TC131971	SoNIP3-1	Maior transcrição	2,94
SD176663	OGI_CI146836	OsPIP2-4	Maior transcrição	2,49
SD176950	PAVIGI_TC1107	PaPIP2-4	Maior transcrição	2,34
SD119746	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Maior transcrição	1,97
SD84963	SOGI_TC127858	SoPIP1-3/PIP1-4	Maior transcrição	1,84
SD241279	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	Maior transcrição	1,72
SD96918	SOGI_TC135800	SoSIP1-2	Maior transcrição	1,35
SD182891	SOGI_TC120416	SoTIP2-2	Menor transcrição	-5,85
SD119963	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	Menor transcrição	-5,32
SD264077	NCBI_gij35282126	SsPIP1-1	Menor transcrição	-4,26
SD231443	SOGI_TC127588	SoPIP1-3/PIP1-4	Menor transcrição	-4,26
SD224474	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	Menor transcrição	-3,19
SD80613	NCBI_gij35984968	SsTIP1-1	Menor transcrição	-2,43
SD110293	SOGI_TC154548	SoSIP1-2	Menor transcrição	-2,33
SD202395	PAVIGI_TC17927	PaNIP1-1	Menor transcrição	-1,85
SD21811	SOGI_TC118552	SoSIP1-1	Menor transcrição	-1,60
SD243880	SOGI_TC142624	SoPIP2-1	Menor transcrição	-1,52
SD159242	NCBI_gij34919725	SsPIP1-1 <sup>#</sup>	ns	-1,14
SD264450	OGI_TC443567	OsPIP1-3/PIP1-4	ns	-1,07
SD124481	SOGI_TC117457	SoPIP1-5	ns	2,20
SD172662	ZMGI_CO457652	ZmPIP2-1	ns	1,17
SD221514	SOGI_TC133236	SoPIP2-1	ns	1,20
SD63093	OGI_CR291214	OsPIP2-2	ns	-1,06
SD146617	OGI_TC418960	OsPIP2-3	ns	-1,07
SD65894	ZMGI_EC882623	ZmPIP2-3	ns	-1,06
SD28080	SOGI_TC143544	SoPIP2-4	ns	1,05
SD198883	SOGI_TC124089	SoPIP2-5	ns	-1,39
SD172663	TAGI_TC442144	TaPIP2-6	ns	1,76
SD138471	TAGI_TC379633	TaTIP1-1	ns	-1,78

<i>Unitag</i>	Banco / EST ou Cluster*	Anotação**	Nível de expressão***	Cont. FC
SD149552	SOGI_TC132934	SoTIP1-1	ns	2,20
SD239051	SBGI_TC112507	SbTIP1-1	ns	1,01
SD36243	HVGI_TC214858	HvTIP2-2	ns	-1,02
SD107796	SOGI_CA258556	SoTIP2-2	ns	-1,14
SD119859	SOGI_TC141059	SoTIP2-3	ns	-2,66
SD46132	SOGI_CA113069	SoTIP4-2	ns	1,41
SD21810	SOGI_TC118552	SoSIP1-1	ns	-1,07
SD96922	SOGI_TC154548	SoSIP1-2	ns	-1,15
SD217703	SOGI_TC131971	SoNIP3-1	ns	1,17
SD192786	SOGI_TC118424	SoNIP3-1	ns	1,60

\*Sigla do banco (HVGI, NCBI, OGI, PAVIGI, SBGI, SOGI, TAGI e ZMGI) seguida do identificador da EST; \*\*Isoformas precedidas da sigla do nome da espécie (Hv - *Hordeum vulgare*; Os - *Oryza sativa*; Pv - *Panicum virgatum*; Sb - *Sorghum bicolor*; So - *Saccharum officinarum*; ; Ss - *Saccharum* sp.; Ta - *Triticum aestivum* e Zm - *Zea mays*);\*\*\* Nível de expressão significativa ou não (ns), ao nível de 5% de probabilidade; #EST Sem domínio.

As participações das prováveis aquaporinas em cada contraste estudado, considerando os totais para cada subfamília e respectivas porcentagens das aquaporinas diferencialmente expressas ou sem expressão diferencial, ao nível de 5% de probabilidade, durante o déficit hídrico de supressão de rega por 24 h (contrastes SD24T vs SDTC, SD24S vs SDSC e SD24T vs SD24S) e em condições normais de rega (contraste SDTC vs SDSC), envolvendo genótipos tolerantes e sensíveis de cana-de-açúcar, são apresentadas na Figura 6.



**Figura 6.** Representatividade (total e percentual) das subfamílias de aquaporinas expressas em cana-de-açúcar durante supressão de rega por 24 h (a, b e c) e em condições normais de rega (d), envolvendo *bulks* de genótipos tolerantes e sensíveis ao estresse. Bibliotecas SuperSAGE: SD24T (*bulk* tolerante sob estresse; SD24S (*bulk* sensível sob estresse); SDTC (*bulk* tolerante controle); SDSC (*bulk* sensível controle).

O número de prováveis isoformas distintas de aquaporinas expressas, para os três níveis de expressão [induzida, reprimida e constitutiva (não significativa ao nível de 5% de probabilidade)], nos contrastes SD24T vs SDTC, SD24S vs SDSC, SD24T vs SD24S e SDTC vs SDSC foram, respectivamente, 26 (de um total de 1.354 alinhamentos envolvendo 220 *unitags* e 459 ESTs), 28 (1.062 alinhamentos envolvendo 194 *unitags* e 375 ESTs), 28 (1.231 alinhamentos envolvendo 179 *unitags* e 465 ESTs) e 28 (1.152 alinhamentos envolvendo 237 *unitags* e 337 ESTs).

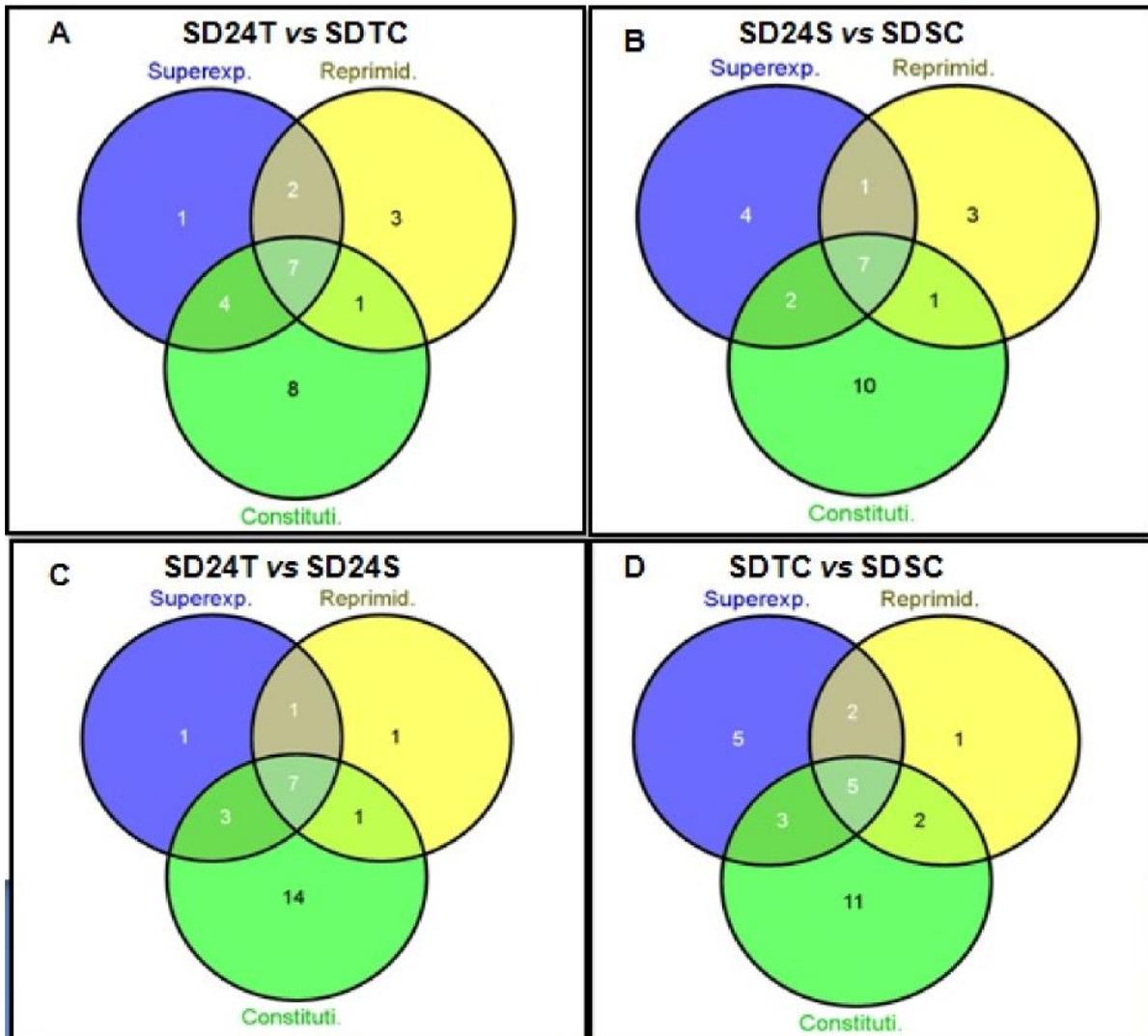
De todas as aquaporinas candidatas encontradas no contraste SD24T versus SDTC (genótipos tolerantes), quatro responderam exclusivamente ao estresse: uma induzida, a *SsPIP1-1* (*unitag* SD264077) com modulação da expressão (*Fold Change*, FC) de 3,58 vezes superior no tolerante em relação ao controle, e três reprimidas, *PvPIP2-2* (*unitag* SD176950, FC: -2,34), *TaPIP2-1* (*unitag* SD176664, FC: -1,73) e *PvNIP1-1* (*unitag* SD202395, FC: -1,36). Oito isoformas (*PvPIP1-1*, *OsPIP2-3*, *OsPIP1-3/PIP1-4*, *ZmTIP1-1*, *TaTIP1-1*, *SbTIP1-1*, *HvTIP1-1* e *SoTIP4-2*) apresentaram nível de expressão exclusivamente constitutiva e variação não significativa, para este contraste. Outras sete (*SoTIP2-3*, *SoTIP2-2*, *SoPIP1-3/PIP1-4*, *SoPIP1-5*, *SoNIP3-1*, *SsTIP1-1* e *SoPIP2-4*) foram observadas em todos os três níveis de transcrição, ao passo que *SoPIP2-5* e *SoTIP1-1* foram observadas sendo induzidas e reprimidas, *SoPIP2-1*, *HvTIP2-2*, *SoSIP1-1* e *SoSIP1-2*, além de constitutivas, também induzidas e *SoPIP2-6* concomitantemente reprimida e constitutiva (Figura 7A).

O contraste SD24S vs SDSC (genótipos sensíveis ao estresse) apresentou *PvPIP2-2* (*unitag* SD176665, FC: 4,83), *HvTIP1-1* (*unitag* SD19004, FC: 1,96), *SoPIP2-6* (*unitag* SD176669, FC: 1,70) e *OsPIP2-4* (*unitag* SD176663, FC: 1,66), como prováveis isoformas exclusivamente induzidas pelo estresse; *SsPIP1-1* (*unitag* SD264077, FC: -4,56), *TaTIP1-1* (*unitag* SD138471, FC: -2,51) e *PaNIP1-1* (*unitag* SD202395, FC: -2,00) como exclusivamente reprimidas, e *SoTIP2-2*, *SoTIP1-1*, *SoPIP2-4*, *SoPIP2-1*, *SoSIP1-2*, *SoTIP2-3* e *SsTIP1-1*, nos três níveis de transcrição. Além disso, *SoPIP1-3/PIP1-4* apresentou-se induzida e também reprimida, enquanto *SoSIP1-1* e *SoPIP1-5*, além de constitutivas, foram também observadas induzidas, e *SoNIP3-1* tanto reprimida como constitutiva, sem variação significativa na expressão (Figura 7B).

Na condição estresse para os *bulks* de genótipos analisados (SD24T vs SD24S), a provável aquaporina *PvPIP2-4* (*unitag* SD176664, FC de 3,64) foi exclusivamente mais induzida no *bulk* dos tolerantes em relação ao *bulk* dos sensíveis, enquanto que *OsPIP2-1* (*unitag* SD176669, FC: -1,13) foi exclusivamente reprimida. Um total de 14 prováveis isoformas (*SsPIP1-1*, *PvPIP1-5*, *PvPIP2-1*, *TaPIP2-1*, *FaPIP2-4*, *SoPIP2-5*, *TaPIP2-5*, *TaTIP1-1*, *HvTIP1-1*, *PvTIP2-2*, *PvTIP2-3*, *SoSIP1-1*, *PvNIP1-1* e *SoNIP1-2*) não diferiram nesta comparação, ao passo que *SoTIP1-1*, *SoNIP3-1* e *HvTIP2-2* foram identificadas em todos os três níveis de expressão. Além dessas, *SoPIP1-3/PIP1-4* foi observada induzida e também reprimida; *SoTIP1-1*, *SoNIP3-1* e *HvTIP2-2*, além de constitutivas, foram também observadas induzidas, enquanto que *SoPIP2-6* foi concomitantemente reprimida e constitutiva (Figura 7C).

O último contraste, SDTC vs SDSC, representativo dos *bulks* de genótipos na condição controle, apresentou cinco prováveis isoformas [*SoPIP1-2* (*unitag* SD92576, FC: 8,44); *PvPIP2-1* (*unitag* SD176664, FC: 6,46); *SoPIP2-6* (*unitag* SD176669, FC: 3,24); *OsPIP2-4* (*unitag* SD176663, FC: 2,49); *PaPIP2-4*, *unitag* SD176950, FC: 2,34) exclusivamente mais expressas no *bulk* tolerante em relação ao sensível e *PaNIP1-1* (*unitag* SD202395, FC: -1,85), exclusivamente reprimida. *OsPIP1-3/PIP1-4*, *OsPIP2-2*, *OsPIP2-3*, *ZmPIP2-3*, *SoPIP2-5*, *TaPIP2-6*, *TaTIP1-1*, *SoTIP1-1*, *HvTIP2-2* e *SoTIP4-2* não apresentaram diferenças significativas no nível de transcritos, enquanto que *SoTIP2-2*, *SoPIP2-4*, *SoPIP2-1*, *SoTIP2-3* e *SoSIP1-2* apresentaram todos os três níveis de expressão. Por outro lado, *SsTIP1-1* e *SoPIP1-3/PIP1-4* foram observadas sendo induzidas e também reprimidas, enquanto *ZmPIP2-1*, *SoNIP3-1* e *SoPIP1-5*, além de constitutivas, foram também induzidas, ao passo que *SsPIP1-1* e *SoSIP1-1* foram,

por sua vez, reprimidas e constitutivas (Figura 7D).



