Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

**Identificação e caracterização de genes referentes a fatores de transcrição CBFs
envolvidos na resposta ao frio em cana-de-açúcar**

Gabriel Luis Lima Soares Moreira

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica em Plantas

**Piracicaba
2021**

Gabriel Luis Lima Soares Moreira
Engenheiro Agrônomo

**Identificação e caracterização de genes referentes a fatores de transcrição CBFs envolvidos na
resposta ao frio em cana-de-açúcar**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **HELAINÉ CARRER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestre em Ciências. Área de concentração: Fisiologia e
Bioquímica em Plantas.

Piracicaba
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Moreira, Gabriel Luis Lima Soares

Identificação e caracterização de genes referentes a fatores de transcrição CBFs envolvidos na resposta ao frio em cana-de-açúcar / Gabriel Luis Lima Soares Moreira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2021.

71 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Maturação 2. Estresse abiótico 3. *C-repeat binding factors* 4. ABA
I. Título

AGRADECIMENTOS

Este trabalho só foi possível pela graça de Deus em toda a minha vida.

Pelo amor e inspiração dos meus pais, Ednalva e Cláudio; das minhas irmãs, Livia e Cláudia; do meu amor, Giselle; e das minhas famílias, Lima e Soares Moreira. A vocês agradeço a força e a coragem.

Pelo carinho e dedicação da minha orientadora, Helaine Carrer; da minha amiga e parceira de trabalho, Máisa Siqueira; dos meus companheiros e colaboradores Fátima e Ênio. A vocês agradeço a confiança e a estima.

Pela atenção e acolhimento dos meus amigos do laboratório, Aline, Ingrid, Juliana, Perla e Fernando, e aos meus amigos de república. A vocês agradeço a persistência e a calma.

Sou grato pelo fomento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Por fim, quero agradecer a todos meus professores que me acompanharam por toda a vida, inclusive meus pais. Vocês me trouxeram até aqui.

EPÍGRAFE

**“No fim tudo dá certo,
se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”**

Fernando Sabino

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	10
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. CANA-DE-AÇÚCAR FRENTE AOS ESTRESSES ABIÓTICOS.	16
2.2. EFEITOS E RESPOSTAS AO ESTRESSE POR BAIXAS TEMPERATURAS EM PLANTAS.	18
2.3. C-REPEATS BINDING FACTORS/DREB BINDING FACTORS (CBFs/DREBs).....	19
2.3.1. <i>A via de sinalização de CBFs: “CBF regulon”</i>	21
3. OBJETIVO.....	25
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. MATERIAL VEGETAL.	27
4.2. IDENTIFICAÇÃO, ISOLAMENTO E SEQUENCIAMENTO DE GENES REFERENTES A CBFs EM CANA DE AÇÚCAR.	27
4.2.1. <i>Elaboração dos iniciadores para PCR de DNA total de cana-de-açúcar.</i>	27
4.2.2. <i>Extração de fragmentos amplificados do gel de eletroforese.</i>	29
4.2.3. <i>Clonagem dos fragmentos em pJET 1.2/blunt.</i>	30
4.3. IDENTIFICAÇÃO DE DEMAIS SoCBFs A PARTIR DA BUSCA NA PLATAFORMA SUCEST-FUN.....	30
4.4. COMPARAÇÃO DE HOMÓLOGOS E CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	31
4.5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CBFs EM CANA-DE-AÇÚCAR FRENTE A DIFERENTES TRATAMENTOS	32
4.5.1. <i>Exposição ao frio (8 °C) e ao congelamento (-2 °C) para análise da expressão de SoCBFs.</i>	32
4.5.2. <i>Exposição de discos foliares a tratamento com ABA e estresses, salino e hídrico, para análise de expressão específica de SoCBFs.</i>	32
4.5.3. <i>Extração total de RNA das amostras de cana-de-açúcar.</i>	32
4.5.4. <i>Síntese de DNA complementar (cDNA) e análise de expressão por PCR em tempo real (qRT-PCR).</i>	33
4.6. ANÁLISE DE PROMOTORES PREDITOS.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
5.1. DEFINIÇÃO DOS INICIADORES PARA ISOLAMENTO DE GENES CBFs EM CANA-DE-AÇÚCAR.....	35
5.2. ISOLAMENTO, SEQUENCIAMENTO E LOCALIZAÇÃO NO GENOMA DA CANA DE GENES REFERENTES A CBFs.....	36
5.3. COMPARAÇÃO DE HOMÓLOGOS E CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA.....	43
5.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE CBFs EM CANA-DE-AÇÚCAR FRENTE A DIFERENTES TRATAMENTOS.....	45
5.4.1. <i>Em condições de estresse ao frio</i>	45
5.4.2. <i>Em condições de estresse salino, hídrico e ABA.</i>	48
5.4.3. <i>Análise de promotores preditos.</i>	50
6. CONCLUSÕES.....	55
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57
REFERÊNCIAS	59
ANEXOS.....	65

RESUMO

Identificação e caracterização de genes referentes a fatores de transcrição CBFs envolvidos na resposta ao frio em cana-de-açúcar

