

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Genética

AMANDA THAMIRES BATISTA DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DAS VIAS
DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS POR FITORMÔNIOS EM CANA-DE-AÇÚCAR SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

Recife
2017

AMANDA THAMIRES BATISTA DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DAS
VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS POR FITORMÔNIOS EM CANA-DE-
AÇÚCAR SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Éderson Akio Kido
Coorientador: Dr. José Ribamar Costa
Ferreira Neto

Recife
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Nascimento, Amanda Thamires Batista do

Identificação e validação da expressão de transcritos das vias de transdução de sinais por fitormônios em cana-de-açúcar sob déficit hídrico. / Recife: O Autor, 2017.

111 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Éderson Akio Kido

Coorientador: José Ribamar Costa Ferreira Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, Recife, 2017.

Inclui referências

1. Genética molecular 2. Cana-de-açúcar 3. Bioinformática I. Kido, Éderson Akio (orient.) II. Ferreira Neto, José Ribamar Costa (coorient.) III. Título

572.8

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 553

AMANDA THAMIRES BATISTA DO NASCIMENTO

**IDENTIFICAÇÃO E VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DE TRANSCRITOS DAS VIAS DE
TRANSDUÇÃO DE SINAIS POR FITORMÔNIOS EM CANA-DE-AÇÚCAR SOB
DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, área de Concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovada em: 23/02/2017

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Éderson Akio Kido
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Mauro Guida dos Santos
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Paulo Paes Andrade
Universidade Federal de Paraíba

Dr^a. Ana Christina Brasileiro Vidal
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente e principalmente a **Deus** por me guiar durante toda esta trajetória, por me conceder sabedoria para superar os obstáculos e pela capacidade para concluir mais esta etapa.

Aos meus pais, **Adenilza Andrade do Nascimento** e **Osvaldo Batista do Nascimento**, por todo apoio, amor, paciência e dedicação, pelo incentivo a seguir em frente e por serem meu alicerce.

Ao meu irmão, **Maximilian Andrade do Nascimento**, por sempre me apoiar e pelo incentivo.

Ao meu orientador, Professor **Dr. Éderison Akio Kido**, pelo apoio e amizade, além da sua dedicação, confiabilidade, competência e especial atenção nas revisões e sugestões, fatores fundamentais para conclusão deste trabalho.

Ao meu coorientador, **Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto**, pelo apoio e amizade.

Aos membros e amigos do LGM, em especial a **Msc. Marislane Carvalho Paz de Souza**, pela amizade, apoio, palavras de incentivo e momentos de descontrações. Ao **Dr. Manassés Daniel da Silva**, por toda dedicação, amizade, apoio, suporte e ajuda nas análises, as quais foram de extrema importância para a conclusão desta dissertação.

Aos meus familiares e amigos, os quais sempre estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso e me apoiando, sem o amor de vocês essa jornada seria muito mais difícil.

A todos os professores e amigos do mestrado que de alguma forma contribuíram para minha formação.

Ao departamento de genética - UFPE, pelo apoio à minha participação no mestrado. A UFPE, por disponibilizar a estrutura necessária para realização deste trabalho.

A **EMBRAPA**, **CNPq**, **FACEPE** e **UFPE** pelo apoio financeiro.

A todos vocês, meus sinceros agradecimentos!

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da Criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schweitzer, 1952

RESUMO

A cana-de-açúcar é uma importante gramínea, muito utilizada como fonte de energia renovável, a partir da produção do etanol. Seu cultivo enfrenta perdas significativas devido a estresses ambientais, incluindo a seca. A tolerância a estresses é influenciada por genes regulados por fitormônios. O presente trabalho identificou transcritos das vias de transdução de sinal por fitormônios em cana-de-açúcar após 24 h de supressão de rega, e validou parte das expressões por RT-qPCR. Para tanto, *unitags* SuperSAGE identificadas em ESTs de cana-de-açúcar foram alinhadas (BlastN) com transcritos de sorgo de oito vias (KEGG). Com base nos resultados foi possível: a) identificar nas oito vias estudadas, transcritos de cana-de-açúcar com *unitags* diferencialmente expressas; b) mapear componentes previstos (43 - 100 %) nas vias, em respostas a seca; c) propor nove *primers* eficientes para RT-qPCR, amplificando componentes de quatro das vias analisadas; d) identificar respostas individualizadas, de acessos tolerantes e sensíveis, nas orquestrações das vias de sinalização do ABA, JA, SA e GA. Assim, a via de sinalização por ABA foi confirmada nos acessos tolerantes CTC15 e SP83-5073 (também no acesso sensível SP90-3414); por JA, no acesso tolerante SP83-2847 (e nos sensíveis CTC9 e CTC13); por SA, no acesso tolerante SP83-5073 (e no sensível CTC9); e por GA, no acesso tolerante SP83-2847. Em conjunto, os resultados contribuem para uma melhor compreensão das respostas de tolerância da planta ao estresse estudado, a partir da ação dos fitormônios expressos por diferentes acessos de cana-de-açúcar.

Palavras-chave: *Saccharum* spp. SuperSAGE. Estresse Abiótico. Bioinformática

ABSTRACT

Sugarcane is an important crop as a source of renewable energy through the production of ethanol. Its cultivation is facing significant losses in crop production due to environmental stresses, mainly drought. The plant stress tolerance is influenced by genes regulated by phytohormones, compounds of great importance in plant physiology. The present work identified transcripts of the signal transduction pathways by phytohormones in sugarcane after 24 h water suppression, also validating their expression profiles by RT-qPCR. Thus, SuperSAGE unitags identified in sugarcane ESTs were aligned (BlastN) with sorghum transcripts of eight phytohormones signalling transduction pathways from the KEGG database. Based on the results it was possible to: a) identify, in the eight pathways studied, sugarcane transcripts with differentially expressed unitags, in response to the stimulus; b) map, between 43 - 100% of the components predicted in pathways, in response to drought; c) to propose nine primers efficient for RT-qPCR, to amplify components of four of the pathways analyzed; d) identify individualized responses, tolerant and sensitive, in the orchestrations of signaling pathways for ABA, JA, SA and GA. Therefore, the ABA signaling pathway was confirmed in the CTC15 and SP83-5073 tolerant accesses (also in SP90-3414 sensitive access), by JA, in the SP83-2847 tolerant access (and in the CTC9 and CTC13 sensitives); by SA, in the SP83-5073 tolerant access (and in the CTC9 sensitive); and by GA, in the SP83-2847 tolerant access. On the whole, the results contribute to a better understanding of the tolerance responses of the plant to the studied stress, based on the action of the phytohormones expressed by different accesses of sugarcane.

Keywords: *Saccharum* spp. SuperSAGE. Abiotic Stress. Bioinformatic

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Via de transdução de sinal por fitormônios, de acordo com a base de dados KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Componentes envolvidos na transdução de sinal e identificados em sorgo estão em destaque em verde..... 46
- Figura 2 - Gráfico com distribuição das unitags nas bibliotecas HT-SuperSAGE de cana-de-açúcar sob estresse de seca (supressão de rega por 24 h) com Regulação UR (induzida; cor vermelha); DR (reprimida; cor verde) e n.s. [expressão não diferencial ($p < 0,05$); cor amarela], conforme contraste tolerante [*unitags* expressas pelo *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse (SD24T) vs o *bulk* tolerante controle negativo (SDTC)] e sensível [*unitags* expressas pelo *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse (SD24S) vs o *bulk* sensível controle negativo (SDSC)]. Eixo x está representando os fitormônios da via de transdução de sinal, para cada contraste e o eixo y a quantidade de *unitags* (tpm; tags por milhão), em cada via. 46
- Figura 3- Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Auxina, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada. 73
- Figura 4 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Citocinina, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada. 74
- Figura 5 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Giberelina, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-

SuperSAGE: em verde – de expressão reprimida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada. 76

Figura 6 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Ácido Abscísico, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) resposta do bulk de quatro acessos tolerantes e (B) do bulk de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em verde – de expressão reprimida; em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa..... 80

Figura 7 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Etileno, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em amarelo – de expressão não significativa (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em branco – sem *unitag* identificada..... 82

Figura 8 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Brassinoesteroide, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em verde – de expressão reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada. 83

Figura 9 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Ácido Jasmônico, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em verde – de expressão reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada. 85

Figura 10 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Ácido Salicílico, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis

de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa.	88
Figura 11 - Resultados de RT-qPCR dos genes-alvo com cDNAs de raízes de cana de açúcar de acessos tolerantes (CTC6, CTC15, SP83-2847 e SP83-5073) após 24 h de supressão de rega. Valores de expressão normalizados pelos genes de referência GAPDH e alfa-tubulina. Dados de expressão relativa fornecidos pelo software REST (v.2.0.13).	89
Figura 12 - Resultados de RT-qPCR dos genes-alvo com cDNAs de raízes de cana de açúcar de acessos sensíveis (CTC9, CTC13, SP90-1638 e SP90-3414) após 24 h de supressão de rega. Valores de expressão normalizados pelos genes de referência GAPDH e alfa-tubulina. Dados de expressão relativa fornecidos pelo software REST (v.2.0.13).	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies do complexo <i>Saccharum</i> , destacando seus respectivos conteúdos de açúcar e número de cromossomos.....	21
Tabela 2 - Regulação das unitags HT-SuperSAGE expressas em bibliotecas de acessos contrastantes de cana-de-açúcar sob estresse de seca (supressão de rega por 24 h), seu quantitativo (tpm; tags por milhão) nas duas bibliotecas e o percentual correspondente ao total de unitags.....	47
Tabela 3 - Número identificador do KO (KEGG Orthology) das ESTs de cana-de-açúcar expressas sob estresse de déficit hídrico (supressão de rega por 24 horas) e respectivas anotações conforme a base de dados UniProt.....	47
Tabela 4 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Auxina, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).....	50
Tabela 5 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Citocinina, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).	53
Tabela 6 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Giberelina, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).	54
Tabela 7 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por ácido Abscísico, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações	

observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).....	55
Tabela 8 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Etileno, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).....	58
Tabela 9 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Brassinoesteroide, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).....	59
Tabela 10 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por ácido Jasmônico, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).....	61
Tabela 11 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por ácido Salicílico, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).....	62
Tabela 12 - Unitags HT-SuperSAGE ancoradas em ESTs anotadas para componentes das vias de transdução de sinal por fitormônios, e que apresentaram respostas distintas quanto a regulação (Reg) de expressão observada na resposta do bulk de quatro acessos tolerantes de cana-de-açúcar (contraste SD24T vs SDTC) e quatro sensíveis (SD24S vs SDSC) após aplicação do estresse de supressão de rega (após 24 h).	64
Tabela 13 - Pares de primers propostos para amplificação por RTq-PCR, com base em ESTs de cana-de-açúcar ancorando unitags HT-SuperSAGE induzidas	

(UR) ou reprimidas (DR), para componentes de via de transdução de sinal por fitormônio#, bem como regulações (Reg) e modulações da expressão gênica (FC) observadas na resposta tolerante (de <i>bulk</i> de quatro acessos de cana-de-açúcar) e na resposta sensível (de <i>bulk</i> de quatro acessos sensíveis), após aplicação do estresse de supressão de rega (após 24 h).	66
Tabela 14 - Teste de eficiência dos primers propostos para componentes das vias de transdução de sinais por fitormônios, visando amplificar amostras a partir de raízes de cana-de-açúcar, em reações de RT-qPCR.....	68
Tabela 15 - Dados da quantificação relativa por RT-qPCR para os acessos sensíveis em nove alvos selecionados.	70
Tabela 16 - Dados da quantificação relativa por RT-qPCR para os acessos tolerantes em nove alvos selecionados.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	- Ácido abscísico
BLAST	- <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (Ferramenta básica de busca de alinhamento local).
A-ARR	- <i>Two-component response regulator ARR4</i>
ABF	- <i>G-box binding factor 4</i>
AHP	- <i>Histidine-containing phosphotransfer protein 5</i>
ARF	- <i>Auxin response factor 5</i>
AUX	- <i>Auxin influx Carrier</i>
AUX/IAA	- <i>Auxin-responsive protein IAA10</i>
BAK1	- <i>Brassinosteroid insensitive 1-associated receptor kinase 1</i>
B-ARR	- <i>Putative two-component response regulator ARR19</i>
BIN2	- <i>Shaggy-related protein kinase ETA</i>
BKI1	- <i>BRI1 kinase inhibitor 1</i>
BLASTn	- <i>Nucleotide BLAST</i> (BLAST de nucleotídeos)
BR	- <i>Brassinoesteróide</i>
BRI1	- <i>Protein brassinosteroid insensitive 1</i>
BSK	- <i>Brassinosteroid-signaling kinase 4</i>
BSU1	- <i>Serine/threonine-protein phosphatase BSU1</i>
BZR1/2	- <i>Protein brassinazole-resistant 2</i>
cDNA	- <i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CKs	- Citocinina
COI1	- <i>Coronatine-insensitive protein 1</i>
CONAB	- Companhia Nacional de Abastecimento
CRE1	- <i>Histidine kinase 3</i>
CTR1	- <i>Serine/threonine-protein kinase CTR1</i>
CYCD3	- <i>Cyclin-D3-3</i>
DELLA	- <i>DELLA protein</i>
DNA	- <i>Desoxiribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucléico)

EBF1/2	- <i>EIN3-binding F-box protein 1</i>
EIN2	- <i>Protein ETHYLENE INSENSITIVE 2</i>
EIN3	- <i>Ethylene insensitive 3-like 3 protein</i>
ERF1/2	- <i>Ethylene-responsive transcription factor 1B</i>
EST	- <i>Expressed Sequence Tag</i> (Etiquetas de sequências expressas)
ETHY	- Etileno
ETR	- <i>Ethylene response sensor 2</i>
FC	- <i>Fold Change</i> (Modulação da expressão)
GA	- Giberelina
GH3	- <i>Auxin responsive GH3 gene family</i>
GID1	- <i>Gibberellin receptor GID1</i>
GID2	- <i>F-box protein GID2</i>
IAA	- Auxina
JA	- Ácido jasmônico
JAR1	- <i>Jasmonic acid-amido synthetase JAR1</i>
JAZ	- <i>Protein TIFY 11^a</i>
KO	- Kegg orthology
MPK6	- <i>MAP kinase 6</i>
MYC2	- <i>Transcription factor MYC2</i>
NaCl	- Cloreto de sódio
NPR1	- <i>Regulatory protein NPR1</i>
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pH	- Potencial hidrogeniônico
PP2C	- <i>Protein phosphatase 2C</i>
PR-1	- <i>Putative pathogenesis-related protein</i>
PYR/PYL	- <i>Regulatory component of ABA receptor 1</i>
RB	- Rb931011
RBC	- Biblioteca supersage com o geótipo tolerante ao sal (RB931011) na condição controle
RBT	- Biblioteca supersage com o genótipo tolerante ao sal (RB931011) sob tratamento de estresse salino (100 mm nacl) por 30 e 60 minutos

RIDESA	- Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético
RNA	- <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucléico)
RTq-PCR	- <i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i> (reação quantitativa da transcrição reversa em cadeia da polimerase)
SA	- Ácido salicílico
SAGE	- <i>Serial Analysis of Gene Expression</i> (análise serial da expressão gênica)
SAUR	- <i>SMALL AUXIN UPREGULATED 41 protein</i>
SD24S	- Biblioteca supersage abrangendo o <i>bulk</i> de genótipos sensíveis à seca sob condição de estresse de supressão de rega por 24 h.
SD24T	- Biblioteca supersage abrangendo o <i>bulk</i> de genótipos tolerantes à seca sob condição de estresse de supressão de rega por 24 h
SDSC	- Biblioteca supersage abrangendo o <i>bulk</i> de genótipos sensíveis à seca sob condição controle
SDTC	- Biblioteca supersage abrangendo o <i>bulk</i> de genótipos tolerantes à seca sob condição controle
SnRK2	- <i>Serine/threonine-protein kinase SRK2A</i>
SuperSAGE	- <i>Super Serial Analysis of Gene Expression</i>
TCH4	- <i>Xyloglucan:xyloglucosyl transferase TCH4</i>
TF	- <i>Transcription factor PIF3</i>
TGA	- <i>Bzip transcription factor family protein</i>
TR1	- <i>Transport inhibitor response 1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1 IMPORTÂNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR	20
2.2 SORGO E SUA APLICABILIDADE COMO PLATAFORMA PARA ESTUDOS MOLECULARES EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	22
2.3 O IMPACTO DA SECA NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR	23
2.4 FITORMÔNIOS E SUA FUNÇÃO NA FISIOLOGIA VEGETAL.....	24
2.4.1 Auxina (IAA).....	25
2.4.2 Citocininas (CKs)	26
2.4.3 Giberelina (GA)	27
2.4.4 Ácido Abscísico (ABA)	28
2.4.5 Etileno (ETHY)	29
2.4.6 Brassinoesteroides (BRs).....	30
2.4.7 Ácido Jasmônico (JA).....	31
2.4.8 Ácido Salicílico (SA).....	32
2.5 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE TRANSCRIPTÔMICA: INFORMAÇÕES GERAIS.....	34
2.6 TRANSCRIPTÔMICA DE CANA-DE-AÇÚCAR: DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO ATUAL	36
3 OBJETIVOS.....	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1 ORIGENS DAS UNITAGS SUPERSAGE	40
4.2 ANÁLISE DAS UNITAGS SUPERSAGE.....	41
4.3 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA	41
4.4 ESCOLHA DOS GENES-ALVO PARA VALIDAÇÃO POR RT-QPCR	42
4.5 DESENHOS DOS PRIMERS	42
4.6 SÍNTESE DE CDNA E REAÇÃO DE RT-QPCR	43
5 RESULTADOS.....	45
5.1 EFEITO DO ESTRESSE DE DÉFICIT HÍDRICO (SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H).....	45

5.2 MAPEAMENTO DAS <i>UNITAGS</i> NAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL POR FITORMÔNIOS	49
5.2.1 Auxina	49
5.2.2 Citocinina	52
5.2.3 Giberelina	52
5.2.4 Ácido Abscísico	52
5.2.5 Etileno	57
5.2.6 Brassinoesteroides	57
5.2.7 Ácido Jasmônico	60
5.2.8 Ácido Salicílico	60
5.3 PROPOSIÇÃO DE PRIMERS PARA DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES FUNCIONAIS.....	64
5.4 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO POR RT-QPCR.....	69
6 DISCUSSÃO	71
6.1 ANÁLISES IN SILICO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO POR FITORMÔNIOS..	71
6.1.1 Via de transdução do sinal por Auxina	71
6.1.2 Via de transdução do sinal por Citocinina	73
6.1.3 Via de transdução do sinal por Giberilinas	74
6.1.4 Via de transdução do sinal por Ácido Abscísico	76
6.1.5 Via de transdução do sinal por Etileno	80
6.1.6 Via de transdução do sinal por Brassinoesteroides	82
6.1.7 Via de transdução do sinal por Ácido Jasmônico	84
6.1.8 Via de transdução do sinal por Ácido Salicílico	86
6.2 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE <i>UNITAGS</i> POR RT-QPCR.....	88
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	92

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), cultivada no Brasil desde 1532, é uma importante gramínea pertencente ao gênero *Saccharum*, tribo Andropogoneae e família Poacea. Sua importância econômica decorre de suas várias utilidades, podendo ser usada como forragem, *in natura*, na alimentação animal, como matéria-prima na fabricação de rapadura e aguardente, além de ser utilizada como fonte de energia renovável, por meio da produção do etanol. Devido à sua ampla empregabilidade e extenso cultivo em território nacional, a cana-de-açúcar apresenta alto valor estratégico, sendo vigorosamente estudada e alvo de programas bastante ativos de melhoramento genético. Entretanto, tal cultura sofre perdas severas decorrentes de estresses, tanto bióticos quanto abióticos. O Estado de Pernambuco possui uma área territorial de aproximadamente 100 mil Km², sendo que áreas suscetíveis à desertificação correspondem a cerca de 90 % desse total. O enfrentamento dessa vulnerabilidade é parte da política pública do Estado, que ganha força com a iniciativa de transposição do rio São Francisco.

Condições ambientais não favoráveis têm influência negativa no crescimento vegetal, resultando em um menor rendimento das culturas no campo. Seca, deficiência mineral, alta salinidade e baixo pH nos solos estão entre os principais fenômenos que diminuem a produtividade agrícola. Nas regiões tropicais, além do estresse hídrico causado pelos baixos índices de precipitação pluviométrica, é comum a ocorrência conjunta de outros estresses, como a salinização dos solos.

Existe um grande número de genes envolvidos nas vias de resposta vegetal a estresses, dificultando a sua caracterização e requerendo, assim, novas tecnologias para isso. Neste sentido, as tecnologias derivadas das ômicas são capazes de amostrar muitos genes e transcritos, de destacada importância na fisiologia dos organismos. A transcriptômica, através da metodologia SuperSAGE (*SuperSerial Analysis of Gene Expression*), dentre outras, pode gerar perfis transcricionais altamente informativos. A orquestração transcricional em genótipos com fenótipos contrastantes (tolerante *versus* sensível, por exemplo) pode revelar o modo como estes percebem, conduzem e amplificam os sinais, em uma cascata de eventos, até as respostas fisiológicas finais, revelando similaridades e

diferenças cruciais no desencadeamento dessas respostas a um estresse estudado. Nestas respostas, fitormônios são um dos principais sistemas de integração de eventos metabólicos e desenvolvimento da planta em resposta a estresses, influenciando o rendimento e qualidade das colheitas. Assim, o estudo de vias de transdução desses importantes atores da fisiologia vegetal poderá revelar informações de grande relevância e impacto para aplicação no melhoramento da cana-de-açúcar, além de nos revelar potenciais novos alvos moleculares com apelo biotecnológico. Assim, identificar e selecionar genótipos tolerantes aos estresses abióticos, com ênfase em seca, bem como entender como se dá o processo de tolerância irá auxiliar na expansão da fronteira agrícola, visando maior exploração de sua área produtiva e manutenção da estabilidade econômica desse setor.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) é uma gramínea pertencente ao gênero *Saccharum* L., tribo Andropogoneae e família Poaceae. O gênero ao qual pertence é composto por seis espécies (*S. spontaneum*, *S. officinarum*, *S. robustum*, *S. edule*, *S. barberi* e *S. sinense*) que apresentam diferentes números de cromossomos [Australian Government, 2004; (Tabela 1)]. A cana-de-açúcar mais cultivada atualmente é um provável híbrido entre *Saccharum officinarum* e *spontaneum*, dando origem à designação *Saccharum* spp. (Toppa et al., 2010).

Tabela 1 - Espécies do complexo *Saccharum*, destacando seus respectivos conteúdos de açúcar e número de cromossomos.

Espécies	Cruzamentos de origem	Conteúdo de Açúcar	Número de cromossomos
<i>S. spontaneum</i>	Selvagem	-----	2n = 40-128
<i>S. robustum</i>	Selvagem	-----	2n = 60-200
<i>S. officinarum</i>	<i>S. spontaneum</i> / <i>Mischantus sinenses</i> / <i>Erianthus arundinaceus</i>	Alto	2n = 80
<i>S. barberi</i>	Híbrido ancestral	Baixo	2n = 111-120
<i>S. sinense</i>	Híbrido ancestral	Baixo	2n = 80-124
<i>S. edule</i>	Selvagem	-----	2n = 60-80

O cultivo de cana-de-açúcar ocorre predominantemente em climas tropicais e subtropicais, representando cerca de 70 a 80 % do açúcar total produzido (Silva, 2010). A cultura tem ampla utilização devido a sua capacidade bioenergética e diversidade de produtos obtidos, sendo elemento fundamental para o desenvolvimento econômico, pois dela derivam o açúcar, o álcool, alguns fertilizantes e polímeros. Além disso, através da queima da sua biomassa, gera-se energia elétrica (Marin et al., 2008).

A região litorânea do Nordeste brasileiro foi o principal polo de produção após a introdução da referida espécie no Brasil. Com o passar dos anos, perdeu espaço para a região Sudeste, principalmente para o Estado de São Paulo, que é o maior produtor de cana-de-açúcar do Brasil, atualmente com 4.498,3 dos 8.654,2 mil hectares de área colhida destinada à atividade (CONAB, 2016). A intensa produção da cultura no país reflete sua utilização sob a forma de forragem, bicompostíveis, alimento animal e base para a fabricação de produtos como açúcar, melado, rapadura e aguardente (Rae et al., 2005; Dillon et al., 2007; Chaves e Davies, 2010). Devido a essa ampla empregabilidade é considerada uma das mais importantes espécies cultivadas (Oliveira, 2006).

No que tange a seu potencial econômico em solo nacional, a cana-de-açúcar é considerada, desde o período colonial, um dos principais produtos agrícolas do país (Marin et al., 2008). Segundo levantamento feito pela CONAB (2016), o Brasil produziu 665,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar na safra

de 2015/16, apresentando incremento de 4,9 % em relação à safra de 2014/15. A produção de cana-de-açúcar estimada para a safra de 2016/17 é de 684,77 milhões de toneladas, o crescimento está previsto em 2,9 % em relação à safra anterior. O Estado de Pernambuco possui, atualmente, 273,4 mil hectares plantados com cana-de-açúcar, resultando em uma produção de 15.464,3 mil toneladas (MAPA, 2016). O levantamento atual feito pelo CONAB (2016) estima que a produção canavieira destinada ao setor sucroalcooleiro no Estado atinja na safra de 2016/17 um volume em torno de 14.400,3 mil toneladas ou 26,9 % a mais em relação à safra passada.

2.2 SORGO E SUA APLICABILIDADE COMO PLATAFORMA PARA ESTUDOS MOLECULARES EM CANA-DE-AÇÚCAR

A alta complexidade do genoma de cana-de-açúcar ($2n = 18 - 170$) limita, em certo ponto, o melhoramento genético e ensaios moleculares relacionados com a cultura (Mariotti, 2002). Ao longo dos anos, estudos têm proporcionado uma compreensão maior da constituição genética da referida gramínea (Wu et al., 1992; D'Hont, 1994; Ming et al., 2001; Rossi et al., 2003), porém o ritmo do progresso com a genômica de cana-de-açúcar ficou para trás, quando comparada com culturas aparentadas como, por exemplo, o sorgo (*Sorghum bicolor*; Ramsay et al., 2000; Mullet et al., 2002).

Sorgo é o parente mais próximo de cana-de-açúcar (Paterson et al., 2004). Bowers et al. (2003) relatam a estreita relação entre cana-de-açúcar e sorgo. Eles partilham muitas semelhanças em sua composição genética, uma vez que se originaram a partir de uma linhagem ancestral comum que divergiu aproximadamente 5 a 8 milhões de anos atrás (Serna-Saldivar e Rooney, 1995; Smith e Frederiksen, 2000).

A cana de açúcar tem um grande genoma que se duplicou, pelo menos, duas vezes desde que divergiu de sorgo (Al-Janbi et al., 1997). Entretanto, existe extensa colinearidade gênica entre os genomas dessas duas culturas. Isso faz do sorgo o melhor modelo para a tribo Andropogoneae, visando compreender o conteúdo e rearranjos de genes, além de apoiar o desenvolvimento de mapas genéticos em cana-de-açúcar (Price et al., 2005).

2.3 O IMPACTO DA SECA NO CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Estresses de origem ambiental constituem os principais responsáveis por perdas na agricultura. Dependendo do organismo, podem reduzir a produtividade entre 60 % a 87 % (Bray et al., 2000). Estresses, de uma forma geral, ocasionam mudanças significativas das condições consideradas ideais para a vida do organismo, induzindo alterações em todos os seus níveis funcionais. Em princípio, tais efeitos podem ser revertidos; mas se persistirem em um longo período, os danos podem ser permanentes (Larcher, 2000).

As plantas estão constantemente expostas a condições adversas do meio em que vivem. Elas reagem a alterações no ambiente através de diversas respostas celulares e morfológicas, na tentativa de defesa ou adaptação às novas condições enfrentadas. Essas alterações incluem diversos fatores, podendo-se ressaltar a indução da expressão de genes específicos e a ativação de vias de transdução de sinais que agem tentando restabelecer a homeostasia celular (Pinheiro e Chaves, 2011). Diversos fatores ambientais podem afetar o desempenho de espécies vegetais. Esses fenômenos ocorrem naturalmente no meio ambiente, porém são intensificados com o aumento da poluição e/ou por meio de ações antrópicas, os quais podem desencadear inúmeras implicações como, por exemplo: tempestades, seca, inundações, salinização do solo, entre outros (Marcinska et al., 2013). A seca é um dos estresses ambientais que limitam drasticamente o crescimento da cultura e a produção mundial (Harb et al., 2010; Shi et al., 2012)

No Nordeste, os canaviais colhidos no final da safra de 2013 sentiram a umidade insuficiente para o desenvolvimento da soqueira, em decorrência de estiagem prolongada, a qual também afetou canaviais em formação (CONAB, 2013). Desta forma, verifica-se que efeitos abióticos, como por exemplo, o déficit hídrico, podem gerar perdas na produção da cultura. Tal efeito foi observado no Norte e Nordeste, onde a cultura de cana-de-açúcar se recuperou de uma forte seca que ocorreu na safra de 2012/13 e 2013/14 diminuindo drasticamente sua produção (CONAB, 2015). De acordo com o levantamento feito pela CONAB (2016) houve queda na produtividade de cana-de-açúcar, principalmente em Alagoas e Pernambuco, maiores produtores da região. Isso foi reflexo do déficit hídrico e abandono de lavouras pelos fornecedores. Em países onde a cana-de-

açúcar é produzida, principalmente nos tropicais e com uma menor extensão nos subtropicais, o déficit hídrico é um fator limitante na produção da cultura (Inman-Bamber, 2004). Verifica-se, portanto, que mudanças climáticas, incluindo disponibilidade hídrica, são fatores limitantes para a agricultura (Chaves e Davies, 2010).