**Figura 7.** Diagramas de Venn com a distribuição das prováveis isoformas de aquaporinas expressas em cana-de-açúcar sob supressão de rega por 24 h (A, B, e C) ou condições controle (D). Bibliotecas SuperSAGE: SD24T (*bulk* tolerante sob estresse; SD24S (*bulk* sensível sob estresse); SDTC (*bulk* tolerante sob condições controle); SDSC (*bulk* sensível controle).

### 5.3. *Unitags* diferencialmente expressas entre os genótipos contrastantes

Visando identificar uma resposta diferencial dos genótipos tolerantes em relação aos sensíveis, a comparação entre as *unitags* diferencialmente expressas nos dois principais contrastes [SD24T vs SDTC (*bulk* dos genótipos tolerantes sob condições de supressão de 24 horas de rega *versus* controle) e SD24S vs SDSC (*bulk* dos genótipos sensíveis em condições de estresse *versus* controle)] permitiu observar de 18 *unitags* induzidas no contraste de tolerantes, oito sendo reprimidas no contraste de sensíveis, enquanto que as demais *unitags* não variaram significativamente a expressão (Tabela 8). Por outro lado, oito de 22 *unitags* reprimidas no contraste de tolerantes foram observadas sendo induzidas no constraste de sensíveis, ao passo que as demais (14) dessas 22 não variaram significativamente ao estresse no contraste de sensíveis (Tabela 8).

**Tabela 8.** *Unitags* anotadas para aquaporinas com respostas distintas quanto ao nível de expressão entre dois contrastes envolvendo bibliotecas SuperSAGE oriundas de genótipos tolerantes (SD24T vs SDTC) e sensíveis (SD24S vs SDSC) para supressão de rega (após 24 h) em cana-de-açúcar.

<i>Unitag</i>	Anotação	FC no contraste SD24T vs SDTC	Nível de expressão (SD24T vs SDTC)	FC no contraste SD24S vs SDSC	Nível de expressão SD24S vs SDSC
SD28082	SoPIP2-4	15,1	Indução	-6,39	Repressão
SD243866	SoPIP2-1	13,51	Indução	-15,97	Repressão
SD2444	SoPIP1-3/PIP1-4	5,93	Indução	-2,66	Repressão
SD119963	SoTIP2-3	5,56	Indução	1,93	Não significativo
SD264077	SsPIP1-1	3,58	Indução	-4,56	Repressão
SD36243	HvTIP2-2	3,53	Indução	1,34	Não significativo
SD243874	SoPIP2-1	3,18	Indução	-2,14	Repressão
SD119859	SoTIP2-3	3,18	Indução	-2,66	Repressão
SD231548	SoPIP1-3/PIP1-4	3,18	Indução	1,28	Não significativo
SD36536	SoTIP1-1	2,97	Indução	-1,9	Não significativo

Cont.

<i>Unitag</i>	Anotação	FC no contraste SD24T vs SDTC	Nível de expressão (SD24T vs SDTC)	FC no contraste SD24S vs SDSC	Nível de expressão SD24S vs SDSC
SD182891	SoTIP2-2	2,78	Indução	-5,85	Repressão
SD96919	SoSIP1-2	2,38	Indução	-1,06	Não significativo
SD84958	SsTIP1-1	2,02	Indução	-1,82	Repressão
SD217703	SoNIP3-1	1,93	Indução	-1,01	Não significativo
SD21811	SoSIP1-1	1,65	Indução	1,01	Não significativo
SD198883	SoPIP2-5	1,46	Indução	-1,25	Não significativo
SD28080	SoPIP2-4	1,23	Indução	-1,39	Não significativo
SD80612	SoTIP1-1	1,11	Indução	-1,07	Não significativo
SD91837	SoPIP2-4	-17,81	repressão	1,32	Não significativo
SD243847	SoPIP2-1	-7,5	repressão	-1,6	Não significativo
SD119919	SoTIP2-3*	-6,56	repressão	1,61	Não significativo
SD233575	SoPIP1-3/PIP1-4	-6,56	repressão	4,21	Indução
SD182871	SoTIP2-2	-6,09	repressão	-1,63	Não significativo
SD243911	SoPIP2-1	-5,62	repressão	-1,33	Não significativo
SD19006	HvTIP1-1	-5,16	repressão	4,67	Indução
SD231438	SoPIP1-3/PIP1-4	-5,16	repressão	1,38	Não significativo
SD84616	SoPIP2-5	-4,42	repressão	1,32	Não significativo
SD173276	SoTIP2-2	-3,33	repressão	496,29	Indução
SD7939	TaTIP1-1*	-2,95	repressão	1,76	Não significativo
SD80616	SsTIP1-1*	-2,81	repressão	2,34	Indução
SD231440	SoPIP1-3/PIP1-4	-2,79	repressão	-2,14	Não significativo
SD54851	SoPIP2-1	-2,53	repressão	1,87	Não significativo
SD176663	OsPIP2-4*	-2,51	repressão	1,66	Indução
SD194892	SoNIP3-1	-2,34	repressão	-1,6	Não significativo
SD176669	SoPIP2-6	-2,15	repressão	1,7	Indução
SD231437	SoPIP1-3/PIP1-4	-1,89	repressão	1,15	Indução
SD205705	SoPIP1-3/PIP1-4	-1,87	repressão	-1,14	Não significativo
SD19005	HvTIP1-1*	-1,87	repressão	1,84	Não significativo
SD176664	SoPIP2-4	-1,73	repressão	1,02	Não significativo
SD241279	SoPIP1-5	-1,22	repressão	2,4	Indução

\*Isoformas precedidas das iniciais da espécie (Hv - *Hordeum vulgare*; Os - *Oryza sativa*; So - *Saccharum officinarum*; Ss - *Saccharum* sp. e Ta - *Triticum aestivum*). Bibliotecas: SD24T (*bulk* de genótipos tolerantes sob estresse); SD24S (*bulk* de genótipos sensíveis sob estresse); SDTC (*bulk* de genótipos tolerantes sob condições controle); SDSC (*bulk* de genótipos sensíveis sob condições controle). FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca sob estresse em relação à biblioteca controle, de mesmos genótipos.

#### 5.4. RTqPCR: Desenho de *primers*, padronização das reações e teste de validação da expressão

As *unitags* anotadas consideradas superexpressas no contraste SD24T *versus* SDTC e, ao mesmo tempo, observadas reprimidas ou não significativas no contraste SD24S *versus* SDSC (Tabela 8), constituíram um universo de 48 ESTs disponíveis para o desenho de *primers*. Foram então desenhados, seguindo critérios descritos na metodologia, treze pares de *primers* específicos para cDNAs de aquaporinas (Tabela 9).

**Tabela 9.** *Primers* para amplificação via RTqPCR, propostos de ESTs de aquaporinas de cana-de-açúcar, respectivas *unitags* SuperSAGE associadas e modulações das expressões gênicas (FC) observadas na biblioteca oriunda de genótipos tolerantes (supressão de rega, 24 h) sob estresse em relação ao controle, sem estresse.

<i>Unitag</i>	FC*	EST / Cluster	Banco**	Aquaporina	<i>Primers</i> (L e R)***
SD28082	15,10	TC143544	SoGI	SoPIP2-4	GAGATCATCCGCACCTTCGT L ATTGGGAGAGGAGCCAACAC R
SD119963	5,56	TC141059	SoGI	SoTIP2-3	ATCCTCACCGGCATCTTCTACT L GATCACGATCTCCATCACCAC R
SD264077	3,58	gi 35203438	dbEST	SsPIP1-1	GTTCTATCCTTGCCCCACT L AGGCGTGATCCCTGTTGTAG R
SD264077	3,58	gi 35282126	dbEST	SsPIP1-1	GTCTCCAAGTCCACCTCCAAGT L AAAGTCACAGCTGGGTTGATGT R
SD264077	3,58	TC128938	SoGI	SoPIP1-3/PIP1-4	TTCCTCTACATCACCATCCTCA L AAAGTCACAGCTGGGTTGATGT R
SD231548	3,18	TC127588	SoGI	SoPIP1-3/PIP1-4	GACTCCCATGTTCTATCCTTG L CGTGATCCCTGTTGTAGATGAT R
SD36536	2,97	gi 35204947	dbEST	SsTIP1-1	GGGATACCAGTGGGTGTACT L GGGAGATCGAGAGAACTGATGA R

<i>Unitag</i>	FC*	EST / Cluster	Banco**	Aquaporina	Primers (L e R)***
SD96919	2,38	TC135800	SoGI	SoSIP1-2	AATATCCTCTGCGACGCACT L ATCAGCTCCGAGATGGCAAG R
SD241667	2,38	TC117457	SoGI	SoPIP1-5	ACCACTGGATCTTCTGGGTTG L GCAATAACAACGAGCCTCTCTT R
SD96922	2,10	TC154548	SoGI	SoSIP1-2	ATGATCTCCATATGCACCATGT L CCACGTATTATGGCGATTGTTA R
SD217703	1,93	TC118744	SoGI	SoNIP3-1	TAACGCTGAACATCCTCGTC L GCCAGCAGGTAGATCCACAG R
SD217703	1,93	TC118424	SoGI	SoNIP3-1	TCATCATCTCCTTCAACCTCCT L GACGAGGATGTTTCAGCGTTAC R
SD21811	1,65	TC118552	SoGI	SoSIP1-1	CGTCCATGAACCCAGCTAAT L TAAAGATCCATCCAGCAAGCAT R

\*FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante sob estresse em relação à biblioteca controle; \*\*Banco [NCBI (dbEST), Gene Index (SOGI)]; \*\*\*L: *primer Left*, R: *primer Right*.

Em uma triagem inicial, para definir a concentração ideal dos *primers* (0,2 a 0,5  $\mu$ M) e o ciclo inicial de detecção de amplificação, foram testados seis pares de *primers* para RTqPCR de aquaporinas e cinco para genes de referência (Tabela 10), visando verificar a eficiência em amplificar em triplicatas técnicas em cinco diluições seriadas (concentrado, 1:10, 1:100, 1:1.000 e 1:10.000), cujas detecções devem variar, em média, 3,3 ciclos limiares (Ct).

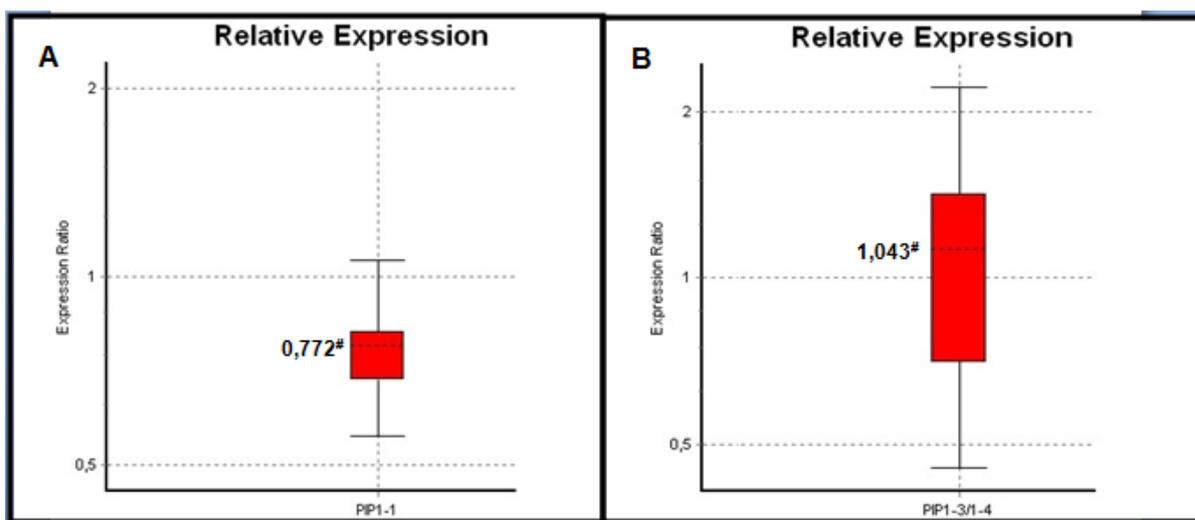
**Tabela 10.** Teste de eficiência de *primers* de RTqPCR propostos para genes de cana-de-açúcar visando amplificação de amostras a partir de raízes.

Gene	EST / Cluster_ID	Eficiência do <i>primer</i>	Ct da diluição 1/10*
<b>Genes de referência</b>			
25S rRNA	Iskandar <i>et al.</i> , 2004	Eficiência superior a 90%	19
GAPDH	SoGI_TC531505	Eficiência superior a 90%	22
Histona	Iskandar <i>et al.</i> , 2004	Eficiência superior a 90%	26
β-Tubulina	SoGI_TC446900	Eficiência superior a 90%	25
Ubiquitina	Paolacci <i>et al.</i> , 2009	Eficiência superior a 90%	29
<b>Aquaporinas</b>			
SoNIP3-1	SOGI_TC118744	Não amplificou	N.D.**
SoSIP1-2	SOGI_TC154548	Não amplificou	N.D.
SoTIP2-3	SOGI_TC141059	Ct tardio	32
SoPIP1-3 /PIP1-4	SOGI_TC127588	Eficiência superior a 90%	25
SoPIP2-4	SOGI_TC143544	Não amplificou	N.D.
SsPIP1-1	GI_35203438	Eficiência superior a 90%	24

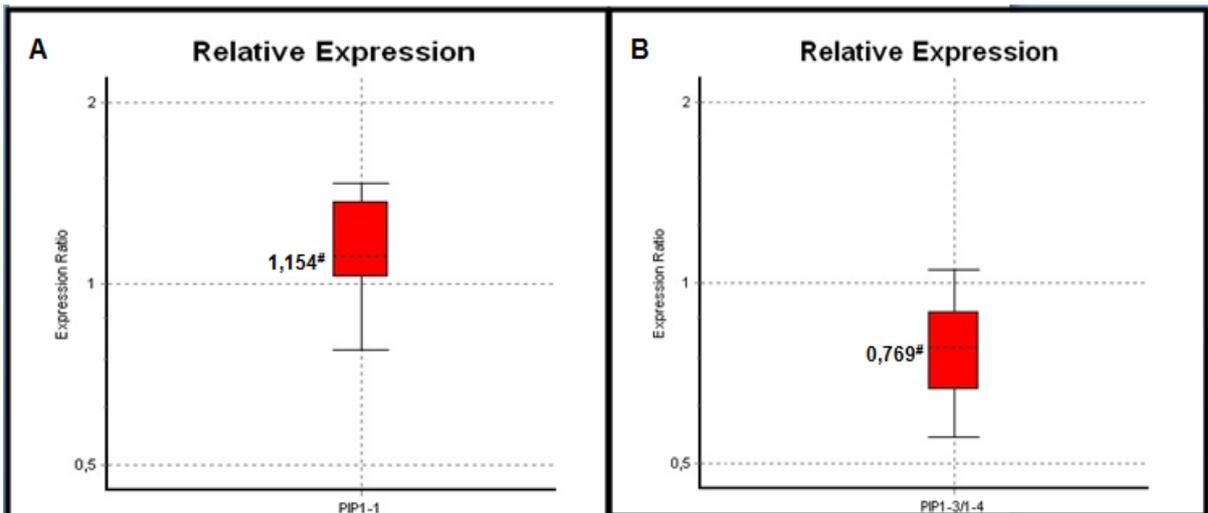
\*Ciclo limiar, 1a detecção significativa da amplificação na diluição 1/10 do concentrado. \*\*Não Definido.