As plantas evoluíram diversos mecanismos de sensoramento para identificar mudanças no ambiente e de sinalização para melhor responder aos estresses que as afetam. Estresses abióticos em plantas são responsáveis por reduzir a produtividade, o crescimento e promover diversas alterações fisiológicas e bioquímicas. O estresse ao frio se destaca principalmente em regiões temperadas assim como regiões de elevada altitude, limitando geograficamente a distribuição de culturas. A cana-de-açúcar é uma espécie de grande importância econômica para a produção de açúcar e etanol, é cultivada nas regiões tropicais e subtropicais. Baixas temperaturas atuam sobre a maturidade e, consequentemente, sobre a produtividade da cana-de-açúcar, logo torna-se relevante estudar fatores responsivos a este estresse na cultura. Fatores de transcrição *C-repeats/Dehydration responsive element binding factors 1* (CBFs/DREB1s), são considerados chaves para a resposta de estresse ao frio, atuam na regulação de diversos genes *COR* (*cold regulated genes*). Estes fatores ainda não estão identificados na cana-de-açúcar. Logo, objetiva-se neste trabalho identificar e caracterizar genes *CBFs* na cana-de-açúcar (SP80-3280) por meio do seu isolamento e sequenciamento; da análise de expressão frente ao frio (8°C) e ao congelamento (-2°C), como também à exposição ao tratamento de ABA (100 mM), solução salina (200 mM NaCl) e de manitol (200 mM); do alinhamento e comparação com homólogos de demais espécies; e do estudo de sua região promotora predita. Neste estudo, encontrou-se quatro genes do tipo CBF, são estes *SoCBF1-4*. As sequências de aminoácidos de *SoCBF1-2* demonstram pouca similaridade com *SoCBF3-4*, e se encontram em polos distintos na árvore filogenética. Todos apresentaram expressão induzida tanto ao frio quanto ao congelamento, com padrões distintos frente ao tempo de exposição. Em contraste, todos apresentaram inibição em tratamentos com ABA e manitol. *SoCBF2* e *4* tiveram expressões impulsionadas em tratamento salino. O padrão de expressão de *SoCBFs* foi analisado pela caracterização de sua região promotora, onde encontrou-se sítios de ligação CM2, MYB, ABRE, MYC, GCC-box e CArG-box. Este trabalho é um passo importante para projetos futuros a respeito da maturação e produtividade frente a estresses por baixas temperaturas sobre a cana-de-açúcar em uma perspectiva molecular.

Palavras-chave: Maturação, Estresse abiótico, C-repeat binding factors, ABA

ABSTRACT

Identification and characterization of genes in sugarcane referring to CBFs transcription factors involved in the cold response

The plants have evolved mechanisms of sensing to identify environmental changes, and of signaling to better respond to stresses. Abiotic stresses are responsible to reduce their productivity and growth and promoting various physiological and biochemical alterations. The low-temperature stress stands out in temperate and/or high-altitude regions, limiting the geographical distribution of crops. Sugarcane is a crop of high economic relevance cultivated in tropical and subtropical areas for sugar and ethanol productions. The low temperature acts upon the sugarcane maturity and consequently upon its productivity, therefore, it becomes relevant to study the transcription factors responsive to the stress in this crop. The *C-repeats/Dehydration responsive element binding factors 1* (CBFs/DREB1s) are key transcription factors in response to low temperatures, regulating genes *COR* (*cold regulated genes*). These transcription factors are not yet identified on sugarcane. Therefore, this work had the objective to identify and characterize genes *CBFs* in sugarcane by their isolation and sequencing; by the analysis of their expression facing cold stress (8°C) and freezing stress (-2°C), facing treatments of abscisic acid (100 mM ABA), salt (200 mM NaCl) and mannitol (200 mM); by their alignment and comparison with homologs from other species; and last by the study of their predicted promoter region. Here, four *CBFs* genes were found, *SoCBF1-4*. The amino acid sequences of *SoCBF1-2* present low similarity with *SoCBF3-4*, thus located in opposite poles of the phylogenetic tree. All of them presented promotion of expression facing both cold and chilling stress with different patterns according to the exposure time. In contrast, they all had repressed expression facing ABA and mannitol treatments. *SoCBF2 e 4* expressions were promoted in salt treatments. The expression patterns of *SoCBFs* are explained by their predicted promoter region where were found CM2, GCCC-box, CArG-box MYB, MYC, and ABRE binding sites. This work is an important step for future projects about the influence of low temperatures upon sugarcane maturation and productivity under low-temperature stresses from a molecular perspective.