Para responder ao estresse hídrico, plantas adquiriram estratégias fisiológicas que permitiram a tolerância as mudanças ambientais repentinas (Quin et al., 2011; Shi et al., 2013), grande parte das respostas de tolerância são reguladas por mensageiros secundários, incluindo alguns fitormônios (Hirayama e Shinozaki., 2010; Qin et al., 2011; Du et al., 2013). A tolerância a estresses bióticos e abióticos é um importante fenômeno, uma vez que a expansão da indústria canavieira ocorre, na sua maior parte, em áreas sujeitas a diversos estresses (Somerville et al., 2010).

2.4 FITORMÔNIOS E SUA FUNÇÃO NA FISIOLOGIA VEGETAL

Fitormônios são, em sua maioria, reguladores do crescimento em plantas, podendo atuar no local da sua síntese ou ser transportados para outro local. Além da função relatada, esses compostos atuam em processos de tolerância / resistência a estresses abióticos e bióticos (Peleg e Blumwald, 2011). Da embriogênese até a senescência de uma planta, diversos processos são iniciados ou mediados por genes regulados por fitormônios. O crescimento e desenvolvimento dos vegetais são regulados de forma coordenada pela atividade de fitormônios, como por exemplo, o ácido abscísico, giberelina, etileno, auxinas, citocininas e brassinoesteroides (Iqbal et al., 2014).

Os fitormônios possuem um papel vital na resposta dos vegetais a estresses abióticos. Esses, geralmente, levam a alterações na produção, distribuição ou transdução de sinal de fitormônios, podendo, assim, promover mecanismos específicos de tolerância (Eyidogan et al., 2012). A percepção de um sinal de estresse desencadeia uma cascata de transdução de sinais em plantas, onde fitormônios atuam como transdutores (Harrison, 2012). Em um estudo do transcriptômica de cana-de-açúcar submetida à seca e fitormônios, Rocha et al. (2007) e Rodrigues et al (2009) identificaram vários genes conhecidos e com

expressão associada a estresses ambientais como PRs, DREBs, HSPs, LEA e PP2C entre outros.

2.4.1 Auxina (IAA)

IAA foi o primeiro fitormônio identificado em plantas sendo predominantemente sintetizado em tecidos com crescimento rápido, como por exemplo, meristemas apicais, folhas jovens, além de frutos e sementes em desenvolvimento (Ljung et al., 2001). Adicionalmente, Aloni et al. (2006) relataram que as extremidades das raízes também podem sintetizar esse composto, regulando a sua distribuição. IAA desempenha um papel chave na regulação do crescimento de plantas, como o alongamento das células, desenvolvimento de tecidos vasculares e dominância apical (Wang et al., 2001).

A expressão de IAA é controlada, basicamente, por duas famílias de fatores de transcrição (FTs): ARF e AUX / IAA (Guilfoyle e Hagen, 2007). ARFs (fatores responsivos a IAA) são capazes de se ligar a elementos de resposta TGTCTC presentes nos promotores de genes que respondem a auxinas, ativando ou reprimindo suas transcrições ou ainda recrutando outros FTs (Guilfoyle e Hagen, 2007), que mediam a resposta auxina (Song et al., 2009). Embora IAA tenha sido amplamente reconhecido por sua regulação no crescimento e desenvolvimento da planta, esse fitormônio pode, ainda, regular resposta do crescimento da planta sob estresses abióticos (Eyidogan et al., 2012). Jung e Park (2011) estabeleceram uma ligação entre a sinalização de IAA e do estresse salino, sugerindo que, sob salinidade, a germinação das sementes é modulada por um fator de transcrição (ARF) que transmite o sinal de IAA para a germinação de sementes.

A via de sinalização SOS regula a homeostase de IAA em raízes. Essa regulação é essencial para a formação de raízes laterais (Zhao et al., 2011). A manutenção da homeostase é um importante mecanismo adaptativo para o crescimento da raiz em plantas, conferindo a tolerância à salinidade e seca. Estresses abióticos podem influenciar a homeostase da auxina devido a alterações na sua distribuição e metabolismo (Buer e Muday, 2004). Além disso, a geração de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio), em resposta a estresse abiótico, pode influenciar a sua sinalização (Schopfer et al., 2002). Algumas

evidências apontam para o papel regulador da sinalização de IAA como resposta da planta sob estresses abióticos (Fang e Yang, 2002; Chen et al., 2012a). De acordo com Ribaut e Pilet (1994) o aumento da concentração de IAA tem sido correlacionado com o crescimento reduzido da planta, sugerindo alterações no equilíbrio dos hormônios em plantas em condições de estresse. Porém, o inverso foi relatado por Nilsen e Orcutt (1996), que concluíram que a exposição de plantas de arroz a estresse osmótico reduziu significativamente o nível de IAA durante um período de incubação por cinco dias. Ainda há pouca informação sobre o efeito do estresse de seca sobre a biossíntese de IAA e seus níveis na planta estressada. Desta forma, se a concentração de IAA aumenta ou diminui em condições de estresse osmótico ainda não foi bem elucidado (Chen et al., 2012a). Portanto, é concebível que a via de sinalização de auxina também desempenhe um papel fundamental na resposta das plantas a seca.

2.4.2 Citocininas (CKs)

Desde a sua descoberta em 1955, CKs são, rotineiramente, utilizadas em cultura *in vitro*, em cultivo de plantas ornamentais, como por exemplo, orquídeas, crisântemos ou cravos (Ferreira et al., 2006); para a multiplicação de clones de árvores florestais (Mala et al., 2013); ou para propagação de batata (Baroja-Fernandez et al., 2002). Aplicações exógenas de CKs são usadas em horticultura para o aumento da ramificação e, assim, quantidades de flores (Kaminek et al., 1987).

CKs exibem uma gama de funções fisiológicas, incluindo a estimulação de ramificação da raiz, o desenvolvimento vascular, diferenciação de cloroplastos, atraso da senescência e abertura dos estômatos entre outros (Mok e Mok, 2001; Spichal, 2012). CKs agem como antagonistas ao ácido abscísico (ABA) em diversos processos na planta, como por exemplo, o controle da abertura de estômatos (Iqbal et al., 2006). Durante o crescimento e desenvolvimento da planta, CKs são reguladores mestres. Além disso, sua participação na tolerância a estresse salino foi relatada por Hadiarto e Tran (2011).

A ligação específica das CKs aos seus receptores é dada pelo domínio de ligação referenciado como CHASE. Este domínio contém receptores histidina quinase que servem para interação com CKs (Heyl et al., 2007; Heyl et al., 2013).

Esse receptor CKs também foi nomeado de CRE1 (Inoue et al., 2001). A ligação de CKs ao seu receptor desencadeia uma auto fosforilação e subsequente transferência do grupo fosfato pelos componentes HPTS (histidina fosfotransferase). Estes transportam o fosfato, recebido através do receptor AHK / CRE1, do citoplasma para o núcleo e o transferem para reguladores de respostas (RR) (Gupta e Rashotte, 2012). Em *Arabidopsis thaliana*, existem duas principais classes de RRs: ARR tipo A e tipo B. ARRs do tipo B, por exemplo, são fatores de transcrição que mediante a fosforilação de um resíduo Asp ativa a transcrição de genes responsivos ao CKs, incluindo ARRs tipo A (Sakai et al., 2000).

2.4.3 Giberelina (GA)

GA é conhecida por sua participação na regulação de respostas das plantas ao meio ambiente (Chakrabarti e Mukherji, 2003). É considerado um fitormônio importante, pois confere tolerância a estresses, incluindo salinidade e seca, em muitas culturas (Hoque e Haque, 2002). A sua rápida acumulação é uma característica das plantas expostas a estresses abióticos. GA regula processos metabólicos, como por exemplo, sinalização de açúcar e atividade de enzimas antioxidantes (Iqbal et al., 2011). Tal fitormônio influencia, ainda, a germinação de sementes, expansão da folha e desempenha um papel importante na modulação de diversos processos ao longo do desenvolvimento da planta (Khan et al., 2007). Gilley e Flecher (2007) verificaram que os efeitos de proteção morfológica e de estresse dos triazóis são revertidos por GA, indicando, assim, uma relação entre a proteção de GA e plantas estressadas.

O fitormônio GA tem sido relacionado com a diminuição dos efeitos negativos de estresses abióticos (Yamaguchi, 2008). Foi relatado por Maggio et al. (2010) que, em plantas de tomate, a aplicação de GA pode aumentar o crescimento e a produtividade das plantas. Kumar e Singh (1996) observaram que o aumento dos níveis de salinidade diminuiu o crescimento de trigo, no entanto, sementes tratadas com GA tiveram seu crescimento normal.

Análises genéticas realizadas em *Arabidopsis* e arroz têm sido fundamentais para identificar componentes da via de transdução de sinais por GA. Basicamente os componentes que formam o esqueleto da via são o receptor

GID1 (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), as proteínas DELLAs, reguladores da transcrição (Peng et al., 1997) e proteínas F-box GID2 (McGinnis et al., 2003). Em essência, a ligação de GA no receptor GID1 permite sua interação com as proteínas DELLAs, que são reguladores negativos da via. Uma vez que essa ligação é estabelecida, DELLAs são degradadas por proteólise mediada pelo complexo 26S da ubiquitina, um processo mediado pela interação de DELLA com GID2. Isso acarreta na ativação de fatores de transcrição e na liberação da resposta de GA, como por exemplo, indução da germinação (Daviere e Achard, 2013).

2.4.4 Ácido Abscísico (ABA)

ABA desempenha um papel importante na resposta e tolerância a estresses abióticos, principalmente salinidade e seca (Sharma et al., 2005). A sinalização de ABA regula a expressão de genes-alvo quando a planta está sob estresse de alta salinidade (Narusaka et al., 2003). Tal fitormônio possui um papel significativo durante várias etapas do ciclo de vida das plantas, incluindo o desenvolvimento de sementes e dormência, mediando, ainda, respostas das plantas a diversos estresses ambientais (Devinar et al., 2013). Por ser o principal sinal interno que confere a tolerância a condições adversas, é considerado o hormônio do estresse abiótico (Keskin et al., 2010).

A via de sinalização de ABA contém a subfamília PP2Cs e três quinases Snfl (SnRK2.2, SnRK2.3 e SnRK2.6; Umezawa et al., 2010). O modelo de transdução de sinal de ABA é descrito da seguinte forma: (1) na ausência de ABA, quinases SnRK2 são inativadas pelas proteínas fosfatases PP2Cs; isso ocorre porque essas fosfatases interagem fisicamente com reguladores negativos das proteínas quinases SnRK2 e desfosforilam o resíduo de serina no loop de ativação dessas quinases, inibindo a resposta final do fitormônio; (2) na presença de ABA, o fitormônio se liga às proteínas receptoras PYR/PYL. Isso permite a ligação ao sítio catalítico das proteínas PP2Cs. Os receptores inativam a atividade enzimática das PP2Cs, ou seja: ABA induz a inibição das PP2Cs, o que leva à ativação das SnRK2 por indução do loop de auto fosforilação. Tal processo acarreta uma resposta fisiológica final, como por exemplo, fechamento dos estômatos (Leung, 2012).

ABA atua como mensageiro endógeno na regulação do conteúdo de água no interior da planta, desempenhando um papel importante na regulação da condição hídrica e crescimento do vegetal, por meio da indução de genes (Zhu, 2002). Zhang et al. (2006) relataram que a exposição da planta à alta salinidade acarreta em um aumento da concentração de ABA. Essa, por sua vez, é geralmente associada com o potencial de água no solo o qual pode ser influenciado pelo estresse salino.

Em conjunto com outros fitormônios, ABA regula o controle do crescimento da raiz, a percepção de estresses e expressão de genes responsivos (Zhu, 2002; Verslues et al., 2006; Fahad et al., 2015), podendo diminuir a transpiração e perda de água através do fechamento dos estômatos (Wilkinson e Davies 2010). Isso ocorre, devido ao aumento da concentração, induzido por ABA, de Ca^{++} no citoplasma. A ativação de canais iônicos na membrana plasmática e perdas do turgor por células guarda também estão relacionados com a indução por ABA da produção de H_2O_2 . Esse peróxido serve como um sinal intermediário de ABA para o fechamento de estômatos (Kim e Wang 2010).

Sripinyowanich et al. (2013) observaram que a aplicação exógena de 100 mM de ABA em mudas de arroz submetidas a alta salinidade, melhorou a taxa de sobrevivência em 20 % e aumentou o acúmulo de prolina pela expressão do gene P5CS1, corroborando as indicações de Zorb et al. (2014) que relataram um aumento na concentração de ABA nas folhas de híbridos de milho tolerantes a sal sob estresse de salinidade. Tal fato é também elucidado para genótipos de tomate tolerantes a salinidade, onde foi observada maior concentração de ABA no xilema (Amjad et al., 2014).

2.4.5 Etileno (ETHY)

ETHY é um fitormônio gasoso cuja sinalização é importante na regulação do crescimento das plantas. El-Iklil et al., (2000) observaram que menor produção de ETHY foi relacionada com tolerância ao sal. As respostas das plantas a estresses abióticos, como por exemplo, seca e salinidade, são mediadas por alterações no nível de receptores de ETHY (Khan et al., 2013). Cao et al., (2007) relatou que apesar da sinalização do ETHY ter função em várias respostas a estresse, esse fato, ainda não está claro para, por exemplo, a salinidade.

ETHY sinaliza uma infinidade de processos, em várias fases do desenvolvimento. Estas sinalizações incluem receptores (ETR1, EIN4, EIN2, EIN5 e EIN6), quinases (MAP quinase CTR1) e FTs (EIN3) (Guo e Ecker, 2003). Na presença de ETHY, a proteína EIN3, fator chave na regulação da transcrição de genes mediados por etileno, aumenta em frequência, enquanto que na ausência de ETHY, essa proteína é degradada via ubiquitina / proteassoma (Guo e Ecker, 2003). De acordo com Potuschak *et al.* (2003), a transdução de sinal é iniciada com a ligação do ETHY a uma família de receptores (ETR1), e a transcrição é terminada com uma cascata envolvendo FTs específicos (da família EIN3/EIL). EIN3 pode ligar-se a sequências promotoras de vários componentes, tais como ERFs. Esses, por sua vez, podem se ligar a GCC *box*, elemento *cis* encontrado em muitos genes regulados por etileno (Zhu e Guo, 2003). A via de sinalização de ETHY ainda participa da sinalização de outros hormônios, incluindo IAA, ABA e ácido jasmônico (JA), influenciando respostas que afetam o desenvolvimento da planta.

2.4.6 Brassinoesteroides (BRs)

BRs compõem um grupo de ocorrência natural composto por brassinolide (BL) e castasterone (CS), precursores direto de BRs, e seus derivados que regulam o crescimento da planta e o desenvolvimento através da produção de uma matriz de alterações fisiológicas (Khripach *et al.*, 2000; Kartal *et al.*, 2009). Eles podem ocorrer de forma livre ou conjugados com açúcares ou ácidos graxos. BRs estão envolvidos em diversas atividades, incluindo a germinação de sementes, a diferenciação vascular, crescimento do tubo polínico, ativação da bomba de prótons, fotossíntese, biossíntese de proteínas, crescimento reprodutivo e produção de flores e frutos (Khripach *et al.*, 2000; Hayat *et al.*, 2010; Fahad *et al.*, 2015). Esse fitormônio é também conhecido por melhorar os efeitos nocivos da salinidade no crescimento vegetal (Wang *et al.*, 2011). Aplicação exógena de BRs melhora os efeitos adversos do estresse salino sobre a germinação de sementes, alongamento da raiz e atividade da redutase do nitrato (Anuradha e Rao, 2001).

Uma via de sinalização para BRs foi apresentada por Ye *et al.* (2011), na qual BRs são percebidos por quinase do tipo receptor de membrana BRI1 [na

ausência de BRs, BKI1 (*BRI1 kinase inhibitor 1*) se liga a BRI1 que inibe sua função]. Ao mesmo tempo, BIN2 (*GSK3-like kinase*) fosforila BES1 e BZR1 (FTs), cujas funções são inibidas por mecanismos como diminuição da proteína de ligação ao DNA ou retenção por proteínas 14-3-3. Na presença de BRs, BRI1 ativado fosforila BKI1, levando à sua dissociação da membrana plasmática, e na promoção da associação de BRI1 com o co-receptor BAK1. BRI1 fosforilaria e ativaria BAK1, que por sua vez fosforilaria e ativaria mais BRI1. BRI1 ativado fosforilaria vários substratos para a transdução do sinal a jusante dos alvos. A fosforilação de BSK1 leva à sua associação com BSU1 fosfatase, que pode inibir a quinase BIN2. Ao mesmo tempo, a fosfatase PP2A poderia desfosforilar BZR1 (e provavelmente BES1), levando ao acúmulo de BZR1 e BES1 não fosforilados no núcleo, onde poderiam interagir com outros reguladores da transcrição e genes, influenciando as respostas BR.

2.4.7 Ácido Jasmônico (JA)

JA é um regulador celular que está envolvido em diversos processos do desenvolvimento da planta, incluindo a germinação das sementes, crescimento da raiz primária, floração e senescência (Cheong e Choi, 2003; Tani et al., 2008). Sua função como regulador de respostas de resistência das plantas a ferimentos, estresse ambientais, ataque por insetos e infecção por fitopatógeno, também é relatada (Mcconn et al., 1997; Overmyer et al., 2000). Algumas dessas respostas envolvem a participação do ETHY (Guo e Ecker, 2004). A biossíntese do JA ocorre nas folhas e não há um esclarecimento de um caminho semelhante nas raízes, assim, organelas celulares, tais como cloroplastos e peroxissomas são considerados como o principal local da biossíntese do JA (Cheong e Choi, 2003). Tais locais são conhecidos por ativar as respostas de defesa da planta a vários estresses bióticos e abióticos (Mei et al., 2006; Wasternack e Hause 2013).

A análise de mutantes insensíveis ao JA ou a coronatina, um análogo do JA, permitiu a identificação do gene *COI1* (*coronatine insensitive 1*; Feys et al., 1994; Xie et al., 1998). Foi observado que plantas com mutação nesse gene não expressam genes que respondem ao JA e são altamente suscetíveis ao ataque de insetos e infecção por fitopatógenos, indicando que *COI1* exerce uma função central na sinalização mediada pelo JA (Li et al., 2004). O gene *COI1* codifica

uma proteína com motivos “F-box” encontrados em proteínas que compõem o complexo ubiquitina ligase envolvido na degradação de proteínas (Xie et al., 1998). O gene JAR1 (*jasmonic acid resistant 1*) tem participação na regulação de genes expressos em resposta ao JA (Staswick et al., 1992). Staswick et al. (1998) relataram que plantas com mutações neste gene têm reduzida expressão de genes responsivos ao JA associado a um aumento na suscetibilidade à infecção por fitopatógenos. Os genes responsivos ao JA são, também, regulados pelo fator de transcrição ERF-1 (Lorenzo e Solano, 2005). Esse fator de transcrição pode ser induzido em resposta ao JA como também em resposta ao ETHY, no segundo caso, sua indução é mediada pelo fator de transcrição EIN3 (*Ethylene insensitive 3*; Lorenzo et al., 2004).

Um modelo de transdução de sinal de JA foi apresentado por Katsir et al. (2008). Em plantas com níveis reduzidos de JA, os genes JA-responsivos seriam reprimidos por proteínas JAZ, que inibiriam a atividade de FTs, incluindo MYC2, envolvidas na expressão de genes de resposta imediata. Quando o estresse levasse ao acúmulo de JAs na sua forma ativa (por exemplo, JA-Ile), a expressão destes genes seria iniciada e JA-Ile se ligaria ao domínio LRR de COI1, causando um complexo no qual as proteínas são JAZs poli-ubiquitinadas e degradadas em proteasoma. A eliminação dos repressores JAZ deixaria o fator de transcrição MYC2 estimular a expressão de genes dependentes de jasmonato, culminando na sua resposta final, como por exemplo, resposta a estresse (Staswick, 2008).

2.4.8 Ácido Salicílico (SA)

SA desempenha um papel crítico na regulação do crescimento das plantas, interação com outros organismos e respostas de defesa a estresses ambientais (Senaratna et al., 2000; Bastam et al., 2013). A sua importância é evidente na germinação das sementes, glicólise, floração, produção de frutos, absorção e transporte de íons, taxa fotossintética, transpiração, tolerância térmica, senescência e nodulação (Khan et al., 2003).

Diversos estudos sugerem que o SA também está envolvido nas respostas a vários estresses abióticos, incluindo seca e salinidade (Khodary, 2004; Javid et al., 2011; Iqbal et al., 2014; Fahad et al., 2014). Em um estudo

realizado por Zhao et al. (1995) foi observado que plantas de soja tratadas com SA tiveram um aumento no teor de pigmentos e na taxa de fotossíntese. Recentemente, Bastam et al. (2013) também relataram que a aplicação exógena de SA aumentou a tolerância à salinidade em mudas de pistache. Tal efeito vem sendo constatado para feijão (Azooz, 2009), trigo (Sakhabutdinova et al., 2003), feijão Mungo (Khan et al., 2010) e mostarda (Syed et al., 2011). Além da aplicação exógena de SA, com a sua adição no solo também foi relatada tolerância à salinidade em milho e mostarda, diminuindo a acumulação de íons tóxicos (Gunes et al., 2007).

A via de sinalização por SA envolve genes expressos que são regulados por NPR1 (*Non-expressor of PR1*), também conhecido como NIM1 (Dong, 2004). Há evidências que a ativação de NPR1 pelo SA envolve a participação da proteína SABP2 (*Salicylic acid-binding protein 2*). Essa tem alta afinidade pelo SA, possivelmente atuando como uma proteína receptora (Kumar e Klessig, 2003; Dong, 2004). Em condições de baixa concentração de SA, proteínas NPR1 permanecem no citoplasma unidas por pontes bissulfídicas formando oligômeros. Com o aumento na concentração de SA ocorre uma alteração no potencial redox da célula, promovendo a redução das pontes bissulfídicas e liberando monômeros de NPR1 (Mou et al., 2003). Estes monômeros migram para o núcleo da célula onde interagem com os fatores de transcrição do tipo TGAs (Despres et al., 2000; Johnson et al., 2003). TGAs têm afinidade pelo elemento *cis* “TGACG” encontrado na região regulatória de genes relacionados com a defesa da planta, como, por exemplo, o PR-1. Despres et al. (2000) demonstraram que o fator TGA2 é capaz de se ligar aos elementos LS5 e LS7 presentes na região promotora do PR-1 *in vitro*. Esta ligação também foi confirmada *in vivo*, em um processo dependente de SA, demonstrando a participação de NPR1 e TGA2 na regulação de PR-1 (Subramaniam et al., 2001). A regulação da expressão de proteínas PRs por NPR1 / TGA possivelmente envolve ainda a proteína NIMIN1 (*NIM1-Interacting 1*) que é capaz de interagir com NPR1 / TGA no sistema triplo-híbrido (Weigel et al., 2005). Neste caso, a super expressão de NIMIN1 em plantas de *Arabidopsis* resultou na redução da expressão de PR-1, PR-2 e PR-5 e aumento na suscetibilidade a *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola*. Do mesmo modo, o silenciamento ou nocaute de NIMIN1 resulta na hiperativação de PR-1 após o

tratamento com SA, demonstrando que NIMIN1 é um regulador negativo da expressão dos genes PR (Weigel et al., 2005).

A regulação de respostas de defesa mediada por NPR1 envolve ainda os fatores de transcrição do tipo WRKY, regulando a expressão de genes que apresentam em sua região promotora os motivos “W-boxes” (Beckers e Spoel, 2006). Yu et al. (2001) identificaram “W-boxes” na região promotora de NPR1 e demonstraram que mutações nesses *cis* elementos promovem redução na expressão NPR1 e de genes por ele regulados. WRKY70 regula mais de 40 genes relacionados com defesa em *Arabidopsis thaliana*, incluindo não só genes cuja expressão é dependente do SA, como também genes cuja expressão é regulada pelo JA (Li et al., 2004).

A utilização desse fitormônio como ferramenta na regulação a tolerância da planta à seca é importante. No entanto, muitos trabalhos ainda precisam ser realizados para desvendar o caminho exato da biossíntese do SA, modo de ação e outros papéis como regulador na tolerância ao estresse abiótico, assim como sua interação com outros fitormônios (Pieterse et al., 2009).

2.5 MÉTODOS PARA ANÁLISE DE TRANSCRIPTÔMICA: INFORMAÇÕES GERAIS

Existe um grande número de genes envolvidos nas vias de respostas das plantas a estresses (Zhu, 2002), o que dificulta caracterizá-las, requerendo novas tecnologias para isso. Neste sentido, estratégias genômicas são capazes de amostrar muitos genes em respostas de plantas sob estresse. O transcriptoma corresponde à fração do código genético que é transcrita pela RNA polimerase em moléculas de RNA. Assim, métodos que analisem o quantitativo de diferentes tipos de RNA mostram o padrão transcricional de genes, permitindo correlacionar atividades gênicas com processos biológicos e doenças. As diversas metodologias utilizadas para analisar o transcriptoma podem ser divididas em basicamente duas categorias (Terauchi et al., 2008):

- (1) Metodologias baseadas em hibridação de fitas de nucleotídeos complementares a sequências alvos;
- (2) Metodologias baseadas no sequenciamento e contagem dos transcritos.

No primeiro grupo, a análise de *microarray* (Schena et al., 1995) é uma das principais representantes. Essa técnica, também conhecida como “chips” de DNA, permite investigar milhares de genes de uma maneira simultânea. O princípio dessa técnica é baseado na hibridação de sondas (fixadas quimicamente na superfície de pequenos chips) com sequências de transcritos alvos a serem analisados (Dalma-Weiszhausz et al., 2006; Cheung et al., 1999). Com o passar dos anos, a técnica de *microarray* vem contribuindo para análises de transcriptoma de organismos modelo. No entanto, para estudos em espécies que ainda não tem chips de *microarray*, essa técnica não seria a melhor empregada uma vez que as lâminas de cDNA utilizadas no *microarray* só estão disponíveis para organismos com bibliotecas de ESTs ou cDNA disponíveis.

No segundo grupo, uma das principais representantes desse grupo é a técnica SuperSAGE (Super Serial Analysis of Gene Expression; Matsumura et al., 2004). Essa consiste em *tags* de 26 pb que são obtidas a partir da fragmentação de cDNAs por meio da enzima EcoP15I. A habilidade da enzima em clivar sítios distantes de seus motivos de reconhecimento na molécula de DNA é que determina a extensão das *tags*. SuperSAGE é uma variação da técnica SAGE, a principal modificação é o tamanho do fragmento gerado, sendo 14 pb em SAGE e 26 pb em SuperSAGE (Velculescu et al., 1995; Matsumura et al., 2003). Uma vez que a enzima EcoP15I apresenta a maior distância entre esses pontos (Matsumura et al., 2008), ocorre uma melhora significativa do processo de anotação, ou seja, melhor identificação das *tags* correspondentes aos transcritos e respectivos genes (Matsumura et al., 2005). Na ocasião, a técnica SuperSAGE proporcionou uma maior amostragem (milhões de *tags*) do transcriptoma, aumentando a sensibilidade e diminuindo custos e tempo de produção (Matsumura et al., 2008; Terauchi et al., 2008), bem como novas aplicações, como por exemplo, observação simultânea de perfis da expressão gênica de duas ou mais espécies (Matsumura et al., 2003), a utilização dessas *tags* para produção de RNA de interferência (Matsumura et al., 2004), o emprego de *tags* para confecção de chips *microarray* que podem ser utilizados, assim como a RTq-

PCR, para validação do perfil gerado pela SuperSAGE (Matsumura et al., 2004; Matsumura et al., 2008), entre outros.

A técnica tem sido empregada com sucesso no estudo da resposta de vegetais a estresses abióticos. Em um artigo referencial, Molina et al. (2008) estudaram o comportamento de grão de bico (*Cicerarietinum* L.) submetido a déficit hídrico, tendo obtido um perfil transcricional mais compreensivo para essa espécie. Em 2013, Ferreira Neto et al. analisaram mais de 2,5 milhões de tags SuperSAGE de raízes de soja em resposta à desidratação, produzindo informações valiosas para a aplicação no melhoramento da mesma.

2.6 TRANSCRIPTÔMICA DE CANA-DE-AÇÚCAR: DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO ATUAL

Nas últimas décadas, o entendimento do genoma de cana-de-açúcar sofreu diversos progressos, isso vem acontecendo graças à utilização de novas abordagens biotecnológicas (Lakshmanan et al., 2005). Em relação à transcriptômica, técnicas como, RNA-seq, *microarray* e SuperSAGE, empregam estratégias diferentes de detecção (Manners e Casu, 2011). No Brasil, o estudo do transcriptoma da cana-de-açúcar iniciou-se com 237.954 ESTs (*Expressed Sequence Tags*) obtidas pelo projeto SUCEST (Vettore et al., 2003). ESTs, de modo geral, podem contribuir para uma caracterização inicial de genes expressos frente a estresses bióticos e abióticos, sendo considerada uma alternativa para a seleção de genes associados a características de interesses (Cordeiro et al., 2006). Sucedendo o SUCEST foram criadas algumas plataformas para estudar o transcriptômica de cana-de-açúcar, o que ajudou na obtenção de grande quantidade de dados de expressão de genes para o acúmulo de sacarose, seca, indução por etanol, fitormônios, estresse biótico e abiótico, entre outros (Casu et al., 2007; Camargo et al., 2007; Rodrigues et al., 2009). No Banco de dados do NCBI está depositado, atualmente, 285.216 sequências ESTs de cana-de-açúcar.