A quantificação relativa, feita para dois *primers* funcionais específicos para aquaporinas [SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) e SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548)], a partir de cDNAs dos *bulks* de genótipos tolerantes sob estresse (SD24T) e condições normais de rega (SDTC), bem como dos *bulks* de genótipos sensíveis (SD24S, sob estresse e SDSC, controle) usando-se como genes de referência 25S rRNA e GAPDH, mostrou para os dois alvos não haver diferenças significativas nos níveis de transcrição com os genes de referência utilizados (Figuras 8 e 9). No contraste SD24T *versus* SDTC, SsPIP1-1 mostrou uma expressão relativa de 0,772 vezes (Figura 8A) e SoPIP1-3/PIP1-4 de 1,043

(Figura 8B). No contraste SD24S *versus* SDSC, SsPIP1-1 apresentou uma expressão relativa de 1,154 vezes (Figura 9A), enquanto que SoPIP1-3/PIP1-4 apresentou 0,769 (Figura 9B).



**Figura 8.** Quantificação relativa das prováveis isoformas SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) (A) e SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548) (B), na comparação entre o *bulk* de genótipos tolerantes à seca de cana-de-açúcar estressados (supressão de rega 24 h) com o *bulk* de mesmos genótipos na situação controle, utilizando-se como genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).



**Figura 9.** Quantificação relativa das prováveis isoformas *SsPIP1-1* (*unitag* SD264077) (A) e *SoPIP1-3/PIP1-4* (*unitag* SD231548) (B), na comparação entre o *bulk* de genótipos sensíveis à seca de cana-de-açúcar estressados (supressão de rega 24 h) com o *bulk* de mesmos genótipos na situação controle, utilizando-se como genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).

Visando individualizar as respostas por genótipo, procedeu-se à “abertura dos *bulks*”. Os resultados de expressão relativa considerando os dois genes-alvo em relação aos genes de referência utilizados, para os diferentes genótipos tolerantes e sensíveis que compõem os *bulks* em questão encontram-se na Tabela 11, conjuntamente com os resultados de SuperSAGE.

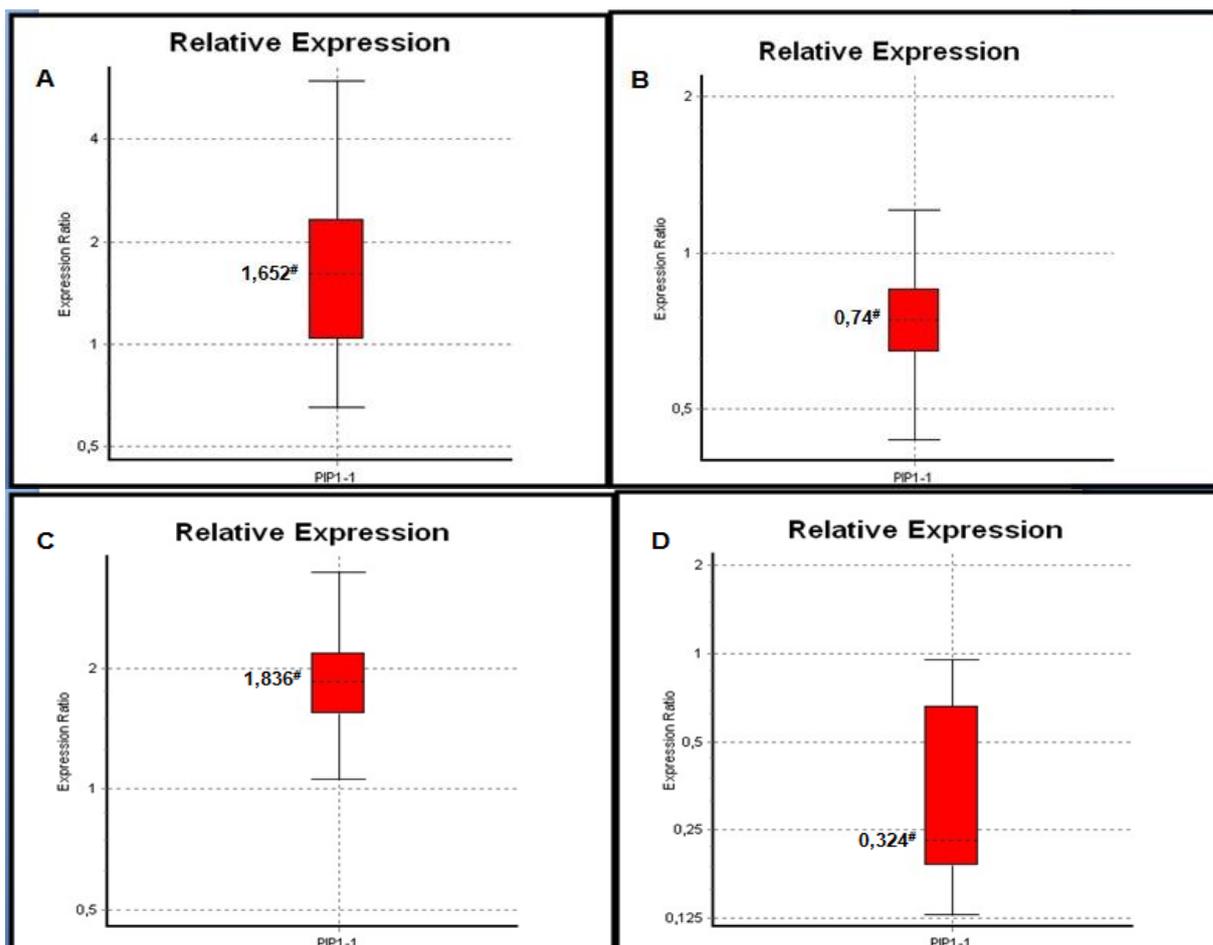
**Tabela 11.** Expressão relativa de duas aquaporinas, SsPIP1-1 (unitag SD264077) e SoPIP1-3/PIP1-4 (unitag SD231548), via técnica SuperSAGE (bibliotecas em *bulks*) e RTqPCR (tanto em *bulks* quanto em genótipos) feita a partir da comparação de cDNAs de genótipos de cana-de-açúcar tolerantes e sensíveis à seca sob supressão de rega por 24 h com seus respectivos controles.

Técnica e material genético		Alvo	
		SsPIP1-1	SoPIP1-3/PIP1-4
		Modulação da expressão gênica <sup>§</sup>	
SuperSAGE* em <i>bulks</i>	Tolerantes	3,58* / indução	3,18* / indução
	Sensíveis	- 4,56* / repressão	1,28* / ns
RTqPCR <sup>#</sup> em <i>bulks</i>	Tolerante	0,772 <sup>#</sup> / ns	1,043 <sup>#</sup> / ns
	Sensível	1,154 <sup>#</sup> / ns	0,769 <sup>#</sup> / ns
RTqPCR <sup>#</sup> em Genótipos Tolerantes	CTC6	1,652 <sup>#</sup> / indução	1,271 <sup>#</sup> / ns
	CTC15	0,740 <sup>#</sup> / repressão	0,670 <sup>#</sup> / repressão
	SP83-2847	1,836 <sup>#</sup> / indução	1,468 <sup>#</sup> / indução
	SP83-5073	0,324 <sup>#</sup> / repressão	0,383 <sup>#</sup> / repressão
RTqPCR <sup>#</sup> em Genótipos Sensíveis	CTC9	1,030 <sup>#</sup> / ns	1,205 <sup>#</sup> / ns
	CTC13	0,635 <sup>#</sup> / repressão	0,644 <sup>#</sup> / repressão
	SP90-1638	1,536 <sup>#</sup> / ns	1,236 <sup>#</sup> / ns
	SP90-3414	0,324 <sup>#</sup> / repressão	0,383 <sup>#</sup> / repressão

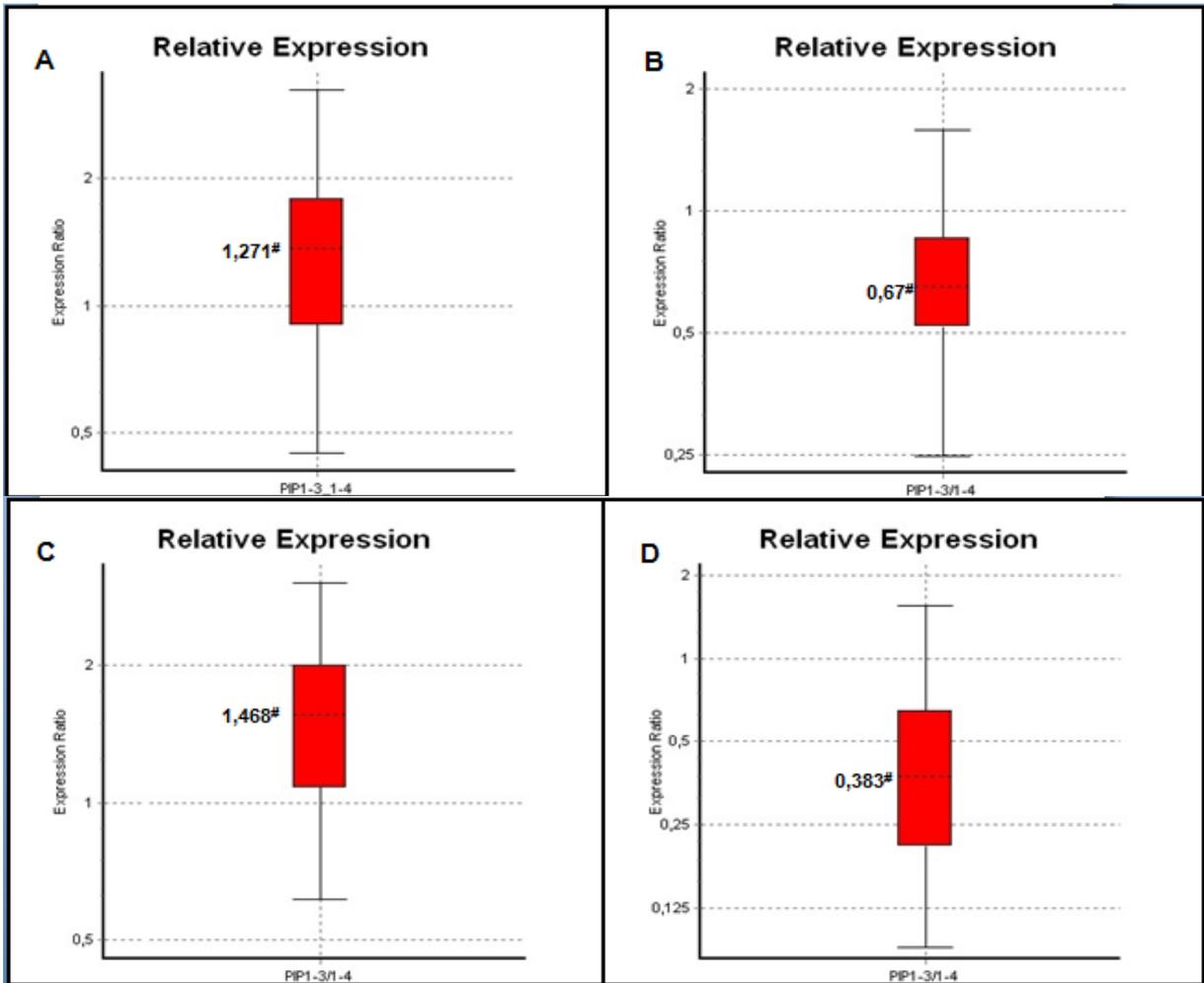
Modulação da expressão gênica (<sup>§</sup>nível de significância de 5%): \**Fold Change* (FC= razão das frequências normalizadas para 1.000.000 da biblioteca estressa pelas frequências, igualmente normalizadas para 1.000.000, da biblioteca controle); <sup>#</sup>Nível de expressão relativa pelo software REST (v. 2.0.13). ns: não significativo ao nível estudado.

Em relação ao alvo SsPIP1-1 (unitag SD264077), para dois dos genótipos tolerantes (CTC6 e SP83-2847) foi observada uma maior expressão na condição de estresse (supressão de rega) em relação aos respectivos controles de rega normal (Tabela 11, Figuras 10A e 10C, respectivamente), concordando com a expressão observada com SuperSAGE. Para os genótipos tolerantes CTC15 e SP83-5073 os resultados de expressão relativa para este alvo mostraram repressão após o estresse aplicado (Tabela 11, figuras 10B e 10D, respectivamente). Para o alvo SoPIP1-3/PIP1-4 (unitag SD231548), o genótipo tolerante CTC6, na comparação da condição estresse em relação ao controle, não apresentou diferenças significativas nos níveis de transcrição (Tabela 11,

Figura 11A). Já para o genótipo SP83-2847, o alvo SoPIP1-3/PIP1-4 apresentou indução de transcrição durante o estresse (Tabela 11 e Figura 11C), sendo este concordante com a expressão em *bulk* para SuperSAGE. Por outro lado, os genótipos tolerantes CTC15 e SP83-5073 reprimiram essa transcrição durante a supressão de rega (Tabela 11, figuras 11B e 11D, respectivamente).