Keywords: Maturation, Abiotic stress, C-repeat binding factors, ABA

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA REPRESENTATIVO DOS EFEITOS DO ESTRESSE A BAIXAS TEMPERATURAS SOBRE ESPÉCIES VEGETAIS.....	13
FIGURA 2. ÁRVORE FILOGENÉTICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA AP2/ERF DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> ORGANIZADAS EM SUBFAMÍLIAS APETAL2, RAV, DREB E ERF, E SEUS SUBGRUPOS: A-1 ATÉ A-6 INDICAM SUBGRUPOS DA SUBFAMÍLIA DREB; B-1 ATÉ B-6 INDICAM SUBGRUPOS DA SUBFAMÍLIA ERF.....	20
FIGURA 3. MODELO PROPOSTO PARA A FUNÇÃO DE CBF2/DREB1C NA ACLIMATAÇÃO AO FRIO E OS EFEITOS SOBRE A EXPRESSÃO DE GENES <i>CBFS</i> QUE RESULTAM NA RESPOSTA A BAIXAS TEMPERATURAS.	23
FIGURA 4. ESQUEMA REPRESENTATIVO DA SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS UTILIZADA PARA ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA PREDITA DE SOCBF1 E SOCBF2.	34
FIGURA 5. ALINHAMENTO GLOBAL DOS ACESSOS UTILIZADOS PARA ELABORAÇÃO DOS INICIADORES (TABELA 1 E 2), UTILIZANDO SEQUÊNCIAS CARACTERÍSTICAS DE GENES <i>CBFS</i>: “PKKP/RAGRKKFR” (AMARELO), ETRHP (VERDE), E DSAWR (AZUL). <i>CONSENSUS</i> É A SEQUÊNCIA GERADA A PARTIR DO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS, CONTENDO OS AMINOÁCIDOS EM CONCORDÂNCIA, REPRESENTADOS POR “.”. OS GAPS, REGIÕES DE DISCORDÂNCIAS REPRESENTADAS POR “-”. DESTACADO EM CINZA ESTÃO OS RESÍDUOS RECORRENTES “PKKP/RAGRKKFR” E DENTRO DE QUADRA. ACESSOS UTILIZADOS : <i>ZEA MAYS</i> (AF450481.1), <i>ORYZA SATIVA</i> (XM_015755426.2; XM_015755442.2; XM_015769271.2), <i>TRITICUM AESTIVUM</i> (AY572831.1), <i>EUCALYPTUS GUNNI</i> (DQ241820.1; DQ241821.1), <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> (NM_118681.4; NM_118679.2; EF523126.1) - E DE POSSÍVEIS CANDIDATOS EM CANA-DE-AÇÚCAR (CA212714.1; CA156028.1). ALINHAMENTO REALIZADO PELO PROGRAMA GENEIOUS PRIME® 2019.2.1. MATRIX BLOSUM65.....	36
FIGURA 6. PCRS ORIUNDOS DOS INICIADORES APRESENTADO NA TABELA 1 E 2: (A) AP2, (B) EGU1, (C) EGU2, (D) CA1, (E) CA2; PARA AS AMOSTRAS DE (1) DNA E (2) CDNA TOTAIS DE CANA-DE-AÇÚCAR (SP80-3280), (3) DNA GENÔMICO DE EUCALIPTO CITRÍDORA (<i>CORYMBIA CITRÍDORA</i>), (4) VETOR DE TRANSFORMAÇÃO CBF1B (CONSTRUÍDO A PARTIR DE <i>EGUCBF1B</i> DE <i>EUCALYPTUS GUNNI</i>), E (5) AMOSTRA EM BRANCO (ÁGUA).....	37
FIGURA 7. PCR DAS DIFERENTES COLÔNIAS DE <i>ESCHERICHIA COLI</i> DH5A™ OBTIDAS APÓS CLONAGEM DE FRAGMENTOS OBTIDOS DE DNA TOTAL DA PCR PARA O PAR DE INICIADORES (A) AP2 (TAMANHO ESPERADO DE 300 PB) E (B) CA2 (360 PB) COM O VETOR PJET1.2/BLUNT., ÁGUA DEIONIZADA COMO CONTROLE NEGATIVO (BR – BRANCO). COMO MARCADOR DE TAMANHO MOLECULAR FOI UTILIZADO 1 KB PLUS LADDER.....	38
FIGURA 8. ANÁLISE DE DOMÍNIOS CONSERVADOS OBTIDOS PELA FERRAMENTA <i>CONSERVED DOMAINS SEARCH</i> (HTTPS://WWW.NCBLNLM.NIH.GOV/STRUCTURE/CDD/WRPSB.CGI). (A) DOMÍNIOS AP2/ERF PRESENTE NO <i>CONTIG</i> "SCGA7_UTI_CNS_0019446"; E (B) "SCGA7_UTI_CNS_0089699"	41
FIGURA 9. ALINHAMENTO GLOBAL DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS REFERENTES AOS GENES PREDITOS "SCGA7_UTI_CNS_0019446.9" E "SCGA7_UTI_CNS_0089699.1" COM A PROTEÍNA ZMDREB1A DE MILHO. DESTACADO EM CINZA ESTÃO OS RESÍDUOS RECORRENTES “PKKP/RAGRKKFR” E DENTRO DE QUADRADOS, AS ASSINATURAS ETRHP E DSAWR PRESENTES EM <i>CBFS</i>. <i>CONSENSUS</i> É A SEQUÊNCIA GERADA A PARTIR DO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS, CONTENDO OS AMINOÁCIDOS EM CONCORDÂNCIA, REPRESENTADOS POR “.”. OS GAPS, REGIÕES DE DISCORDÂNCIAS REPRESENTADAS POR “-”. ALINHAMENTO REALIZADO PELO PROGRAMA GENEIOUS PRIME® 2019.2.1. MATRIX BLOSUM65.....	42
FIGURA 10. ALINHAMENTO GLOBAL DAS SEQUÊNCIAS DE AMINOÁCIDOS REFERENTES AOS GENES PREDITOS "SCGA7_UTI_CNS_0019446.9", "SCGA7_UTI_CNS_0089699.1", "SCACLR1129E10.G", E "SCSFLR2031C10.G" COM A PROTEÍNA ZMDREB1A DE MILHO. DESTACADO EM CINZA ESTÃO OS RESÍDUOS RECORRENTES “PKKP/RAGRKKFR” E DENTRO DE QUADRADOS, AS ASSINATURAS ETRHP E DSAWR PRESENTES EM <i>CBFS</i>. <i>CONSENSUS</i> É A SEQUÊNCIA GERADA A PARTIR DO ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS,	

CONTENDO OS AMINOÁCIDOS EM CONCORDÂNCIA, REPRESENTADOS POR “.”. OS GAPS, REGIÕES DE DISCORDÂNCIAS REPRESENTADAS POR “-”.ALINHAMENTO REALIZADO COM O PROGRAMA GENEIOUS PRIME® 2019.2.1. MATRIX BLOSUM65.43

FIGURA 11. ALINHAMENTO POR IDENTIDADE DE PARES DA SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS DE SOCBF1 COM, SOCBF2 (A), SOCBF3 (B) E SOCBF4 (C); SOCBF2 COM SOCBF3 (D) E SOCBF4 (E); SOCBF3 COM SOCBF4 (F). ALINHAMENTO REALIZADO ATRAVÉS DA FERRAMENTA BLASTP ([HTTPS://BLAST.NCBI.NLM.NIH.GOV/](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)).....44

FIGURA 12. ÁRVORE FILOGÊNÉTICA DE PROTEÍNAS CBFS DE DIFERENTES ESPÉCIES, INCLUINDO SOCBFS AQUI ESTUDADOS. OS RAMOS QUE INCLUEM SOCBFS ESTÃO DESTACADOS EM VERMELHO.45