A transcriptômica pode gerar perfis transcricionais de genótipos tolerantes e sensíveis após aplicação do estresse. A metodologia SuperSAGE tem sido utilizada com sucesso com esta finalidade em diversas espécies, inclusive cana-de-açúcar (Kido et al., 2012). A expressão diferencial de genótipos com fenótipos

contrastantes pode estar relacionada com o modo como estes genótipos percebem o estresse, conduzem e amplificam os sinais, em uma cascata de eventos até a resposta fisiológica final. Nesta sinalização, fitormônios são fundamentais. Kido et al. (2012) utilizaram a técnica SuperSAGE para caracterizar o transcriptoma de cana-de-açúcar sob estresse de supressão de rega por 24 horas, o que permitiu a identificação de potenciais genes alvos responsivos a seca, um total de 213 *tags* induzidas foram relacionadas com o referido estresse e cerca de 145 genes ainda sem função predita foram detectados. Da Silva et al. (2013) também utilizam a SuperSAGE para identificar e validar expressão de aquaporinas no transcriptoma de cana-de-açúcar a partir de perfis de transcrição de acesso sensível e tolerante ao estresse de seca, onde foi identificado representantes de quatro subfamílias de aquaporinas descritas em vegetais superiores (PIP, TIP, SIP e NIP) e cerca de 28 isoformas de aquaporinas foram observadas sendo expressas após aplicação do estresse.

Outras técnicas têm sido utilizadas para estudar genes diferencialmente expressos em cana-de-açúcar em escala moderada. Estes incluem a hibridização subtrativa de cDNA que tem sido utilizada para estudar estresses abióticos tais como salinidade e déficit hídrico (Prabu et al., 2010, Patade et al., 2010), bem como a resposta aos patógenos fúngicos *Ustilago scitaminea* e *Bipolaris sacchari* (Borras- Hidalgo et al., 2005). Uma vasta gama de técnicas e estratégias moleculares tais como análise em série da expressão genética, hibridização subtrativa de cDNA, microarrays e RNAseq permitiram a identificação de alvos genéticos e suas modificações, possuindo alto potencial para alcançar fenótipos de interesse, foram implantadas para identificar genes envolvidos em respostas de estresses (Sreenivasulu et al., 2007). Na cana-de-açúcar, a hibridização subtrativa de supressão de cDNA (SSH), microarrays, RNAseq, RT-qPCR e SUCEST foram utilizados para estudar as respostas ao estresse oxidativo (Kurama et al., 2002), déficit hídrico (Rocha et al., 2007) e estresses bióticos (Gupta et al., 2009). O isolamento de genes induzidos pelo estresse com déficit hídrico e o estudo de sua relevância funcional são importantes para o desenvolvimento de variedades de cana-de-açúcar tolerantes à seca (Grabherr et al., 2011).

Apesar da importância econômica da cana-de-açúcar, há necessidade de novos esforços de seqüenciamento de transcriptomas de cana-de-açúcar derivados de vários tecidos e tratamentos, visando aumentar o conjunto básico de informações e auxiliar nas estratégias biotecnológicas. Novas tecnologias genômicas, como a próxima geração de sequenciamento, permitirão estudos transcriptômicos mais eficientes e ajudarão a estabelecer uma plataforma para a genômica da cana-de-açúcar (Cardoso-Silva et. al., 2014).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e validar a expressão de transcritos SuperSAGE relacionados com as vias de transdução de sinais por fitormônios, em cana-de-açúcar sob déficit hídrico (supressão de rega, 24h), para desenvolvimento futuro de marcadores moleculares funcionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar as *unitags* SuperSAGE diferencialmente expressas envolvendo bibliotecas de raízes de plantas tolerantes e sensíveis, após 24h de estresse de supressão de rega;
2. Minerar ESTs associados às *unitags* diferencialmente expressas pelos bulks de acessos tolerantes e sensíveis, nas comparações sob estresse em relação aos respectivos controles negativos, cujas anotações forem de proteínas/ genes das vias de transdução de sinais por fitormônios, discutindo suas participações nas respostas ao estresse.
3. Desenhar e propor, a partir das ESTs acima, ao menos 25 pares de *primers* para RT-qPCR, contribuindo para futuros desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais para seleção assistida envolvendo o estresse;
4. Validar parte das expressões diferenciais observadas por RT-qPCR, de alvos moleculares selecionados das diferentes vias de transdução de sinais, com o proposito de reforçar a importância dos dados obtidos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ORIGENS DAS *UNITAGS* SUPERSAGE

As *unitags* disponíveis para este trabalho foram oriundas de bibliotecas HT-SuperSAGE envolvendo ensaios, que estão aqui descritos sumariamente somente para entendimento dos acessos implicados e do estresse aplicado. Em janeiro de 2008, em Piracicaba (SP), foi estabelecido e conduzido pelo Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), um ensaio com 20 acessos previamente selecionados com base em históricos, em relação à tolerância a seca. Esses acessos foram plantados em vasos (de 40 L) contendo substrato Plantmax[®] e, após dois meses do plantio, foram aplicados os tratamentos para a identificação dos acessos mais contrastantes, tolerantes e sensíveis à seca. Foram quatro tratamentos (T1: planta com irrigação permanente; T2: planta com supressão de rega por 3 dias; T3: supressão de rega por 10 dias e T4: supressão de rega por 20 dias) e três repetições. Com base em análises estatísticas dos dados fisiológicos foram selecionados quatro acessos tolerantes (CTC6, CTC15, SP83-2847, SP83-5073) e quatro sensíveis (CTC9, CTC13, SP903414, SP90-1638). Esses acessos foram estabelecidos em novo ensaio para fins de amostrar raízes para extração de RNA total. O ensaio foi conduzido em caixas de 10 L e com o tempo de supressão de rega alterado para dois tratamentos: (1) controle negativo: plantas constantemente irrigadas e (2) estressado: plantas com supressão de rega de 24 h. A extração de RNA total de todas as amostras seguiu o protocolo do reagente Trizol[®] (Invitrogen). Após purificação com *RNeasy Mini kit* (Qiagen[®]) e quantificação, amostras de RNA de cada acesso tolerante foram combinadas equimolarmente em *bulk*. O mesmo foi feito para amostras de acessos sensíveis. Todos os procedimentos moleculares encontram-se descritos em Kido et al. (2012). Os bulks de RNA foram usados para confeccionar quatro bibliotecas SuperSAGE: (1) SD24T: plantas tolerantes estressadas; (2) SDTC: plantas tolerantes controle; (3) SD24S: plantas sensíveis estressadas e (4) SDSC: plantas sensíveis controle. As bibliotecas HT-SuperSAGE foram geradas sob supervisão do prof. Guenter Kahl (Universidade de Frankfurt – Alemanha), seguindo basicamente a metodologia proposta por Matsumura et al. (2003), mas com

adaptadores e sequenciamento via SOLEXA[®] (Illumina Genome Analyzer II), por intermédio da empresa GenXPro GmbH (Frankfurt, Germany). Maiores detalhes encontram-se em Kido et al. (2012). As *tags* (de 26 pb) sequenciadas estiveram disponíveis para o presente trabalho.

4.2 ANÁLISE DAS UNITAGS SUPERSAGE

Das *tags* disponíveis (8.787.315, distribuídas nas quatro bibliotecas), aquelas *singlets* (sequenciadas apenas uma vez) foram excluídas, e as análises, realizadas através do software DiscoverySpace 4.0.1 (Robertson et al., 2007), para os contrastes entre as duas bibliotecas tolerantes (SD24T vs SDTC) e as duas sensíveis (SD24S vs SDSC), feitas aplicando-se o teste de significância de Audic e Claverie (1997), ao nível de 5 % de probabilidade ($p < 0,05$), sendo as *tags* diferencialmente expressas, classificadas como sendo de expressão: reprimida (DR), induzidos (UR) e não significativa (n.s.). O valor da modulação da expressão da *tag* (FC; *Fold Change*), obtido após a normalização da biblioteca para um milhão de *tags*, foi calculado como simples relação entre frequências observadas de mesma *unitag* (ou *tag* única) em duas bibliotecas, geralmente a estressada e a controle, representando quantas vezes uma determinada *unitag* foi mais ou menos expressa (sua modulação), ao se comparar duas situações.

4.3 ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

As *unitags* foram alinhadas via BLASTn com ESTs de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) disponíveis na base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), tendo sido aceitos alinhamentos demonstrando: (1) e-value < 0,005; (2) máximo de um erro no alinhamento *unitag* – EST; (3) sequência CATG íntegra (5') e (4) alinhamentos *plus / plus*. ESTs com *unitags* ancoradas, por sua vez, foram alinhadas via BLASTx (e-value < e^{-10}) com sequências protéicas curadas da base de dados UniProt/SwissProt (<http://www.uniprot.org/>) para confirmar uma possível anotação e obter, se disponível, o identificador KO (*Kegg Ortholog*), o qual foi utilizado com a ferramenta KEGG Mapper (*Search&Color Pathway*), da base de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; <http://www.genome.jp/kegg/>), para confeccionar o mapa metabólico que inclui as vias de transdução de sinal por

fitormônios (*Plant Hormone Signal Transduction*), a partir do modelo disponível para sorgo.

4.4 ESCOLHA DOS GENES-ALVO PARA VALIDAÇÃO POR RT-QPCR

De acordo com as expressões observadas nas análises *in silico* das *unitags* relacionadas com as vias de transdução de sinal por fitormônios, alguns genes-alvo foram escolhidos para validação por RT-qPCR. Assim, foram escolhidas *unitags* com expressão induzida ou reprimida na comparação entre tratamentos do estresse de déficit hídrico, expressão contrastante entre os *bulks* analisados (ex: superexpressa no *bulk* tolerante e reprimida ou expressão não-diferencial no *bulk* sensível). Foram também considerados na escolha a modulação de expressão da *unitag* (maiores valores FC) e a frequência observada da *unitag* nas bibliotecas comparadas.

4.5 DESENHOS DOS PRIMERS

Os *primers*, para amplificar as ESTs alvos que alinharam na via de fitormônio e que continham as *unitags* de interesse, foram desenhados através do programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), com os seguintes parâmetros: (1) tamanho do *primer* (pb): mínimo de 20, ótimo de 22 e máximo de 24; (2) tamanho do *amplicom* (pb): de 80 a 150; (3) temperatura de dissociação (TM) do *primer* (°C): mínima de 58, ótima de 60 e máxima de 62; (3) Temperatura de *melting* do produto (°C): mínima de 75, ótima de 85 e máxima de 95; (4) conteúdo GC (%):variação de 45 a 55 e (5) CG clamp: 1. Os demais parâmetros seguiram o padrão do programa. Os *inputs* utilizados no programa foram as sequências de ESTs de cana-de-açúcar que alinharam com *unitags* de interesse (UR ou DR), com no máximo um erro (*mismatch*) no alinhamento das 26 pb.

As ESTs escolhidas para desenho de primers consideraram *unitags* contrastantes nas respostas dos *bulks* de acessos tolerantes e sensíveis, ou seja, induzidas (UR) no *bulk* de acessos tolerantes, após aplicação do estresse (SD24T x SDTC) e, ao mesmo tempo, reprimidas (DR) ou ao menos n.s. na resposta do *bulk* de acessos sensíveis (SD24S x SDSC), ou vice-versa (DR na resposta do

bulk de acessos tolerantes e UR ou n.s. na resposta do *bulk* de acessos sensíveis).

4.6 SÍNTESE DE CDNA E REAÇÃO DE RT-QPCR

As amostras de RNA total de cada acesso sob os quatro tratamentos (SD24T, SDTC, SD24S e SDSC) foram isoladas dos mesmos tecidos utilizados para a construção das bibliotecas HT-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®), conforme orientações do fabricante, a partir de 1 ng de RNA provenientes de amostras quantificadas via fluorômetro Qubit® (Invitrogen®). Testes de PCR convencional foram realizados para verificar amplificação dos cDNAs, com os primers propostos, nas seguintes condições: 95 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 segundos, 58 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Os fragmentos foram analisados em gel de agarose 1.5 %, corado com Blue-green Loading Dye (LGC Biotechnology®). As reações de 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)], 0,3 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* (USB®), 3,4 µL de água ultrapura estéril. As reações de RT-qPCR foram realizadas no equipamento *Fluorescent Quantitative Quantification System* (BIOER®) utilizando-se a seguinte programação: desnaturação inicial de 95 °C por 2 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 60 segundos, com uma extensão 65 °C por 20 segundos, 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 que acompanha o termociclador *Line Gene 9600* (BIOER®). As análises de quantificação relativa, utilizando-se como normalizadores α - tubulina e GAPDH (D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), cujas sequências foram oriundas da literatura e analisadas com o software REST (*Relative Expression Software Tool*) versão 2.0.13 (Pfaffl, Horgan e Dempfle, 2002).

5 RESULTADOS

5.1 EFEITO DO ESTRESSE DE DÉFICIT HÍDRICO (SUPRESSÃO DE REGA POR 24 H)

Das *tags* HT-SuperSAGE disponíveis (8.787.315), após a exclusão dos *singlets*, resultaram 205.975 *unitags* (*tags* diferentes ou *tags* únicas). Destas *unitags*, após alinhamento BLASTn (e-value < 0,005) com ESTs de cana-de-açúcar da base de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 76.441 *unitags* ancoraram com no máximo um erro no alinhamento com as ESTs. As ESTs ancorando *unitags*, depois de retirado as redundantes, foram alinhadas com os 234 transcritos de sorgo previstos nas vias de transdução de sinal por fitormônios, da base de dados KEGG (*Plant Hormone Signal Transduction*), cujos genes identificados para sorgo estão destacados em verde na Figura 1. Assim, foi possível identificar 66 ESTs de cana-de-açúcar, relacionadas com 144 *unitags* e com as vias de sinalização por fitormônios para sorgo. Os perfis de regulação das *unitags* observadas nas vias de sinalização, em relação ao total de cada tipo (UR, DR e n.s.) estão dispostos na Tabela 2, para os contrastes tolerante [*bulk* dos quatro acessos tolerantes com supressão de rega de 24 h *versus* mesmo *bulk* na condição controle (SD24T vs SDTC)] e sensível [*bulk* dos quatro acessos sensíveis com supressão de rega de 24 h *versus* mesmo *bulk* na condição controle (SD24S vs SDSC)]. As ESTs que ancoraram *unitags* (66) tiveram suas anotações confirmadas com similaridades com proteínas curadas (após alinhamento BLASTx com o banco UniProt/SwissProt). Tal procedimento permitiu obter identificadores KO, dispostos na Tabela 3, com os quais foram confeccionados os mapas metabólicos das vias de transdução de sinais dos oito fitormônios estudados, tendo por base as vias de sorgo já mapeadas.

Figura 1 - Via de transdução de sinal por fitormônios, de acordo com a base de dados KEGG Pathway (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Componentes envolvidos na transdução de sinal e identificados em sorgo estão em destaque em verde.

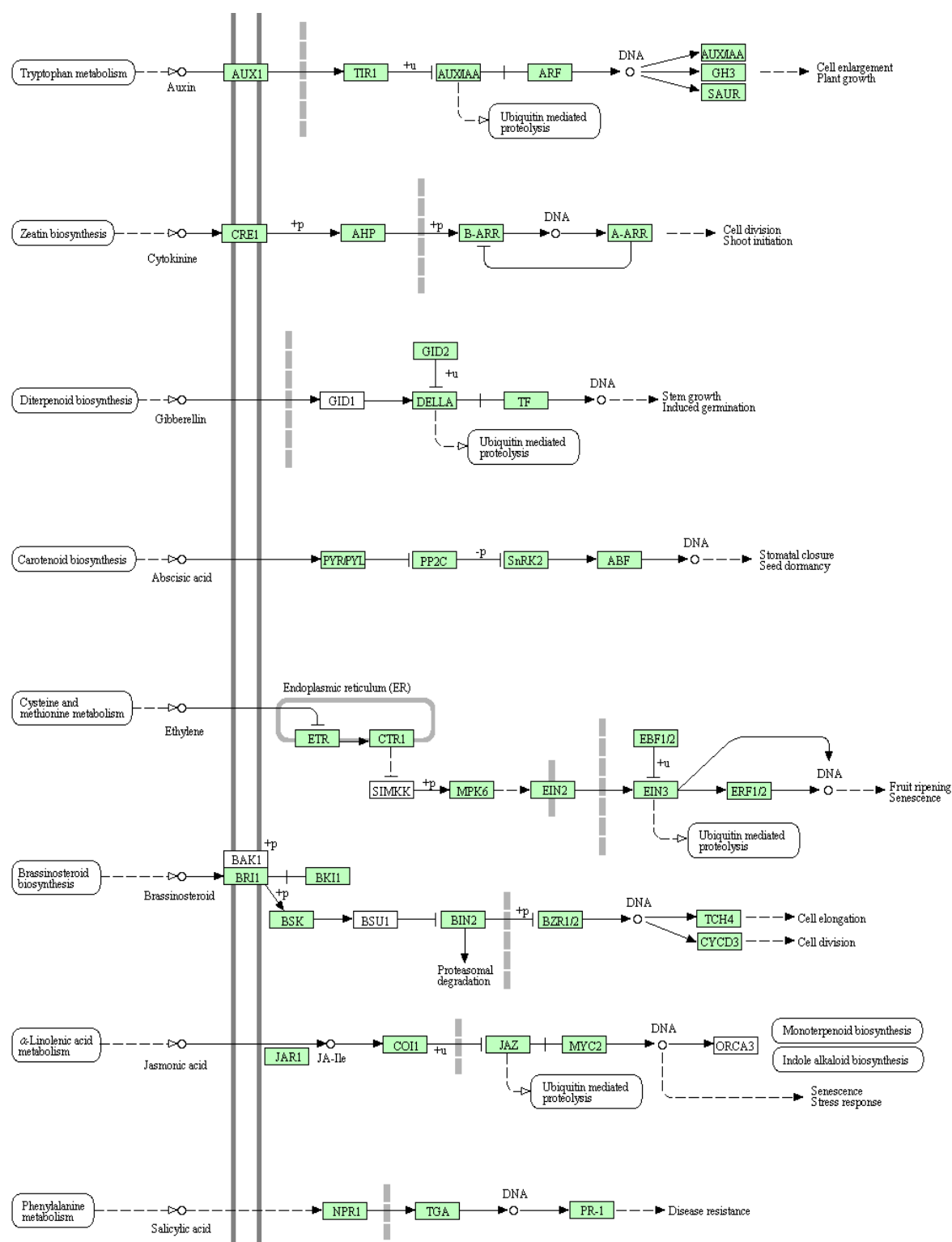


Tabela 2 - Regulação das unitags HT-SuperSAGE expressas em bibliotecas de acessos contrastantes de cana-de-açúcar sob estresse de seca (supressão de rega por 24 h), seu quantitativo (tpm; tags por milhão) nas duas bibliotecas e o percentual correspondente ao total de unitags.

Regulação	SD24T vs SDTC*	%	SD24S vs SDSC*	%
UR total	12179	8,01	12085	8,51
UR da via de transdução de sinal	15	13	14	13
DR total	12482	8,20	16339	11,51
DR da via de transdução de sinal	8	7	11	11
n.s. total	127388	83,78	113522	79,98
n.s. da via de transdução de sinal	93	80	80	76
Total de UR, DR e n.s.	152049	100	141946	100

*Total de unitags; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (não significativa ao nível de $p < 0,05$ em teste Audic-Claverie); SD24T vs SDTC: *bulk* de quatro acessos tolerantes com supressão de rega de 24 h *versus* mesmo *bulk* de acessos na condição controle; SD24S vs SDSC: *bulk* de quatro acessos sensíveis com supressão de rega de 24 h *versus* mesmo *bulk* na condição controle.

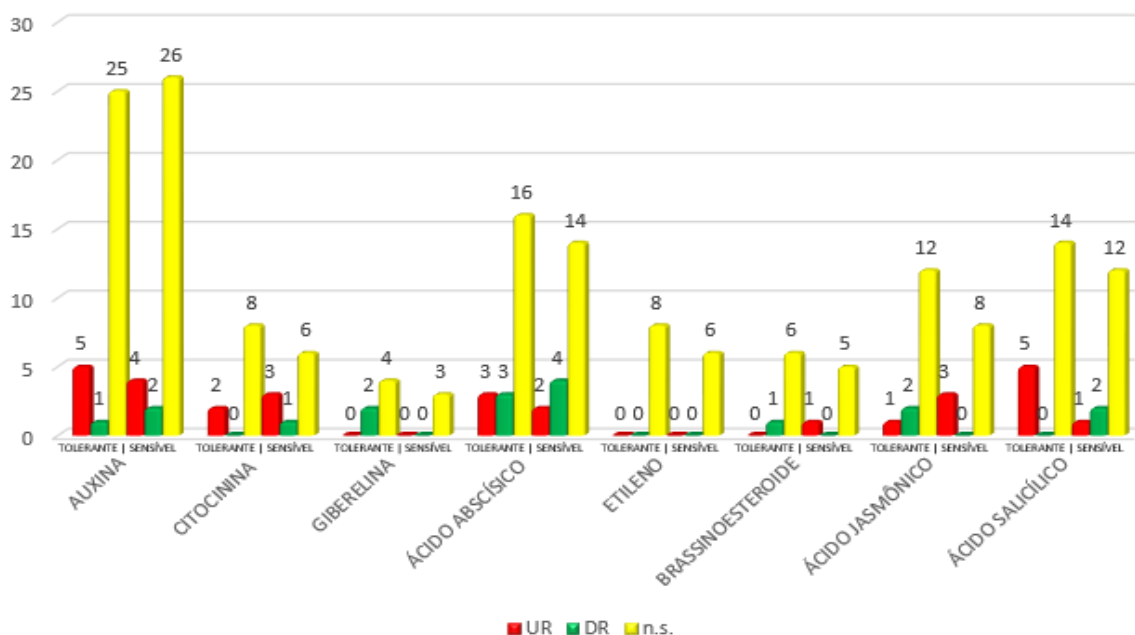
Tabela 3 - Número identificador do KO (KEGG Orthology) das ESTs de cana-de-açúcar expressas sob estresse de déficit hídrico (supressão de rega por 24 horas) e respectivas anotações conforme a base de dados UniProt.

KO	Anotação	KO	Anotação
K13449	<i>pathogenesis-related protein 1</i>	K14496	<i>abscisic acid receptor PYR/PYL/PYR/PYL</i>
K13463	<i>coronatine-insensitive protein 1</i>	K14497	<i>protein phosphatase 2C</i>
K13464	<i>jasmonate ZIM domain-containing protprot</i>	K14498	<i>serine/threonine-protein kinase SRK2</i>
K14431	<i>transcription factor TGA</i>	K14500	<i>BR-signaling kinase</i>
K14432	<i>ABA responsive element bindingbinding facto</i>	K14502	<i>protein brassinosteroid insensitive</i>
K14484	<i>auxin-responsive protein IAA</i>	K14505	<i>cyclin D3 plant</i>
K14486	<i>auxin response factor</i>	K14506	<i>jasmonic acid-amino synthetase</i>
K14487	<i>auxin responsive GH3 genegene family</i>	K14508	<i>regulatory protein NPR1</i>
K14488	<i>SAUR family protein</i>	K14509	<i>ethylene receptor</i>
K14490	<i>histidine-containing phosphotransfer</i>	K14514	<i>ethylene-insensitive protein 3</i>
K14491	<i>two-component response regulator ARRARR</i>	K14515	<i>EIN3-binding F-box protein</i>
K14492	<i>two-component response regulator ARRARR</i>	K14516	<i>ethylene-responsive transcription factor</i>
K14495	<i>F-box protein GID2</i>	K16189	<i>phytochrome-interacting factor 4</i>

As quantidades de *unitags* UR, DR ou n.s. observadas nos bulks de acessos tolerantes e sensíveis, e em cada via de transdução de sinal, podem ser vistas na Figura 2. De acordo com a figura, nas análises dos contrastes (tolerante ou sensível) se observa que grande parte das *unitags* mapeadas apresentou regulação n.s. Por outro lado, a única via a não apresentar *unitags* diferencialmente expressas foi a do Etileno (Figura 2). Nas vias do Etileno, ácido Abscísico e Auxina, comportamentos semelhantes foram observados nos dois contrastes (tolerante e sensível). No entanto, ao se comparar os contrastes

tolerante e sensível é possível observar algumas diferenças, como por exemplo, na via relativa ao ácido Jasmônico, no contraste tolerante foram observadas *unitags* sob as três regulações (reprimidas, induzidas e n.s.), enquanto no contraste sensível não se observou *unitag* reprimida. O contrário foi observado na via da Citocinina e do ácido Salicílico, onde no contraste tolerante não foi observado *unitag* reprimida, enquanto no contraste sensível foram observadas *unitags* sob as três regulações. Ainda, na via da Giberelina, no contraste tolerante só foram observadas *unitags* n.s., enquanto no contraste sensível foram observadas *unitags* também reprimidas. Já na via referente aos Brassinoesteroides, no contraste tolerante foram observadas *unitags* reprimidas e n.s., enquanto no contraste sensível, somente *unitags* induzidas e n.s.

Figura 2 - Gráfico com distribuição das *unitags* nas bibliotecas HT-SuperSAGE de cana-de-açúcar sob estresse de seca (supressão de rega por 24 h) com Regulação UR (induzida; cor vermelha); DR (reprimida; cor verde) e n.s. [expressão não diferencial ($p < 0,05$); cor amarela], conforme contraste tolerante [*unitags* expressas pelo *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse (SD24T) vs o *bulk* tolerante controle negativo (SDTC)] e sensível [*unitags* expressas pelo *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse (SD24S) vs o *bulk* sensível controle negativo (SDSC)]. Eixo x está representando os fitormônios da via de transdução de sinal, para cada contraste e o eixo y a quantidade de *unitags* (tpm; *tags* por milhão), em cada via.



5.2 MAPEAMENTO DAS *UNITAGS* NAS VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAL POR FITORMÔNIOS

5.2.1 Auxina

Em relação ao mapeamento dos componentes previstos especificamente em cada via, na via de transdução de sinal do fitormônio auxina cinco dos seis componentes previstos foram mapeados (exceção para TR1), representando aproximadamente 83 % da via mapeada. Para estes cinco componentes, uma possível expressão diferencial foram observadas, com *unitags* induzidas e reprimidas (além de n.s.). Componentes mapeados (e não mapeados), EST similar de cana-de-açúcar, *unitags* observadas, com respectivas regulações, valores de FC e frequências normalizadas (tpm; *tags* por milhão) em cada biblioteca HT-SuperSAGE podem ser vistos, especificamente para esta via, na Tabela 4.