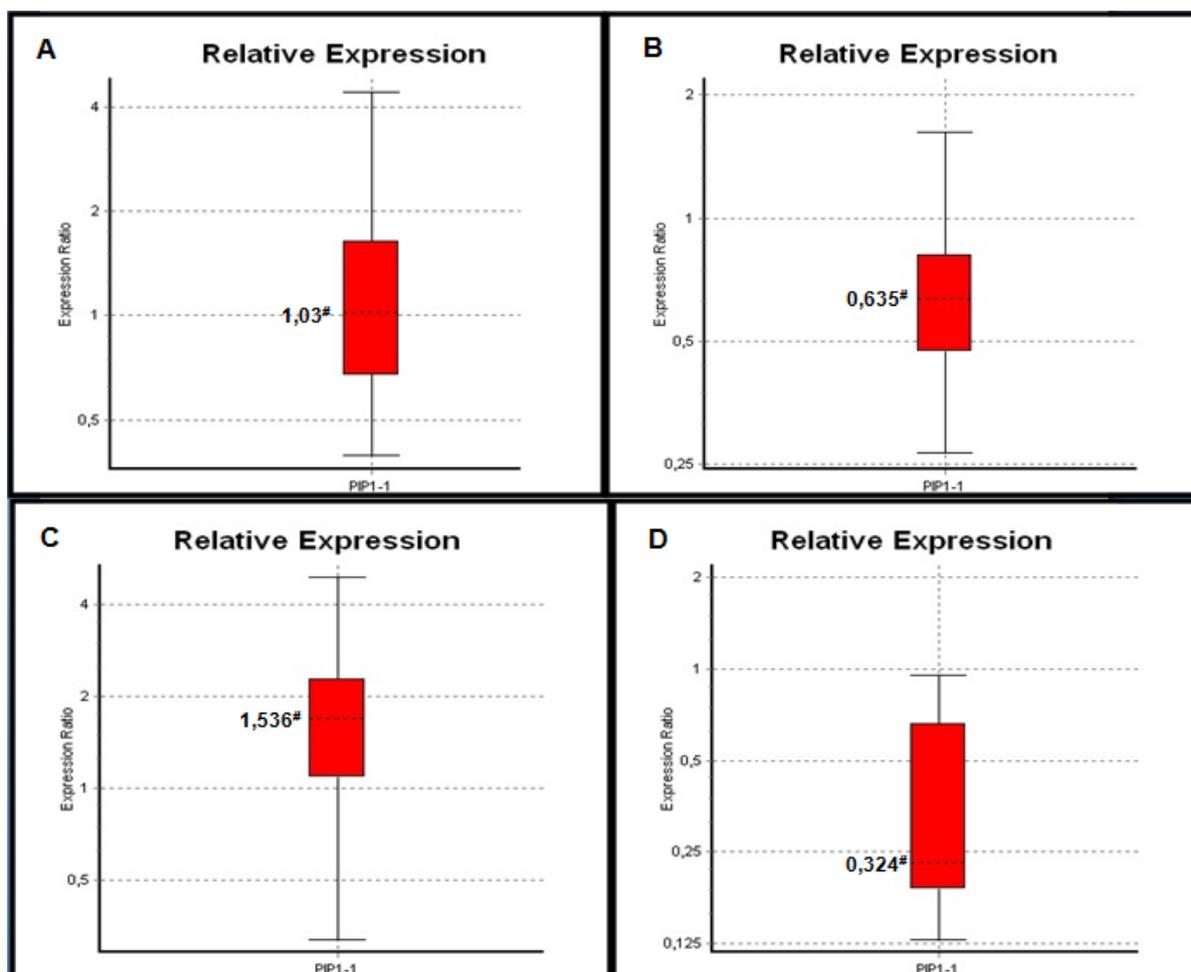
**Figura 10.** Quantificações relativas para aquaporina SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) obtidas a partir de cDNAs de genótipos tolerantes à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC6, (B) CTC15, (C) SP83-2847 e (D) SP83-5073] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).



**Figura 11.** Quantificações relativas para aquaporina SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548) obtidas a partir de cDNAs de genótipos tolerantes à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC6, (B) CTC15, (C) SP83-2847 e (D) SP83-5073] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).

Quando da abertura dos *bulks* de genótipos sensíveis, o alvo SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) apresentou para os genótipos CTC13 e SP90-3414 uma repressão significativa de transcrição na condição de estresse em relação à condição controle, concordante com dados de SuperSAGE em *bulk* (Tabela 11 e

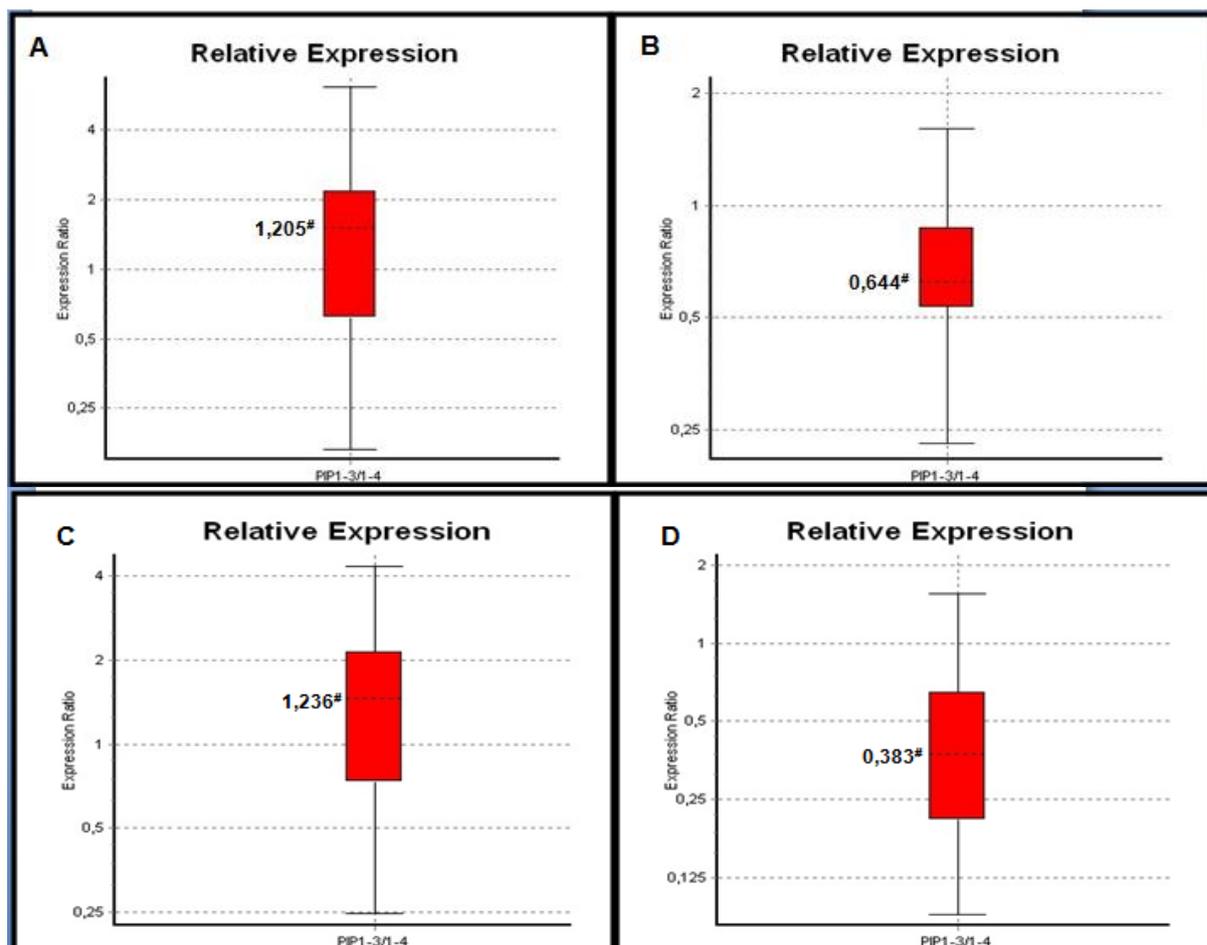
Figuras 12B e 12D). No entanto, a expressão deste alvo não variou significativamente com os genótipos sensíveis CTC9 e SP90-1638, nas mesmas condições (Tabela 11 e Figuras 12A e 12C, respectivamente).



**Figura 12.** Quantificações relativas para aquaporina SsPIP1-1 (*unitag* SD264077) obtidas a partir de cDNAs de genótipos sensíveis à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC9, (B) CTC13, (D) SP90-1638 e (D) SP90-3414] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. #Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).

Em relação ao alvo SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548), este foi reprimido

significativamente em dois dos quatro genótipos sensíveis (CTC13, Figura 13B, e SP90-3414, Figura 13D), quando da comparação na condição de estresse em relação aos controles respectivos. Para os genótipos CTC9 (Figura 13A) e SP90-1638 (Figura 13D), os dados não variaram significativamente, em concordância com os dados de SuperSAGE em *bulk*.



**Figura 13.** Quantificações relativas para aquaporina SoPIP1-3/PIP1-4 (*unitag* SD231548) obtidas a partir de cDNAs de genótipos sensíveis à seca de cana-de-açúcar [(A) CTC9, (B) CTC13, (D) SP90-1638 e (D) SP90-3414] na condição de estresse (supressão de rega 24 h), com relação aos mesmos genótipos na situação controle e em relação aos genes de referência 25S rRNA e GAPDH. <sup>#</sup>Expressão relativa (software REST versão 2.0.13) com valor da mediana (pontilhado horizontal na caixa colorida) e intervalo compreendendo 100% das observações (entre barras horizontais), sendo 50% delas na caixa colorida (intervalo de confiança ao nível de 95%).

## 6. Discussão

### 6.1. Aquaporinas em cana-de-açúcar

O tema aquaporina é atual e extensivamente estudado, cobrindo desde fisiologia animal (Lucero *et al.* 2012) e humana (Di Giusto *et al.* 2012) à osmoadação de microorganismos (Geijer *et al.* 2012) e vegetais (Ayadi *et al.* 2011, Hu *et al.*, 2012, Liu *et al.*, 2013). Apesar da relevante importância fisiológica e do envolvimento em várias funções durante o desenvolvimento das plantas e sua aclimatação frente a estresses abióticos e bióticos (Maurel *et al.*, 2008), as únicas aquaporinas descritas em cana-de-açúcar foram descobertas marginalmente em trabalhos de transcriptômica, como no recente artigo de Lembke *et al.* (2012), que a partir de um arranjo de 21,901 sondas de oligonucleotídeos de cana-de-açúcar sob déficit hídrico detectaram 987 sondas diferencialmente expressas, validando, via RTqPCR, 17 genes, dentre os quais, apenas uma aquaporina, a isoforma PIP2-5. Esse trabalho é, desta forma, pioneiro em abordar especificamente as aquaporinas de cana-de-açúcar, derivadas de perfis transcricionais gerados a partir da técnica SuperSAGE.

### 6.2. Anotação das *tags* via BLASTn contra ESTs de bancos públicos de gramíneas

A eficiência da anotação está relacionada com o banco de EST utilizado (Kido *et al.*, 2011). Neste caso, o SoGI (banco de dados público compreendendo atualmente 282.683 ESTs, que compõem 42.377 sequências TC (*Tentative*

*Consensus*; agrupamentos de ESTs formando grandes transcritos virtuais; TGI, 2012) se apresentou como a melhor fonte para anotação de *unitags* de cana-de-açúcar, por ser composto de ESTs e TCs de *Saccharum officinarum* L. [uma das espécies do complexo *Saccharum* sp. (D'Hont *et al.*, 1996, Grivet e Arruda, 2002)] e por estas apresentarem melhores descrições do nome/função do gene do que, por exemplo, o banco dbEST, composto por 135.534 ESTs, extraídas basicamente de transcriptomas da cultivar SP80-3280 (híbrido *Saccharum* spp.), oriundas do projeto brasileiro SUCEST-FAPESP (DBEST, 2012). Além disso, o banco SoGI possibilitou ancorar quase a totalidade das *unitags* de aquaporinas (260 das 289; Tabela 2), superando o dbEST em número de alinhamentos e de *unitags* envolvidas, com uma eficiência seis vezes superior (Tabela 2). Os resultados sugerem que isto pode ter ocorrido, principalmente, ao tamanho das sequências dos bancos envolvidos, pois o maior número de alinhamentos ocorreu em sequências TC (Tabelas 4, 5, 6 e 7). O banco dbEST se apresentou como a segunda melhor fonte para o mapeamento, mas não para anotação, devido as suas ESTs apresentam em sua maioria apenas referências ao clone da qual a EST foi sequenciada.

Sorgo é o diploide mais próximo de *S. officinarum* (Dillon *et al.*, 2007) e dele se esperava uma identificação mais eficiente de isoformas de aquaporinas em relação aos outros bancos de ESTs de gramíneas menos relacionadas taxonomicamente, mas apenas 19 *unitags* foram ancoradas em sete ESTs (Tabela 2). Este fraco desempenho pode ser explicado principalmente pelo baixo número de ESTs disponíveis neste banco, apenas 46.043, sendo o segundo menor banco utilizado (Tabela 2).

### **6.3. A categorização como alternativa para maximizar a identificação de transcritos**

A categorização via ontologia gênica, cobrindo os três domínios (função molecular, processo biológico e localização celular; TGO, 2012), caracterizou todas as 484 ESTs com *unitags* ancoradas (Tabela 2), mas muitos termos foram comuns a proteínas não pertencentes à superfamília MIP. Por exemplo, 42 ESTs de aquaporinas só apresentavam o termo GO *membrane*, que apesar de presente nas aquaporinas também é compartilhado por *Auxin-induced protein 5NG4*, *Dihydrolipoyl dehydrogenase*, *50S ribosomal protein L5*, *NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 5* e vários outros genes. Entretanto, o termo GO “*water transport*”, por sua vez, foi exclusivo às aquaporinas, e a busca utilizando esse termo (como palavra-chave) aumentou a eficiência na identificação de transcritos de aquaporinas em aproximadamente 15 %, correspondendo a 230 alinhamentos dos 1.579 (Figura 5).

### **6.4. Perfil Transcricional das Aquaporinas de Cana-de-açúcar**

Foram identificadas em média 28 isoformas de prováveis aquaporinas expressas em raízes durante o estresse hídrico de supressão de rega (24 h) e condições de rega normal, número que está próximo da média da quantidade de isoformas de aquaporinas encontradas nos vegetais – entre 31 no milho (Chaumont *et al.*, 2001, Bansal & Sankararamakrishnan, 2007) e 35 em *A. thaliana* (Jang *et al.*, 2004) a 39 isoformas no arroz (Bansal & Sankararamakrishnan, 2007) e 71 no algodão (Park *et al.*, 2010) – e já sendo

superior ao dobro do número presente nos vertebrados (de 11 a 13) (Zardoya, 2005, Magni *et al.*, 2006).

A abundância de tipos de isoformas de aquaporinas de cana-de-açúcar deve ser certamente maior, pois algumas isoformas de aquaporinas respondem especificamente a determinados tecidos (Alexandersson *et al.*, 2005) e estímulos – salinidade (Boursiac *et al.*, 2005, Zhu *et al.*, 2005), congelamento (Aroca *et al.*, 2005, Yu *et al.*, 2006), patógenos (Opperman, Taylor e Conkling, 1994), micorrização (Uehlein *et al.*, 2006, Giovannetti *et al.*, 2012), luminosidade (Lopez *et al.*, 2003, Vandeleur *et al.*, 2009, Voicu, Cooke e Zwiazek, 2009), crescimento celular (Hachez *et al.*, 2006, Besse *et al.*, 2011), entre outros. Porém, só seria possível indicar o número real de aquaporinas de cana-de-açúcar através do total sequenciamento do genoma. No entanto, como essa cultura apresenta um dos genomas mais complexos do reino vegetal, com um número diploide que varia de 100 a 130 cromossomos, indicando uma alta taxa de poliploidia e aneuploidia (Grivet e Arruda, 2002), seria necessário um investimento pesado para esse feito.