FIGURA 13. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES *SOCBFS* EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTAS A TEMPERATURA DE CONGELAMENTO (-2 °C) POR QRT-PCR. (A) SOCBF1, (B) SOCBF2, (C) SOCBF3 E (D) SOCBF4. ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA PELO TESTE “T” DE STUDENT COMPARANDO-SE AS MÉDIAS DE CADA TRATAMENTO INDIVIDUALMENTE COM MÉDIAS DO CONTROLE (0 HORAS). *DIFERENÇA ESTATÍSTICA A 95% DE SIGNIFICÂNCIA ($P\text{-VALOR} < 0,05$).46

FIGURA 14. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES *SOCBFS* EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTAS AO FRIO (8 °C) POR QRT-PCR. (A) SOCBF1, (B) SOCBF2, (C) SOCBF3 E (D) SOCBF4. ANÁLISE ESTATÍSTICA REALIZADA ATRAVÉS DO TESTE “T” DE STUDENT COMPARANDO-SE AS MÉDIAS DE CADA TRATAMENTO INDIVIDUALMENTE COM O CONTROLE (0 HORAS). *DIFERENÇA ESTATÍSTICA A 95% DE SIGNIFICÂNCIA ($P\text{-VALOR} < 0,05$).47

FIGURA 15. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE GENES *SOCBFS* EM PLANTAS DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTAS A DIFERENTES TRATAMENTOS (CONTROLE EM CINZA, NaCl EM AZUL, ABA EM VERMELHO E MANITOL EM AMARELO). POR QRT-PCR PARA OS GENES (A) SOCBF1, (B) SOCBF2, (C) SOCBF4 E (D).49

FIGURA 16. ANÁLISE DA REGIÃO PROMOTORA PREDITA PARA (A) *SOCBF1* E (B) *SOCBF2* E SEUS RESPECTIVOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO: ABRE (VERMELHO), MYC (ROSA), CM2 (AMARELO), MYB (AZUL), CARGBOX (DOURADO), GCCBOX (CINZA), TATABOX (CIANO) E CÓDON DE INICIAÇÃO (VERDE).53

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. INICIADORES DEGENERADOS ELABORADOS COM BASE NO PAR “AP2 + SIGNATURES”, E ADAPTADOS A PARTIR DE ASSINATURAS CARACTERÍSTICAS DE CBFS, ETRHP E DSAWR, E DE SEQUÊNCIAS REFERENTES A RESÍDUOS RECORRENTES, “PKKP/RAGRKKFR”.....	28
TABELA 2. INICIADORES E SUAS RESPECTIVAS PROGRAMAÇÕES PARA PCR ELABORADOS COM BASE NOS ACESSOS DE POSSÍVEIS CBFS EM CANA-DE-AÇÚCAR, CA212714.1 E CA156028.1 (NCBI), E DE CBFS EM EUCALYPTUS GUNNI, DQ241820.1 E DQ241821.1 (NCBI) DE EGUCBF1A E EGUCBF1B, RESPECTIVAMENTE. DESENHADOS UTILIZANDO COMO REFERÊNCIA ASSINATURAS CARACTERÍSTICAS DE CBFS, ETRHP E DSAWR, E DE SEQUÊNCIAS REFERENTES A RESÍDUOS RECORRENTES, “PKKP/RAGRKKFR”.	29
TABELA 3. INICIADORES REFERENTES AO VETOR PJET1.2/BLUNT E A PROGRAMAÇÃO DO PCR UTILIZADOS PARA IDENTIFICAR A PRESENÇA DO FRAGMENTO CLONADO E INSERIDO EM CÉLULAS COMPETENTES DH5A™.	30
TABELA 4. ACESSOS UTILIZADOS PARA COMPARAÇÃO POR ALINHAMENTO E CONSTRUÇÃO DE ÁRVORE FILOGENÉTICA COM SOCBS IDENTIFICADOS E TRADUZIDOS.	31
TABELA 5. INICIADORES E SEUS RESPECTIVOS GENES ALVO PARA REAÇÕES DE QRT-PCR.	33
TABELA 6. CONTIGS OBTIDOS ATRAVÉS DO ALINHAMENTO POR BLASTN DAS SEQUÊNCIAS ORIUNDAS DAS DIFERENTES COLÔNIAS RECOMBINANTES, OU SEJA, DAS SEQUÊNCIAS ISOLADAS PARA OS PARES DE INICIADORES AP2 E CA2.	39
TABELA 7. SEQUÊNCIAS OBTIDAS PELO ALINHAMENTO DE “SCGA7_UTI_CNS_0089699” E “SCGA7_UTI_CNS_0019446” POR BLASTN SEM ESPECIFICAÇÃO DO ORGANISMO.....	40
TABELA 8. SÍTIOS DE LIGAÇÃO PRESENTES NA REGIÃO PROMOTORA PREDITA DE SOCBF1 E SOCBF2.	51

1. INTRODUÇÃO

Diferente dos animais, as plantas são organismos sésseis que não podem se afastar das condições ambientais adversas, procurar um local sombreado em dias quentes ou se expor ao Sol durante os dias frios. Mas se engana quem as vê como meras vítimas indefesas destes fatores externos. As plantas evoluíram mecanismos de sensoriamento para identificar mudanças no ambiente e de sinalização para melhor responder aos estresses que as “atacam”, com o objetivo de sobrevivência e de se manter no ambiente.

Estresse abiótico é definido como o impacto negativo de fatores “não-vivos” em seres vivos no ambiente, como exemplo temos a mudança de temperatura, secas e alagamentos, a salinidade dos solos assim como a deposição de compostos tóxicos. Aos estresses abióticos credita-se um grande risco à segurança alimentar mundialmente, considerado fator chave e determinante da produtividade (GONG *et al.*, 2020), o que ainda se agrava no atual contexto de alterações climáticas, especialmente nos trópicos onde a tendência é que se agrave as secas, as chuvas intensas e com elas alagamentos, a salinização dos solos, as ondas de calor e quedas bruscas de temperatura (CAI *et al.*, 2014; PORTER *et al.*, 2015).