Tabela 4 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Auxina, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Auxina							
				Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
AUX1	BQ536843	CTC_SD145198	CATGGCATATAAGGCTCGCTAGCTCG	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD75431	CATGCAGCCAGTGTTAATTGCTAGGT	1,19	n.s.	17,88	15,00	6,15	UR	16,36	2,66
TR1	X	x	x	x	x	x	X	x	x	x	x
AUX/IAA	CA268118	CTC_SD128895	CATGGACCAGAAGCAATAATCTATCT	2,02	UR	334,60	165,45	1,54	UR	273,38	177,75
		CTC_SD147145	CATGGCCCAGAAGCAATAATCTATCT	-2,81	DR	1,00	2,81	-4,79	DR	1,00	4,79
	CA099829	CTC_SD80735	CATGCATCTCCTTTGTGCTGCTAAAA	4,77	UR	4,77	1,00	-1,90	n.s.	1,40	2,66
	CA118538	CTC_SD31886	CATGACTTTGTCCCTCCCTACTTAC	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD236438	CATGTGATGCTGAGGCTATACTAACC	1,06	n.s.	1,99	1,87	-1,37	n.s.	2,34	3,19
	CA282838	CTC_SD10790	CATGAAGAATATTATAATTCCAAGGA	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD10791	CATGAAGAATATTATAATTCCAAGGC	-2,12	n.s.	3,97	8,44	-1,94	n.s.	4,67	9,05
		CTC_SD182029	CATGGTTATTTGTTAAAGAACAGGCA	1,07	n.s.	1,00	0,94	-1,14	n.s.	0,93	1,06
		CTC_SD236367	CATGTGATGCAGAGGCTATACTAACC	-1,26	n.s.	0,79	1,00	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CA098951	CTC_SD239194	CATGTGCATTGTATGTCTGTGATGT	1,81	UR	32,19	17,81	1,30	n.s.	40,19	30,87
		CTC_SD239201	CATGTGCATTGTGTGTCTGTGATGT	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD240306	CATGTGCCTTTGTATGTCTGTGATGT	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD86459	CATGCCACAAGACCTGATGGTTCGTG	-1,41	n.s.	1,00	1,41	-2,13	DR	1,00	2,13
		CTC_SD86461	CATGCCACAAGAGCTGATGGTTCGTG	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD239192	CATGTGCATTGTATGTCTGCGATGT	1,19	n.s.	1,19	1,00	#	#	#	#

Auxina											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
AUX/IAA	CA193103	CTC_SD32033	CATGAGAAAAAGCTCAACGAGTGCAC	-1,77	n.s.	0,79	1,41	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CF575557	CTC_SD112100	CATGCTGCGTAGTAGCCATCTCTAAT	2,54	n.s.	3,58	1,41	2,11	n.s.	5,61	2,66
	CA105632	CTC_SD102169	CATGCGTGGAATGATGTGTGGTCACT	1,13	n.s.	4,77	4,22	2,05	n.s.	3,27	1,60
		CTC_SD115227	CATGCTGTGTGCTGTTTTATTGTAT	1,30	UR	81,46	62,81	1,10	n.s.	73,84	67,06
	CF576007	CTC_SD115226	CATGCTGTGTGCTGCTTTTATTGTAT	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD115239	CATGCTGTGTGGTGTTCATTGTAT	1,15	n.s.	7,55	6,56	1,65	n.s.	14,02	8,52
		CTC_SD123050	CATGGAACTTCTCAGTTTCAAGTGC	1,19	n.s.	1,19	1,00	-1,07	n.s.	0,93	1,00
ARF	CA196922	CTC_SD90882	CATGCCCTGGTATTGAGGTTCTGGGCA	1,30	n.s.	47,69	36,56	1,31	n.s.	29,91	22,88
		CTC_SD90883	CATGCCCTGGTATTGAGGTTCTGGGCC	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD90884	CATGCCCTGGTATTGCGGTTCTGGGCA	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD90887	CATGCCCTGGTCTTGAGGTTCTGGGCA	1,07	n.s.	1,00	0,94	-1,07	n.s.	0,93	1,00
	CA083441	CTC_SD91129	CATGCCCTTGATTGAGGTTCTGGGCA	-1,41	n.s.	1,00	1,41	#	#	#	#
		CTC_SD11643	CATGAAGATGGTTGGATCGAGGATGC	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
GH3	CA130024	CTC_SD203387	CATGTAGCCTGTCTGTAAGTAGTAGT	1,77	UR	19,87	11,25	1,04	n.s.	36,92	35,66
		CTC_SD142572	CATGGCAACAGATTCATCAGGTGCTT	#	#	#	#	1,87	n.s.	1,87	1,00
		CTC_SD209416	CATGTATCCTGTCTGTAAGTAGTAGT	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CA138672	CTC_SD218838	CATGTCAGTTACATATACTAAATTAC	-2,36	n.s.	1,19	2,81	-1,60	n.s.	1,00	1,60
SAUR	CA080190	CTC_SD193742	CATGTAATCCTCCATTGAGGCTAGCT	1,07	n.s.	1,00	0,94	-1,14	n.s.	0,93	1,06
	CA190410	CTC_SD106661	CATGCTCAATCCACACAACGAAACGG	1,07	n.s.	1,00	0,94	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD106662	CATGCTCAATCCACACAAGGAAACGG	-1,18	n.s.	3,97	4,69	-1,99	n.s.	3,74	7,45
	CA282321	CTC_SD51059	CATGATCGAAATTGCTGCTCAGACAT	#	#	#	#	3,74	UR	3,74	1,00
		CTC_SD51058	CATGATCGAAATTCCTGCTCAGACAT	1,19	n.s.	1,19	1,00	4,67	UR	4,67	1,00

* com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negatido do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

5.2.2 Citocinina

Já na via relativa ao fitormônio citocinina foram mapeados três dos quatro componentes previstos (75 % da via), faltando somente o componente CRE1. Para aqueles mapeados, *unitags* majoritariamente induzidas foram observadas no *bulk* de acessos tolerantes, sendo todas as regulações observadas no *bulk* de acessos sensíveis (Tabela 5).

5.2.3 Giberelina

Em relação ao fitormônio giberelina, foram mapeados todos os componentes previstos para sorgo (100 % da via). Para os componentes mapeados, *unitags* majoritariamente reprimidas e não significativas foram observadas (Tabela 6).

5.2.4 Ácido Abscísico

Na via relativa ao ácido Abscísico, foram mapeados também todos os quatro componentes previstos em sorgo (100 % da via). Com base nas expressões das *unitags*, dois componentes apresentaram *unitags* com expressões contrastantes ao se comparar os *bulks* de acessos tolerantes e sensíveis. Assim, duas *unitags* referentes ao componente PYR / PYL apresentaram-se induzidas (UR) no *bulk* de acessos tolerantes (CTC_SD122705 e CTC_SD122727), sendo uma delas (CTC_SD122705), reprimida (DR) no *bulk* de acessos sensíveis. Para o componente PP2C, a *unitag* CTC_SD63056 se comportou de forma inversa (Tabela 7).

Tabela 5 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Citocinina, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Citocinina											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
CRE1	X	x	X	x	x	x	x	x	x	x	x
AHP	CA159114	CTC_SD264868	CATGTTTCGCTGTGTTCCCGCAATCGT	2,49	UR	183,19	73,59	1,45	UR	200,48	137,84
		CTC_SD264869	CATGTTTCGCTGTGTTCTGCAATCGT	6,36	UR	6,36	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD264928	CATGTTTCGCTTTGTTCCCGCAATCGT	#	#	#	#	2,34	UR	2,34	1,00
		CTC_SD45454	CATGATAAGTATATCTTTGAAGGTGT	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
B-ARR	CA149447	CTC_SD96004	CATGCCTTGAATCGCAAATGATGTTG	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CA090780	CTC_SD49218	CATGATCAAGGCGGAGAAGGATGATC	-1,54	n.s.	5,17	7,97	1,53	n.s.	15,42	10,11
A-ARR	CA154673	CTC_SD50355	CATGATCCATCCACCCCTGCGCCCG	1,41	n.s.	1,99	1,41	-1,14	n.s.	1,40	1,60
		CTC_SD129872	CATGGACGCCCTTGTGTTGTTAGGA	1,12	n.s.	19,47	17,34	-4,88	DR	6,54	31,93
	CA110996	CTC_SD129932	CATGGACGCCCTTGTGTTGTTAGGA	1,99	n.s.	1,99	1,00	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD161835	CATGGGCGCCCTTGTGTTGTTAGGA	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD77156	CATGCAGTCCAGAGGCGAGGCAAGCA	1,27	n.s.	1,19	0,94	-1,07	n.s.	0,93	1,00
	DN193250	CTC_SD43267	CATGAGTGTGCGCCACGTACGCTTGC	1,19	n.s.	1,19	1,00	#	#	#	#
	CA285156	CTC_SD66728	CATGCAAAAAAGTAAAGAACCCTGTC	-1,26	n.s.	16,69	21,09	3,07	UR	19,63	6,39

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negativo do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

Tabela 6 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Giberelina, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Giberelina											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
DELLA	CA090901	CTC_SD150565	CATGGCGCAGCCTCCCCGGGCGCCGG	-2,660943155	DR	1,00	2,66	#	#	#	#
GID2	CA226480	CTC_SD51570	CATGATCGGCTAATGTGTAAAGTTTC	1,192153721	n.s.	1,19	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD24403	CATGACATATATGTGATGTGCCAAGA	-2,277636423	DR	4,21	9,58	1,07	n.s.	7,55	7,03
		CTC_SD24421	CATGACATATCTGTGATGTGCCAAGA	-1,258227	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD28764	CATGACGTATATGTGATGTGCCAAGA	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
TF	CA072933	CTC_SD36234	CATGAGCAGGAAAACGCCGTCCCCTG	1,271781841	n.s.	1,19	0,94	1,87	n.s.	1,87	1,00
		CTC_SD67828	CATGCAAATGCCAAATGCAAAGCGGC	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negatido do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

Tabela 7 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por ácido Abscísico, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Ácido Abscísico											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
PYR/PYL	CA103150	CTC_SD132025	CATGGAGACGGACTACGTGCGGCGGT	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD132573	CATGGAGATCTATCCTTTTTCTCCA	-1,25	n.s.	26,62	33,28	-2,88	DR	15,89	45,77
		CTC_SD128681	CATGGACATCTATCCTTTTTCTCCA	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
	CF571884	CTC_SD132589	CATGGAGATCTCTCCTTTTTCTCCA	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD132596	CATGGAGATCTGTCCTTTTTCTCCA	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD137270	CATGGATATCTATCCTTTTTCTCCA	-1,41	n.s.	1,00	1,41	#	#	#	#
		CTC_SD202615	CATGTAGATCTATCCTTTTTCTCCA	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CA151002	CTC_SD122705	CATGGAAAATGAGTTTGGAGGAAGT	1,97	UR	31,39	15,94	-1,70	DR	21,03	35,66
		CTC_SD122727	CATGGAAAATGGGTTTGGAGGAAGT	2,19	UR	34,97	15,94	-1,42	n.s.	13,08	18,63
		CTC_SD263896	CATGTTCCGATCATTGCATTCTTAG	-1,26	n.s.	0,79	1,00	-1,07	n.s.	0,93	1,00
PP2C	CA272368	CTC_SD131708	CATGGAGAAGAGCTACTCGAGGATGG	-1,18	n.s.	0,79	0,94	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	BQ534396	CTC_SD136634	CATGGATAATTCCAGTCCCAGAGGTA	-1,18	n.s.	0,79	0,94	#	#	#	#
	BQ532692	CTC_SD63056	CATGATTGCTTTCTTTAGCCCTTTC	1,13	n.s.	102,53	90,46	1,35	UR	102,34	75,57
		CTC_SD119071	CATGCTTGCTTTCTTTAGCCCTTTC	-2,34	DR	1,00	2,34	#	#	#	#

Ácido Abscísico											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
SnRK2	CA174990	CTC_SD134033	CATGGAGGACCTAGACTCAGATGCCG	-1,98	DR	8,74	17,34	-1,02	n.s.	8,88	9,05
		CTC_SD134034	CATGGAGGACCTAGCCTCAGATGCCG	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD134487	CATGGAGGCCCTAGACTCAGATGCCG	-1,87	DR	1,00	1,87	#	#	#	#
	CA250797	CTC_SD3128	CATGAAACTTATATGCCGAAATCTAC	2,54	UR	10,73	4,22	2,63	n.s.	4,21	1,60
		CTC_SD3133	CATGAAACTTATATGCTGAAATCTAC	-1,32	n.s.	20,27	26,72	-2,19	DR	17,29	37,79
	CA091132	CTC_SD243896	CATGTGGAGTTACTCTGTATGTGATG	1,59	n.s.	1,59	1,00	-1,07	n.s.	0,93	1,00
	BQ533476	CTC_SD67977	CATGCAAATTTGTCACCGGGACTTGA	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CA147205	CTC_SD115325	CATGCTGTAAATGCGCGCCTGTAAC	1,17	n.s.	11,52	9,84	5,56	UR	17,76	3,19
	CA069381	CTC_SD213370	CATGTATGTTTGTGTTATTCTCAT	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
ABF	CA237816	CTC_SD115713	CATGCTGTTGTTGCGGCAATCTTGCT	-2,16	n.s.	2,38	5,16	-1,42	n.s.	3,74	5,32
		CTC_SD257350	CATGTTAATAGTAGTAGCAAGCCGTC	-1,41	n.s.	1,00	1,41	-1,14	n.s.	0,93	1,06
	CF577297	CTC_SD134603	CATGGAGGCGGAGTGGAGAAAGTGGT	#	#	#	#	-3,19	DR	1,00	3,19
	CA230985	CTC_SD49159	CATGATCAAGAACC GCGAGTCCGCGG	1,59	n.s.	1,59	1,00	-1,07	n.s.	0,93	1,00
	CA235595	CTC_SD49158	CATGATCAAGAACAGGGAGTCGGCCG	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negatido do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

5.2.5 Etileno

Na via de transdução de sinal do fitormônio etileno, foi possível mapear *unitags* em quatro dos sete componentes previstos em sorgo (57 % da via). Para os componentes mapeados foram observadas *unitags* de expressão não diferencial após aplicação do estresse (n.s.). Os componentes para os quais não foram detectadas *unitags* foram CTR1, EIN2 e ERF 1/2 (Tabela 8).

5.2.6 Brassinoesteroides

Para a via de transdução de sinal por brassinoesteroides, somente três dos sete componentes previstos em sorgo (43 % da via) puderam ser mapeados (exceção para BRI1, BKI1, BZR1/2 e TCH4). Para os componentes mapeados, *unitags* de expressão diferencial somente foram observados para o componente BSK (*unitag* CTC_SD5807, reprimida e expressa pelo *bulk* de acessos tolerantes; Tabela 9), e para o componente BIN2 (*unitag* CTC_SD57752, observada induzida pelo *bulk* de acessos sensíveis após aplicação do estresse; Tabela 9).

Tabela 8 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Etileno, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Etileno							
				Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
ETR		CTC_SD30307	CATGACTGACAATGAATACGACCCCG	-1,61	n.s.	4,37	7,03	1,56	n.s.	7,48	4,79
	CA264722	CTC_SD29143	CATGACTAACAATGAATACGACCCCG	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD30310	CATGACTGACAGTGAATACGACCCCG	-1,18	n.s.	1,59	1,87	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	CA089819	CTC_SD67244	CATGCAAATATTCTGAACATCTCTG	1,59	n.s.	1,59	1,00	#	#	#	#
	CA287079	CTC_SD74395	CATGCAGACGATTGATGGATTCTGAAG	-2,95	n.s.	0,79	2,34	-1,60	n.s.	1,00	1,60
CTR1	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MPK6	CA082922	CTC_SD9045	CATGAACTACCTCTCTTACAGACAAC	-1,26	n.s.	0,79	1,00	-1,42	n.s.	1,87	2,66
EIN2	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x
EIN3	BQ535140	CTC_SD106227	CATGCTATTGACATCGTCGAAGACTC	-1,26	n.s.	0,79	1,00	1,40	n.s.	1,40	1,00
EBF1/2	CA134593	CTC_SD178606	CATGGTGGGTCTCCTGTTTGTCTTAG	1,19	n.s.	1,19	1,00	-1,07	n.s.	0,93	1,00
ERF1/2	X	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negativo do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

Tabela 9 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por Brassinoesteroide, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Brassinoesteroide											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
BRI1	X	x		x	x	x	x	x	x	x	x
BSK	CA098432	CTC_SD171857	CATGGTCAACAGCATTCTATCTTCAG	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD5807	CATGAAATTCTAGAAAAGACGGGCTA	-1,87	DR	1,00	1,87	#	#	#	#
BKI1	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
BIN2	CA092667	CTC_SD272903	CATGTTGGTCCAGTAGTTAAGGGTAA	1,07	n.s.	24,64	22,97	-1,21	n.s.	30,38	36,72
		CTC_SD272906	CATGTTGGTCCAGTTGTTAAGGGTAA	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD272912	CATGTTGGTCCCGTAGTTAAGGGTAA	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD57751	CATGATGTAAATGATCATCACCCAAA	1,07	n.s.	1,00	0,94	-1,71	n.s.	0,93	1,60
		CTC_SD57752	CATGATGTAAATGATCATCACCCAAC	1,28	n.s.	31,79	24,84	1,61	UR	35,05	21,82
		CTC_SD57755	CATGATGTAAATGCTCATCACCCAAC	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
BZR1/2	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TCH4	X	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
CYCD3	CA103401	CTC_SD38440	CATGAGCTTCCTCGCCTGCGATGTCG	-1,05	n.s.	3,58	3,75	-1,30	n.s.	3,27	4,26

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial p < 0,05, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse; SDTC (controle negatido do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

5.2.7 Ácido Jasmônico

Em relação à via pertinente ao ácido jasmônico, três dos quatro componentes previstos em sorgo foram mapeados (75 % da via). Para os componentes mapeados (Tabela 10), foram observadas *unitags* induzidas, reprimidas e n.s. Em relação a uma possível expressão diferencial pelos bulks de acessos contrastantes, o componente JAZ apresentou *unitag* reprimida pelo *bulk* de acessos tolerantes após aplicação do estresse, enquanto que o *bulk* de acessos sensíveis apresentou *unitag* induzida (Tabela 10).

5.2.8 Ácido Salicílico

Por sua vez, na via referente ao ácido salicílico, todos os três componentes previstos em sorgo foram mapeados (100 % da via), e todos eles apresentaram *unitags* induzidas pelo *bulk* de acessos tolerantes após aplicação do estresse. Por sua vez, o *bulk* de acessos sensíveis somente apresentou uma *unitag* induzida, para um dos componentes (NPR1), em conjunto com duas outras *unitags* reprimidas (Tabela 11).

Tabela 10 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por ácido Jasmônico, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Ácido Jasmônico											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
JAR1	BQ534401	CTC_SD265760	CATGTTCTAGTGCTGCTGGTTGCTAG	2,54	UR	28,61	11,25	1,23	n.s.	13,08	10,64
		CTC_SD194920	CATGTAATTATCTTTTCACTGTTCC	1,20	n.s.	6,76	5,62	1,13	n.s.	4,21	3,73
		CTC_SD265761	CATGTTCTAGTGCTGCTTGTGCTAG	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD266697	CATGTTCTGGTGCTGCTGGTTGCTAG	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
COI1	CA218522	CTC_SD89217	CATGCCCAGGTTCTTGCGTACTGCTC	-1,87	DR	1,00	1,87	2,20	n.s.	2,34	1,06
	CA107151	CTC_SD111527	CATGCTGCAGGAGCTCAAGCTCGACA	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
JAZ	CA111140	CTC_SD131734	CATGGAGAAGCGCAAGGGCCGGGTCG	1,35	n.s.	23,45	17,34	9,44	UR	80,38	8,52
		CTC_SD122583	CATGGAAAAGCGCAAGGGCCGGGTCG	1,43	n.s.	8,74	6,09	#	#	#	#
		CTC_SD131737	CATGGAGAAGCGCAAGGTCCGGGTCG	-1,18	n.s.	0,79	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD132015	CATGGAGACGCGCAAGGGCCGGGTCG	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD150193	CATGGCGAGGAAGGCGTCGCTGCGGC	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD163289	CATGGGAAGCGCAAGGGCCGGGTCG	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
	DN192804	CTC_SD131733	CATGGAGAAGCGCAAGGGCAGGATCG	1,32	n.s.	5,56	4,22	1,90	n.s.	6,08	3,19
	CA090429	CTC_SD239239	CATGTGCCAAAGTGTCTGTTTTGGG	1,38	n.s.	5,17	3,75	2,34	UR	2,34	1,00
	BQ533779	CTC_SD135657	CATGGAGTCACCAGGGATGGAGGTGG	1,14	n.s.	18,68	16,40	2,54	UR	12,15	4,79
		CTC_SD135658	CATGGAGTCACCAGTGATGGAGGTGG	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD135694	CATGGAGTCCCCAGGGATGGAGGTGG	1,07	n.s.	1,00	0,94	1,40	n.s.	1,40	1,00
		CTC_SD135749	CATGGAGTCGCCAGGGATGGAGGTGG	-1,87	DR	1,00	1,87	#	#	#	#
MYC2	X	x	X	X	x	x	x	x	x	x	x

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negativo do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

Tabela 11 - ESTs de cana-de-açúcar mapeadas na via de transdução de sinal por ácido Salicílico, com respectivas unitags HT-SuperSAGE dos bulks de acessos de cana-de-açúcar sensíveis e tolerantes sob estresse de 24 horas de supressão de rega, suas modulações de expressão [FC (fold change)], regulações observadas (Reg), e quantitativo (tpm; tags por milhão) por biblioteca analisada (SD24T; SDTC; SD24S e SDSC).

Ácido Salicílico											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
NPR1	CA141021	CTC_SD111184	CATGCTGATTGTTAGCTTTGCAGCCA	1,13	n.s.	6,36	5,62	-3,80	DR	2,80	10,64
		CTC_SD111185	CATGCTGATTGTTAGCTTTGCAGCCG	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD111189	CATGCTGATTGTTTGCCTTGCAGCCA	1,13	n.s.	1,59	1,41	#	#	#	#
		CTC_SD190609	CATGTAACACTGCTTCAGTAGATAAA	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD190610	CATGTAACACTGCTTCAGTAGATAAT	1,41	n.s.	1,99	1,41	-1,14	n.s.	1,40	1,60
		CTC_SD190611	CATGTAACACTGTTTCAGTAGATAAT	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
	CA164927	CTC_SD171970	CATGGTCAATCTGTTGGCCATTTCTGA	3,58	UR	3,58	1,00	#	#	#	#
		CTC_SD106848	CATGCTCACTTGCTTGTTGACAGTAT	1,51	n.s.	6,36	4,22	2,05	n.s.	6,54	3,19
	CF570803	CTC_SD32076	CATGAGAAAAGAGTCAGAAGAATCCA	#	#	#	#	-2,66	DR	1,00	2,66
		CTC_SD12906	CATGAAGCTTCTCTACCTGGAAAACA	#	#	#	#	-1,07	n.s.	0,93	1,00
	CA066843	CTC_SD67687	CATGCAAATCAACATCTCCATTGTTT	1,70	n.s.	1,59	0,94	-1,07	n.s.	0,93	1,00
		CTC_SD67683	CATGCAAATCAACATATCCATTGTTT	1,07	n.s.	1,00	0,94	#	#	#	#
		CTC_SD67684	CATGCAAATCAACATCACCATTGTTT	-1,26	n.s.	0,79	1,00	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD67690	CATGCAAATCAACATCTTCATTGTTT	2,83	n.s.	3,97	1,41	-1,14	n.s.	1,40	1,60
	CA121739	CTC_SD266132	CATGTTCTCGGGCCTGTCTTCATCGT	1,49	n.s.	23,05	15,47	2,07	UR	27,57	13,30

Ácido Salicílico											
Via*	EST	Unitag	Composição de bases	Tolerante				Sensível			
				FC**	Reg	SD24T	SDTC	FC**	Reg	SD24S	SDSC
TGA	CA168959	CTC_SD215549	CATGTATTTGGGGTAGCTCTCCTCTG	4,13	UR	15,50	3,75	1,76	n.s.	4,67	2,66
PR-1	CA284756	CTC_SD82795	CATGCATGTATACCGTGGGTCTGAGG	4,37	UR	4,37	1,00	1,17	n.s.	1,87	1,60
		CTC_SD206797	CATGTATACCTTGGGTCTGAGGGAAT	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD209287	CATGTATCCCGTGGGTCTGAGGGAAT	1,99	n.s.	1,99	1,00	1,87	n.s.	1,87	1,00
		CTC_SD214148	CATGTATTCCGTGGGTCTGAGGGAAT	#	#	#	#	-1,06	n.s.	1,00	1,06
		CTC_SD82819	CATGCATGTATCCCGTGGGTCTGAGG	-1,26	n.s.	0,79	1,00	#	#	#	#
		CA281933 CTC_SD69679	CATGCAAGTATACCGGGTCGGACGG	4,77	UR	4,77	1,00	-1,90	n.s.	1,40	2,66

* Com base em componentes previstos para sorgo (base de dados KEGG Pathway); ** FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante ou sensível sob estresse em relação à biblioteca controle; UR (induzida), DR (reprimida) e n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse); SDTC (controle negativo do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

5.3 PROPOSIÇÃO DE *PRIMERS* PARA DESENVOLVIMENTO DE MARCADORES MOLECULARES FUNCIONAIS

As *unitags* consideradas contrastantes nas respostas dos *bulks* de acessos tolerantes e sensíveis, ou seja, induzidas (UR) no *bulk* de acessos tolerantes, após aplicação do estresse (SD24T x SDTC) e, ao mesmo tempo, reprimidas (DR) ou ao menos n.s. na resposta do *bulk* de acessos sensíveis (SD24S x SDSC), ou vice-versa (DR na resposta do *bulk* de acessos tolerantes e UR ou n.s. na resposta do *bulk* de acessos sensíveis), totalizaram 33, cujas ESTs (Tabela 12) estiveram disponíveis para desenho de *primers*, possibilitando a proposição de 20 pares de *primers* envolvidos com as diversas vias de transdução de sinal por fitormônios (Tabela 13).

Tabela 12 - Unitags HT-SuperSAGE ancoradas em ESTs anotadas para componentes das vias de transdução de sinal por fitormônios, e que apresentaram respostas distintas quanto a regulação (Reg) de expressão observada na resposta do *bulk* de quatro acessos tolerantes de cana-de-açúcar (contraste SD24T vs SDTC) e quatro sensíveis (SD24S vs SDSC) após aplicação do estresse de supressão de rega (após 24 h).

Unitag	Tolerante		Sensível		EST	Fitormônio***
	FC*	Reg**	FC*	Reg**		
CTC_SD119071	-2,34	DR	#	#	BQ532692	Ácido Abscísico
CTC_SD63056	-2,34	DR	1,35	UR	BQ532692	Ácido Abscísico
CTC_SD135749	-1,87	DR	#	#	BQ533779	Ácido Jasmônico
CTC_SD135657	1,14	n.s.	2,54	UR	BQ533779	Ácido Jasmônico
CTC_SD265760	2,54	UR	1,23	n.s.	BQ534401	Ácido Jasmônico
CTC_SD75431	1,19	n.s.	6,15	UR	BQ536843	Auxina
CTC_SD239239	1,38	n.s.	2,34	UR	CA090429	Ácido Jasmônico
CTC_SD150565	#	#	-2,66	DR	CA090901	Giberelina
CTC_SD57752	1,28	n.s.	1,61	UR	CA092667	Brassinosteróide
CTC_SD5807	-1,87	DR	#	#	CA098432	Brassinosteróide
CTC_SD86459	-1,41	n.s.	-2,13	DR	CA098951	Auxina
CTC_SD239194	1,81	UR	1,30	n.s.	CA098951	Auxina
CTC_SD80735	4,77	UR	-1,90	n.s.	CA099829	Auxina
CTC_SD129872	1,12	n.s.	-4,88	DR	CA110996	Citocinina
CTC_SD131734	1,35	n.s.	9,44	UR	CA111140	Ácido Jasmônico
CTC_SD266132	1,49	n.s.	2,07	UR	CA121739	Ácido Salicílico

Unitag	Tolerante		Sensível		EST	Fitormônio***
	FC*	Reg**	FC*	Reg**		
CTC_SD203387	1,77	UR	1,04	n.s.	CA130024	Auxina

CTC_SD111184	1,13	n.s.	-3,8	DR	CA141021	Ácido Salicílico
CTC_SD115325	1,17	n.s.	5,56	UR	CA147205	Ácido Abscísico
CTC_SD122705	1,97	UR	-1,7	DR	CA151002	Ácido Abscísico
CTC_SD122727	2,19	UR	-1,42	n.s.	CA151002	Ácido Abscísico
CTC_SD264869	6,36	UR	#	#	CA159114	Citocinina
CTC_SD264928	#	#	2,34	UR	CA159114	Citocinina
CTC_SD264868	2,49	UR	1,45	UR	CA159114	Citocinina
CTC_SD171970	3,58	UR	#	#	CA164927	Ácido Salicílico
CTC_SD215549	4,13	UR	1,76	n.s.	CA168959	Ácido Salicílico
CTC_SD134487	-1,87	DR	#	#	CA174990	Ácido Abscísico
CTC_SD134033	-1,98	DR	-1,02	n.s.	CA174990	Ácido Abscísico
CTC_SD89217	-1,87	DR	2,2	n.s.	CA218522	Ácido Jasmônico
CTC_SD24403	1,07	n.s.	-2,28	DR	CA226480	Giberelina
CTC_SD3133	-1,32	n.s.	-2,19	DR	CA250797	Ácido Abscísico
CTC_SD3128	2,54	UR	2,63	n.s.	CA250797	Ácido Abscísico
CTC_SD147145	-2,81	DR	-4,79	DR	CA268118	Auxina
CTC_SD128895	2,02	UR	1,54	UR	CA268118	Auxina
CTC_SD69679	4,77	UR	-1,9	n.s.	CA281933	Ácido Salicílico
CTC_SD51059	#	#	3,74	UR	CA282321	Auxina
CTC_SD51058	1,19	n.s.	4,67	UR	CA282321	Auxina
CTC_SD82795	4,37	UR	1,17	n.s.	CA284756	Ácido Salicílico
CTC_SD66728	-1,26	n.s.	3,07	UR	CA284756	Ácido Salicílico
CTC_SD32076	#	#	-2,66	DR	CF570803	Ácido Salicílico
CTC_SD132573	-1,25	n.s.	-2,88	DR	CF571884	Ácido Abscísico
CTC_SD115227	1,3	UR	1,1	n.s.	CF576007	Auxina
CTC_SD134603	#	#	-3,19	DR	CF577297	Ácido Abscísico

* FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante sob estresse, em relação à biblioteca controle; **Reg: regulação da *unitag* [UR (induzida); DR (reprimida); n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie); *** Fitormônio: via de transdução de sinal por fitormônio do KEGG *Pathway*; SD24T (biblioteca com *bulk* de quatro acessos tolerantes sob estresse; SDTC (controle negativo do *bulk* tolerante); SD24S (biblioteca com *bulk* de quatro acessos sensíveis sob estresse) e SDSC (controle negativo do *bulk* sensível); X: componente não observado; #: *unitag* não observada.

Tabela 13 - Pares de primers propostos para amplificação por RTq-PCR, com base em ESTs de cana-de-açúcar ancorando unitags HT-SuperSAGE induzidas (UR) ou reprimidas (DR), para componentes de via de transdução de sinal por fitormônio#, bem como regulações (Reg) e modulações da expressão gênica (FC) observadas na resposta tolerante (de *bulk* de quatro acessos de cana-de-açúcar) e na resposta sensível (de *bulk* de quatro acessos sensíveis), após aplicação do estresse de supressão de rega (após 24 h).