#### **6.4.1. Abundância das subfamílias de aquaporinas de cana-de-açúcar expressas durante o déficit hídrico e o nível da modulação da transcrição**

As 19 *unitags* de prováveis aquaporinas mais transcritas foram das subfamílias PIP e TIP (Tabela 3); um perfil semelhante ao estudo de referência de Alexandersson e colaboradores (2005), que analisaram o perfil transcricional das 35 aquaporinas de *Arabidopsis* em três tipos de tecidos (raízes, folhas e flores) durante o déficit hídrico, concluindo, para todos os três tecidos, que a maioria das PIP e algumas TIP possuem altos níveis de expressão, enquanto que as NIPs

apresentam níveis muito baixos de transcrição. Zhu *et al.* (2005) também confirmaram uma menor abundância de NIP e SIP, em milho sob condições controle (solução hidropônica média, continuamente arejada, seguindo os parâmetros de Gibeaut *et al.* (1997)), frente às PIP a TIP, que pode ser explicada por suas especificidades de transporte (Wallace, Choi e Roberts, 2006), estando NIP e SIP relacionadas ao transporte de pequenos solutos (Maurel *et al.*, 2008, Bezerra-Neto, 2012).

Observou-se ainda que SIP e NIP foram as subfamílias de aquaporinas menos responsivas à seca, chegando a NIP não ser detectada dentre as superexpressas no contraste SD24S vs SDSC (*bulks* de genótipos sensíveis, Figura 6b), nem nas reprimidas no contraste SD24T vs SD24S (*bulks* de genótipos tolerantes, Figura 6c), enquanto que a subfamília SIP não apresentou nenhuma isoforma nas reprimidas no contraste SD24T vs SDTC (Figura 6a). Alexandersson e colaboradores (2005) também confirmaram que algumas isoformas de SIP possuem pouca variação quanto à seca, principalmente a AtSIP1-1 que foi considerada constitutiva.

O nível de transcrição variou, em média, em menos de 10 vezes (Tabelas 4, 5, 6 e 7), com exceção da *unitag* SD173276 (anotada como SoTIP2-2), que apresentou valores de modulação acima de quase duas mil vezes maior na condição controle (Tabela 7) e de quase 500 vezes no contraste de genótipos sensíveis (SD24S vs SDSC; Tabela 5). Alexandersson *et al.* (2005) também observaram que a expressão da maioria das aquaporinas não variou muitas vezes sob déficit hídrico (nenhuma isoformas de aquaporina de *Arabidopsis* variou a expressão mais que duas vezes até o sétimo dia de supressão de rega, cujos tempos de tratamento foram: 0, 2, 5, 7, 9 e 12 dias). Visto que a supressão

de rega no presente caso foi de apenas 24 horas, devido ao intuito de se estudar a resposta imediata desses genótipos sob estresse, a modulação expressiva da *unitag* acima é vista como um relevante indicador do potencial desta *unitag* e de sua regulação para estudos futuros.

#### **6.4.2. Isoformas identificadas no contraste SD24T vs SDTC**

Para o contraste que compara a diferença nos níveis de expressão em *bulks* de genótipos tolerantes ao déficit hídrico sob condições contrastantes (supressão de rega e controle), foi possível identificar, a partir de um diagrama de Venn (Figura 7), dentre as 27 isoformas encontradas de aquaporinas (Tabela 4), quatro alvos potenciais: a isoforma exclusivamente induzida *SsPIP1-1* (*unitag* SD264077) e três exclusivamente reprimidas, *PvPIP2-2* (*unitag* SD176950), *TaPIP2-1* (*unitag* SD176664) e *PvNIP1-1* (*unitag* SD202395). Estes são potenciais alvos para posterior utilização no melhoramento genético via seleção assistida por PCR em tempo real (*Real-time PCR-assisted selection*) (Terzi *et al.*, 2005) ou via cisgenia, inserção de genes em cultivares diferentes de uma mesma espécie (Schouten, Krens e Jacobsen, 2006), procedimento já demonstrado com sucesso em cultivares de maçã pela equipe de Joshi *et al.* (2011), que inseriram genes de resistência à Sarna da macieira, sob promotor do gene da enzima rubisco, em variedades susceptíveis ao patógeno.

No sentido de uso futuro no melhoramento genético, em um trabalho atual se concluiu que a mesma isoforma *PIP1-1* (*unitag* SD264077) observada neste trabalho como sendo induzida nas análises de bioinformática e validada via RTqPCR para dois genótipos tolerantes (CTC6 e SP83-2847) e dois sensíveis

(CTC13 e SP90-3414), promovia resistência em arroz ao estresse salino (Liu *et al.*, 2013). Esta isoforma também esteve envolvida com a reidratação após o estresse de resfriamento em variedades tolerantes de arroz (Yu *et al.*, 2006), em respostas ao déficit hídrico e diurno em videira (Vandeleur *et al.*, 2009) enquanto a superexpressão da PIP1-1 de arroz acentuou a tolerância ao déficit hídrico e ao estresse salino em transgênicos de *Arabidopsis* (Guo *et al.*, 2006). Portanto, os resultados aqui obtidos de bioinformática, junto com os resultados de validação em diferentes genótipos de cana-de-açúcar via RTqPCR, em conjunto com as conclusões da literatura, sugerem a isoforma SsPIP1-1 como um promissor alvo tanto para cisgenia quanto para uso como marcador molecular para seleção assistida por PCR em tempo real.

A PIP2-2, uma das três prováveis isoformas de aquaporinas observadas exclusivamente reprimidas neste contraste entre tolerantes (com FC de -2.34, respectivamente, Tabela 4) foi reprimida em mais de quatro vezes em *Arabidopsis* sobre déficit hídrico de 12 dias (Alexandersson *et al.*, 2005), indicando estas isoformas, após as necessárias validações via PCR em tempo real, como candidatas também a alvos como marcadores moleculares para seleção assistida por PCR em tempo real, mas com indicação de sensibilidade ao estresse em questão. Isto é reforçado pela observação da isoforma PIP2-1 com expressão reprimida em cevada sob estresse salino (Katsuhara *et al.*, 2002), sendo que, posteriormente, se observou que a expressão dessa aquaporina causou um aumento na sensibilidade à salinidade em plantas transgênicas de arroz (Katsuhara *et al.*, 2003). Esse potencial também é reforçado pelo fato de compartilhamento de muitas vias de respostas entre os estresses de seca e de salinidade (Mahajan e Tuteja, 2005, Huang *et al.*, 2012).

As prováveis isoformas SoPIP2-5 e SoTIP1-1 observadas induzidas e reprimidas, SoPIP2-1, HvTIP2-2, SoSIP1-1 e SoSIP1-2, além de constitutivas, também induzidas e SoPIP2-6 concomitantemente reprimidas e constitutivas, necessitam, por sua vez, de uma confirmação de seus perfis transcricionais através de validações via RTqPCR, que confirmará ou não algumas dessas aquaporinas como alvos úteis em programas de melhoramento. Neste sentido, Jang *et al.* (2007) concluíram que a aquaporina PIP2-5 (concomitantemente induzida e reprimida neste trabalho) reduziu a tolerância à seca de plantas transgênicas de *Arabidopsis* e tabaco que a superexpressaram. Essa equipe também observou que a expressão de PIP2-5 influencia os níveis de transcrição de outras aquaporinas PIP e H<sup>+</sup>-ATPases [enzimas que regulam o pH citoplasmático, cujos níveis de H<sup>+</sup> interferem no controle da abertura/fechamento dos canais das aquaporinas – *aquaporin gating* (Tournaire-Roux *et al.*, 2003)]. Esta isoforma foi validada via RTqPCR por Lembke *et al.* (2012), que concluíram ser esta isoforma reprimida sob déficit hídrico, 72 horas de supressão de rega, apesar da indução observada via arranjo de oligonucleotídeos, reforçando a expressão controversa observada com SuperSAGE já com 24 h de supressão de rega. Portanto, ao menos para genótipos de cana-de-açúcar tolerantes, espera-se que essa aquaporina obtenha uma repressão de sua expressão em resposta à seca.

#### **6.4.3. Isoformas identificadas no contraste SD24S vs SDSC**

As isoformas diferencialmente expressas para o contraste SD24S vs SDSC possuem importância no sentido de se traçar um perfil de aquaporinas

diferencialmente expressas durante o déficit hídrico por genótipos sensíveis ao estresse. Logo, as quatro isoformas exclusivamente induzidas – *PvPIP2-2* (*unitag* SD176665), *HvTIP1-1* (*unitag* SD19004), *SoPIP2-6* (*unitag* SD176669) e *OsPIP2-4* (*unitag* SD176663) e as três exclusivamente reprimidas (*SsPIP1-1* (*unitag* SD264077), *TaTIP1-1* (*unitag* SD138471) e *PaNIP1-1* (*unitag* SD202395) – podem servir também como marcadores moleculares funcionais para seleção assistida por PCR em tempo real, cujos genótipos que apresentarem esse perfil de transcrição predominante seriam indicativos de sensibilidade ao estresse. Entretanto, maiores estudos são necessários para indicar o real valor de cada isoforma nessa resposta combinada.

*SsPIP1-1* (*unitag* SD264077), mesma isoforma e *unitag* induzida (3,58 vezes) no contraste envolvendo genótipos tolerantes (SD24T vs SDTC), apresentou um nível de expressão completamente oposto (-4,56) nos genótipos sensíveis em condições de estresse (SD24S vs SDSC). De modo contrário, quanto à expressão, a isoforma *PvPIP2-2*, exclusivamente reprimida nos genótipos tolerantes durante o estresse, mostrou regulação transcricional completamente oposta nos genótipos sensíveis, sendo exclusivamente induzida. Logo, ambas isoformas aparecem como forte candidatas a alvos para, além da seleção assistida por PCR em tempo real, também para cisgenia, sendo esperadas respostas contrastantes para genótipos portadores dessas isoformas.

#### **6.4.4. Isoformas presentes nos contrastes SD24T vs SD24S e SDTC vs SDSC**

Isoformas presentes no contraste SD24T vs SD24S são expressas pelos genótipos tolerantes em relação aos sensíveis, na condição de estresse. Nesta

comparação vale ressaltar as duas isoformas: *PvPIP2-4* (*unitag* SD176664, exclusivamente mais induzida no *bulk* dos tolerantes em relação ao *bulk* dos sensíveis) e *OsPIP2-1* (*unitag* SD176669, exclusivamente reprimida em relação aos mesmos *bulks*). Sob este ponto de vista, de expressões contrastantes nas respostas ao estresse de genótipos tolerantes e sensíveis durante o estresse, ambas poderiam ser indicadas como alvos para estudos futuros. A isoforma *PvPIP2-4*, cuja *unitag* (SD176664) se mostrou reprimida no contraste envolvendo os genótipos tolerantes (Tabela 4), constitutiva e sem diferenças significativas, no contraste de genótipos sensíveis ao estresse (Tabela 5) e induzidas nos dois contrastes envolvendo os grupos divergentes de genótipos (Tabelas 6 e 7). Levando a crer que essa isoforma é mais expressa em condições normais de rega, em genótipos tolerantes. A recomendação dessa aquaporina para estudos futuros seria fortalecida, principalmente, ao se considerar que em milho a PIP2-4 foi induzida, após duas horas de aplicação de estresse salino, durante fase de recuperação do potencial osmótico (Zhu *et al.*, 2005). Logo, devido ao compartilhamento de muitas vias de respostas entre seca e salinidade (Mahajan e Tuteja, 2005, Huang *et al.*, 2012), a real participação dessa isoforma na resposta ao déficit hídrico, merece ser investigada.

Para a segunda isoforma, *OsPIP2-1*, aquaporina da qual a expressão aumentou a sensibilidade à salinidade em plantas transgênicas de arroz (Katsuhara *et al.*, 2003), cuja *unitag* (SD176669) se mostrou reprimida no contraste envolvendo os genótipos tolerantes (Tabela 4), induzida no contraste de genótipos sensíveis ao estresse (Tabela 5) e reprimida nos dois contrastes envolvendo os grupos contrastantes de genótipos (Tabelas 6 e 7), e que seria, portanto, mais expressa tanto nas condições de estresse quanto controle, em

genótipos sensíveis do que tolerantes ao estresse, esse comportamento diferencial também fortaleceria essa recomendação.

A comparação entre os controles permitiu identificar as aquaporinas expressas em condições normais de rega. Nessa condição, genótipos tolerantes apresentaram mais transcritos que os genótipos sensíveis, para cinco prováveis isoformas (SoPIP1-2, *unitag* SD92576; PvPIP2-1, *unitag* SD176664; SoPIP2-6, *unitag* SD176669; OsPIP2-4, *unitag* SD176663; PaPIP2-4, *unitag* SD176950) e apenas uma foi exclusivamente menos transcrita nos tolerantes em relação aos sensíveis (PaNIP1-1, *unitag* SD202395). Esse perfil de aquaporinas pode servir como referência para outros estudos com estresses, levando-se em conta que a modulação da expressão gênica das MIPs vegetais pode ser afetada por diferentes estímulos e tecidos. Em arroz, por exemplo, a aquaporina OsAQP (idêntica à OsTIP1;1) é superexpressa em folhas, durante a seca, salinidade e baixas temperaturas, mas é reprimida nas raízes (Liang *et al.*, 2012).

#### **6.4.5. Alvos com resposta diferencial entre os genótipos contrastantes**

A presença de um grande número de isoformas idênticas em diferentes níveis de expressão encontradas em todos os contrastes (Figura 8) pode ser explicada pela alta taxa de poliploidia e aneuploidia dos híbridos do complexo *Saccharum* spp. (Grivet e Arruda, 2002) e/ou pelo alto grau de semelhança entre as sequências que codificam essas aquaporinas (Bezerra-Neto, 2012), resultado, em parte, do alto grau de duplicação gênica das MIPs vegetais, muito superior ao dos vertebrados, devido às grandes pressões ambientais nas quais as plantas foram e estão frequentemente expostas (Zardoya, 2005, Soto *et al.*, 2012).

Por outro lado, todas as 40 *unitags* com resposta diferencial, 16 com respostas opostas e 24 com respostas distintas – indução ou repressão nos tolerantes e ao mesmo tempo sem variação significativa nos sensíveis e vice-versa (Tabela 8), são importantes para estudos aplicados ao melhoramento da cana-de-açúcar frente ao déficit hídrico, pois essas respostas diferenciais são indicativas de tolerância ou sensibilidade.

Três dos cinco alvos exclusivamente diferencialmente expressos para o contraste SD24T vs SDTC, o único induzido (*SsPIP1-1*, *unitag* SD264077) e dois reprimidos – *TaTIP1-1* (*unitag* SD7939) e *SoPIP2-4* (*unitag* SD176664), obtiveram respostas desiguais no contraste entre os sensíveis (SD24S vs SDSC), sendo *SsPIP1-1* com resposta completamente oposta nos tolerantes comparada a dos sensíveis e as reprimidas na resposta tolerante, *TaTIP1-1* e *SoPIP2-4*, não apresentaram diferença significativa na expressão no contraste sensível (Tabela 8). Isto torna estes três alvos ainda mais atraentes para serem utilizados em programas de melhoramento genético.