Estresses abióticos causam mudanças fisiológicas, moleculares e bioquímicas que resultam em mudanças no crescimento e desenvolvimento vegetal. Para contorná-los são utilizados diferentes manejos culturais, estratégias de melhoramento e estratégias de engenharia genética. O último, permite a produção de transgênicos com expressões alteradas de um gene de interesse, acarretando alterações bioquímicas e fisiológicas, por exemplo. Reforça-se a importância ecológica do uso de transgênicos, ao passo que plantas mais resistentes e tolerantes demandam menor consumo de água e fertilizantes (ZHU, 2016), tornando-se ferramentas essenciais para uma agricultura sustentável. Entretanto, tolerância a um determinado estresse abiótico é um fenótipo consequente da ação de diversos genes. Logo, o estudo da expressão diferencial de fatores de transcrição se torna de suma importância sobre seus efeitos na geração de novos fenótipos como tolerantes a estresses abióticos. Fatores de transcrição são proteínas que atuam sob a transcrição - impulsionando ou reprimindo - de diversos genes, atuando, portanto, em um espectro maior de processos biológicos.

Dentre os estresses abióticos, destaca-se o estresse térmico caracterizado por variações na temperatura, tanto por sua elevação (estresse ao calor) quanto para o seu caimento (estresse ao frio). Perceber estas variações é fundamental para a plantas medirem corretamente seu crescimento e desenvolvimento frente as diferentes estações, como também para se aclimatar em flutuações térmicas de curto período. A temperatura do ambiente tem grande influência sobre a disponibilidade de água e sobre condições químicas no solo (LAMERS; VAN DER MEER; TESTERINK, 2020), e consequentemente afeta em uma variedade de fatores fisiológicos das plantas como o crescimento de raízes e brotos, florescimento, produtividade de frutos, grãos e sementes, além de afetar a sensibilidade das plantas frente a patógenos (QUINT *et al.*, 2016). Além de também afetar fatores bioquímicos uma vez que a temperatura é capaz de alterar as propriedades físicas de todas as moléculas, alterando por exemplo a atividade e propriedades de enzimas e demais proteínas, como também a composição e logo a fluidez de membranas (QUINT *et al.*, 2016). Portanto, são necessários mecanismos vegetais para percepção de flutuações térmicas para que se antecipe maiores danos devido a este estresse (FINKA *et al.*, 2012). E para isso, as plantas possuem elaborados sistemas moleculares de percepção e sinalização de modo que permita a melhor resposta frente a temperaturas distantes do ótimo para seu desenvolvimento (FINKA *et al.*, 2012).

Frente ao estresse por baixas temperaturas, as plantas superiores possuem diversos mecanismos de respostas que partem de genes regulados pelo frio (*cold regulated genes* ou COR) (Figura 1). Uma resposta comum dos

genes *COR* é a produção de enzimas para a biossíntese de osmólitos, proteínas crioprotetoras e açúcares solúveis (Figura 1), reparando o enrijecimento de membranas além de estabilizar o potencial osmótico celular (Figura 1) (JAGLO *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 1998; STOCKINGER; GILMOUR; THOMASHOW, 1997). *C-repeats Binding Factors/Dehydration responsive element binding factors 1* (CBFs/DREB1s) são fatores de transcrição chave para resposta de estresse ao frio, atuando na regulação de diversos genes *COR* (CHO *et al.*, 2017). ZHAO *et al.* (2016) demonstraram que CBFs/DREB1s estão envolvidos na regulação de 414 *COR*, dos quais 346 são ativados por CBFs/DREB1s e 68 são reprimidos. CBFs possuem domínios de vinculação de DNA característicos dos “*ethylene-responsive element-binding factors*” (ERF) e da “*floral homeotic protein*” (APETALA 2 - AP2), pertencendo, portanto, à família de fatores de transcrição AP2/ERF (SAKUMA *et al.*, 2002).

Figura 1. Esquema representativo dos efeitos do estresse a baixas temperaturas sobre espécies vegetais.

Fonte: próprio autor.

Os fatores de transcrição *CBFs* ainda não estão identificados na cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*). Cultura fundamental da indústria latino-americana, especialmente no Brasil que está entre os maiores produtores mundiais, a cana-de-açúcar serve como matéria-prima para o etanol que movimenta o transporte de diversas mercadorias (MESA *et al.*, 2020). Assim como é a principal cultura para a produção de açúcar, sendo matéria-prima para 80% da produção mundial (RODY *et al.*, 2019). Entretanto, sua produção, como a de qualquer cultura, é limitada devido a exposição a diversos estresses como a seca, o frio e a salinidade dos solos, que limitam também sua distribuição geográfica (DEVARUMATH *et al.*, 2019). O estresse hídrico é atuante sobre o amadurecimento da cana, junto a deficiência de nitrogênio e ao estresse causado por baixas temperaturas (ZHAO, DULI; LI, 2015).

A cana é característica do metabolismo C4, distribuindo-se majoritariamente através de áreas tropicais e subtropicais, o que remete à sua susceptibilidade a baixas temperaturas (ZHANG, SHU ZHEN *et al.*, 2006). A este estresse, credita-se a redução do crescimento da cana ao forçar a conversão de seus açúcares reduzidos à sacarose (ZHAO, DULI; LI, 2015), sendo, portanto, agente fundamental sobre o amadurecimento da planta (ALEXANDER, 1973). Inclusive, em regiões tropicais e subtropicais, a colheita da cana é programada conforme a estação seca e de baixas temperaturas, como o inverno brasileiro (CARDOZO; SENTELHAS, 2013).