Unitag	Tolerante		Sensível		EST	Fitormônio***	Via analisada#	Amplicon##	TA (°C)###	Primer (L e R)*#
	FC*	Reg**	FC*	Reg**						
CTC_SD63056	-2,34	DR	1,35	UR	BQ532692	ABA	PP2C	140	61	TGCTCTGCTCCAAGAATCATC CAAGGAGGATTCCGACAAGG
CTC_SD134033	-1,98	DR	-1,02	ns	CA174990	ABA	SnRK2	143	61	GTAACCTGCAACGCAACAAAC TGGAGGACCTAGACTCAGATGC
CTC_SD3128	2,54	UR	2,63	ns	CA250797	ABA	SnRK2	150	60	CTCCGTTGAAACACGAACATAG TGTTTGTCTTCCGAGTAACAC
CTC_SD115325	1,17	ns	5,56	UR	CA147205	ABA	SnRK2	127	60	AATGACCAGTACGAGGAGGAAG AGGTGTCGTGTCAGATTTGGAG
CTC_SD134603	#	#	-3,19	DR	CF577297	ABA	ABF	105	61	CCGTGCTTTTTCTGTTTGAAG GACTCCCTGTTCTTGATCATCC
CTC_SD122705	1,97	UR	-1,70	DR	CA151002	ABA	PYR / PYL	148	59	TAGTGTGAGGGAGGTCAATGTC GGTGAGGATGGAGGAGTAGTTC
CTC_SD111184	1,13	ns	-3,80	DR	CA141021	Ácido Salicílico	NPR1	139	60	GAACAGACTGCACCTCAACAAC CACAAAAGATAAGGCAGCAGTG
CTC_SD171970	3,58	UR	#	#	CA164927	Ácido Salicílico	NPR1	142	60	ATGGAACCTCCTCTTCTTCTCC GAGAGCCCTATCCAAAACAGTG
CTC_SD69679	4,77	UR	-1,90	ns	CA281933	Ácido Salicílico	PR-1	137	61	ATGGAACCTCCTCTTCTTCTCC GAGAGCCCTATCCAAAACAGTG
CTC_SD82795	4,37	UR	1,17	ns	CA284756	Ácido Salicílico	PR-1	145	59	GTACTACGACCACGACACCAAC GTAGTTGCAGGTGATGAAGACG
CTC_SD89217	2,54	DR	1,23	ns	BQ534401	Ácido Jasmônico	COI1	145	60	CTCTGATGCAAGTGAGGATGTC CTCCTTGAAGGTTCCCTTTTTC

Unitag	Tolerante		Sensível		EST	Fitormônio***	Via analisada [#]	Amplicon ^{##}	TA (°C) ^{###}	Primer (L e R) ^{*#}
FC*	Reg**	FC*	Reg**							
CTC_SD131734	1,35	ns	9,44	UR	CA111140	Ácido Jasmônico	JAZ	124	61	AGTTCATGGAGAAGCGCAAG TATCAGAGCGTGAGAGCGAGAT
CTC_SD239239	1,38	ns	2,34	UR	CA090429	Ácido Jasmônico	JAZ	127	59	CAGAAGAGTGCGGCAGATATAC TCACAGGTGTAGCATCTGAAGG
CTC_SD135657	1,14	ns	2,54	UR	BQ533779	Ácido Jasmônico	JAZ	92	61	TTGCTGACGCTAGCTCAATATG GTCACGACGTTTCTCAAGGAAG
CTC_SD150565	-2,66	DR	#	#	CA090901	Giberelina	DELLA	113	60	AGAGTACGGGCTACCGTAGTTG GGGATGAGAGATGGACACTTTG
CTC_SD80735	4,77	UR	-1,90	Ns	CA099829	Auxina	AUX	163	59	CCATGTTCTGTATCCTCCAACAG CCTGTGGCTTCAGATCTCTTC
CTC_SD32076	#	#	-1,79	DR	CF570803	Ácido salicílico	TGA	131	60	AGAGGGAGATGATGCGAAATC CCCTATATCAAGGCATGGTGTC
CTC_SD215549	2,98	UR	1,65	Ns	CA121739	Ácido salicílico	TGA	149	59	ACCTCCCTCAGTTTACCACAAG TGAGGCTTCTCTACCTGGAAAC
CTC_SD115325	1,17	ns	5,56	UR	CA147205	ABA	PP2C	127	60	AATGACCAGTACGAGGAGGAAG AGGTGTCGTGTCAGATTTGGAG
CTC_SD51059	#	#	3,74	UR	CA282321	Auxina	SAUR	117	60	TGAGTTTCGGGTACAAACAGGAG ATCAGTCATCAGTTCCGAGAGC

*FC: razão entre as frequências de uma *unitag* presente na biblioteca do *bulk* tolerante sob estresse em relação à biblioteca controle; **Reg: regulação das unitags [UR (induzida); DR (reprimida); n.s. (não significativa ao nível de $p < 0,05$, teste Audic-Claverie)]; *** Fitormônio: via de transdução de sinal por fitormônio do KEGG *Pathway*; [#]Via analisada: componente de uma das vias de transdução de sinal; ^{##}Amplicon (pb): tamanho do fragmento de DNA a ser amplificado; ^{###} TA: temperatura de anelamento do primer (°C); ^{*#} Primer L: *primer Left*, *primer R*: *primer Right*.

Na triagem inicial, a partir de PCR convencional visando amplificar cDNAs com os 20 *primers* propostos, 18 deles amplificaram bandas em gel de agarose (exceção para os alvos AUX / IAA e SnRK2b), sendo aqueles que amplificaram, testados quanto à eficiência em reações de RT-qPCR. Os resultados dos testes de eficiência dos *primers* propostos em reações de RT-qPCR podem ser verificados na Tabela 14, bem como o ciclo inicial de detecção de amplificação, para os alvos e para os dois genes de referência.

Tabela 14 - Teste de eficiência dos primers propostos para componentes das vias de transdução de sinais por fitormônios, visando amplificar amostras a partir de raízes de cana-de-açúcar, em reações de RT-qPCR.

Gene	EST	Eficiência do primer (%)	Ct da diluição 1/10*
Genes de referência			
GAPDH	SoGI_TC531505	> 90	22
α -Tubulina	SoGI_TC446900	> 90	25
Componente alvo			
ABF	CF577297	101,51	24
AUX / IAA	CA099829	n.a.	n.d.
COI1	BQ534401	94,59	22
DELLA	CA090901	101,48	23,6
JAZa	BQ533779	n.e.	-
JAZb	CA090429	n.e.	-
JAZc	CA111140	93,73	21,8
NPR1a	CA141021	n.e.	-
NPR1b	CA164927	92,59	24,64
NPR1c	CA141021	n.e.	-
PP2Ca	BQ532692	90	24
PP2Cb	CA147205	n.e.	-
SAURa	CA282321	n.e.	-
PR1	CA284756	95,88	22,4
PYR / PYL	CA151002	108,24	23,7
SAURb	CA098951	n.e.	-
SnRK2a	CA174990	91,35	22,55
SnRK2b	CA147205	n.a.	n.d.

* Ciclo limiar, primeira detecção significativa da amplificação na diluição 1/10 do concentrado; n.d. (não determinado); n.e.(não eficiente); n.a. (não amplificou)

A quantificação relativa, feita para nove *primers* funcionais (eficiências entre 90 e 110 %) específicos para componentes das vias de transdução de sinais por fitormônios (SnRK2, NPR1, PP2C, ABF, DELLA, COI1, JAZ, PR1 e

PYR/PYL), 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 sob estresse (SD24S) e respectivo controle negativo (SDSC), mostrou para os alvos selecionados não haver diferenças significativas nos níveis de transcrição.

5.4 RESULTADOS DA VALIDAÇÃO POR RT-QPCR

Os dados *in silico* de algumas das *unitags* diferencialmente expressas [induzida (UR) ou reprimida (DR), em testes Audic-Claverie ($p < 0,05$)], para os alvos selecionados com *primers* eficientes (ABF, DELLA, COI1, NPR1, PR1, PYR/PYL, PP2C, SnRK2 e JAZ) tiveram suas respectivas quantificações relativas por RT-qPCR estimadas, a partir dos normalizadores α -Tubulina e GAPDH, e cDNAs individuais dos acessos sensíveis (Tabela 15) e tolerantes (Tabela 16) .

Tabela 15 - Dados da quantificação relativa por RT-qPCR para os acessos sensíveis em nove alvos selecionados.

	Sensível																	
	ABF		DELLA		COI1		NPR1		PR1		PYR/PYL		PP2C		SnRK2		JAZ	
	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.
CTC 9	0,79	n.s.	1,147	n.s.	1,807	UR	1,532	UR	0,471	DR	1,696	n.s.	1,245	n.s.	0,757	n.s.	3,473	UR
CTC 13	0,91	n.s.	0,802	n.s.	1,531	n.s.	1,192	n.s.	0,617	DR	1,507	n.s.	1,229	n.s.	1,218	n.s.	1,964	UR
SP90-1638	1,29	n.s.	0,782	n.s.	1,543	n.s.	0,966	n.s.	0,735	n.s.	1,243	n.s.	1,044	n.s.	1,142	n.s.	1,165	n.s.
SP90-3414	0,365	DR	1,232	n.s.	0,377	DR	1,143	n.s.	0,763	n.s.	0,877	n.s.	0,816	n.s.	0,877	n.s.	0,961	n.s.

Exp: valor da quantificação relativa por RT-qPCR; Reg: regulação da unitag [UR (induzida); DR (reprimida); n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie)]

Tabela 16 - Dados da quantificação relativa por RT-qPCR para os acessos tolerantes em nove alvos selecionados.

	Tolerante																	
	ABF		DELLA		COI1		NPR1		PR1		PYR/PYL		PP2C		SnRK2		JAZ	
	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.	Exp.	Reg.
CTC6	1,245	n.s.	1,093	n.s.	0,763	n.s.	0,734	n.s.	0,322	DR	0,549	n.s.	1,06	n.s.	0,645	n.s.	1,152	n.s.
CTC15	0,656	n.s.	1,027	n.s.	0,553	n.s.	1,193	n.s.	0,888	n.s.	0,389	DR	0,349	DR	1,982	UR	2,694	UR
SP83-2847	0,474	n.s.	0,611	DR	0,452	DR	0,59	n.s.	0,4	DR	0,491	n.s.	0,94	n.s.	1,007	n.s.	1,266	n.s.
SP83-5073	0,978	n.s.	1,292	n.s.	1,519	n.s.	1,831	n.s.	1,896	UR	2,154	UR	1,15	n.s.	1,057	n.s.	0,701	n.s.

Exp: valor da quantificação relativa por RT-qPCR; Reg: regulação da unitag [UR (induzida); DR (reprimida); n.s. (expressão não diferencial $p < 0,05$, teste Audic-Claverie)]

6 DISCUSSÃO

6.1 ANÁLISES *IN SILICO* DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO POR FITORMÔNIOS

As análises *in silico* permitiram detalhar o comportamento transcricional em algumas das vias de transdução de sinais por fitormônios.

6.1.1 Via de transdução do sinal por Auxina

Auxina (IAA) é uma classe de fitormônios que está envolvida com o crescimento das plantas frente a uma gama de estresses, incluindo a seca (Han et al., 2009; Jain e Khurana, 2009). Entretanto, há pouca informação ainda quanto aos efeitos do estresse de déficit hídrico sobre a sua biossíntese e os seus níveis na planta estressada. Existe uma alteração no nível endógeno de IAA quando o vegetal está exposto ao estresse de déficit hídrico, entretanto, se a auxina aumenta ou diminui em condições de estresse permanece controverso. Kazan e Manners (2009) sugeriram uma potencial ligação entre a resposta de IAA e estresses bióticos e abióticos, especialmente considerando *crosstalks* de IAA e outros fitormônios, como o ácido salicílico e ABA.

Na via de transdução do sinal do IAA, AUX1 é um transportador de IAA, bombeando-o para dentro da célula, já a proteína TIR1 controla respostas transcricionais a IAA (Chapman e Estelle, 2009). No presente estudo, *unitags* foram observadas para o transportador de auxina AUX1 com expressão n.s. pelo *bulk* de acessos tolerantes após a aplicação do estresse, e com *unitag* induzida (FC de 6,15) pelo *bulk* de acessos sensíveis (tabela 4).

Sob baixas concentrações de IAA, AUX / IAA (genes responsivos a IAA) reprimem a atividade do fator de resposta a IAA (ARF) (Chapman e Estelle, 2009). Quando ocorre um aumento no nível de IAA, a proteína F-box TIR1 e AUX / IAA, se unem para formar um co-receptor de IAA e ligam-se diretamente a IAA (Dharmasiri et al., 2005; Kepinski e Leyser, 2005). A proteína F-box TIR1 participa de um complexo de ubiquitina ligase (SCF^{TIR1}), fazendo com que o repressor de AUX / IAA marque-a para ser degradada pelo protoassoma 26S. Esta degradação acarreta na não repressão de ARF, permitindo a transcrição de genes responsivos a IAA (GH3 e SAUR), culminando na resposta do fitormônio, como

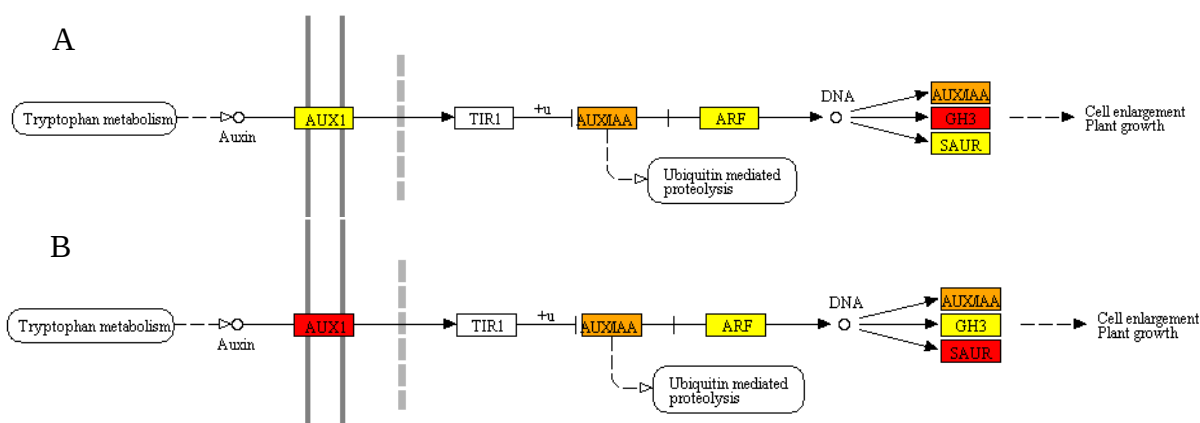
por exemplo, alongamento celular. Para ESTs das famílias AUX / IAA, uma mesma *unitag* foi induzida pelos dois *bulks* (tolerante e sensível) e outra *unitag* foi reprimida, também pelos dois *bulks*, definindo o destaque em laranja na Figura 4. Mas o *bulk* tolerante teve outras três *unitags* induzidas (FC de até 4,77), enquanto que o *bulk* sensível teve outra *unitag* reprimida (FC de -4,79), o que poderia diferenciar os *bulks*.

Para o fator de transcrição ARF todas as *unitags* relacionadas foram de expressão n.s., enquanto que *unitags* relacionadas com TIR1 não foram detectadas (Figura 3). Por sua vez, o *bulk* tolerante apresentou, após o estímulo, *unitag* induzida para GH3 (FC de 1,77) e n.s. para SAUR; enquanto que o *bulk* sensível apresentou *unitags* n.s. para GH3 e duas induzidas (FC de até 4,67) para SAUR (tabela 4). Logo, percebe-se nos dois *bulks* tendência de indução como resultado de transcrição de genes responsivos a IAA, em resposta ao estresse aplicado. IAA seria o principal fitormônio envolvido no começo do crescimento das raízes adventícias e laterais, sob estresse hídrico (De Smet *et al.*, 2006). Esta poderia ser uma das estratégias dos acessos pesquisados em resposta ao estímulo.

Em plantas transgênicas (com maior nível endógeno de IAA) e selvagens de *Arabidopsis thaliana* submetidas a estresse de supressão de rega por 21 dias, quando tratadas com 1 μ M de IAA diariamente por sete dias antes do tratamento hídrico, apresentaram maior taxa de crescimento (20 – 30 %), menor perda de eletrólitos (20 – 30 %) e baixa taxa de perda de água nas folhas, quando comparada com as plantas sem tratamento (Shi *et al.*, 2014). Já a planta mutante com deficiência para três enzimas chave na biossíntese de IAA (YUCCA1, YUCCA2 e YUCCA6) apresentou, após o mesmo tratamento, uma diminuição de 20 % na taxa de crescimento, aumento de 30 % na perda de eletrólitos e maior taxa de perda de água nas folhas. Por outro lado, alguns estudos relataram que o aumento no nível de IAA está correlacionado com o crescimento reduzido da planta (Ribaut e Pilet, 1994), ao passo que pesquisas em fisiologia mostraram que estresses osmóticos provocam uma grande redução do IAA em folhas de arroz, tomate (Nilsen e Orcutt, 1996) e em raízes de trigo (Shakirova *et al.*, 2003). Além disso, vários miRNAs associados com a sinalização de IAA são regulados

positivamente por seca ou estresse osmótico e desempenham papel importante no crescimento da raiz (Liu et al., 2008). De qualquer forma, estes fatos indicam que auxina pode desempenhar um papel importante na resposta a estresses abióticos, e que o controle da homeostase da auxina nas plantas necessita de maiores entendimentos, para que forneça novas abordagens sobre os mecanismos moleculares de adaptação da planta ao estresse.

Figura 3- Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Auxina, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) bulk de quatro acessos tolerantes e (B) bulk de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada.



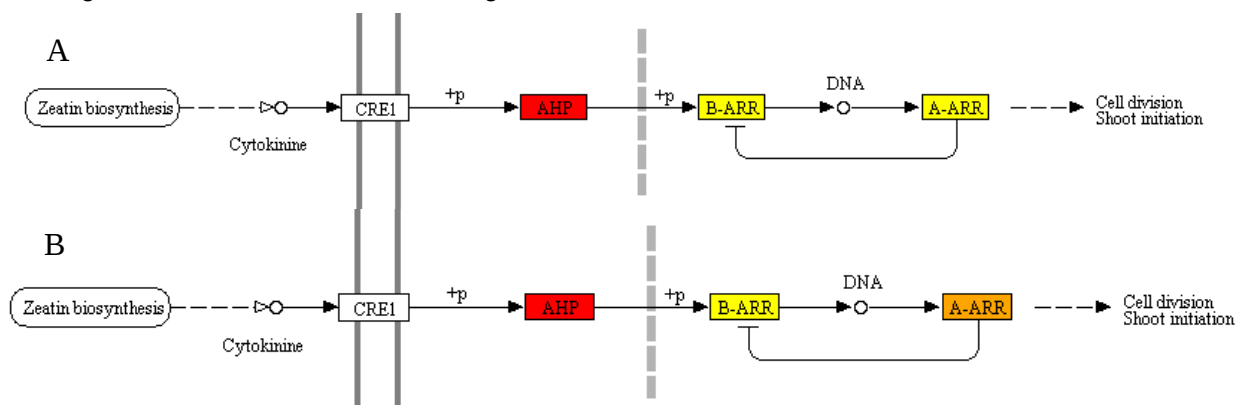
6.1.2 Via de transdução do sinal por Citocinina

A via de transdução de sinal por citocinina (CKs) é mediada pela fosforilação de diversas etapas (Argueso et al., 2009). A ligação específica de CKs aos seus receptores (CRE1, AHK) acarreta na sua autofosforilação e liberação do grupo fosfato, fazendo com que os componentes da cascata de sinalização (HPTs; histidina fosfotransferases), transfira, do citoplasma para o núcleo, o grupo fosfato (West, 2001), que posteriormente, é transferido para fatores de transcrição B-AAR. Estes, por sua vez, ativam a transcrição do A-ARR e de genes responsivos aos CKs (Sakai et al., 2000), acarretando na ação do fitormônio na divisão celular e abertura dos estômatos, por exemplo (Iqbal et al., 2006; Gupta e Rashotte, 2012). De acordo com os dados *in silico*, não foi possível identificar *unitag* HT-SuperSAGE para EST correspondente ao receptor CRE1. A

partir de AHP, a via se comportou de maneira semelhante nos dois *bulks* (tolerante e sensível), com exceção para o fator de transcrição A-ARR, de expressão n.s. pelo *bulk* tolerante e de expressão tanto induzida quanto reprimida pelo *bulk* sensível (Figura 4).

Segundo Hadiarto e Tran (2011), durante o crescimento e desenvolvimento das plantas, citocininas são reguladores mestres, sendo considerados como controladores da tolerância das plantas a estresses osmóticos (Fahad et al.

Figura 4 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Citocinina, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada.



2014).

6.1.3 Via de transdução do sinal por Giberilinas

Segundo Bewley (1997), giberilina (GA) é um ativador enzimático endógeno, portanto, promotor da germinação, aumentando a porcentagem e a velocidade de germinação. GA atuam na expressão gênica, ativação e síntese de várias enzimas, dentre elas, enzimas que hidrolisam e mobilizam reservas dos tecidos. Análises genéticas em *Arabidopsis* e arroz foram fundamentais para identificar os principais componentes da via de transdução de sinais por este fitormônio. Os componentes que embasam a via são: receptor GID1 (Ueguchi-Tanaka et al., 2005), reguladores da transcrição de proteínas DELLA (Peng et al., 1997), proteínas F-box GID2 (McGinnis et al., 2003) e fator de transcrição (TF). O fitormônio GA se liga ao receptor GID1 permitindo, assim, sua interação com

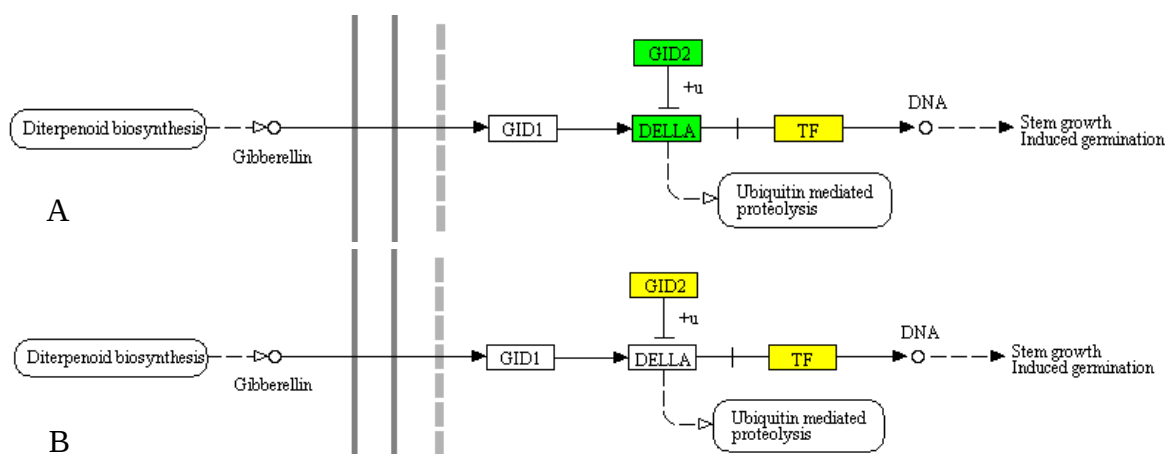
proteínas DELLAs. Esta ligação promove a interação de DELLA com GID2 fazendo com que essas proteínas sejam degradadas por proteólise mediada pelo complexo 26S da ubiquitina. Uma vez que proteínas DELLAs são reguladores negativos da via, a sua degradação faz com que fatores de transcrição (TF) sejam ativados promovendo, por exemplo, a indução da germinação (Daviere e Achard, 2013) e a expansão foliar (Khan et al., 2007).

Os dados HT-SuperSAGE não possibilitaram mapear todos os componentes da via de transdução por GA. Assim, componentes como o receptor GID1 não puderam ser mapeadas com as *unitags* disponíveis (Tabela 6). Também *unitag* para a proteína DELLA não foi observada a partir do *bulk* sensível, mas foi observada uma *unitag* reprimida a partir do *bulk* tolerante (FC de -2,66). A proteína DELLA é um regulador negativo da via, o que poderia explicar a *unitag* reprimida, pelo *bulk* tolerante. GID2 também poderia estar sendo degradada ao interagir com DELLA, sendo consistente com o achado de *unitag* reprimida (FC de -2,28) observada também para GID2, a partir do *bulk* tolerante. Os demais componentes não apresentaram expressões diferenciais significativas (Figura 5).

Em relação a proteína DELLA, a validação por RT-qPCR da *unitag* SD150565 com anotação de DELLA *protein*, confirmou a repressão observada no *bulk* de acessos tolerantes (FC -2,66), foi verificado valor de repressão de 0,61 no acesso SP83-2847 do *bulk* de acessos tolerantes, enquanto nos demais acessos sua expressão não teve diferença significativa (Figura 11 e 12). As proteínas DELLAs são degradadas com a formação de GA, semelhantes as proteínas JAZs na formação de JA (Chenng et al., 2009 e 2011). Segundo Kazan e Manners (2013) na presença de GA, o crescimento da planta ocorre devido a degradação das proteínas DELLAs mediada por GA. A ligação do fitormônio ao seu receptor GID1 promove a interação GID1-DELLA, que por sua vez estimula a interação entre DELLAs e o complexo específico E3 ubiquitina ligase SCFSLY1 / GID2, conduzindo à subsequente degradação de DELLAs pelo proteassoma 26S (Willige et al., 2007). Conforme visto acima, DELLA estaria sendo reprimida em um dos acessos tolerantes, tal fato indica que GA pode estar com seu nível mais elevado nos acessos tolerantes sob estresse de seca

Hou et al. (2010) observou que em baixos níveis de GA, DELLAs interagem com JAZ competindo pela ligação no fator de transcrição MYC2, ao passo que, quando o nível de GA atinge um limiar crítico, as proteínas DELLAs são ubiquitinadas fazendo com que JAZ não seja reprimido pelas mesmas, tornando-o disponível para interagir com MYC2. As proteínas DELLAs interagem e reprimem JAZs liberando MYC2, este por sua vez regula positivamente a inibição do crescimento da raiz mediada por JA (Wild et al., 2012). Yang et al. (2011) sugerem que esse equilíbrio entre a sinalização de GA e JA permite que a planta priorize o crescimento ou a defesa contra patógenos.

Figura 5 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Giberelina, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em verde – de expressão reprimida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag*



6.1.4 Via de transdução do sinal por Ácido Abscísico

Em relação ao fitormônio Ácido Abscísico (ABA), um regulador de crescimento que está envolvido na regulação da fase final do desenvolvimento da planta (Gepstein et al., 1980), sabe-se que a sua função pode ser aumentada quando a planta está sob estresse, estimulando o fechamento dos estômatos e mudanças na expressão gênica, aumentando a capacidade da planta para lidar com situações de estresse (Kim et al., 2010; Savchenko et al., 2014). Na fase inicial, quando a planta está sob estresses abióticos como, por exemplo, seca ou

salinidade, os estômatos se fecham em resposta ao déficit hídrico (Schwab et al., 1989).

Na via de transdução de sinal por ABA, as fosfatases e quinases presentes promovem um efeito regulatório oposto. De acordo com análise *in silico* (tabela 7), o *bulk* tolerante apresentou duas *unitags* induzidas para a família PYR / PYL do receptor ABA (FC de 1,97 e 2,19), sendo que uma delas foi reprimida pelo *bulk* sensível (FC de -1,70), que também apresentou outra igualmente reprimida (FC de -2,88) (Figura 6). No *bulk* com acessos tolerantes, a quantificação relativa por RT-qPCR para este alvo mostrou indução de 2,15 para o acesso SP83-5073, repressão de 0,38 para o acesso CTC15 e expressão não significativa ($p < 0,05$) para os acessos CTC6 e SP83-2847. Por sua vez, sob a mesma condição nenhum dos acessos sensíveis mostrou diferença significativa em sua expressão (Figura 11 e 12).

Conforme Sheard e Zheng (2009), a etapa crucial da via de transdução de sinal por ABA é a percepção do fitormônio pelas proteínas receptoras PYR / PYL, e a subsequente inibição da fosfatase PP2C pela ligação de ABA ao seu receptor. De acordo com Hauser et al (2011) na presença de ABA, o receptor PYR / PYL liga e inativa a PP2C, permitindo o acúmulo de SnRK2 fosforilada e a subsequente ativação por fosforilação dos fatores de transcrição ABFs. Desta forma, a presença de receptores PYR / PYL explicaria a tolerância da planta ao estresse, uma vez que na presença de ABA, o nível de PYR / PYL aumenta, fazendo com que se liguem ao fitormônio, interagindo com PP2C (Park et al., 2009). Em um estudo realizado em *Arabidopsis* por Nishimura et al. (2009) foi observado que a família de proteínas PYR / PYL interagem com a família de proteínas fosfatases 2C, sendo a proteína ABI1 a mais significativa desta família. Esta interação era significativamente melhorada após 5 minutos da adição de 1, 10, 20 e 50 μM de ABA. Ainda neste estudo, foi observado que o gene PYR / PYL é fundamental para o fechamento dos estômatos induzido por ABA.

Para a fosfatase 2C (PP2C) uma mesma *unitag* apresentou-se reprimida (FC de -2,34) pelo *bulk* tolerante, mas foi induzida pelo *bulk* sensível (FC de 1,35). Os dados de RT-qPCR para o gene PP2C (*protein phosphatase 2C*), ancorando a *unitag* CTC_SD63056, indicou que para o acesso tolerante CTC15 a expressão

do gene foi reprimida 0,34 vezes, ao passo que para os demais acessos tolerantes e sensíveis a expressão não teve diferença significativa (Figura 11 e 12). A repressão do gene é explicada pela ligação do ABA a família de proteínas PYR / PYL, inibindo assim PP2C, uma família de proteínas fosfatases que desempenham papéis críticos como reguladores negativos na transdução de sinal mediado por ABA (Nishimura et al., 2009).