Já as isoformas exclusivamente diferencialmente expressas nos sensíveis em resposta à seca apresentaram duas das quatro isoformas exclusivamente superexpressas – *SoPIP2-6* (*unitag* SD176669) e *OsPIP2-4* (*unitag* SD176663) e apenas *SsPIP1-1* (*unitag* SD264077) entre as três exclusivamente reprimidas demonstraram respostas distintas às do contraste SD24T vs SDTC. Essas três isoformas obtiveram respostas opostas – indução nos tolerantes e repressão nos sensíveis para *SsPIP1-1* e Indução de *SoPIP2-6* e *OsPIP2-4* nos sensíveis e repressão nos tolerantes (Tabela 8). Portanto, a isoforma *SsPIP1-1*, é, sem dúvidas, um alvo prioritário ao melhoramento da cana-de-açúcar e *SoPIP2-6* e *OsPIP2-4* também podem ser utilizados como marcadores moleculares e / ou

alvos para cisgenia.

### **6.5. Padronização das reações de RTqPCR: testes de primers de aquaporinas e genes de referência**

Exemplos recentes da literatura demonstram a aplicabilidade da RTqPCR para observação das variações na expressão gênica de transcritos de aquaporina em gramíneas, como os trabalhos em milho (Gu *et al.*, 2012) e em cana-de-açúcar (Lembke *et al.*, 2012). Na padronização das reações de RTqPCR, a melhor concentração observada para os *primers* propostos foi de 0,5  $\mu$ M, sendo a melhor diluição dos cDNAs em estudo, de 1/10. Considerando que para validação da expressão de genes via RTqPCR são requeridos preferencialmente três genes de referência (Pfaffl *et al.*, 2004), os cinco genes escolhidos neste trabalho como de referência amplificaram eficientemente as amostras, sendo os *primers* para GAPDH e  $\beta$ -Tubulina desenhados neste projeto. Os genes de referência GAPDH e 25S rRNA embasaram os ensaios de expressão relativa deste trabalho. Dos seis *primers* escolhidos como alvo para padronização das reações de PCR em tempo real, três amplificaram, mas apenas dois de modo eficiente (para SsPIP1-1 e SoPIP1-3/PIP1-4). Para estes dois alvos, os resultados de RTqPCR não mostraram diferenças significativas na expressão relativa comparando-se os *bulks* tolerante ou sensível em condição de estresse em relação aos respectivos controles, e em relação aos dois genes de referência GAPDH e 25S rRNA, diferindo parcialmente dos resultados de SuperSAGE obtidos em *bulks* (a indução no *bulk* tolerante não foi confirmada para os dois alvos e nem a repressão com o *bulk* sensível para o alvo SsPIP1-1). Tal fato mostra a dificuldade de validação de

dados de expressão gênica da metodologia aplicada (SuperSAGE) a partir de uma segunda (no caso, RTqPCR), quando se utiliza da estratégia de maximizar informações, a partir da geração artificial de *bulks* ou com objetivo de minimizar custos de geração e sequenciamento de bibliotecas. Neste caso, além dos custos, a geração de *bulks* de genótipos diferentes se justifica pelo aumento da possibilidade de reunião de genes favoráveis advindos desses genótipos e da contribuição diferencial de vias metabólicas distintas, que estarão sendo utilizadas para expressão da tolerância ao caráter, visto que a tolerância ao déficit hídrico é uma característica complexa (Denby e Gehring, 2005, Valliyodan e Nguyenque, 2006) da qual a resposta à seca depende de múltiplas vias (Bray, 1993, Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki e Motoaki Seki, 2003).

A estratégia de validação por genótipo, com a “abertura dos *bulks*”, no entanto, possibilitou a validação dos dados de SuperSAGE para os alvos estudados, em determinados genótipos, que devem ter contribuído para a resposta conjunta observada em *bulk*. Desta forma, os resultados de SuperSAGE de indução observada no *bulk* tolerante, para o alvo aquaporina SsPIP1-1, devem ter sido oriundos de ao menos dois dos quatro genótipos tolerantes (CTC6 e SP83-2847). Logo, os dados sugerem que esses genótipos CTC6 e SP83-2847 possam estar superexpressando essa provável aquaporina (SsPIP1-1) como parte da resposta desses a uma maior tolerância ao estresse em estudo, de forma semelhante ao reportado para videira, em que a mesma isoforma esteve altamente expressa em raízes (RTqPCR), em resposta também ao déficit hídrico de supressão de rega de 8 dias (Vandeleur *et al.*, 2009). Dando suporte a esses dados, está o relato de superexpressão (em raiz e folha) de PIP1-1 de arroz (nas primeiras 24 h) em transgênicos de *Arabidopsis*, acentuando a tolerância ao

déficit hídrico (200 mM de manitol) e ao estresse salino (100 mM de NaCl; Guo *et al.*, 2006).

Para o *bulk* de sensíveis, observada como repressão com SuperSAGE para o mesmo alvo, esta foi confirmada também por dois dos quatro genótipos sensíveis (CTC13 e SP90-3414), validando a expressão.

Em relação ao outro alvo (aquaporina SoPIP1-3/PIP1-4), a indução observada com SuperSAGE deve ter sido decorrente da elevada expressão relativa demonstrada pelo genótipo tolerante SP83-2847. As PIP1-3 e PIP1/4 por serem altamente semelhantes são agrupadas como uma única isoforma, conforme análises filogenéticas de sequências de aminoácidos de aquaporinas PIP de cevada, sendo filogeneticamente mais distantes da PIP1-1 (tanto em cevada quanto em arroz; Horie *et al.*, 2011), alvo também de validação em nosso estudo.

Isoformas de PIP1-3 e PIP1-4 de *Arabidopsis thaliana* elevaram o nível de transcrição em RTqPCR em mais de cinco vezes (nas primeiras 48 h de estresse), em condições de seca (250 mM de manitol), tanto em raízes quanto em folhas, como também em respostas a salinidade (150 mM de NaCl) e resfriamento (Jang *et al.*, 2004). Por sua vez, a superexpressão de uma PIP1-3 em plantas transgênicas de arroz com aquaporina (de arroz) fusionada com promotor constitutivo de milho mostrou acentuada tolerância ao estresse de resfriamento (Matsumoto *et al.*, 2009). No entanto, com relação ao transporte de água a PIP1-3, que parece ser menos permeável a água (Matsumoto *et al.*, 2009), atuaria melhor em conjunto com membros do subgrupo PIP2, cujas análises *in silico* mostraram-se, em sua maioria, reprimidas.

A definição de um protocolo em cana-de-açúcar para validação via

RTqPCR de alvos potenciais com base em *unitags* SuperSAGE, como os aqui apresentados para PIP1-1 e PIP1-3/1-4, com uso de genes de referência eficientes, igualmente propostos, será útil para definição futura de um painel de marcadores moleculares funcionais, tendo por base perfis de expressão validados em genótipos adequados. O uso desse painel de marcadores moleculares servirá como base para os melhoristas aplicarem a seleção assistida, identificando genótipos de cana-de-açúcar mais adequados para os estresses abióticos, como o aqui abordado.

## 7. Conclusões

O presente trabalho, pioneiro em abordar especificamente o tema aquaporinas no transcriptoma de cana-de-açúcar oriundos de perfis transcricionais SuperSAGE, de raízes de genótipos tolerantes e sensíveis a supressão de rega de 24 h, permitiu concluir que:

1. A melhor fonte para anotação de *unitags* de cana-de-açúcar, dentre as bases de dados de ESTs de gramíneas utilizadas, correspondeu ao banco de dados público SoGI (*S. officinarum*, Gene Index), que permitiu ancorar quase a totalidade das *unitags* anotadas para aquaporinas;
2. A estratégia de categorizar via Ontologia Gênica (GO) as ESTs observadas ancorando *unitags* aumentou a eficiência da anotação ( $\cong 15\%$ ), com uso do termo “*water transport*”, exclusivo às aquaporinas;
3. A metodologia empregada permitiu detectar nos transcriptomas avaliados, representantes das quatro subfamílias de aquaporinas descritas em vegetais superiores (PIP, TIP, SIP e NIP). Sugerindo também para cana-de-açúcar o emprego dos mesmos mecanismos gerais de transporte de água e pequenos solutos àqueles descritos comumente para as plantas;
4. Um número médio de 28 isoformas de prováveis aquaporinas foi observado sendo expresso, com base nas *unitags* SuperSAGE, em cana-de-açúcar após 24 horas de supressão de rega e/ou em condições controle, sem estresse;
5. As subfamílias de aquaporinas com maiores níveis de transcritos em cana-de-açúcar, com base nas *unitags* SuperSAGE, foram PIP e TIP. As subfamílias SIP e NIP, além de menos transcritas, foram também menos responsivas ao déficit hídrico estudado (supressão de rega, 24 h);

6. O nível de expressão de quase totalidade das aquaporinas de cana-de-açúcar, com base nas *unitags* SuperSAGE, variou, em média, em menos de 10 vezes com a aplicação do estresse, tanto nas respostas dos genótipos tolerantes quanto na de sensíveis;
7. Foi possível propor um protocolo para validar as expressões das *unitags* via RTqPCR, bem como um conjunto de cinco pares de *primers* que se mostraram funcionais como genes de referência (25S rRNA, GAPDH, Histona,  $\beta$ -Tubulina e Ubiquitina) nas amostras de cDNAs de raízes de cana-de-açúcar, além de dois pares de *primers* para aquaporinas PIP (SsPIP1-1 e PIP1-3/1-4), com base em alvos obtidos neste trabalho, cujas expressões foram validadas em genótipos de cana-de-açúcar pertencente aos *bulks* tolerantes ou sensíveis ao estresse em estudo.

## 8. Bibliografia

- Aroca R, Amodeo G, Fernández-Illescas S, Herman EM, Chaumont F and Chrispeels MJ (2005) The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol* 137: 341-353.
- Adams MD *et al.* (1991) Complementary dna sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science* 252: 1651-1656.
- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A and Nielsen S (2002) Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. *J Physiol* 542: 3-16.
- Agre P (2004) Aquaporin Water Channels (Nobel Lecture) *Angew Chem Int Ed Engl* 43: 4278 - 4290.
- Alexandersson E, Fraysse L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Mol Biol* 59: 469-484.
- Alleva K, Niemietz CM, Sutka M, Maurel C, Parisi M, Tyerman SD and Amodeo G (2006) Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *J Exp Bot* 57: 609-621.
- Audic S and Claverie JM (1997) The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res* 7: 986-995.
- Ayadi M, Cavez D, Miled N, Chaumont F and Masmoudi K (2011) Identification and characterization of two plasma membrane aquaporins in durum wheat (*Triticum turgidum* L. subsp. durum) and their role in abiotic stress tolerance. *Plant Physiol Biochem* 49: 1029-1039.
- Bansal A and Sankararamakrishnan R (2007) Homology modeling of major intrinsic proteins in rice, maize and Arabidopsis: comparative analysis of transmembrane helix association and aromatic/arginine selectivity filters. *BMC Struct Biol* 7: 27.
- Bellati J, Alleva K, Soto G, Vitali V, Jozefkowicz C, Amodeo G (2010) Intracellular pH sensing is altered by plasma membrane PIP aquaporin co-expression. *Plant Mol Biol* 74(1-2):105-18.
- Besse M, Knipfer T, Miller AJ, Verdeil JL, Jahn TP and Fricke W (2011) Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. *J Exp Bot* 62: 4127-42.
- Beitz E, Wu B, Holm LM, Schultz JE, Zeuthen T (2006) Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 269-274.
- Biela A, Grote K, Otto B, Hoth S, Hedrich R and Kaldenhoff R (1999) The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercury-insensitive and permeable for glycerol. *Plant J* 18: 565-570.
- Bienert GP, Thorsen M, Schussler MD, Nilsson HR, Wagner A, Tamás MJ, Jahn TP (2008) A subgroup of plant aquaporins facilitate the bi-directional diffusion of As(OH)<sub>3</sub> and Sb(OH)<sub>3</sub> across membranes. *BMC Biol* 6: 26.

- Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M and Chaumont F (2011) Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J* 66: 306–317.
- Bonhivers M, Carbrey JM, Gould SJ and Agre P (1998) Aquaporins in *Saccharomyces*. Genetic and functional distinctions between laboratory and wild-type strains. *J Biol Chem* 273: 27565-27572.
- Boursiac Y, Chen S, Luu DT, Sorieul M, van den Dries N, Maurel C (2005) Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol* 139: 790-805.
- Bray EA (1993) Molecular responses to water stress deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040.
- Calamita G, Bishai WR, Preston GM, Guggino WB and Agre P (1995) Molecular Cloning and Characterization of AqpZ, a Water Channel from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 29063-29066.
- CanaVialis, <http://www.canavialis.com.br/src/index.php> (06 de outubro 2012)
- Caputo MM, Beauclair EGF, Silva MA and Piedade SMS (2008) Response of sugarcane genotypes to the application of ripeners. *Bragantia* 67: 15-23.
- Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), <http://www.ctcanavieira.com.br/historia.html> (06 de outubro, 2012).
- Chandel AK, Silva SS, Carvalho W and Singh OV (2012) Sugarcane bagasse and leaves: foreseeable biomass of biofuel and bio-products. *J Chem Technol Biotechnol* 87: 11–20.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ and Jung R (2001) Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. *Plant Physiol* 125: 1206-1215.
- Chaumont F, Moshelion M and Daniels MJ (2005) Regulation of plant aquaporin activity. *Biol Cell* 97(10):749-64.
- Cidade, DAP, Garcia, RO, Duarte, AC, Sachetto-Martins G., Mansur, E (2006) Morfogênese in vitro de variedades brasileiras de cana-de-açúcar. *Pesq agropec bras* 40: 385-391.
- Coemans B, Matsumura H, Terauchi R, Remy S, Swennen R and Sági L (2005) SuperSAGE combined with PCR walking allows global gene expression profiling of banana (*Musa acuminata*), a non model organism. *Theor Appl Genet* 111: 1118-1126.
- Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_05\\_09\\_11\\_59\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_agosto\\_2012\\_2o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_05_09_11_59_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf) (22 novembro, 2012).
- Daniels MJ, Chrispeels MJ and Yeager M (1999) Projection Structure of a Plant Vacuole Membrane Aquaporin by Electron Cryo-crystallography. *J Mol Biol* 294: 1337-1349.
- Danielson JÅH and Johanson U (2008) Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol* 8: 45.
- Database of Expressed Sequence Tags (DBEST), [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST\\_summary.html](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html) (21 de agosto, 2012)
- D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, Rao S, Berding N, Glaszmann JC (1996) Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Mol Gen Genet* 250: 405-413.