Devido aos impactos causados pelo estresse a baixas temperaturas sobre a cana-de-açúcar e sua importância sobre a maturidade e produtividade da cultura, buscou-se identificar os genes referentes aos fatores de transcrição CBFs/DREBs em plantas de cana (SP80-3280) através do seu isolamento do DNA total e subsequente sequenciamento; da sua análise de expressão frente ao frio (8°C) e ao congelamento (-2°C), como também à exposição ao tratamento de ABA (100 mM), solução salina (200 mM NaCl) e de manitol (200 mM); do seu alinhamento e comparação com homólogos de demais espécies; e do estudo de sua região promotora predita. Este trabalho é um passo importante para projetos futuros a respeito da maturação e produtividade da cana-de-açúcar sobre uma perspectiva molecular quanto aos efeitos das baixas temperaturas sobre a cultura.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar frente aos estresses abióticos.

A cana-de-açúcar pertence ao gênero *Saccharum* L., da tribo Andropogoneae, família Poaceae. A cana possui um genoma haplóide de cerca de 1Gpb, entretanto, cultivares modernos derivados do cruzamento entre *S. officinarum* L. e *S. spontaneum* L. são poliplóides e atingem cerca de 130 cromossomos distribuídos entre aproximadamente 12 grupos homólogos, com o genoma próximo de 10 Gpb (RIÑO-PACHÓN & MATTIELLO, 2017; D'HONT *et al.*, 1996). A cana-de-açúcar é cultura fundamental da indústria latino-americana, especialmente no Brasil que está entre os maiores produtores mundiais, servindo como matéria-prima para o etanol que movimenta o transporte de diversas mercadorias (MESA *et al.*, 2020). Também é a principal cultura para a produção de açúcar, sendo matéria-prima para 80% da produção mundial (RODY *et al.*, 2019). Entretanto, sua produção, assim como de demais culturas, é limitada devido a exposição a diversos estresses como a seca, o frio e a salinidade dos solos, que limitam também sua distribuição geográfica (DEVARUMATH *et al.*, 2019).

A região brasileira com a maior produção da cana-de-açúcar é o Centro-Sul, contribuindo com cerca de 85% da produção no país (CONAB, 2020). Com destaques para os estados de São Paulo, maior produtor, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul (CONAB, 2020). Ainda assim, esta região está suscetível a diversos estresses como períodos de seca na última década (DA SILVA BARROS *et al.*, 2019).

A seca é considerado o maior limitante à produção da cana-de-açúcar, acompanhada do estresse causada por extremas temperaturas (DEVARUMATH *et al.*, 2019). Os efeitos da seca sobre a cana-de-açúcar são dependentes do seu estágio de crescimento, do nível e duração do estresse (DEVARUMATH *et al.*, 2019). A desidratação durante as fases iniciais e medianas do desenvolvimento afetam a produtividade, reduzindo rendimento de açúcar, ao passo que uma desidratação moderada nas fases finais favorece o acúmulo de açúcar nos talos (ZHAO, DULI; LI, 2015). Diversas estratégias de manejo são utilizadas para contornar o estresse hídrico, alguns exemplos mais recentes são a exposição prévia ao estresse (KHONGHINTAISONG *et al.*, 2018, MARCOS *et al.*, 2018), a aplicação de óxido nítrico (SILVEIRA *et al.*, 2017, SILVEIRA *et al.*, 2019), a associação com microrganismos do solo (PEREIRA *et al.*, 2019).

Diversos trabalhos indicam a possibilidade de se traçar estratégias de biotecnologia, almejando a geração de variedades de cana mais tolerantes a estresses (AUGUSTINE *et al.*, 2015; LEMBKE *et al.*, 2012; RODRIGUES; DE LAIA; ZINGARETTI, 2009; XUE; LOVERIDGE, 2004; ZHAO, XIAOWEN; JIANG; *et al.*, 2020; ZHAO, XIAOWEN; LIU; *et al.*, 2020). Como a superexpressão do gene *AtDREB2A CA* de *Arabidopsis* na variedade RB855156 de cana, que apresentou a expressão e repressão diferencial de diversos genes que conferiram maior tolerância à seca aos transgênicos, demonstrando assim a existência de um homólogo de *AtDREB2A CA* em cana-de-açúcar (XUE; LOVERIDGE, 2004). Ademais, RODRIGUES; DE LAIA & ZINGARETTI (2009) encontraram 165 genes diferencialmente expressos relacionados à tolerância ao estresse hídrico ao investigar 3575 ESTs de um cultivar tolerante à seca. Também, LEMBKE *et al.*, (2012) por matriz de oligonucleotídeos, identificaram 987 genes diferencialmente expressos em amostras do cultivar SP90-1638 submetidas a diferentes tempos de exposição à seca.

Outra estratégia utilizada para contornar a seca é o uso da agricultura irrigada. Entretanto, a irrigação acarreta salinização a longo prazo através da deposição de sais no solo, causando a redução do potencial osmótico e redução de água disponível no solo, além da toxidez por sódio e cloreto em plantas (DIAS; BLANCO, 2010). Os efeitos da salinidade também atuam sobre a eficiência fotossintética, ao afetar o potencial hídrico e osmótico de toda a planta como também a nível celulares (MUNNS; TESTER, 2008). Estudos *in vitro* detectaram exsudação de sais a

partir dos calos de cana em tratamentos salinos acompanhado da inibição do crescimento e redução da viabilidade celular, ao passo que os controles apresentaram maior concentração do íon K^+ e sem disfunções no seu desenvolvimento, demonstrando que a cana possui natureza glicofítica, ou seja, são sensíveis à salinidade (PATADE; BHARGAVA; SUPRASANNA, 2009). O estresse salino afeta tanto quantitativamente quanto qualitativamente a produção de cana, assim reduzindo o acúmulo e a qualidade de açúcar no talo (AKHTAR; WAHID; RASUL, 2003).