Li et al. (2016) observaram que em cana-de-açúcar submetida ao estresse de seca por 3, 7 e 9 dias, considerada pelos autores, respectivamente, como estresse leve, moderado e severo, o nível de ABA endógeno nas plantas estressadas foi 20, 32 e 72 % maior quando comparado com os controles. Ainda no mesmo estudo, os autores validaram por RT-qPCR a expressão do gene PP2C, sendo este reprimido em um dos acessos estressados quando comparado com os controles. Este resultado mostra que a repressão de PP2C é importante para tolerância ao estresse, uma vez que o mesmo é um regulador negativo da via, e sua indução inativa a quinase SnKR2 impossibilitando a resposta do fitormônio (Park et al., 2009). O sequestro da fosfatase PP2C por ABA, permite a autoativação da proteína serina / treonina-quinase SnRK2, que posteriormente irá fosforilar o fator de transcrição ABF, facilitando a transcrição dos genes responsivos ao ABA e sua resposta fisiológica, como por exemplo, fechamento dos estômatos. Espera-se, desta forma, que tais genes possam estar atuando no controle do fechamento dos estômatos, garantindo uma menor troca de água com o meio ambiente (Wilkinson et al., 2002).

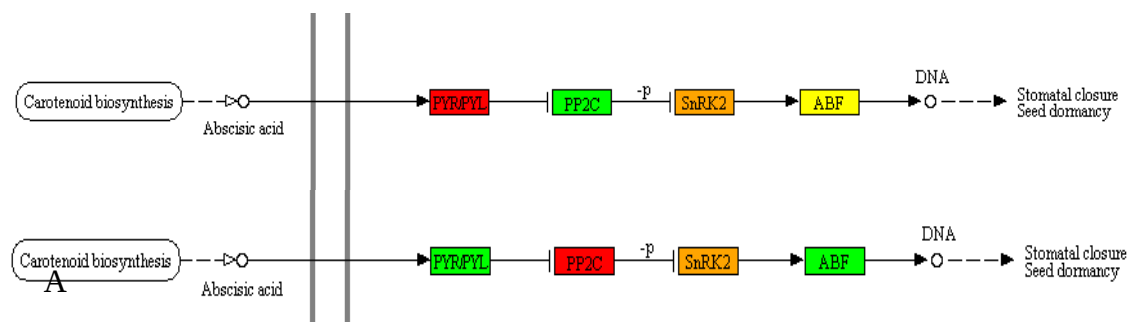
Para SnRK2 foram observadas *unitags* induzidas, bem como outras sendo reprimidas, pelos dois *bulks*. De acordo com os dados de RT-qPCR, a quinase SnRK2 (*serine / threonine-protein kinase SRK2*; *unitag* CTC_SD3128; 2,54 vezes induzida nos tolerantes e não significativa nos sensíveis) foi induzida 1,98 vezes no acesso CTC15 do *bulk* de acessos tolerantes. Nos demais acessos, de ambos *bulks*, tal gene mostrou ter expressão não significativa (Figura 11 e 12). Em um estudo realizado em cana-de-açúcar por Li et al. (2016) o gene SnRK2 foi potencialmente induzido quando a planta estava sob estresse hídrico por 3, 7 e 9 dias. Tal fato corrobora com o relatado por Cutler et al. (2010), onde foi observado que a quinase SnRK2 é um regulador positivo da via, sendo ativada na presença de ABA em plantas sob estresses abióticos, conferindo assim a tolerância ao

referido estresse. Além disso, a ativação das quinases acarreta no direcionamento de proteínas de membrana, canais iônicos e fatores de transcrição de genes responsivos ao ABA, assim como o ABF (Umezawa et al., 2010).

Em relação ao fator de ligação ABA responsivos (ABF), as *unitags* apresentaram expressão n.s. no *bulk* tolerante, e uma delas foi considerada reprimida pela resposta do *bulk* sensível. Na ausência de ABA, a fosfatase PP2C atua como um regulador constitutivo negativo da família de quinases SnRK2, desfosforilando-a. A *unitag* CTC_SD134603 anotada como *ABA responsive element binding factor* (ABF), teve sua regulação *in silico* reprimida -3,19 vezes no *bulk* com acessos sensíveis e não foi detectada nos tolerantes. A validação por RT-qPCR confirmou essa expressão, o fator de transcrição ABF teve expressão reprimida no acesso SP90-3414 do *bulk* com acessos sensíveis, enquanto nos demais acessos, de ambos *bulks*, sua expressão não foi significativa (Figura 11 e 12). ABFs ativam a transcrição de genes da via de sinalização do ABA pelo reconhecimento de elementos cis da família ABRE em seus promotores (Hossain et al., 2011), desta forma, a repressão de tal gene em acessos sensíveis, pode estar relacionada com a não transcrição de genes responsivos ao ABA (Sheard e Zheng, 2009).

Ensaio com *Arabidopsis* sob estresse de seca permitiram observar que 1.310 dos 1.969 transcritos, ou seja, 67 % dos genes regulados pela seca, foram significativamente regulados por ABA (Huang et al., 2008). As análises dos genes revelaram que a maioria é regulada (induzindo ou reprimindo) da mesma forma para seca e ABA. Após aplicação do estresse (supressão de rega por cinco dias), os autores observaram que a ação de ABA aumentou cerca de 400 ng / g de peso seco, quando comparado com a planta controle. A reirrigação reverteu o efeito da seca, recuperando o nível de expressão normal da maioria dos genes responsivos a seca em até 3 h, confirmando a influência do estresse no metabolismo de ABA.

Figura 6 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Ácido Abscísico, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) resposta do bulk de quatro acessos tolerantes e (B) do bulk de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de unitags HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em verde – de expressão reprimida; em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa.



B

6.1.5 Via de transdução do sinal por Etileno

O fitormônio etileno (ETHY) funciona como reguladores negativos na via de transdução de sinal ao se ligar a uma família de receptores que estão integrados à membrana. Esses receptores de etileno são codificados por uma família pequena de genes. Em *Arabidopsis* são cinco membros, incluindo ETR1, ERS1, ETR2, ERS2 e EIN4 (Chang et al., 1993; Hua et al., 1995). Com base nas *unitags*, o receptor de etileno ETR apresentou *unitags* de regulação n.s. para acessos tolerantes e sensíveis (Figura 7). A ligação do ETHY inativa os receptores, resultando na inativação do CTR1, um regulador negativo da via, pois na presença do etileno a região N-terminal do CTR1 não interage com os receptores de ETHY (Huang et al., 2003). EIN2, por sua vez, é um componente central da via e a perda da sua função pode levar a completa insensibilidade ao etileno (Alonso et al., 1999). Na ausência de ETHY, EIN2 é fosforilada por CTR1, impedindo a transdução do sinal, já na presença do fitormônio a fosforilação é reduzida e o fragmento C-terminal de EIN2 é clivado e translocado para o núcleo, onde irá ativar EIN3 (Ju et al., 2012). No presente estudo, tanto para CTR1 quanto para EIN2 não foi possível identificar ESTs de cana-de-açúcar dispondo de *unitags*. O fator de transcrição EIN3 / EIL (EIN3-LIKE), por sua vez, atua ativando diretamente a expressão de fatores de transcrição do ERF, os quais modulam a

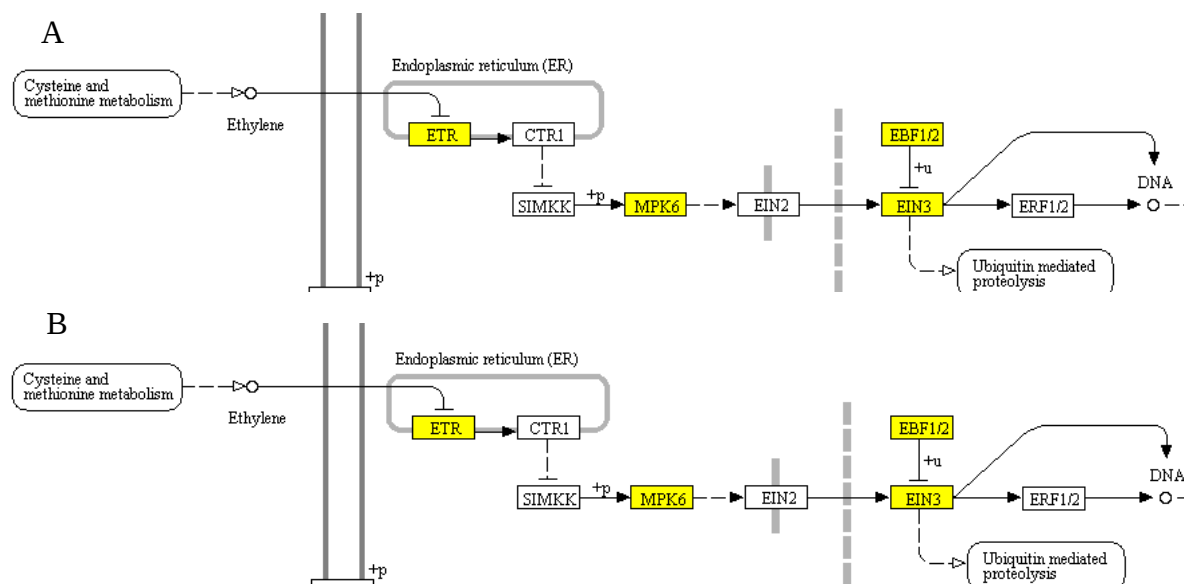
expressão de vários genes responsivos ao etileno, culminando, por exemplo, no amadurecimento de frutos (Bleecker e Kende, 2000). Para este componente (EIN3), a *unitag* identificada foi n.s. em sua expressão, para ambos acessos, após aplicação do estresse em relação ao controle sem estresse (Figura 7).

Na presença do ETHY, as proteínas F-box EBFs são inativadas, desta forma, não ocorre a degradação da EIN3 por proteólise mediada pelo complexo 26S da ubiquitina. ERF são fatores de resposta ao ETHY, pertencente à classe AP2 / ERF que contém domínios com fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento da planta e diversas respostas adaptativas, como por exemplo, adaptação a estresses abióticos (Riechmann e Meyerowitz, 1998). Proteínas ERF 1, quando ativadas pelo fator de transcrição EIN3, ligam-se ao GCC-box nos promotores de genes-alvo para ativar a resposta ao ETHY (Solano et al., 1998). Os dados *in silico* também mostraram que as proteínas EBF 1 / 2 tiveram suas expressões não alteradas significativamente após aplicação do estresse, para ambos acessos. Já para as proteínas ERF1 / 2 não foi observada EST dispondo de *unitag* (Figura 7). Mas, visto que para alguns fatores de transcrição não há necessidade de uma super expressão para a devida atuação (Phillips e Hoopes 2008), a via poderia estar sendo útil, necessitando, entretanto, de estudos complementares.

Deve se ressaltar que o papel do ETHY sob estresse osmótico, incluindo seca e salinidade, ainda é controverso. El-Iklil et al. (2000) observaram que variedade sensível de tomate quando submetida a 200 mM de NaCl após 36 h apresentaram maior produção de ETHY quando comparado com variedades tolerantes. O contrário foi relatado por Khan et al., (1987), onde foi observado em arroz uma maior produção de ETHY em plantas tolerantes ao sal submetidas a 100 mM de NaCl após 6 dias quando comparadas com o controle. Por sua vez, Pierik et al. (2006) sugerem que quando a sinalização do receptor de ETHY é prevalente (ETHY ausente), a planta é sensível ao estresse salino, ao passo que quando a sinalização do ETHY é prevalente (receptor inativo), a planta seria tolerante ao estresse salino. Ainda, Achard et al. (2006) sugerem que a sinalização de ETHY promove a tolerância ao sal em *Arabidopsis*; a função do receptor de etileno levaria a sensibilidade ao sal e ACC (1-aminociclopropano-1-

carboxílico) sintase suprimiria esta sensibilidade, o que implica que a sinalização de etileno seria necessária para tolerância ao sal.

Figura 7 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Etileno, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em amarelo – de expressão não significativa (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em branco – sem *unitag* identificada.



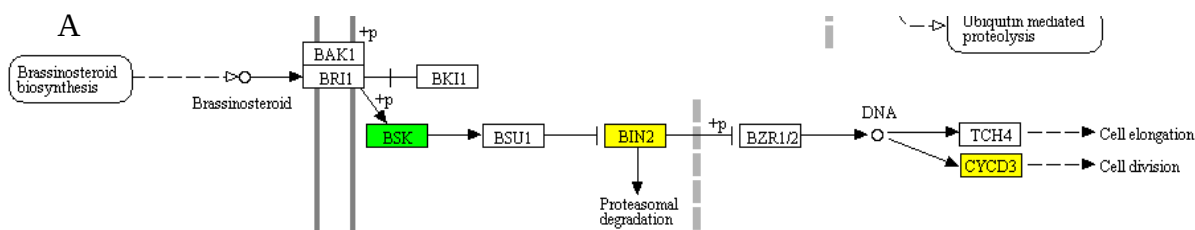
6.1.6 Via de transdução do sinal por Brassinoesteroides

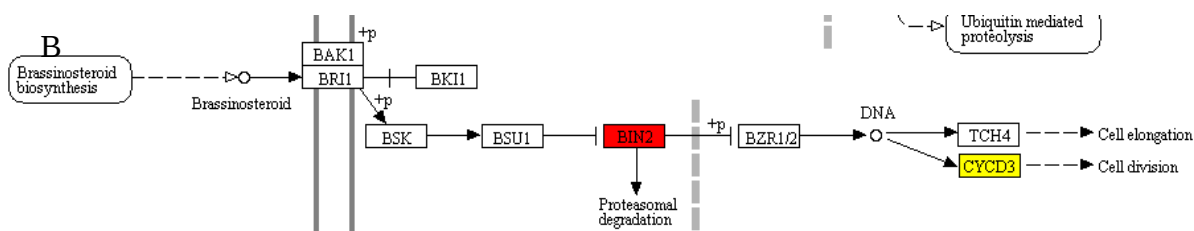
BRs participam de processos fundamentais em plantas, tais como: expressão do genoma, sinalização, crescimento e desenvolvimento das plantas frente a estresses abióticos. A via de transdução de sinal por Brassinoesteróide (BRs), estabelecida graças ao desenvolvimento das ômicas e abordagens em *A. thaliana* (Wang et al. 2012), é iniciada pela percepção do fitormônio pelo complexo ligado aos receptores BRI1 e BAK1, associados à membrana celular, que mediante eventos de fosforilação / desfosforilação, em cascata de sinalização, leva a mudanças na expressão gênica dos alvos (Gruszka, 2013; She et al., 2013). Ainda na sinalização de BRs, a serina-tirosina-quinase BIN2 desempenharia um papel crucial; BIN2 é outro regulador negativo da via, fosforilando e inibindo FTs que regulam a expressão de genes alvos, como por exemplo, BZR 1 / 2 (Vert e Chory, 2006; Yan et al., 2009). Nas análises *in silico*, não foram identificadas *unitags* relacionadas com BRI1 e BAK1 (Figura 8), mas foram observadas *unitags* referentes a transcritos BIN2, sendo estas de

expressão s.n. pelo *bulk* tolerante, e de expressão induzida no sensível. O nível de BIN2 pode ser regulado pelo sinal do fitormônio, pois uma aplicação exógena de BRs pode levar a uma redução de BIN2 (He et al., 2002; Li e Nam 2002).

A atividade de BIN2, por sua vez, seria diretamente inibida pela fosfatase BSU1, que desfosforilaria o resíduo Tyr-200 da quinase BIN2 (Ye et al., 2011; Hao et al., 2013). Logo, a percepção de BRs ativa BRI1 e BAK1, que por sua vez, fosforilam BKI1 em Try211; uma vez fosforilada, BKI1 interage com proteínas 14-3-3 e inibe a liberação de BZR1 e BZR2 (Wang et al. 2011). BRI1 ativada, fosforila quinases de sinalização (BSKS) com subsequente ativação da fosfatase BSU1 que por sua vez, inativa BIN2 através da desfosforilação. Após a inativação de BIN2, uma proteína fosfatase 2A desfosforila BZR1 e BES1 (Kim e Wang, 2010); estes, vão para o núcleo onde se ligam aos promotores de genes regulados por BRs (Gruszka, 2013), culminando, por exemplo, com a divisão e o alongamento celular. As análises *in silico*, entretanto, não permitiram um entendimento completo da via, mas como houve expressão induzida de transcritos BIN2 pelo *bulk* sensível (Figura 8), provavelmente a expressão dos genes-alvo não estaria ocorrendo, o que poderia acarretar um não crescimento e alongação de células de raízes dos acessos sensíveis. Os mecanismos moleculares sob a participação de BRs na tolerância da planta ao estresse de seca não estão esclarecidos. Entender a transdução de sinais de BRs durante este estresse é importante para o entendimento do processo de tolerância e necessita maiores investigações.

Figura 8 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Brassinosteróide, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em verde – de expressão reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada.





6.1.7 Via de transdução do sinal por Ácido Jasmônico

Conhecimentos sobre como estresses abióticos afetam os níveis endógenos do ácido jasmônico (JA) em plantas são escassos. Segundo Kang et al. (2005), a aplicação exógena de 30 mM de JA, em 24 e 48 h após tratamento com NaCl, produz uma melhora na tolerância de arroz ao sal (em todas as concentrações, de 20, 40 e 80 mM de NaCl), quando comparado com aplicação de JA antes e durante o tratamento com NaCl, especialmente em cultivares sensíveis ao sal. Além disso, aplicações de JA podem alterar outros fitormônios, tais como ABA, cujo nível aumentou em plantas sensíveis após tratamento com JA. Isto ajudaria na tolerância da planta, uma vez que aumentos de ABA melhoram a resposta de tolerância ao estresse salino.

As análises *in silico* identificaram *unitags* diferencialmente expressas relacionadas com três componentes da via de transdução de sinal por JA (Figura 9). Para JAR1 a expressão foi induzida no *bulk* tolerante e n.s. no sensível (Tabela 10). O gene JAR1 participa da regulação de genes expressos em resposta ao JA (Staswick et al., 1992). Plantas com mutações neste gene têm reduzida expressão de genes responsivos ao JA, associado a um aumento na suscetibilidade à infecção por fitopatógenos (Staswick e Tiryaki, 2004), por exemplo.

Para JAZ (*jasmonate ZIM domain-containing*), a *unitag* observada foi n.s. pelo *bulk* tolerante e induzida (2,54 vezes) no sensível (Tabela 10). Dados de RT-qPCR para JAZ confirmaram indução para os acessos sensíveis CTC13 e CTC9, bem como para o acesso tolerante CTC15 (Figura 11 e 12). A indução corrobora com o descrito na literatura, uma vez que a repressão das proteínas DELLAs estaria relacionada com a não repressão de JAZ, já que as duas proteínas competem pela interação com MYC2 (Ballaré, 2011). JAZs são proteínas

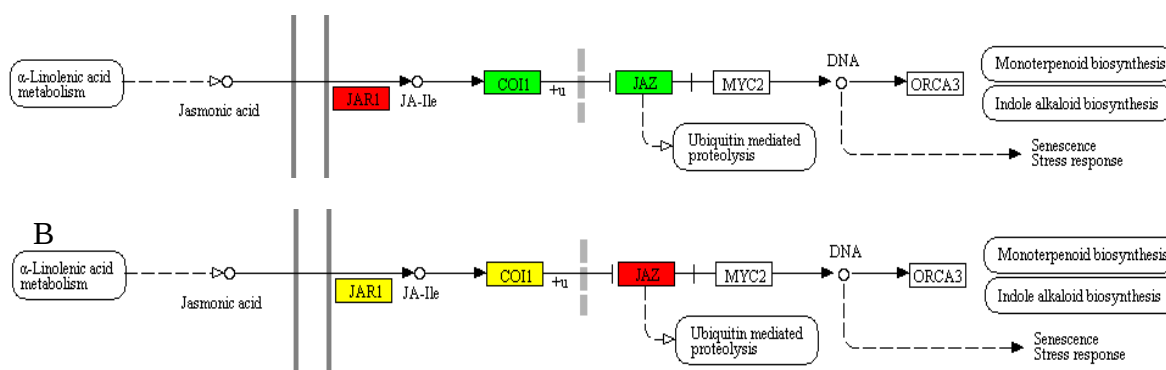
repressoras da sinalização de JA (Yang et al., 2013); quando as proteínas JAZs são expressas, elas inibem a atividade de grande variedade de FTs, incluindo MYC2, MYC3 e MYC4, que regulam os principais aspectos da expressão gênica mediada por JA (Fernández-Calvo et al., 2011). A indução das proteínas JAZs reprime a sinalização de JA e MYC2, acarretando na inibição da resposta dos genes responsivos ao JA (Hou et al., 2013). Além dos MYCs, JAZs interagem com outros membros, incluindo FTs do ETHY (EIN3), para reprimir outro conjunto de respostas mediadas por JA (Yan et al., 2013).

Outro componente da via, COI1 (*coronatine-insensitive protein 1*), apresentou *unitag* reprimida (de 2,54 vezes) pelo *bulk* tolerante e n.s. no sensível, após aplicação do estresse. COI1 é uma proteína F-BOX receptora de JA (Xie et al., 1998), que na presença do fitormônio tem sua expressão aumentada formando um complexo com SCF^{COI1} (Xu et al., 2002). O gene para COI1 é central na sinalização mediada pelo JA, uma vez que mutação acarreta a não expressão de genes que respondem ao JA (Li et al., 2004). Dados de RT-qPCR mostraram repressão para o acesso tolerante SP83-2847 (0,45 vezes) e para o acesso sensível SP83-3414 (0,37 vezes), enquanto que o acesso sensível CTC9 apresentou indução de 1,80 vezes (Figura 11 e 12). Demais acessos apresentaram expressão n.s.

Em plantas com níveis reduzidos de JA, proteínas JAZs reprimem genes JA-responsivos, que inibem a atividade de FTs (fator de transcrição MYC2), envolvidos na expressão de genes de resposta imediata. A eliminação dos repressores JAZ, pela presença de JA, deixaria o fator de transcrição MYC2 estimular a expressão de genes dependentes de JA, acarretando na resposta final do fitormônio, como por exemplo, resposta a estresses e inibição do crescimento (Shoji, 2011).

Figura 9 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Ácido Jasmônico, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em verde – de expressão reprimida; em amarelo – de expressão não significativa; em branco – sem *unitag* identificada.

A



6.1.8 Via de transdução do sinal por Ácido Salicílico

O fitormônio ácido salicílico (SA), considerado o hormônio mais importante na defesa da planta contra patógenos, organismos biotróficos e hemibiotróficos (Delaney et al., 1994; Vlot et al., 2009), também é sinalizador de estresses abióticos, como seca e salinidade (Humphreys e Chapple, 2002; Yang e Hua, 2004; Catinot et al., 2008). As análises *in silico* mostraram que a via foi predominantemente induzida no *bulk* tolerante (Figura 10 A), e majoritariamente reprimida ou n.s. no *bulk* sensível (Figura 10 B). O *bulk* tolerante apresentou *unitags* induzidas para todos os componentes da via (NPR1, TGA e PR-1), enquanto o *bulk* sensível apresentou *unitags* reprimidas e induzidas (para a proteína NPR1) e n.s. (para a proteína PR-1 e para FTs do tipo TGA).

FTs TGA possuem afinidades por elementos *cis* encontrados na região regulatória de genes relacionados com a defesa vegetal, dentre os quais genes para proteínas de defesa PR-1 (*pathogenesis-related protein 1*), induzindo-os. Tendo por base a *unitag* tolerante induzida, FTs TGA poderiam estar regulando processos após o estresse aplicado.

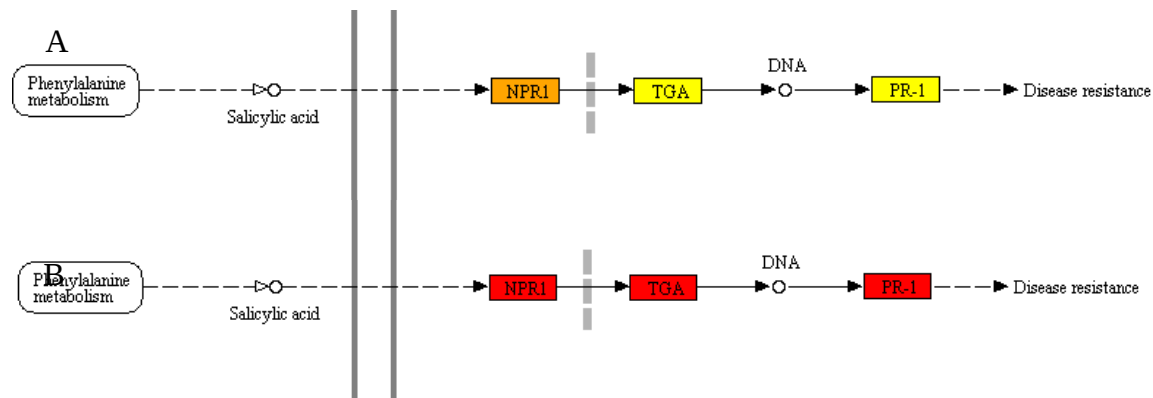
O gene para NPR1 é fundamental na resistência sistêmica adquirida e na tolerância a estresses abióticos em plantas (Liu et al., 2005). A proteína NPR1 (*regulatory protein NPR1*; Mou et al., 2003), por sua vez, está associada com o aumento na tolerância ao estresse oxidativo, um efeito secundário comum a diversos estresses (bióticos e abióticos), cujo controle é relevante para a viabilidade celular (Spoel et al. 2009). Aumentos na concentração de SA fazem com que monômeros de NPR1 migrem para o núcleo da célula e interajam com FTs TGAs (Despres et al., 2000; Johnson et al., 2003). Estes, por sua vez,

interagem com as proteínas PR-1, ativando-as, acarretando a resposta fisiológica final do fitormônio. A proteína NPR1 também intermedia *cross-talk* entre a via de sinalização do SA e do JA (Spoel et al., 2007). Análises de expressão relativa para NPR1 confirmou expressão induzida do acesso tolerante CTC9 (1,53 vezes), sendo n.s. para os demais acessos de ambos os *bulks* (Figura 11 e 12).

Em estudo realizado por Chen et al. (2012), com a variedade ROC22 de cana-de-açúcar, a qual foi retirada do solo após 6 semanas de idade e colocada em copo contendo 40 ml de água para as plantas controles, tendo se acrescidos cinco mM de SA para as plantas tratadas, durante 72 horas, se observou uma expressão induzida para NPR1, em 1,53 vezes, em comparação com o controle não tratado. Logo, o gene para NPR1, um co-regulador transcricional central para a ativação de genes de defesa dependentes de SA (Wu et al., 2012), poderia ser também fundamental na resposta da planta frente a estresses abióticos. Ainda, plantas de *A. thaliana* e *N. tabacum* deficientes no acúmulo de SA ou da proteína reguladora NPR1 são incapazes de ativar a síntese das proteínas PR1 (Pieterse et al., 2001).

As análises *in silico* para PR1 mostraram *unitag* induzida (4,37 vezes) pelo *bulk* tolerante e n.s. pelo sensível. Por sua vez, dados de RT-qPCR confirmaram indução pelo acesso tolerante SP83-5073 (1,89 vezes) e, curiosamente, certa repressão pelos acessos tolerantes SP83-2847 e CTC6 (0,4 e 0,32 vezes, respectivamente), enquanto que os acessos sensíveis foram de expressão reprimida (para CTC9 e CTC13; 0,47 e 0,61 vezes, respectivamente) e n.s. para os demais (Figura 11 e 12). A indução da proteína PR1 por acesso tolerante e repressão ou n.s. por maioria dos acessos sensíveis, pode indicar possível indução de NPR1, pois NPR1 ativa a síntese de proteínas PR1 (Zhou et al., 2000). Logo, a via aqui analisada poderia contribuir com a tolerância de acessos de cana-de-açúcar ao estresse aplicado.

Figura 10 - Orquestração transcricional da via de transdução de sinal pelo fitormônio Ácido Salicílico, em resposta ao estresse de supressão de rega (24 h) pelo: (A) *bulk* de quatro acessos tolerantes e (B) *bulk* de quatro acessos sensíveis de cana-de-açúcar. Em destaque, componentes da via com presença de *unitags* HT-SuperSAGE: em vermelho – de expressão induzida (ao nível de $p < 0,05$, Teste Audic-Claverie); em laranja – de expressão induzida e reprimida; em amarelo – de expressão não significativa.



6.2 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *UNITAGS* POR RT-QPCR

A estratégia de maximizar informações genéticas e também minimizar custos de sequenciamento através de amostras compostas requereu a abertura dos *bulks* para se validar os dados de expressão gênica SuperSAGE por RT-qPCR. A individualização de cada um dos quatro acessos tolerantes e dos quatro sensíveis foi necessária para verificar que acesso(s) possuía(m) a(s) *unitag(s)* diferencialmente expressa(s) detectada(s) influenciando as vias estudadas. Assim, a validação dos dados superSAGE para os genes-alvo selecionados foi confirmada em acessos específicos, tolerantes ou sensíveis. Os genes-alvo com *primers* eficientes para RT-qPCR permitiram avaliar as vias de sinalização de ABA (SnRK2, PP2C, ABF, PYR/PYL), de SA (NPR1 e PR1), de JA (COI1 e JAZ) e de GA (DELLA). Dentre os acessos tolerantes, CTC15 confirmou dois alvos da via de sinalização de ABA (SnRK2, UR; PP2C, DR); SP83-5073, um alvo da via de ABA (PYR/PYL, UR) e um de SA (PR1, UR); SP83-2847, um alvo da via de JA (COI1, DR) e um de GA (DELLA, DR); e CTC6 não validou nenhum. Dentre os acessos sensíveis, CTC9 confirmou um alvo de SA (NPR1, DR) e um de JA (JAZ, UR); CTC13, um alvo de JA (JAZ, UR); SP90-3414, um alvo de ABA (ABF, DR), enquanto SP83-1638 não validou nenhum.