- Di Giusto G, Flamenco P, Rivarola V, Fernández J, Melamud L, Ford P and Capurro C (2012) Aquaporin 2-increased renal cell proliferation is associated with cell volume regulation. *J Cell Biochem* doi: [10.1002/jcb.24246].
- Dillon SL, Shapter FM, Henry RJ, Cordeiro G, Izquierdo L and Lee LS (2007) Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and Saccharum (Andropogoneae). *Ann Bot* 100: 1-15.
- Denby K and Gehring C (2005) Engineering drought and salinity tolerance in plants: lessons from genome-wide expression profiling in Arabidopsis. *Trends Biotechnol* 23: 547-552.
- Dordas C, Chrispeels MJ and Brown PH (2000) Permeability and channel-mediated transport of boric acid across membrane vesicles isolated from squash roots. *Plant Physiol* 124: 1349-1362.
- Dynowski M, Schaaf G, Loque D, Moran O, Ludewig U (2008) Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Biochem J* 414: 53-61.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), "FAO STAT, Countries by commodity, <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (13 de agosto, 2011).
- Fotiadis D, Jenö P, Mini T, Wirtz S, Muller SA, Fraysse L, Kjellbom P and Engel A (2001) Structural Characterization of Two Aquaporins Isolated from Native Spinach Leaf Plasma Membranes. *J Biol Chem* 276: 1707-1714.
- Fortin MG, Morrison NA and Verma DP (1987) Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res* 15: 813-824.
- Fouquet R, Léon C, Ollat N and Barrieu F (2008) Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. *Plant Cell Rep* 27: 1541-1550.
- Fu D, Libson A, Miercke LJ, Weitzman C, Nollert P, Krucinski J and Stroud RM (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science* 290: 481-486.
- Gaspar M, Bousser A, Sissoëff I, Roche O, Hoarau J and Mahé A (2003) Cloning and characterization of ZmPIP1-5b, an aquaporina transporting water and urea. *Plant Sci* 165:21-31.
- Geijer C, Ahmadpour D, Palmgren M, Filipsson C, Klein DM, Tamás MJ, Hohmann S and Lindkvist-Petersson K (2012) Yeast aquaglyceroporins use the transmembrane core to restrict glycerol transport. *287: 23562-70.*
- Gerbeau P, Guçlu J, Ripoche P and Maurel C (1999) Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J* 18: 577-587.
- Gibeaut DM, Hulett J, Cramer GR, and Seemann JR (1997) Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions. *Plant Physiol* 115: 317-319.
- Giovannetti M, Balestrini R, Volpe V, Guether M, Straub D, Costa A, Ludewig U and Bonfante P (2012) Two putative-aquaporin genes are differentially expressed during arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Lotus japonicas*. *BMC Plant Biol* 12: 186.
- Gomes D, Agasse A, Thiébaud P, Delrot S, Gerós H, Chaumont F (2009) Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *1788: 1213-1228.*

- Gorin MB, Yancey SB, Cline J, Revel JP and Horwitz J The major intrinsic protein (MIP) of the bovine lens fiber membrane: characterization and structure based on cDNA cloning. *Cell* 39: 49-59, 1984.
- Gosal SS, Wani SH and Kang MS (2009) Biotechnology and drought tolerance. *Journal of Crop Improvement* 23: 19-54.
- Grégoire C, Rémus-Borel W, Vivancos J, Labbé C, Belzile F and Bélanger RR (2012) Discovery of a multigene family of aquaporin silicon transporters in the primitive plant *Equisetum arvense*. *Plant J* doi: 10.1111/j.1365-313X.2012.05082.x.
- Grivet L and Arruda P (2002) Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. *Curr Opin Plant Sci* 5: 122–127.
- Gu R, Chen X, Zhou Y and Yuan L (2012) Isolation and characterization of three maize aquaporin genes, *ZmNIP2;1*, *ZmNIP2;4* and *ZmTIP4;4* involved in urea transport. *BMB Rep* 45: 96-101.
- Guo L, Wang ZY, Lin H, Cui WE, Chen J, Liu M, Chen ZL, Qu LJ and Gu H (2006) Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Res* 16: 277-286.
- Hachez C, Moshelion M, Zelazny E, Cavez D and Chaumont F (2006) Localization and quantification of plasma membrane aquaporin expression in maize primary root: a clue to understanding their role as cellular plumbers. *Plant Cell Environ* 29: 305-323.
- Harbers M and Carninci P (2005) Tag-based approaches for transcriptome research and genome annotation. *Nat Methods* 2:495-502.
- Henzler T, Waterhouse RN, Smyth AJ, Carvajal M, Cooke DT, Schaffner AR, Steudle E, Clarkson DT (1999) Diurnal variations in hydraulic conductivity and root pressure can be correlated with the expression of putative aquaporins in the roots of *lotus japonicus*. *Planta* 210: 50-60.
- Henzler T and Steudle E (2000) Transport and metabolic degradation of hydrogen peroxide in *Chara corallina*: model calculations and measurements with the pressure probe suggest transport of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> across water channels. *J Exp Bot* 51: 2053-2066.
- Henzler T, Ye Q and Steudle E (2004) Oxidative gating of water channels (aquaporins) in *Chara* by hydroxyl radicals. *Plant Cell Environ* 27: 1184-1195.
- Hieter P and Boguski M (1997) Functional genomics: it's all how you read it. *Science* 278: 601-602.
- Horie T, Kaneko T, Sugimoto G, Sasano S, Panda SK, Shibasaka M, Katsuhara M (2011) Mechanisms of Water Transport Mediated by PIP Aquaporins and Their Regulation Via Phosphorylation Events Under Salinity Stress in Barley Roots. *Plant Cell Physiol* 52: 663-675.
- Hu W *et al.* (2012) Overexpression of a Wheat Aquaporin Gene, *TaAQP8*, Enhances Salt Stress Tolerance in Transgenic Tobacco. *Plant Cell Physiol* 53: 2127-2141.
- Huang GT, Ma SL, Bai LP, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M and Guo ZF (2012) Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Mol Biol Rep* 39: 969-87.
- Hub JS and de Groot BL (2008) Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 1198-203.
- Ingelbrecht IL, Irvine JE and Mirkov TE (1999) Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection Of homology-dependent virus resistance

- in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiol* 119: 1187-1198.
- Inovação UNICAMP (INOVA UNICAMP), <http://www.inovacao.unicamp.br/report/noticias/index.php?cod=501> (06 de outubro, 2012).
- Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), <http://www.iac.sp.gov.br/areasdepesquisa/cana/centrocana.php?pg=historicocana> (06 de outubro, 2012).
- Ishikawa F, Suga S, Uemura T, Sato MH, Maeshima M (2005) Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579: 5814-5820.
- Iskandar HM, Simpson RS, Casu RE, Bonnett GD, Maclean DJ and Manners JM (2004) Comparison of Reference Genes for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis of Gene Expression in Sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter* 22: 325-337.
- Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS and Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. 54: 713-725.
- Jang J Y, Lee SH, Rhee J Y, Chung G C, Ahn S J, Kang H (2007) Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 64:621–632
- Johanson U and Gustavsson S (2002) A New Subfamily of Major Intrinsic Proteins in Plants. *Mol Biol Evol* 19: 456-461.
- Johansson I, Karlsson M, Johanson U, Larsson C, Kjellbom P (2000) The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim Biophys Acta* 1465: 324-342.
- JORNAL CANA, <http://www.canaweb.com.br/Conteudo/Conheca%20o%20Setor.asp>, (29 de junho, 2011).
- Joshi SG, Schaart JG, Groenwold R, Jacobsen E, Schouten HJ and Krens FA (2011) Functional analysis and expression profiling of HcrVf1 and HcrVf2 for development of scab resistant cisgenic and intragenic apples. *Plant Mol Biol* 75: 579-591.
- Jung JS, Preston GM, Smith BL, Guggino WB and Agre P (1994) Molecular structure of the water channel through aquaporin CHIP. The hourglass model. *J Biol Chem* 269: 14648-14654.
- Katsuhara M, Akiyama Y, Koshio K, Shibasaka M and Kasamo K (2002) Functional analysis of water channels in barley roots. *Plant Cell Physiol* 43: 885-893.
- Katsuhara M, Koshio K, Shibasaka M, Hayashi Y, Hayakawa T and Kasamo K (2003) Over-expression of a barley aquaporin increased the shoot/root ratio and raised salt sensitivity in transgenic rice plants. *Plant Cell Physiol* 44: 1378-1383.
- Kido ÉA, Barbosa PK, Neto JR, Pandolfi V, Houllou-Kido LM, Crovella S, Molina C, Kahl G and Benko-Iseppon AM (2011) Identification of Plant Protein Kinases in Response to Abiotic and Biotic Stresses Using SuperSAGE. *Curr Protein Pept Sci* 12: 643-656.
- Kido ÉA, Ferreira Neto JR, Silva RL, Pandolfi V, Guimarães AC, Veiga DT, Chabregas SM, Crovella S and Benko-Iseppon AM (2012) New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by SuperSAGE. *ScientificWorldJournal* 2012:1-14.

- Kjellbom P, Larsson C, Johansson I I, Karlsson M, Johanson U (1999) Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci* 4: 308-314.
- Kimbeng, CA and Cox, MC (2003) Early generation selection of sugarcane families and clones in Australia: a review. *Journal American Society of Sugarcane Technologists* 23: 20-39.
- Kozono D, Ding X, Iwasaki I, Meng X, Kamagata Y, Agre P and Kitagawa Y (2003) Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from *Methanothermobacter marburgensis*. *J Biol Chem* 278: 10649-10656.
- Landell, MGA et al. (1999) Avaliação final de clones IAC de cana-de-açúcar da série 1982, em Latossolo Roxo da região de Ribeirão Preto. *Bragantia* 58: 269-280.
- Le Cahérec F, Deschamps S, Delamarche C, Pellerin I, Bonnet G, Guillam MT, Thomas D, Gouranton J and Hubert JF (1996) Molecular Cloning and Characterization of an Insect Aquaporin Functional Comparison with Aquaporin 1. *Eur J Biochem* 241: 707-715.
- Lee HK, Cho SK, Son O, Xu Z, Hwang I and Kim WT (1999) Drought Stress-Induced Rma1H1, a RING Membrane-Anchored E3 Ubiquitin Ligase Homolog, Regulates Aquaporin Levels via Ubiquitination in Transgenic Arabidopsis Plants. *Plant Cell* 21: 622-41.
- Lembke CG, Nishiyama MY Jr, Sato PM, de Andrade RF, Souza GM (2012) Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. *79:461-477*.
- Liang W et al. (2012) Effects of abiotic stress, light, phytochromes and phytohormones on the expression of OsAQP, a rice aquaporin gene. *Plant Growth Regul* doi: 10.1007/s10725-012-9743-x.
- Liu C et al. (2013) Aquaporin OsPIP1;1 promotes rice salt resistance and seed germination. *Plant Physiol Biochem* 63: 151-158.
- Liu LH, Ludewig U, Gassert B, Frommer WB and von Wirén N (2003) Urea Transport by Nitrogen-Regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 133: 1220-1228.
- Lopez F, Bousser A, Sissoëff I, Gaspar M, Lachaise B, Hoarau J and Mahé A (2003) Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell Physiol* 44: 1384-95.
- Loqué D, Ludewig U, Yuan L and von Wirén N (2005) Tonoplast Intrinsic Proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 Facilitate NH<sub>3</sub> Transport into the Vacuole. *Plant Physiol* 137: 671-680.
- Lucero MS, Mirarchi F, Goldstein J and Silberstein C (2012) Intraperitoneal administration of Shiga toxin 2 induced neuronal alterations and reduced the expression levels of aquaporin 1 and aquaporin 4 in rat brain. *Microb Pathog* 53: 87-94.
- Maeshima M and Ishikawa F (2008) ER membrane aquaporins in plants. *Pflügers Arch* 456: 709-716.
- Magni F, Sarto C, Ticozzi D, Soldi M, Bosso N, Mocarelli P and Kienle MG (2006) Proteomic knowledge of human aquaporins. *Proteomics* 6: 5637-5649.
- Mahajan S and Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys* 444: 139–158
- Matsumoto T, Lian HL, Su WA, Tanaka D, Liu Cw, Iwasaki I and Kitagawa Y (2009) Role of the aquaporin PIP1 subfamily in the chilling tolerance of rice. *Plant Cell Physiol* 50: 216-29.

- Matsumura H, Reich S, Ito A, Saitoh H, Kamoun S, Winter P, Kahl G, Reuter M, Kruger DH and Terauchi R (2003) Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 15718-15723.
- Matsumura H, Reich S, Reuter M, Kruger DH, Winter P, Kahl G and Terauchi R (2004) SuperSAGE: A Potent Transcriptome Tool for Eukaryotic Organisms. In: San Ming Wang (eds) *Current Technologies and Applications*. Horizon Scientific Press, Norwich, United Kingdom, pp 77-90.
- Matsumura H, Kruger DH, Kahl G and Terauchi R (2008) SuperSAGE: A Modern Platform for Genome-Wide Quantitative Transcript Profiling. *Curr Pharm Biotechnol* 9: 368-374.
- Maurel C, Reizer J, Schroeder JI and Chrispeels MJ (1993) The vacuolar membrane protein  $\gamma$ -TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *EMBO J* 12: 2241-2247.
- Maurel C, Tacnet F, Guclu J, Guern J and Ripoche P (1997) Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7103-7108.
- Maurel C (2007) Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Lett* 581(12):2227-2236.
- Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant Aquaporins: Membrane Channels with Multiple Integrated Functions. *Annu Rev Plant Biol* 59: 595-624.
- Maurel C, Santoni V, Luu DT, Wudick MM, Verdoucq L (2009) The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Curr Opin Plant Biol* 12: 690-698.
- Mei-Hao S, Min-Hua Z, Hong-Yan L, Le-Gong L, Xin Y, Wei-Ai S, Zhang-Cheng T (2004) Distribution of Water Channel Protein RWC3 and Its Regulation by GA and Sucrose in Rice (*Oryza sativa*). *Acta Botanica Sinica* 46: 1056-1064.
- Mitani-Ueno N, Yamaji N, Zhao FJ and Ma JF (2011) The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *J Exp Bot* 12: 4391-4398.
- Molina C *et al.* (2008) The drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics* 9: 1-28.
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods* 5: 621-628.
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y (2000) Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599-605.
- Muramatsu S and Mizuno T (1989) Nucleotide sequence of the region encompassing the *glpKF* operon and its upstream region containing a bent DNA sequence of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 17: 4378.
- Nogueira, FTS (2004) Identificação e Caracterização de Genes Expressos em Resposta ao Estresse por Baixa Temperatura em Cana-de-açúcar. Universidade Estadual de Campinas, Dissertação de mestrado, Campinas, pp 1-127.
- Bezerra-Neto JP (2012) Caracterização e análise evolutiva in silico de aquaporinas no transcriptoma do feijão caupi (*Vigna unguiculata*(L.) Walp.)