O cultivo da cana-de-açúcar no Centro-Sul também enfrenta o estresse causado por baixas temperaturas. Por exemplo, as geadas podem ocorrer com frequência em regiões de latitude acima do paralelo 20 °S, abrangendo desde Minas Gerais, Mato Grosso do Sul indo até o Rio Grande do Sul (MOISÉS *et al.*, 2016). Também devido a susceptibilidade da cana a baixas temperaturas, sua produção é limitada no estado mais ao Sul do país, sendo o Rio Grande do Sul o estado com a menor produção e produtividade (CONAB, 2020). A cana é característica do metabolismo C4, distribuindo-se majoritariamente através das áreas tropicais e subtropicais, o que remete à sua susceptibilidade a baixas temperaturas (ZHANG, SHU ZHEN *et al.*, 2006). A este estresse credita-se a redução do crescimento da cana ao forçar a conversão de seus açúcares reduzidos a sacarose, logo também é agente fundamental sobre o amadurecimento da planta (ZHAO, DULI; LI, 2015; ALEXANDER, 1973).

O estresse por baixas temperaturas é atuante sobre o amadurecimento da cana, junto a deficiência de nitrogênio e ao estresse hídrico (ZHAO, DULI; LI, 2015). Inclusive, em regiões tropicais e subtropicais, a colheita da cana é programada conforme a estação seca e de baixas temperaturas, como o inverno brasileiro (CARDOZO; SENTELHAS, 2013). O estresse por baixas temperaturas também mostram efeitos sobre a fotossíntese, o que pode ser observado nas maiores concentrações dos aminoácidos aspartato e alanina em folhas de cana expostas a 10 °C (Y. C. DU *et al.*, 1999, Y. C. DU *et al.*, 1999), além de existir evidências que as enzimas ortofosfato-di-quinase (PPDK) e NAD-malato desidrogenase (NADP-MDH) atuarem como chaves na regulação à sensibilidade ao frio durante a fotossíntese (DEVARUMATH *et al.*, 2019).

Assim como para o estresse hídrico, ao estresse por baixas temperaturas há grandes possibilidades de se traçar estratégias biotecnológicas. NOGUEIRA *et al.* (2003) identificaram 34 ESTs induzidos pela exposição ao frio analisando o transcriptoma da variedade de cana SP80-3280. Dentre estes estão genes relacionados à síntese de celulose, assim como fatores de transcrição como *JsNAC23*, envolvido no crescimento e desenvolvimento de cana-de-açúcar durante estresses bióticos e abióticos (OLSEN *et al.*, 2005).

Diante do exposto, fica claro que o estresse ao frio, e os mecanismos envolvidos em sua resposta, possui papel no desenvolvimento e crescimento da cana, principalmente durante sua maturação. Logo, torna-se de grande interesse o estudo de genes envolvidos na resposta a baixas temperaturas em cana-de-açúcar, frente sua influência sobre o acúmulo de açúcares e sua maturação, afetando a produtividade da cultura.

O genoma da cana-de-açúcar é particularmente complexo, sendo ele redundante e carregar múltiplas cópias de seus genes (SOUZA *et al.*, 2019). Supõe-se que devido a eventos independentes de poliploidização sobreposto a uma duplicação de todo o genoma desde a diversificação das gramíneas (VILELA *et al.*, 2017). Além do mais, as cultivares de cana são híbridos, contendo 80-85% de seu genoma oriundo de *Saccharum officinarum*, 10-15% de *Saccharum spontaneum*, e 5% de cromossomos recombinados entre seus progenitores (D'HONT, 2005; JANNOO *et al.*, 1999). Toda a complexidade de seu genoma somada ao seu tamanho (estimado em >10 Gb) resultam em grandes dificuldades no seu sequenciamento e caracterização de seus genes (SOUZA *et al.*, 2019; THIRUGNANASAMBANDAM; HOANG; HENRY, 2018).

2.2. Efeitos e respostas ao estresse por baixas temperaturas em plantas.

Estresses abióticos em plantas são responsáveis por reduzir a produtividade, o crescimento e promover diversas alterações fisiológicas e bioquímicas. Dentre estes, o estresse ao frio se destaca principalmente em regiões temperadas e em regiões de elevada altitude (acima de 1600 metros), sendo o principal fator limitante à produtividade de diversas culturas nestas regiões. Este estresse tem seu efeito de acordo com sua intensidade e o tempo de exposição, afetando o metabolismo celular a partir da alteração da expressão gênica e os produtos proteicos (SANGHERA *et al.*, 2011). Incluem-se o estresse ao frio (0 – 15°C) e ao congelamento (<0°C). O primeiro se caracteriza por limitações ao crescimento e desenvolvimento com efeitos celulares como o enrijecimento de membranas, a desestabilização de complexos proteicos, a redução da atividade de algumas enzimas (YE *et al.*, 2019), a expressão gênica e síntese proteica, além de favorecer a formação de estruturas secundárias de RNA (RUELLAND *et al.*, 2009; RAJKOWITSCH *et al.*, 2007). Considera-se o congelamento mais danoso e crítico às plantas devido a formação de cristais de gelo no apoplasto, que induzem o efluxo de água e, assim, a desidratação celular (PEARCE, 2001).