É sabido que a tolerância ao déficit hídrico é uma característica complexa, portanto, variabilidade entre acessos tolerantes e sensíveis é esperada, reflexo do modo como as vias de transdução de sinais são utilizadas, em conjunto com diferentes estratégias empregadas por um acesso frente ao estresse, culminando com uma resposta da planta.

Figura 11 - Resultados de RT-qPCR dos genes-alvo com cDNAs de raízes de cana de açúcar de acessos tolerantes (CTC6, CTC15, SP83-2847 e SP83-5073) após 24 h de supressão de rega. Valores de expressão normalizados pelos genes de referência GAPDH e alfa-tubulina. Dados de expressão relativa fornecidos pelo software REST (v.2.0.13).

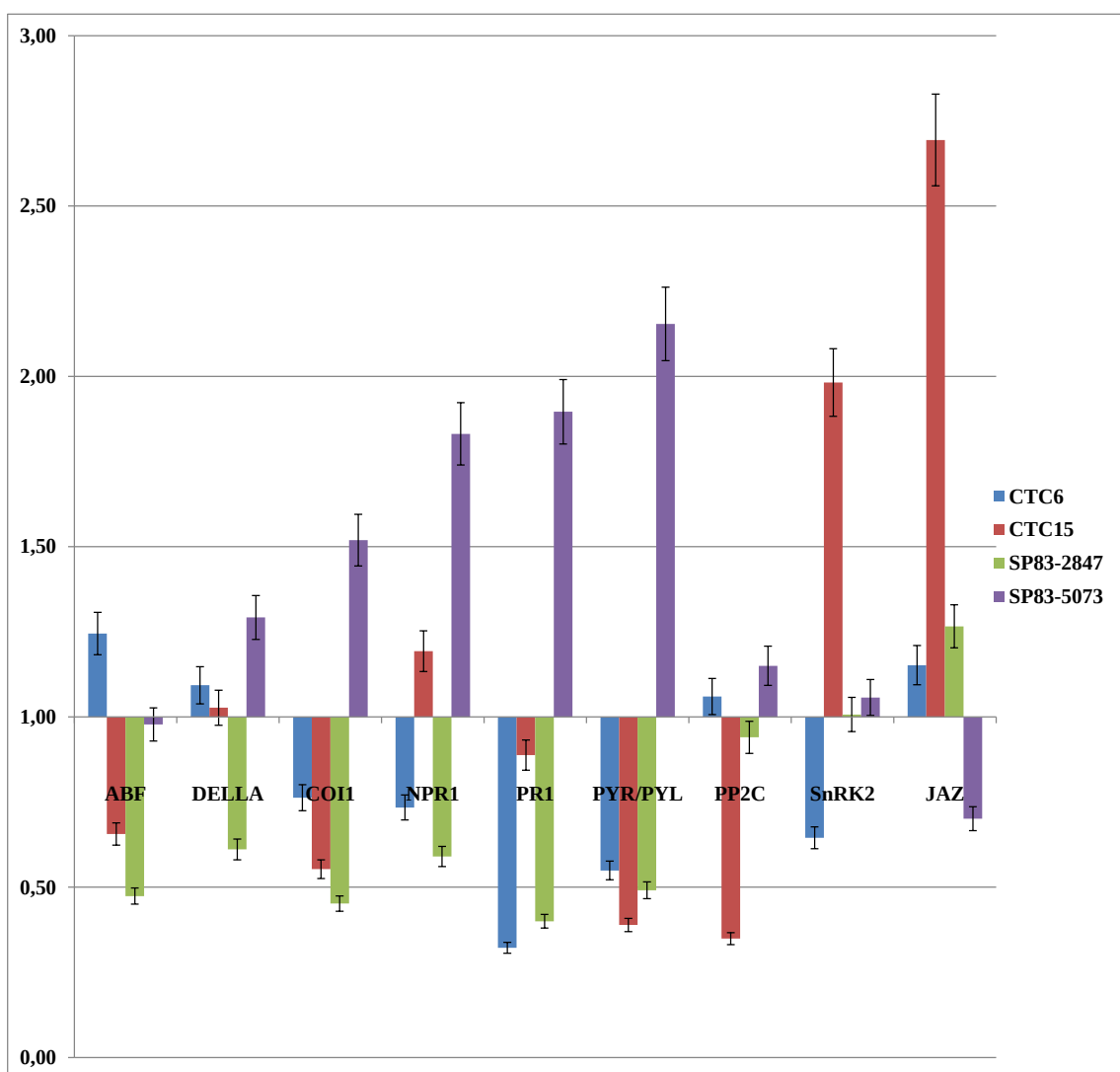
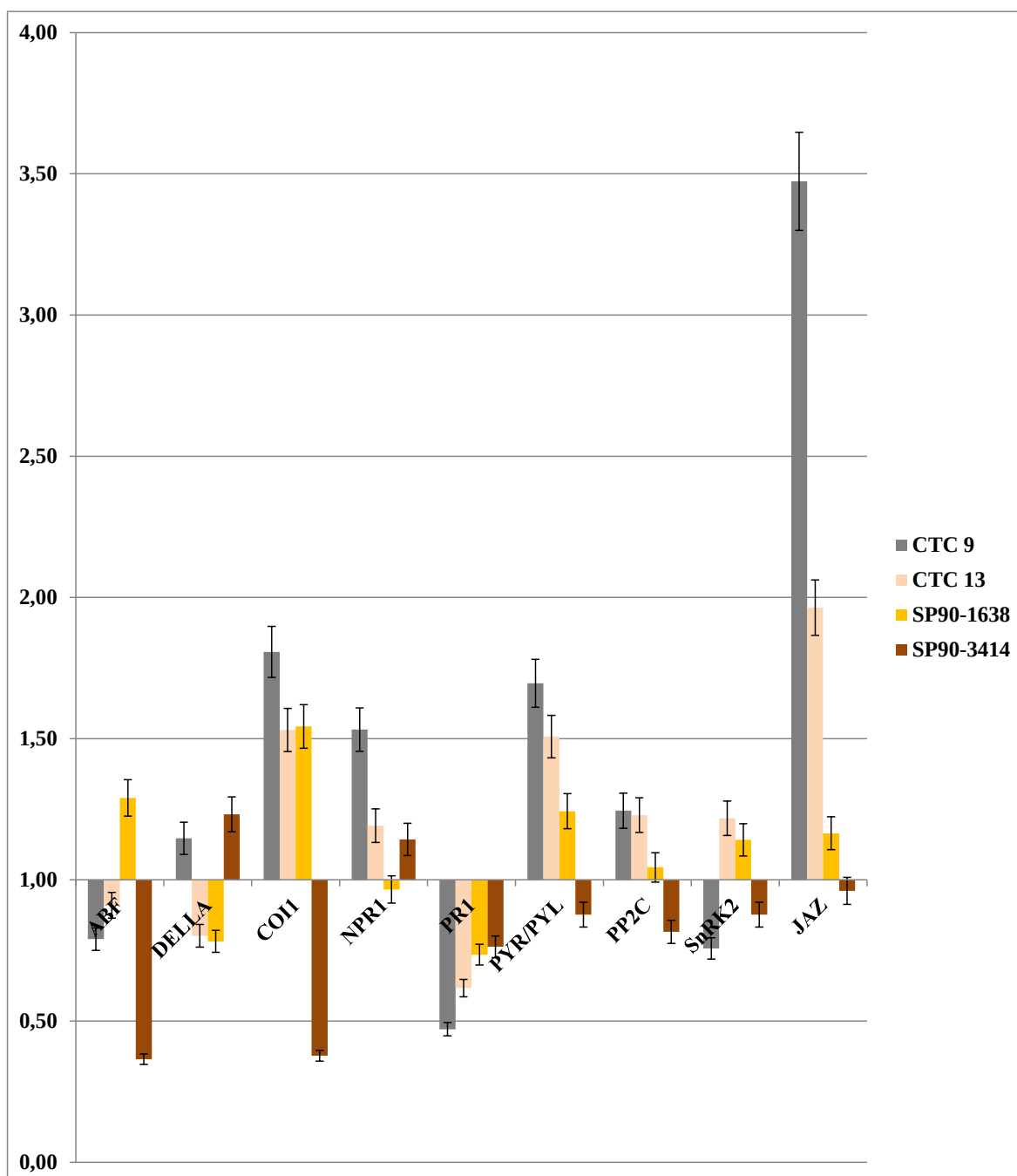


Figura 12 - Resultados de RT-qPCR dos genes-alvo com cDNAs de raízes de cana de açúcar de acessos sensíveis (CTC9, CTC13, SP90-1638 e SP90-3414) após 24 h de supressão de rega. Valores de expressão normalizados pelos genes de referência GAPDH e alfa-tubulina. Dados de expressão relativa fornecidos pelo software REST (v.2.0.13).



7 CONCLUSÕES

O presente trabalho representa a expressão *in silico* de genes de vias de transdução de sinal por fitormônios, em respostas de acessos tolerantes e sensíveis de cana-de-açúcar, após 24 h de supressão de rega, tendo por base *unitags* HT-SuperSAGE, com validação parcial de resultados por RT-qPCR. Assim, com base nos objetivos propostos e na metodologia foi possível identificar nas oito vias estudadas, transcritos de cana-de-açúcar com *unitags* diferencialmente expressas, em resposta ao estímulo, assim como, mapear os componentes previstos (43 - 100 %) nas oito vias de transdução de sinal, em respostas ao estresse aplicado, propor nove *primers* eficientes para RT-qPCR, amplificação dos componentes de quatro das vias analisada e identificar respostas individualizadas, de acessos tolerantes e sensíveis, nas orquestrações de quatro das vias de sinalização (por ABA, JA, SA e GA). Assim, a via de sinalização por ABA foi confirmada nos acessos tolerantes CTC15 e SP83-5073 (também no acesso sensível SP90-3414); por JA, no acesso tolerante SP83-2847 (e nos sensíveis CTC9 e CTC13); por SA, no acesso tolerante SP83-5073 (e no sensível CTC9); e por GA, no acesso tolerante SP83-2847. Aparentemente não expressaram os candidatos propostos, de modo diferencial após aplicação do estresse, o acesso tolerante CTC6 e o sensível SP83-1638. Para melhor caracterizar esses acessos faz se necessário trabalho similar envolvendo genes efetivos na tolerância ao estresse em questão, para que, em conjunto com os candidatos aqui propostos, estes possam ser eficientes na seleção de genótipos superiores e úteis em programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

REFERÊNCIAS

- ACHARD P, CHENG H, DE GRAUWE L, Decat J, Schoutteten H, Moritz T, Van Der Straeten D, Peng J, Harberd NP. Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. **Science** 311:91–94, 2006.
- AITKEN K, JACKSON P, PIPERIDIS G, MCINTYRE L. QTL identified for yield components in a cross between a sugarcane (*Saccharum* spp.) cultivar Q165A and a *S. officinarum* clone IJ76-514. In: **New directions for a diverse planet**. Proceedings for the 4th International Crop Science Congress, Brisbane, Australia, 26 September to 1 October 2004.
- AL-JANBI SM, HONEYCUTT RJ, PETERSON C, SOBRAL BWS. Phylogenetics analysis of organellar DNA sequences in the Andropogoneae: *Saccharum*. **Theoretical and Applied Genetics** 88: 933–944. 1997.
- ALONI R, ALONI E, LANGHANS M, ULLRICH C. Role of cytokinin and auxin in shaping root architecture: regulating vascular differentiation, lateral root initiation, root apical dominance and root gravitropism. **Ann Bot** 97(5):883–893, 2006.
- ALONSO JM, HIRAYAMA T, ROMAN G, NOURIZADEH S, ECKER JR. EIN2, a bifunctional trans-ducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. **Science** 284:2148–2152, 1999.
- AMJAD M, AKHTAR J, ANWAR-UL-HAQ M, YANG A, AKHTAR SC, JACOBSEN E. Integrating role of ethylene and ABA in tomato plants adaptation to salt stress. **Sci Hortic** 172:109–116, 2014.
- ANURADHA S, RAO SSR (2001) Effect of brassinosteroids on salinity stress induced inhibition of seed germination and seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). **Plant Growth Regul** 33:151–153, 2001.
- ARGUESO CT, FERREIRA FJ, KIEBER JJ. Environmental perception avenues: the interaction of cytokinin and environmental response pathways. **Plant Cell Environ** 32:1147–1160, 2009.
- Audic S and Claverie JM. The significance of digital gene expression profiles. **Genome Res** 7: 986-995, 1997.
- AZOOZ MM. Salt stress mitigation by seed priming with salicylic acid in two faba bean genotypes differing in salt tolerance. *Int J Agric Biol* 11:343–350, 2009.
- Ballaré CL. Jasmonate-induced defenses: a tale of intelligence, collaborators and rascals. **Trends Plant Sci** 16:249–257, 2011.
- BAROJA-FERNANDEZ E, AGUIRREOLEA J, MARTINKOVA H, HANUS J, STRNAD M. Aromatic cytokinins in micropropagated potato plants. **Plant Physiol Biochem** 40:217–224, 2002.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and salt tolerance in plants. Critical Reviews in **Plant Sciences**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BASTAM N, BANINASAB B, GHOBADI C. Improving salt tolerance by exogenous application of salicylic acid in seedlings of pistachio. **Plant Growth Regul** 69:275–284, 2013.

BECKERS, G.J.M., SPOEL, S. Fine-tuning plant defense signaling: salicylate versus jasmonate. **Plant Biology**, v.8, p.1-10, 2006.

BEWLEY JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9:1055–1066, 1997.
Bleecker AB, Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. **Annu Rev Cell Dev Biol** 16:1–18, 2000.

BORRAS-HIDALGO O, THOMMA BPHJ, CARMONA E, BORROTO CJ, PUJOL M, ARENCIBIA A, LOPEZ J. Identification of genes induced in disease-resistant somaclones upon inoculation with *Ustilago scitaminea* or *Bipolaris sacchari*. **Plant Physiol Biochem** 43:1115–1121, 2005.

BOWERS JE, ABBEY C, ANDERSON S, CHANG C, DRAYE X, HOPPE AH, ET AL. A high density genetic recombination map of sequence-tagged sites for Sorghum, as a framework for comparative structural and evolutionary genomics of tropical grasses. **Genetics** 165: 367–386, 2003.

BRAY, E. A., BAILEY-SERRES, J., WERETILNYK, E. RESPONSES TO ABIOTIC STRESS. IN: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, cap. 22, p. 1167- 1168, 2000.

BUER CS, MUDAY GK. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. **Plant Cell** 16(5):1191–1205, 2004.

CAMARGO SR, CANÇADO GMA, ULIAN EC, MENOSSI M. Identification of genes responsive to the application of ethanol on sugarcane leaves. **Plant Cell Rep** 26:2119–2128, 2007.

CAO WH, LIU J, HE XJ, MU RL, ZHOU HL, CHEN SY, ZHANG JS. Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. **Plant Physiol** 143:707–719, 2007.

CARDOSO-SILVA CB, COSTA EA, MANCINI MC, BALSALOBRE TW, CANESIN LE, PINTO LR, CARNEIRO MS, GARCIA AA, DE SOUZA AP, VICENTINI R. De novo assembly and transcriptome analysis of contrasting sugarcane varieties. **PLoS One**, 2014.

CASU RE, JARMEY JM, BONNETT GD, MANNERS JM: Identification of transcripts associated with cell wall metabolism and development in the stem of sugarcane by Affymetrix GeneChip Sugarcane Genome Array expression profiling. **Functional & integrative genomics**, 2007.

CATINOT J, BUCHALA A, ABOU-MANSOUR E, M'ETRAUX J-P. Salicylic acid production in response to biotic and abiotic stress depends on isochorismate in *Nicotiana benthamiana*. **FEBS Lett.** 582:473–78. 2008.

CHAKRABARTI N, MUKHERJI S. Alleviation of NaCl stress by pretreatment with phytohormones in *Vigna radiata*. **Biol Plant** 46:589–594. 2003.

Chang, C., Kwok, S.F., Bleecker, A.B., and Meyerowitz, E.M. Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. **Science** 262:539–544, 1993.

CHAPMAN EJ, ESTELLE M. Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. **Annu Rev Genet** 43:265–285. 2009.

CHAVES M, DAVIES B. DROUGHT EFFECTS AND WATER USE EFFICIENCY: IMPROVING, 2010.

CHEN H, LI Z, XIONG L. A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. **FEBS Lett** 586(12):1742–1747, 2012a.

CHEN JIAN-WEN, JIAN-FEI KUANG, GANG PENG, SI-BAO WAN, RUI LIU, ZHAN-DUAN YANG AND HAI-HUA DENG. Molecular cloning and expression analysis of a npr1 gene from sugarcane. **Pak. J. Bot.**, 44(1): 193-200, 2012b.

CHENG H, SONG S, XIAO L, SOO HM, CHENG Z, XIE D, PENG J. Gibberellin acts through jasmonate to control the expression of MYB21, MYB24, and MYB57 to promote stamen filament growth in Arabidopsis. **PLoS Genet** 5:e1000440, 2009.

CHENG Z, SUN L, QI T, ZHANG B, PENG W, LIU Y, XIE D. THE BHLH transcription factor MYC3 interacts with the jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in Arabidopsis. **Mol Plant** 4:279–288, 2011.

CHEONG JJ, CHOI YD. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. **Trends Genet** 19:409–413. 2003.,

CHEUNG VG, MORLEY M, AGUILAR F, MASSIMI A, KUCHERLAPATI R, CHILDS G. Making and reading microarrays. **Nat Genet.** 21(1 Suppl):15-9. 1999.

CLOUSE SD. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. **Plant Cell.** Apr, 2011.

Companhia Nacional de Abastecimento (**CONAB**), <<http://www.conab.gov.br/>> acessado em 22 dezembro de 2013.

Companhia Nacional de Abastecimento (**CONAB**), <<http://www.conab.gov.br/>> acessado em 03 Junho de 2016.

CORDEIRO GM, ELIOTT F, MCINTYRE CL, CASU RE, HENRY RJ. Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. **Theor Appl Genet** 113:331–343. 2006.

COWELL JK, HAWTHORN L. The application of microarray technology to the analysis of the cancer genome. **Curr Mol Med**, 2007.

CRUZ C, LIPS SH, MARTINS-LOUCAO MA. Uptake regions of inorganic nitrogen in roots of carob seedlings. **Physiol Plant** 95:167–175, 1995.

CUTLER S.R., RODRIGUEZ P.L., FINKELSTEIN R.R., ABRAMS S.R. Absciscic acid: emergence of a core signaling network. **Annu Rev Plant Biol** 61: 651 – 679. 2010.

D'HONT A. A molecular approach to unravelling the genetics of sugarcane, a complex polyploid of the Andropogoneae tribe. **Genome** 37, 1994.

DA SILVA MD, SILVA RL, COSTA FERREIRA NETO JR, GUIMARÃES AC, VEIGA DT, CHABREGAS SM, BURNQUIST WL, KAHL G, BENKO-ISEPPON AM, KIDO EA. Expression Analysis of Sugarcane Aquaporin Genes under Water Deficit. **J Nucleic Acids**. 2013.

DALMA-WEISZHAUSZ DD, WARRINGTON J, TANIMOTO EY, MIYADA CG. The affymetrix GeneChip platform: an overview. **Methods Enzymol**. 2006.

DAVIERE JM, ACHARD P. Gibberellin signaling in plants. **Development** 140:1147–1151. 2013.

DE SMET I, ZHANG HM, INZE ´ D, BEECKMAN T. A novel role for abscisic acid emerges from underground. **Trends Plant Sci** 11:434–439. 2006.

DELANEY TP, UKNES S, VERNOOIJ B, FRIEDRICH L, WEYMANN K, NEGROTTO D, GAFFNEY T, GUT-RELLA M, KESSMANN H, WARD E, RYALS J. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. **Science** 266:1247–1250. 1994.

DESPRES, C., DELONG, C., GLAZE, S., LIU, E., FOBERT P.R. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. **The Plant Cell**, v.12, p.279-290, 2000.

DEVINAR G, LLANES A, MASCIARELLI O, LUNA V. Different relative humidity conditions combined with chloride and sulfate salinity treatments modify abscisic acid and salicylic acid levels in the halophyte *Prosopis strombulifera*. **Plant Growth Regul** 70:247–256. 2013.

DHARMASIRI N, DHARMASIRI S, ESTELLE M. 2005. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature** 435, 441–445. 2005.

DILLON SL, SHAPTER FM, HENRY RJ, CORDEIRO G, IZQUIERDO L AND LEE LS. Domestication to Crop Improvement: Genetic Resources for Sorghum and *Saccharum* (Andropogoneae). **Ann Bot** 100: 1-15. 2007.

DONG, X. NPR1, all things considered. **Current Opinion in Plant Biology**, 7: 547–552. 2004.

DU H, LIU HB, XIONG LZ. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. **Front Plant Sci**. 2013.

EL-IKLIL Y, KARROU M, BENICHO M. Salt stress effect on epinasty in relation to ethylene production and water relations in tomato. **Agronomie** 20:399–406. 2000.

ESTEVEES, B.S. & SUZUKI, M.S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis**, 12 (4): 662-679. 2008.

EYIDOĞAN F, OZ MT, YUCEL M, OKTEM HA. Signal transduction of phytohormones under abiotic stresses. In: Khan NA, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (eds) **Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants**. Springer, Berlin, pp 1–48. 2012.

FAHAD S, HUSSAIN S, BANO A, SAUD S, HASSAN S, SHAN D, KHAN FA, KHAN F, CHEN Y, WU C, TABASSUM MA, CHUN MX, AFZAL M, JAN A, JAN MT, HUANG J. Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment. **Environ Sci Pollut Res**. doi:10.1007/s11356-014-3754-2. 2014.

FAHAD S, NIE L, CHEN Y, WU C, XIONG D, SAUD S, HONGYAN L, CUI K, HUANG J. Crop plant hormones and environmental stress. **Sustain Agric Rev** 15:371–400. 2015.

FANG B, YANG L. Evidence that the auxin signaling pathway interacts with plant stress response. **Acta Bot Sin** 44:532–536. 2002.

FERNÁNDEZ-CALVO P, CHINI A, FERNÁNDEZ-BARBERO G, CHICO J-M, GIMENEZ-IBANEZ S, GEERINCK J, EECKHOUT D, SCHWEIZER F, GODOY M, FRANCO-ZORRILLA JM, PAUWELS L, WITTERS E, PUGA MI, PAZ-ARES J, GOOSSENS A, REYMOND P, DE JAEGER G, SOLANO R. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. **Plant Cell** 23:701–715. 2011.

FERREIRA NETO, J.R.C. Análise *in silico* de EST-SSR em *Phaseolus vulgaris* Glycinemaxe transferibilidade de marcadores para *Vigna unguiculata*. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2009. 110p. Dissertação de Mestrado. Ferreira WD, Kerbauy GB, Costa APP. Micropropagation and genetic stability of a Dendrobium hybrid (Orchidaceae). **In Vitro Cell Dev Plant** 42:568–571. 2006.

FEYS, B.J.F., BENEDETTI, C.E., PENFOLD, C.N., AND TURNER, J.G. (1994). Arabidopsis mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. **Plant Cell** 6, 751-759.

FUJITA Y, YOSHIDA T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K. Pivotal role of the AREB/ABF-SnRK2 pathway in ABRE-mediated transcription in response to osmotic stress in plants. **Physiol Plant**. 2012.

GEPSTEIN S, THIMANN KV. Changes in the abscisic acid content of oat leaves during senescence. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1980.

GILLEY A, FLECHER RA. Gibberellin antagonizes paclobutrazole induced stress protection in wheat seedlings. **J Plant Physiol**. 2007.

GLAZEBROOK J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annu Rev Phytopathol** 43:205–227. 2005.

GRABHERR MG, HAAS BJ, YASSOUR M, LEVIN JZ, THOMPSON DA, AMIT I, ADICONIS X, FAN L, RAYCHOWDHURY R, ZENG Q, ET AL. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nat Biotechnol**. 2011.

GRIVET L, ARRUDA P. Sugarcane genomics: depicting the complex genome of an important tropical crop. **Plant Biology** 5:122-127. 2001.

GRUSZKA D. The brassinosteroid signaling pathway—new key players and interconnections with other signaling networks crucial for plant development and stress tolerance. **Int J Mol Sci** 14:8740–8774, 2013.

GUILFOYLE TJ, HAGEN G. Auxin response factors. **Curr Opin Plant Biol**. 2007. Oct;10(5):453-60. Review.

GUNES A, INAL A, ALPASLAN M, ERASLAN F, BAGCI EG, CICEK N. Salicylic acid induced changes on some physiological parameters symptomatic for oxidative stress and mineral nutrition in maize (*Zea mays* L.) grown under salinity. **J Plant Physiol** 164:728–736. 2007.

GUO H, ECKER JR. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF(EBF1/EBF2)-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. **Cell**. Dec, 2003.

GUPTA S, RASHOTTE AM. Down-stream components of cytokinin signaling and the role of cytokinin throughout the plant. **Plant Cell** 31:801–812. 2012.

GUPTA V, RAGHUVANSHI S, GUPTA A, SAINI N, GAUR A, KHAN MS, GUPTA RS, SINGH J, DUTTAMAJUMDER SK, SRIVASTAVA S, SUMAN A, HADIARTO T, TRAN LS. Progress studies of drought-responsive genes in rice. **Plant Cell Rep** 30:297–310. 2011.

HAN W, RONG H, ZHANG H, WANG M-H. Abscisic acid is a negative regulator of root gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. **Biochem Biophys Res Commun** 378:695–700. 2009.

HAO J, YIN Y, FEI S-Z. Brassinosteroid signaling network: implications on yield and stress tolerance. **Plant Cell Rep** 32:1017–1030. 2013.

HARRISON M. Cross-talk between phytohormone signaling pathways under both optimal and stressful environmental conditions. In: Khan NA, Nazar R, Iqbal N, Anjum NA (eds) **Phytohormones and abiotic stress tolerance in plants**. Springer, Berlin, pp 49–76. 2012.

HAUSER F, WAADT R, SCHROEDER JI. Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. **Curr Biol**; 21:R346–55. 2011.

HAYAT S, MORI M, FARIDUDDIN Q, BAJGUZ A, AHMAD A. Physiological role of brassinosteroids: an update. **Indian J Plant Physiol** 15:99–109. 2010.

HE JX, GENDRON JM, YANG Y, LI J, WANG ZY. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in Arabidopsis. **Proc Natl Acad Sci USA** 99:10185–10190. 2002.

HEYL A, BRAULT M, FRUGIER F, KUDEROVA A, LINDNER AC, MOTYKA V, VON SCHWARTZENBERG K, VANKOVA R, SCHALLER GE. Nomenclature for members of the two-component signaling pathway of plants. **Plant Physiol** 161:1063–1065. 2013.

HEYL A, WULFETANGE K, PILS B, NIELSEN N, ROMANOV GA, SCHMULLING T. Evolutionary proteomics identifies amino acids essential for ligand-binding of the cytokinin receptor CHASE domain. **BMC Evol Biol** 7:62. 2007.

HOARAU JY, GRIVET L, OFFMANN B, RABOIN LM, DIORFLAR JP, PAYET J, ET AL. Genetic dissection of a modern sugarcane cultivar (*Saccharum* spp.). II. Detection of QTLs for yield components. **Theoretical and Applied Genetics** 105: 1027–1037. 2002.

HOQUE M, HAQUE S. Effects of GA3 and its mode of application on morphology and yield parameters of mungbean (*Vigna radiata* L.). **Pak J Biol Sci** 5:281–283. 2002.

HOSSAIN MA, MUNEMASA S, URAJI M, NAKAMURA Y, MORI IC, MURATA Y. Involvement of endogenous abscisic acid in methyl jasmonate-induced stomatal closure in Arabidopsis. **Plant Physiol** 156:430–438. 2011.

HOU X, DING L, YU H. Crosstalk between GA and JA signaling mediates plant growth and defense. **Plant Cell Rep** 32:1067–1074. 2013.

HOU X, LEE LYC, XIA K, YAN Y, YU H. DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. **Dev Cell** 19:884–894. 2010.

HUA, J., CHANG, C., SUN, Q., AND MEYEROWITZ, E.M. Ethylene insensitivity conferred by Arabidopsis ERS gene. **Science** 269: 1712–1714. 1995.

HUANG XS, LIU JH, CHEN XJ. Overexpression of PtrABF gene, a bZIP transcription factor isolated from *Poncirus trifoliata*, enhances dehydration and drought tolerance in tobacco via scavenging ROS and modulating expression of stress-responsive genes. **BMC Plant Biol.** Oct, 2010.

HUANG, D., WU, W., ABRAMS, S.R. & CUTLER, A.J.. The relationship of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. **Journal of Experimental Botany**, 59, 2008.

HUMPHREYS JM, CHAPPLE C. Rewriting the lignin roadmap. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5:224–29, 2002.

HUSSAIN, A. ET AL. Sugarcane, sugar metabolism and some abiotic stress. **Internacional Journal Of Agriculture & Biology**, v. 6, n. 4, p. 732-742, 2004.

INMAN-BAMBER NG. Sugarcane water stress criteria for irrigation and drying off. **Field Crops Res** 89:107–122, 2004.

INMAN-BAMBER NG, SMITH DM. Water relations in sugarcane and response to water deficits. *Field Crops Res* 92:185–202. 2005.

Inoue, T.; Higuchi, M.; Hashimoto, Y.; Seki, M.; Kobayashi, M.; Kato, T.; Tabata, S.; Shinozaki, K.; Kakimoto, T. Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. **Nature**, London, v. 409, p. 1060-1063, 2001.