- Universidade Federal de Pernambuco, Dissertação de mestrado, Recife, pp 1-133.
- Opperman CH, Taylor CG and Conkling MA (1994) Root-knot nematode-directed expression of a plant root-specific gene. *Science* 263: 221-223.
- Paolacci AR, Tanzarella OA, Porceddu E and Ciaffi M (2009) Identification and validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in wheat. *BMC Mol Biology* doi:10.1186/1471-2199-10-11.
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ and Campbell BT (2010) Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology* 10: 1-17.
- Péret B et al. (2012) Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* doi: 10.1038/ncb2573.
- Pfaffl MW, Horgan GW and Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR *Nucleic Acids Res* 30: 1-10.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C and Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515.
- Phillips AL and Huttly AK (1994) Cloning of two gibberellin-regulated cDNAs from *Arabidopsis thaliana* by subtractive hybridization: expression of the tonoplast water channel,  $\gamma$ -TIP, is increased by GA 3. *Plant Mol Biol* 24: 603-615.
- Pinheiro DG (2009) Desenvolvimento de uma Plataforma Integrativa para Depuração e Análise de Dados de Expressão Gênica. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Tese de doutorado, Ribeirão Preto, pp 1-125.
- Prabu G, Kwar PG, Pagariya MC and Prasad DT (2011) Identification of Water Deficit Stress Upregulated Genes in Sugarcane. *Plant Mol Biol Rep* 29: 291-304.
- Preston GM, Carroll TP, Guggino WB and Agre P (1992) Appearance of Water Channels in *Xenopus* Oocytes Expressing Red Cell CHIP28 Protein. *Science* 256: 385-387.
- Preston GM, Jung JS, Guggino WB, Agre P (1993) The mercury-sensitive residue at cysteine 189 in the CHIP28 water channel. *J Biol Chem* 268: 17-20.
- Rae AL, Grof CPL, Casu RE, Bonnett GD (2005) Sucrose accumulation in the sugarcane stem: pathways and control points for transport and compartmentation. *Field Crops Res* 92:159-168.
- Rae L, Lao NT and Kavanagh TA (2011) Regulation of multiple aquaporin genes in *Arabidopsis* by a pair of recently duplicated DREB transcription factors. *Planta* 234: 429-444.
- Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA), <http://www.ridesa.agro.ufg.br/> (06 de outubro, 2012).
- Robertson N, Oveisi-Fordorei M, Zuyderduyn SD, Varhol RJ, Fjell C, Marra M, Jones S and Siddiqui A (2007) DiscoverySpace: an interactive data analysis application. *Genome Biology* 8: R6.
- Rodrigues FA, Graça JP, Laia ML, Nhani-Jr A, Galbiati JA, Ferro MIT, Ferro JA and Zingaretti SM (2011) Sugarcane genes differentially expressed during water deficit. *Biologia Plantarum* 55: 43-53.
- Saha S, Sparks AB, Rago C, Akmaev V, Wang CJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO (1995) Quantitative

- monitoring of gene expression patterns with a complementary dna microarray. *Science* 270: 467-470.
- Saha S, Sparks AB, Rago C, Akmaev V, Wang CJ, Vogelstein B, Kinzler KW and Velculescu VE (2002) *Nat Biotechnol* 20: 508-512.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6: 410-417.
- Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J Exp Bot* 58: 221–227.
- Schouten HJ, Krens FA and Jacobsen E (2006) Do cisgenic plants warrant less stringent oversight? *Nat Biotechnol* 24: 753.
- Silva MA, Silva JAG, Enciso J, Sharma V and Jifon J (2008) Yield Components as Indicators of Drought Tolerance of Sugarcane. *Sci agric* 65: 620-627.
- Smith BL and Agre P (1991) Erythrocyte 2Mr 28,000 Transmembrane Protein Exists as a Multisubunit Oligomer Similar to Channel Proteins. *J Biol Chem* 266: 6407-6415.
- Soto G, Alleva K, Amodeo G, Muschietti J, Ayub ND (2012) New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: orthologous identification and functional transfer is possible. *Gene* 503: 165-176.
- Souza VC and Lorenzi H (2008) *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. 2a edição. Nova Odessa, São Paulo, 704 pp.
- Takano J, Wada M, Ludewig U, Schaaf G, von Wirén N and Fujiwara T (2006) The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell* 18: 1498–1509.
- Terzi V, Pastori G, Shewry PR, Fonzo ND, Stanca AM and Faccioli P (2005) Real-time PCR-assisted selection of wheat plants transformed with HMW glutenin subunit genes. *J Cereal Sci* 45: 133-136.
- The Gene Index Project (TGI), <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/definitions.html> (22 de agosto, 2012).
- The Gene Ontology (TGO), <http://www.geneontology.org/GO.doc.shtml#ontologies> (22 de agosto, 2012).
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006) Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688-694.
- Tournaire-Roux C, Sutka M, Javot H, Gout E, Gerbeau P, Luu DT, Bligny R, Maurel C (2003) Cytosolic pH regulates root water transport during anoxic stress through gating of aquaporins. *Nature* 425 :393-7.
- Tyerman SD, Niemietz CM and Bramley H (2002) Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ* 25: 173-194.
- Uehlein N, Lovisolo C, Siefritz F and Kaldenhoff R (2003) The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO<sub>2</sub> pore with physiological functions. *Nature* 425:734-737.
- Uehlein N, Fileschi K, Eckert M, Bienert GP, Bertl A, Kaldenhoff R (2006) Arbuscular mycorrhizal symbiosis and plant aquaporin expression. *Phytochemistry* 68: 122-129.

- União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA), <http://www.unica.com.br/content/default.asp?cchCode={C2B8C535-736F-406B-BEB2-5D12B834EF59}> (28 junho, 2011).
- União da Indústria da Cana-de-Açúcar (UNICA), <http://www.unica.com.br/noticias/show.asp?nwsCode={0F95CD89-32CA-4D84-A3C0-340961382C22}> (22 fevereiro, 2012).
- Valliyodan B and Nguyen HT (2006) Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Curr Opin Plant Biol* 9: 189-195.
- Vandeleur RK, Mayo G, Shelden MC, Gilliam M, Kaiser BN and Tyerman SD (2009) The role of plasma membrane intrinsic protein aquaporins in water transport through roots: diurnal and drought stress responses reveal different strategies between isohydric and anisohydric cultivars of grapevine. *Plant Physiol* 149: 445-460.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.
- Vera-Estrella R, Barkla BJ, Bohnert HJ and Pantoja O (2004) Novel Regulation of Aquaporins during Osmotic Stress. *Plant Physiol* 135: 2318-2329.
- Vertuan CA (2003) Fluxos de transpiração de três variedades de cana-de-açúcar sob altas condições de demanda hídrica. Unicamp, Dissertação de mestrado, Campinas, pp. 133.
- Voicu MC, Cooke JE e Zwiazek JJ (2009) Aquaporin gene expression and apoplastic water flow in bur oak (*Quercus macrocarpa*) leaves in relation to the light response of leaf hydraulic conductance. *J Exp Bot* 60: 4063-4075.
- von Bulow J, Muller-Lucks A, Kai L, Bernhard F, Beitz E (2012) Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *J Biol Chem* 287: 7487-7494.
- Wallace IS, Roberts DM (2004) Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis major* intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol* 135: 1059-1068.
- Wallace IS, Choi WG and Roberts DM (2006) The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. *Biochim Biophys Acta* 1758: 1165-1175.
- Walz T, Smith BL, Agre P and Engel A (1994) The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. *EMBO J* 13: 2985-2993.
- Wan X, Steudle E, Hartung W (2004) Gating of water channels (aquaporins) in cortical cells of young corn roots by mechanical stimuli (pressure pulses): effects of ABA and of HgCl<sub>2</sub>. *J Exp Bot* 55: 411-422.
- Welbaum GE and Meinzer FC (1990) Compartmentation of solutes and water in developing sugarcane stalk tissue. *Plant Physiol* 93: 1147-53.
- Ye Q, Steudle E (2006) Oxidative gating of water channels (aquaporins) in corn roots. *Plant Cell Environ* 29: 459-470.
- Yu X, Peng YH, Zhang MH, Shao YJ, Su WA and Tang ZC (2006) Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Res* 16: 599-608.
- Yu X, Peng YH, Zhang MH, Shao YJ, Su WA and Tang ZC (2006) Water relations and an expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. *Cell Res* 16: 599-608.
- Zardoya R (2005) Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol Cell* 97: 397-414.

- Zelazny E, Borst JW, Muylaert M, Batoko H, Hemminga MA and Chaumont F (2007) FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 12359-12364.
- Zhu C, Schraut D, Hartung W, Schäffner AR (2005) Differential responses of maize MIP genes to salt stress and ABA. *J Exp Bot* 56: 2971-2981.

## **9. Curriculum vitae (Lattes)**

**Manasses Daniel da Silva**

*Curriculum Vitae*

Novembro/2012

## **Manasses Daniel da Silva**

*Curriculum Vitae*

---

### **Dados pessoais**

**Nome** Manasses Daniel da Silva

**Filiação** Tito Daniel da Silva e Zuleide Daniel de Oliveira

**Nascimento** 16/12/1987 - Camaragibe/PE - Brasil

**Carteira de Identidade** 6964972 sds - PE - 11/11/2001

**CPF** 074.151.494-08

**Endereço residencial** Rua Cassimiro de Abreu, 18

Timbi - Camaragibe

54768-420, PE - Brasil

Telefone: 81 34845401

**Endereço profissional** Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Moraes Rego, 1235

Cidade Universitária - Recife

50670-901, PE - Brasil

Telefone: 81 21268000

### **Endereço eletrônico**

E-mail para contato: manassesdaniel@gmail.com

### **Formação acadêmica/titulação**

2006 - 2010 Graduação em Ciências Biológicas- Bacharelado. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Título: IDENTIFICAÇÃO DE ALVOS MOLECULARES EM CANA-DE-AÇÚCAR PARA TOLERÂNCIA AO DEFICIT HÍDRICO

Orientador: Éderson Akio Kido

Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco

---

### **Formação complementar**

2010 - 2010 Extensão universitária em Propriedade Intelectual e Inovação no Agronegócio.

Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil

Palavras-chave: Patente, Propriedade Intelectual, Inovação

2008 - 2008 Extensão universitária em Identificação e Caracterização da Função Gênica em.

Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil

2008 - 2008 Regulação da Expressão Gênica de Procariotos e Euc. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil Palavras-chave: International

### **Áreas de atuação**

1. Genética Vegetal
  2. Biologia Geral
- 

### **Projetos**

Projetos de pesquisa  
Projetos de pesquisa 2011 - 2013      Análise in Silico de Subfamílias de Aquaporinas em Cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) sob Condições de Déficit Hídrico via Tecnologia SuperSAGE

Descrição: O presente projeto pretende contribuir para um maior entendimento dos processos envolvidos na resposta da cana-de-açúcar à seca através da geração de um perfil mais detalhado dos níveis de expressão de mRNAs que codificam aquaporinas, que poderá indicar os diferentes tipos de aquaporinas que estão relacionadas com a resposta ao déficit hídrico e, assim, traçar estratégias que irão auxiliar o melhoramento genético da cana-de-açúcar na tolerância à seca, como transformações genéticas de plantas e seleção assistida por marcadores moleculares.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Manasses Daniel da Silva (Responsável); Ederson Akio Kido

---

## **Idiomas**

Inglês Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Razoavelmente , Lê Bem

Espanhol Compreende Razoavelmente , Fala Razoavelmente , Escreve Pouco , Lê Razoavelmente

Português Compreende Bem , Fala Bem , Escreve Bem , Lê Bem

## **Produção**

---

### **Produção bibliográfica**

#### **Artigos completos publicados em periódicos**

1. Kido, E. A., FERREIRA NETO, J. R. C., Silva, R. L. O., BELARMINO, L. C., BEZERRA NETO, J. P., SOARES-CAVALCANTI, N. M., PANDOLFI, V., Silva, M. D., NEPOMUCENO, A. L., BENKO-ISEPPON, A. M.

Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: identifying important components to face abiotic stress. BMC Bioinformatics. , v.14, p.1 - 1, 2013.

## Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. MOURA, D. A. P., CARVALHO, M. W. P., Silva, M. D., CORREIA, C. N, Kido, E. A. Desenvolvimento de marcadores SSR para mapeamento genético do feijão-caupi In: XIX Encontro de Genética do Nordeste, I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste, 2012, Petrolina.

Anais do XIX Encontro de Genética do Nordeste, I Simpósio de Genética Humana e Médica do Nordeste. , 2012.

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Outro

2. Silva, M. D., Kido, E. A. ANÁLISE IN SILICO DE SUBFAMÍLIAS DE AQUAPORINAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO VIA TECNOLOGIA SUPERSAGE In: I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE, 2011, Recife.

Anais da I Jornada de Pós-Graduação em Genética da UFPE. , 2011.

Palavras-chave: Aquaporinas, Bioinformática, seca, *Saccharum*, SuperSAGE

Áreas do conhecimento : Genética Vegetal

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

3. CORREIA, C. N, Silva, M. D., DANTAS, F. A., GIMARÃES, A. C. R., VEIGA, D. T., Chabregas, S. M., Benko, A. M. B., Kido, E. A. IDENTIFICAÇÃO DE TRANSCRITOS SUPERSAGE, RELACIONADOS A PROTEÍNAS QUINASES, EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SUBMETIDA A CONDIÇÕES DE SECA In: XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución I Jornadas Regionales SAG-NEA, 2011, Corrientes.

Anais do XL Congreso Argentino de Genética. , 2011.

Palavras-chave: Bioinformática, Estresse Hídrico, SuperSAGE

Áreas do conhecimento : Agronomia, Genética Vegetal

Referências adicionais : Brasil/Português. Meio de divulgação: Impresso

4. Silva, M. D., CORREIA, C. N, DANTAS, F. A., Guimarães, A.C.R., VEIGA, D. T., Chabregas, S. M., BENKO-ISEPPON, A. M., Kido, E. A.

IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE TAGS SUPERSAGE DE AQUAPORINAS EM CANA-DE-AÇÚCAR (*Saccharum spp.*) SOB CONDIÇÕES DE DÉFICIT HÍDRICO

In: XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución I Jornadas Regionales SAG-NEA, 2011, Corrientes.

Anais do XL Congreso Argentino de Genética. Buenos Aires: , 2011.

Palavras-chave: SuperSAGE, Aquaporinas, *Saccharum*, Bioinformática

Áreas do conhecimento : Genética Vegetal

Referências adicionais : Argentina/Português. Meio de divulgação: Impresso

## **Eventos**

## **Eventos**

### **Participação em eventos**

1. Apresentação de Poster / Painel no(a) XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución I Jornadas Regionales SAG-NEA, 2011. (Congresso)

IDENTIFICAÇÃO IN SILICO DE TAGS SUPERSAGE DE AQUAPORINAS EM

**Totais de produção**

**Produção bibliográfica**

Trabalhos publicados em anais de eventos..... 17

Apresentações de trabalhos (Congresso)..... 4

**Eventos**

Participações em eventos (congresso)..... 5

Participações em eventos (encontro)..... 1

Participações em eventos (outra)..... 2