IQBAL M, ASHRAF M, JAMIL A. Seed enhancement with cytokinins: changes in growth and grain yield in salt stressed wheat plants. **Plant Growth Regul** 50:29–39. 2006.

IQBAL N, NAZAR R, IQBAL MRK, MASOOD A, NAFEES AK. Role of gibberellins in regulation of source sink relations under optimal and limiting environmental conditions. **Curr Sci** 100:998–1007. 2011.

IQBAL N, UMAR S, KHAN NA, KHAN MIR. A new perspective of phytohormones in salinity tolerance: regulation of proline metabolism. **Environ Exp Bot** 100:34–42, 2014.

JAIN M, KHURANA JP. Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. **FEBS J** 276:3148–3162. 2009.

JAVID MG, SOROOSHADEH A, MORADI F, SANAVY SAMM, Allahdadi I. The role of phytohormones in alleviating salt stress in crop plants. **Aust J Crop Sci** 5:726–734. 2011.

JIA W, WANG Y, ZHANG S, ZHANG J (2002) Salt -stress-induced ABA accumulation is more sensitively triggered in roots than in shoots. **J Exp Bot** 53:2201–2206.

JOHNSON, C., BODEN, E., ARIAS, J. Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v.15, p.1846-1858, 2003.

JUNG J, PARK C (2011) Auxin modulation of salt stress signaling in *Arabidopsis* seed germination. **Plant Signal Behav** 6:1198–1200.

KAMINEK M, VANEK T, KALEDOVA-KULASOVA A, PILAR J (1987) The effect of two cytokinins on production of stem cuttings by stock plants of *Euphorbia pulcherrima* Willd. and *Gerbera jamesonii* Hook. **Sci Hortic**-Amsterdam 33:281–289.

KANG DJ, SEO YJ, LEE JD, ISHII R, KIM KU, SHIN DH, PARK SK, JANG SW, LEE IJ (2005) Jasmonic acid differentially affects growth, ion uptake and abscisic acid concentration in salt-tolerant and salt-sensitive rice cultivars. **J Agron Crop Sci** 191:273–282.

KARTAL G, TEMEL A, ARICAN E, GOZUKIRMIZI N (2009) Effects of brassinosteroids on barley root growth, antioxidant system and cell division. **Plant Growth Regul** 58:261–267.

KATSIR L, CHUNG HS, KOO AJ, HOWE GA. Jasmonate signaling: a conserved mechanism of hormone sensing. *Curr Opin Plant Biol*. 2008 Aug;11(4):428-35.
Kazan K, Manners JM (2013) MYC2: the master in action. **Mol Plant** 6:686–703.

KEPINSKI S, LEYSER O (2005) The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. **Nature** 435(7041):446–451.

KESKIN BC, SARIKAYA AT, YUKSEL B, MEMON AR (2010) Absciscic acid regulated gene expression in bread wheat. **Aust J Crop Sci** 4:617–625.

KHAN AA, AKBAR M, SESHU DV (1987) Ethylene as an indicator of salt tolerance in rice. **Crop Sci** 27:1242–1248

KHAN MIR, IQBAL N, MASOOD A, PER TS, KHAN NA (2013) Salicylic acid alleviates adverse effects of heat stress on photosynthesis through changes in proline production and ethylene formation. doi: 10.4161/psb.26374.

KHAN MIR, KHAN NA (2013) Salicylic acid and jasmonates: approaches in abiotic stress tolerance. **J Plant Biochem Physiol** 1:e113. doi:10.4172/2329-9029.1000e113.

KHAN NA, SINGH S, NAZAR R, LONE PM (2007) The source–sink relationship in mustard. *Asian Aust J Plant Sci Biotechnol* 1:10–18.

KHAN NA, SYEED S, MASOOD A, NAZAR R, IQBAL N (2010) Application of salicylic acid increases contents of nutrients and antioxidative metabolism in mungbean and alleviates adverse effects of salinity stress. *Int J Plant Biol* 1:e1.

- KHAN W, PRITHIVIRAJ B, SMITH D (2003) Photosynthetic response of corn and soybean to foliar application of salicylates. *J Plant Physiol* 160:485–492.
- KHODARY SEA (2004) Effect of salicylic acid on growth, photosynthesis and carbohydrate metabolism in salt stressed maize plants. *Int J Agric Biol* 6:5–8.
- KHRIPACH V, ZHABINSKII VN, DEGROOT AE (2000) Twenty years of brassinosteroids: steroidal plant hormones warrant better crops for the XXI century. *Ann Bot* 86:441–447.
- KHURANA JP, KAPUR R, TYAGI AK (2009) The water-deficit stress- and red-rot-related genes in sugarcane. *Funct Integr Genomics* 10(2):207–214. doi:10.1007/s10142-009-0144-9.
- KIDO É. A., 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 É. A., 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. *Scientific World Journal* 2012:1-14.
- KIM T-W, WANG Z-Y (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61:681–704.
- KUMAR B, SINGH B (1996) Effect of plant hormones on growth and yield of wheat irrigated with saline water. *Ann Agric Res* 17:209–212.
- KUMAR, D., KLESSIG, D.F. High-affinity salicylic acid-binding protein 2 is required for plant innate immunity and has salicylic acid-stimulated lipase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.100, p.16101-16106, 2003.
- KURAMA EE, FENILLE RC, ROSA VE, ROSA DD, ULIAN EC (2002) Mining the enzymes involved in the detoxification of reactive oxygen species (ROS) in sugarcane. *Mol Plant Pathol* 3:251–259.
- LAKSHMANAN P, GEIJSKES RJ, AITKEN KS, GROF CPL, BONNETT GD, ET AL. (2005) Sugarcane biotechnology: The challenges and opportunities. *In Vitro Cell Dev - PI* 41: 345–363.
- LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: Rima Artes E Textos, 2000. 531p.
- LEUNG, J.; VALON, C.; MOREAU, B.; BOEGLIN, M.; LEFOULON, C.; JOSHI-SAHA, A.; CHEREL, I. (2012). Mécanisme moléculaire d'action de l'acide abscissique en réponse à la sécheresse chez les végétaux - The ABC of abscisic

acid action in plant drought stress responses. **Biologie Aujourd'hui**. 206, 301-312.

LI J, NAM KH (2002) Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. **Science** 295:1299–1301.

LI J, WANG XQ, WATSON MB, ASSMANN SM. Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. **Science** (2016);287:300–3.

LI L, MCCAIG B, WINGERD B, WANG B, WHATON M, PICHERSKY E, HOWE G (2004) The tomato homo- log of CORONATINE-INSENSITIVE1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. **Plant Cell** 16:126–143.

LI, J., BRADER, G., AND PALVA, E.T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. **Plant Cell** 16, 319-331.

LIU HH, TIAN X, LI YJ, WU CA, ZHENG CC (2008) análise baseada em Microarray de estresse-regulada microRNAs em *Arabidopsis thaliana*. **ARN** 14: 836-843

LIU, G., E.B. HOLUB, J.M. ALONSO, J.R. ECKER AND P.R. FOBERT. 2005. An *Arabidopsis* NPR1-like gene, NPR4, is required for disease resistance. **Plant J.**, 41: 304-318.

LJUNG K, BHALERAO RP, SANDBERG G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. **Plant J** 28(4):465–474.

LOCKHART DJ, DONG H, BYRNE MC, FOLLETTIE MT, GALLO MV, CHEE MS, MITTMANN M, WANG C, KOBAYASHI M, HORTON H, BROWN EL. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nat Biotech.** 1996;14(13):1675-80.

LORENZO, O., AND SOLANO, R. (2005). Molecular players regulating the jasmonate signalling network. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 532-540.

LORENZO, O., CHICO, J.M., SANCHEZ-SERRANO, J.J., AND SOLANO, R. (2004). JASMONATE- INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 16, 1938-1950.

MALA J, MACHOVA P, CVRCKOVA H, KARADY M, NOVAK O, MIKULIK J, DOSTAL J, STRNAD M, DOLEZAL K (2013) The role of cytokinins during micropropagation of wych elm. **Biol Plant** 57:174–178.

MANNERS J, CASU R. Transcriptome Analysis and Functional Genomics of Sugarcane. **Trop Plant Biol.** Springer-Verlag; 2011;4: 9–21. doi: 10.1007/s12042-011-9066-5.

MARCINSKA, I. ET AL. Impact of osmotic stress on physiological and biochemical characteristics is drought-susceptible and drought-resistant wheat genotypes. **Acta Physiologiae Plantarum**, Copenhagen, v. 35, n. 2, p. 451-461, 2013.

MARIN, F. R. ET AL. Sugarcane crop efficiency in two growing seasons in São Paulo State, Brazil. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 43, n. 11, p. 1449-1455, 2008.

MARIOTTI JA. 2002. Selection for sugar cane yield and quality components in subtropical climates. **Sugar Cane International**, March/April, 22–26.

MATSUMURA H, REICH S, REUTER M, KRUGER DH, WINTER P, KAHL G AND TERAUCHI R (2004) SuperSAGE: A Potent Transcriptome Tool for Eukaryotic Organisms Tool for Eukaryotic Organisms. In: San Ming Wang (eds) Current Technologies and Applications. **Horizon Scientific Press**, Norwich, United Kingdom, pp 77-90.

MATSUMURA H.; REUTER M.; KRÜGER D.H.; WINTER P.; KAHL G.; TERAUCHI R. SuperSAGE. **Cellular Microbiology**, 2005. v. 7, n. 1, p. 11-18

MATSUMURA H.; TERAUCHI R.; KAHL G.; WINTER P. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. **BMC Genomics**, 2008.v.9, n.1, p.553-580.

MCGINNIS KM, THOMAS SG, SOULE JD, STRADER LC, ZALE JM, SUN TP ET AL (2003) The Arabidopsis SLEEPY1 gene encodes a putative F-box subunit of an SCF E3 ubiquitin ligase. **Plant Cell** 15:1120–1130.

MEI C, QI M, SHENG G, YANG Y (2006) Inducible overexpression of a rice allene oxide synthase gene increases the endogenous jasmonic acid level, PR gene expression, and host resistance to fungal infection. **Mol Plant Microbe Interact** 19:1127–1137.

MING R, LIU S-C, MOORE PH, IRVINE JE, PATERSON AH. 2001. QTL analysis in a complex autoploid: genetic control of sugar content in sugarcane. **Genome Research** 11: 2075–2084

Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (**MAPA**), <http://www.agricultura.gov.br/>, (15 de Abril de 2015)

MOK DWS, MOK MC (2001) Cytokinin metabolism and action. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 89:89–118.

MOLINA C.L.; ROTTER B.; HORRES R.; UDUPA S.M.; BESSER B.; BELLARMINO L.; BAUM M.; MATSUMURA H.; TERAUCHI R.; KAHL G.; WINTER

P. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. **BMC Genomics**, 2008.v. 9, n. 1.

MOU, Z., FAN, W., DONG, X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. **Cell**, v.113, p.935-944, 2003.

MULLET JE, KLEIN RR, KLEIN PE. 2002. Sorghum bicolor—an important species for comparative grass genomics and a source of beneficial genes for agriculture. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 118–121.

MUNNS, R.; HUSAIN, S. RIVELLI, A. R.; RICHARD, A. J.; CONDON, A. G.; MEGAN, P. L.; EVANS, S. L.; SCHACHTMAN, D. P.; HARE, R.A. Avenues for increasing salt tolerance of crops, and the role of physiologically based selection traits. **Plant and Soil**, v.247, p. 93-105, 2002

NARUSAKA Y, NAKASHIMA K, SHINWARI ZK, SAKUMA Y, FURIHATA T, ABE H, NARUSAKA M, SHINOZAKI K, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2003) Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. **Plant J** 34:137–148.

NI BING-RUI E BRADFORD K.J. Cermination and Dormancy of Absciscic Acid- and Cibberellin-Deficient Mutant Tomato (*Lycopersicon esculentum*) Seeds. (1993) **Department of Vegetable Crops**, University of California, Davis, California 9561 6-863 1.

NILSEN ET, ORCUTT DM (1996) Physiology of plants under stress. **Abiotic factors**. Wiley, New York.

NISHIMURA N, HITOMI K, ARVAI AS, RAMBO RP, HITOMI C, CUTLER SR, ET AL. Structural mechanism of abscisic acid binding and signaling by dimeric PYR1. **Science** 2009;326: 1373–9.

OLIVEIRA, K. M. Desenvolvimento de marcadores moleculares EST-SSRs e mapeamento funcional em cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). 2006. 165 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006.

PARK S-Y, FUNG P, NISHIMURA N, JENSEN DR, FUJII H, ZHAO Y, ET AL. Absciscic acid inhibits Type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. **Science** 2009;324: 1068–71.

PATADE VY, RAI AN, SUPRASSANA P (2010) Expression of a sugarcane shaggy-like kinase (SuSK) gene identified through cDNA subtractive hybridisation in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) **Protoplasma**. doi:10.1007/s00709-010-0207-8.

PATERSON AH, BOWERS JE, CHAPMAN BA. 2004. Ancient polyploidization predating divergence of the cereals, and its consequences for comparative

genomics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** 101: 9903–9908.

PELEG Z, BLUMWALD E (2011) Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Curr Opin Plant Biol** 14:290–295.

PENG J, CAROL P, RICHARDS DE, KING KE, COWLING RJ, MURPHY GP ET AL (1997) The Arabidopsis GAI gene defines a signaling pathway that negatively regulates gibberellin responses. **Genes Dev** 11:3194–3205.

PFAFFL, MW; HORGAN, GW; DEMPLE, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.

PHILLIPS, T. & HOOPES, L. (2008) Transcription factors and transcriptional control in eukaryotic cells. **Nature Education** 1(1):119.

PIERIK R, THOLEN D, POORTER H, VISSER EJW, VOESENEK LACJ (2006) The janus face of ethylene: growth inhibition and stimulation. **Trends Plant Sci** 11:176–183

PIETERSE CM, LEON-REYES A, VAN DER ENT S, VAN WEES SCM (2009) Networking by small molecule hormones in plant immunity. **Nat Chem Biol** 5:308–316.

POTUSCHAK T, LECHNER E, PARMENTIER Y, YANAGISAWA S, GRAVA S, KONCZ C, GENSCHIK P. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. **Cell**. 2003 Dec 12;115(6):679-89.

PRABU G, KAWAR PG, PAGARIYA MC, PRASAD DT (2010) Identification of water-deficit stress-upregulated genes in sugarcane. **Plant Mol Biol Rep**.

PRICE HJ, DILLON SL, HADNETT G, ROONEY WL, ROSS L, JOHNSTON JS. 2005. Genome evolution in the genus *Sorghum* (Poaceae). **Annals of Botany** 95: 219–227.

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.

RAMSAY L, MACAULAY M, DEGLI IVANISSEVICH S, MACLEAN K, CARDLE L, FULLER J, ET AL. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. **Genetics** 156: 1997–2005.

RIBAUT J, PILET P (1994) Water stress and indol-3yl-acetic acid content of maize roots. **Plants** 193(4):502–507.

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.

ROCHA FR, PAPINI-TERZI FS, NISHIYAMA MY JR, VENCIO RZ, VICENTINI R, DUARTE RD, DE ROSA VE, VINAGRE F JR, BARSALOBRES C, MEDEIROS AH, RODRIGUES FA, ULIAN EC, ZINGARETTI SM, GALBIATTI JA, ALMEIDA RS, FIGUEIRA AV, HEMERLY AS, SILVA-FILHO MC, MENOSSI M, SOUZA GM (2007) Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics** 8:71

RODRIGUES F, DE LAIA LM, ZINGARETTI S (2009) Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. **Plant Sci** 176:286–302.

ROSSI M, ARAUJO PG, PAULET F, GARSMEUR O, DIAS VM, CHEN H, ET AL. 2003. Genomic distribution and characterization of EST-derived resistance gene analogs (RGAs) in sugarcane. **Molecular Genetics and Genomics** 269: 406–419.

SAKAI H, AOYAMA T, OKA A (2000) Arabidopsis ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. **Plant J** 24:703–711.

SAKHABUTDINOVA AR, FATKHUTDINOVA DR, BEZRUKOVA MV, SHAKIROVA FM (2003) Salicylic acid prevents the damaging action of stress factors on wheat plants. *Bulg J Plant Physiol* 29:314–319.

SAVCHENKO T, KOLLA VA, WANG CQ, ET AL. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought. **Plant Physiol.** 2014;164:1151–60.

SCHENA M, SHALON D, DAVIS RW, BROWN PO (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science** 270: 467-70.

SCHOPFER P, LISZKAY A, BECHTOLD M, FRAHRY G, WAGNER A (2002) Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth. *Planta* 214:821–828.

SCHWAB KB, SCHREIBER U, HEBER U. Response of photosynthesis and respiration of resurrection plants to desiccation and rehydration. *Planta*. 1989;177:217–27.

SENARATNA T, TOUCHELL D, BUMM E, DIXON K (2000) Acetylsalicylic acid (aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. **Plant Growth Regul** 30:157–161.

SERNA-SALDIVAR S, ROONEY L. 1995. Structure and chemistry of sorghum and millets. In: Dendy DAV, ed. *Sorghum and millets, chemistry and technology*. St Paul, MN: **American Association of Cereal Chemists** 69–124.

SHAKIROVA FM, SAKHABUTDINOVA AR, BEZRUKOVA MV, FATKHUTDINOVA RA, FATKHUTDINOVA DR (2003) Changes in the hormonal status of wheat seedlings induced by salicylic acid and salinity. **Plant Sci** 164(3):317–322.

SHARMA N, ABRAMS SR, WATERER DR (2005) Uptake, movement, activity, and persistence of an abscisic acid analog (80 acetylene ABA methyl ester) in marigold and tomato. **J Plant Growth Regul** 24:28–35.

SHARP FR, XU H, LIT L, WALKER W, APPERSON M, GILBERT DL, GLAUSER TA, WONG B, HERSHEY A, LIU DZ, PINTER J, ZHAN X, LIU X, RAN R. The future of genomic profiling of neurological diseases using blood. **Arch Neurol**. 2006;63(11):1529-36.

SHE J, HAN Z, ZHOU B, CHAI J (2013) Structural basis for differential recognition of brassinolide by its receptors. **Protein Cell** 4:475–482.

SHEARD LB, ZHENG N (2009) Plant biology signal advance for abscisic acid. **Nature** 462:575-576.

SHEARD LB, ZHENG N. Plant biology: signal advance for abscisic acid. **Nature** 2009;462: 575–6..

SHI HT, CHEN L, YE TT, LIU XD, DING KJ, CHAN ZL. Modulation of auxin content in Arabidopsis confers improved drought stress resistance. **Plant Physiol Biochem**. 2014;82:209–17.

SHINOZAKI K AND YAMAGUCHI-SHINOZAKI K (2007) Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **J Exp Bot** 58: 221–227.

SHOJI T, HASHIMOTO T (2011) Tobacco MYC2 regulates jasmonate-inducible nicotine biosynthesis genes directly and by way of the NIC2 -locus ERF genes. **Plant and Cell Physiology** 52:1117–1130.

SKIRYCH A, INZED (2010) More from less: plant growth under limited water. **Curr Opin Biotechnol** 21:197–203.

SMITH CW, FREDERIKSEN RA. 2000. Sorghum: origin, history, technology, and production. New York, NY: **John Wiley and Sons**, 824.

SOMERVILLE C, YOUNGS H, TAYLOR C, DAVIS SC, LONG SP: Feedstocks for lignocellulosic biofuels. **Science** 2010, 329:790-792.

SONG Y, YOU J, XIONG L. Characterization of OsIAA1 gene, a member of rice Aux/IAA family involved in auxin and brassinosteroid hormone responses and plant morphogenesis. **Plant Mol Biol**. 2009 Jun;70(3):297-309.

SPICHAL L (2012) Cytokinins—recent news and views of evolutionally old molecules. **Funct Plant Biol** 39:267–284.

SPOEL SH, MOU Z, TADA Y, SPIVEY NW, GENSCHIK P, DONG X (2009) Proteasome-mediated turnover of the transcription coactivator NPR1 plays dual roles in regulating plant immunity. **Cell** 137:860–872

SPOEL, S.H., J.S. JOHNSON AND X.N. DONG. 2007. Regulation of tradeoffs between plant defenses against pathogens with different lifestyles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 104: 18842-18847.

SREENIVASULU N, SOPORY SK, KAVI KISHOR PB (2007) Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. **Gene** 388:1–13.

SRIPINYOWANICH S, KLOMSAKUL P, BOONBURAPONG B, BANGYEEKHUN T, ASAMI T, GU H, BUABOOCHA T, CHADCHAWAN S (2013) Exogenous ABA induces salt tolerance in indica rice (*Oryza sativa* L.): the role of OsP5CS1 and OsP5CR gene expression during salt stress. **Environ Exp Bot** 86:94–105.

STASWICK P, SU W, HOWELL S (1992) Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:6837–6840.

STASWICK PE, TIRYAKI I (2004) The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in *Arabidopsis*. **Plant Cell** 16:2117–2127

STASWICK PE. JAZing up jasmonate signaling. **Trends Plant Sci.** 2008 Feb;13(2):66-71.

STASWICK, P.E., SU, W., HOWELL, S.H. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.89, p.6837-6840, 1992.

STASWICK, P.E., YUEN, G.Y., AND LEHMAN, C.C. (1998). Jasmonate signaling mutants of *Arabidopsis* are susceptible to the soil fungus *Pythium irregulare*. **Plant J.** 15, 747-754.

SUBRAMANIAM, R., DESVEAUX, D., SPICKLER, C., MICHNICK, S.W., BRISSON, N. Direct visualization of protein interaction in plant cells. **Nature Biotechnology**, v.19, p.769-772, 2001.

SYEED S, ANJUM NA, NAZAR R, IQBAL N, MASOOD A, KHAN NA (2011) Salicylic acid-mediated changes in photosynthesis, nutrients content and antioxidant metabolism in two mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars differing in salt tolerance. *Acta Physiol Plant* 33:877–886.

TAIZ L.; ZEIGER E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre: ARTMED, 2004.719p

TANI T, SOBAJIMA H, OKADA K, CHUJO T, ARIMURA S, TSUTSUMI N, NISHIMURA M, SETO H, NOJIRI H, YAMANE H (2008) Identification of the

OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. **Planta** 227:517–526.

TERAUCHI R, MATSUMURA H, KRÜGER DH, KAHL G. SuperSAGE: The most advanced transcriptoma technology for functional genomics. In: Kahl, Günter; Meksem, Khalid (eds.). **The handbook of plant functional genomics**. 1^a ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, cap. 3, p. 37-54, 2008.

TOPPA. E. V. B.; JADOSKI, C. J.; JULIANETTI, A.; HULSHOF, T.; ONO, E. O.; RODRIGUES, J. D. Aspectos da fisiologia de produção da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.). **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v.3, n.3, p. 215-221, 2010. Disponível em: <http://revistas.unicentro.br/index.php/repaa/article/view/1065/1256>

UEGUCHI-TANAKA M, ASHIKARI M, NAKAJIMA M, ITOH H, KATOH E, KOBAYASHI M ET AL (2005) GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. **Nature** 437:693–698.

UMEZAWA T., NAKASHIMA K., MIYAKAWA T., KUROMORI T., TANOKURA M., SHINOZAKI K., YAMAGUCHI- SHINOZAKI K. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. **Plant Cell Physiol.** 11: 1821 – 1839.

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

VERSLUES PE, AGARWAL M, KATIYAR-AGARWAL S, ZHU J, ZHU JK (2006) Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant J** 45:523–539.

VERT G, CHORY J (2006) Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. **Nature** 441:96–100.

VETTORE AL, DA SILVA FR, KEMPER EL, ARRUDA P. 2001. The libraries that made SUCEST. **Genetic Molecular Biology** 24:1–7.

VETTORE AL, DA SILVA FR, KEMPER EL, SOUZA GM, DA SILVA AM ET AL (2003) Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Res** 13 (12):2725-2735

VLOT AC, DEMPSEY DA, KLESSIG DF (2009) Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu Rev* **Phytopathol** 47:177–206.

WANG B, ZHANG J, XIA X, ZHANG WH (2011) Ameliorative effect of brassinosteroid and ethylene on germination of cucumber seeds in the presence of sodium chloride. **Plant Growth Regul** 65:407–413.

WANG Y, MOPPER S, HASENTEIN KH (2001) Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. **J Chem Ecol** 27:327–342.

WANG ZY, BAI MY, OH E, ZHU JY (2012) Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet* 46:701–724

WASTERNAK C, HAUSE B (2013) Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *annals of botany*. **Ann Bot** 111:1021–1058

WEIGEL, R.R., PFITZNER, U.M., GATZ, C. Interaction of NIMIN1 with NPR1 modulates PR gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.17, p.1279-1291, 2005.

WEST AH, STOCK AM (2001) Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. **Trends Biochem Sci** 26:369–376.

WILD M, DAVIERE JM, CHEMINANT S, REGNAULT T, BAUMBERGER N, HEINTZ D ET AL (2012) The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 is a direct target of MYC2 and modulates jasmonate signaling responses. **Plant Cell** 24:3307–3319.

WILKINSON S, DAVIES WJ (2010) Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. **Plant Cell Environ** 33:510–525.

WILKINSON S, DAVIES WJ. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. **Plant Cell Environ**. 2002;25:195–210.

WILKINSON, S., DAVIES, W.J.: Xylem sap pH increase: a drought signal received at the apoplastic face of the guard cell that involves the suppression of saturable abscisic acid uptake by the epidermal symplast. - **Plant Physiol**. 113: 559-573, 1997.

WU K, BURNQUIST W, SORRELS M, TEW TL, MOORE P, TANKSLEY S. 1992. The detection and estimation of linkage in polyploids using single-dose restriction fragments. **Theoretical and Applied Genetics** 83: 294–300.

WU X, HE J, CHEN J, YANG S, ZHA D (2013) Alleviation of exogenous 6-benzyladenine on two genotypes of egg-plant (*Solanum melongena* Mill.) growth under salt stress. **Protoplasma** 251:169–176.

XIE, D.X., FEYS, B.F., JAMES, S., NIETO-ROSTRO, M., AND TURNER, J.G. (1998). COI1: an Arabidopsis gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. **Science** 280, 1091-1094.

XU, L., LIU, F., LECHNER, E., GENSCHIK, P., CROSBY, W.L., MA, H., PENG, W., HUANG, D., XIE, D. The SCFCOI1 ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in Arabidopsis. *Plant Cell*, v.14, p.1919-1935, 2002.

Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Physiol* 59:225–251

YAN J, LI H, LI S, YAO R, DENG H, XIE Q, XIE D (2013) The Arabidopsis F-box protein CORONATINE INSENSITIVE1 is stabilized by SCFCOI1 and degraded via the 26S proteasome pathway. **Plant Cell Online** 25:486–498.

YAN Z, ZHAO J, PENG P, CHIHARA RK, LI J (2009) BIN2 functions redundantly with other Arabidopsis GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling. **Plant Physiol** 150:710–721.

YANG C-J, ZHANG C, LU Y-N, JIA-QI JIN J-Q, WANG X-L (2011) The mechanisms of brassino-steroids' action: from signal transduction to plant development. **Mol Plant** 4:588–600.

YANG D-H, BALDWIN IT, WU J (2013) Silencing brassinosteroid receptor BRI1 impairs herbivory-elicited accumulation of jasmonic acid-isoleucine and diterpene glycosides, but not jasmonic acid and trypsin proteinase inhibitors in *Nicotiana attenuata*. **J Integr Plant Biol** 55:514–526.

YANG S, HUA J. 2004. A haplotype-specific Resistance gene regulated by BONZAI1 mediates temperature-dependent growth control in Arabidopsis. **Plant Cell** 16:1060–71.

YE H, LI L, YIN Y (2011) Recent advances in the regulation of brassinosteroid signaling and biosynthesis pathways. **J Integr Plant Biol** 53:455–468.

YU, D., CHEN, C., CHEN, Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of NPR1 gene expression. **The Plant Cell**, v.13, 1527-1540, 2001.

YUAN, Y., ZHONG, S., LI, Q., ZHU, Z., LOU, Y., WANG, L., WANG, J., WANG, M., LI, Q., YANG, D., AND HE, Z. (2007). Functional analysis of rice NPR1-like genes reveals that OsNPR1/NH1 is the rice orthologue conferring disease resistance with enhanced herbivore susceptibility. **Plant Biotechnol. J.** 5, 313-324.

ZHANG J, JIA W, YANG J, ISMAILAM (2006) Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crop Res** 97:111–119.

ZHAO HJ, LIN XW, SHI HZ, CHANG SM (1995) The regulating effect of phenolic compounds on the physiological characteristics and yield of soybeans. **Acta Agron Sin** 21:351–355.

ZHAO Y, WANG T, ZHANG W, LI X (2011) SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in Arabidopsis. **New Phytol** 189(4):1122–1134.

ZHOU, J.M., TRIFA, Y., SILVA, H., PONTIER, D., LAM, E., SHAH, J., AND KLESSIG, D.F. (2000). NPR1 differentially interacts with members of the TGA/OBF family of transcription factors that bind an element of the PR-1 gene required for induction by salicylic acid. **Mol. Plant-Microbe Interact.** 13, 191-202.

ZHU JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. **Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol** 53:247–273.

ZHU Z, GUO H. Genetic basis of ethylene perception and signal transduction in Arabidopsis. *J Integr Plant Biol.* 2008 Jul;50(7):808-15.

ZORB C, GEILFUSB C-M, MUHLINGB KH, LUDWIG-MU "LLER J (2014) The influence of salt stress on ABA and auxin concentrations in two maize cultivars differing in salt resistance. *J Plant Physiol* 170:220–224.