Plantas originárias de regiões temperadas como o centeio (*Secale cereale* L.), a cevada (*Hordeum vulgare*) e a aveia (*Avena sativa*) são mais tolerantes ao estresse por frio em diferentes níveis devido ao fato de possuírem um sofisticado mecanismo de aclimação (SHI; DING; YANG, 2018). A aclimação consiste do processo onde um sinal induzido por baixas temperaturas parte da membrana ao núcleo, com a indução/repressão de genes responsivos ao frio (*cold regulated genes* ou *COR*), gerando alterações do metabolismo vegetal a fim de prover maior tolerância ao estresse (SHI; DING; YANG, 2018). Este processo é comumente utilizado em manejos agrônômicos, onde as plantas são expostas a temperaturas próximas ao do congelamento para que assim lhes confira maior tolerância a baixas temperaturas no campo (WARDLAW, 1972). Entretanto, plantas tropicais e subtropicais – entre elas importantes culturas como o arroz (*Oryza sativa*), milho (*Zea mays*), tomate (*Solanum lycopersicum*), soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium hirsutum*) e cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*) - são deficitárias de um bom mecanismo de aclimação ao frio (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007), limitando seu cultivo geograficamente. Principalmente em cultivos perenes e anuais, como a cana-de-açúcar, que perpassam as estações do ano. Efeitos comum do frio sob as plantas tropicais são a clorose, a necrose e o retardo no crescimento (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007).

O estresse ao frio afeta a rigidez das membranas, desestabiliza complexos proteicos e prejudica a fotossíntese (RUELLAND *et al.*, 2009). As principais, e iniciais, alterações sob efeito das baixas temperaturas ocorrem na membrana celular, onde os efeitos são sentidos pela desidratação causada pelo frio (SANGHERA *et al.*, 2011). Inclusive, o início das respostas, ou seja, a percepção ao estresse é creditado ao aumento da rigidez das membranas celulares (ÖRVAR *et al.*, 2000). Afinal, uma das funções chave da aclimação é atenuar o efeito do frio sobre essas estruturas partindo da expressão de genes *COR* (THOMASHOW, 2010; COOK, 2004; ZARKA *et al.*, 2003; JAGLO-OTTOSEN *et al.*, 1998).

Exemplos de *COR* são os genes *LOW-TEMPERATURE INDUCED* (LTI), *RESPONSIVE TO DESICCATION* (RD), *EARLY DEHYDRATION-INDUCIBLE* (ERD) e *COLD INDUCIBLE* (KIN) (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007). Uma resposta comum dos genes *COR* é a produção de enzimas para a biossíntese de osmólitos, proteínas crioprotetoras e açúcares solúveis, reparando o enrijecimento de membranas além de estabilizar o potencial osmótico celular (JAGLO *et al.*, 2001; LIU *et al.*, 1998; STOCKINGER; GILMOUR; THOMASHOW, 1997). A regulação dos genes *COR* partem principalmente de fatores de transcrição do tipo CBFs/DREB1s (ZHAO, CHUNZHAO *et al.*, 2016).

2.3. C-repeats Binding Factors/DREB binding factors (CBFs/DREBs).

CBFs/DREBs (ou apenas CBFs) são fatores de transcrição chave para resposta de estresse ao frio, atuando na regulação de diversos genes *COR* (CHO *et al.*, 2017). ZHAO *et al.* (2016) demonstraram que CBFs estão envolvidos na regulação de 414 *COR*, dos quais 346 são ativados por CBFs e 68 são reprimidos. CBFs possuem domínios de ligação de DNA característicos dos “*ethylene-responsive element-binding factors*” (ERF) e da “*floral homeotic protein*” (APETALA 2 - AP2), pertencendo, portanto, à família de fatores de transcrição AP2/ERF (SAKUMA *et al.*, 2002).

A família *APETALA 2/ethylene-responsive element binding-factor* (AP2/ERF) é composta por fatores de transcrição de plantas onde se incluem majoritariamente as subfamílias: AP2, RAV, ERF e DREB (SAKUMA *et al.*, 2002) (Figura 2). Dentro da família AP2/ERF pode-se caracterizar três grupos quanto a sua estrutura em *Arabidopsis*. AP2 possui dois domínios AP2/ERF, RAV possui apenas um domínio AP2/ERF e também um domínio B3 de ligação ao DNA, enquanto as demais possuem apenas um domínio AP2/ERF, constituídos de 125 membros (SAKUMA *et al.*, 2002). Destes 125 membros, Sakuma *et al.* (2002) analisaram a similaridade dos domínios AP2/ERF, e assim classificou dois grupos: a subfamília DREB e a subfamília ERF. Proteínas da subfamília DREB possuem maior afinidade pela sequência “A/GCCGAC” denominada “*dehydration responsive element*” (DRE) (FUJIMOTO *et al.*, 2000; SAKUMA *et al.*, 2002). Enquanto proteínas da subfamília ERF apresentam maior afinidade pela sequência “AGCCGCC” denominada “*ethylene responsive element*” (ERE) (SAKUMA *et al.*, 2002). Genes de DREB e ERF comumente não apresentam íntrons (SAKUMA *et al.*, 2002), inclusive CBFs (MEDINA *et al.*, 1999). DREB é dividido em seis subgrupos de A-1 a A-6, e ERF também em seis subgrupos B-1 a B-6 (SAKUMA *et al.*, 2002). Por exemplo, CBFs pertencem ao subgrupo A-1 e DREB2s à A-2 (SAKUMA *et al.*, 2002) (Figura 2). Embora DREB1/CBFs e DREB2 ambos sejam relacionados a estresses, o primeiro demonstrou-se estar relacionado às tolerâncias ao frio e à seca, enquanto DREB2A são relacionados a fenótipos de maior tolerância apenas à seca (MARUYAMA *et al.*, 2009).

Figura 2. Árvore filogenética de fatores de transcrição da família AP2/ERF de *Arabidopsis thaliana* organizadas em subfamílias APETALA2, RAV, DREB e ERF, e seus subgrupos: A-1 até A-6 indicam subgrupos da subfamília DREB; B-1 até B-6 indicam subgrupos da subfamília ERF.

Fonte: (SAKUMA *et al.*, 2002).

Logo, podemos definir CBFs como uma classe de fatores de transcrição da família AP2/ERF, pertencentes à subfamília DRE e subgrupo A-1 (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012; SAKUMA *et al.*, 2002; SHI; DING; YANG, 2018), que se ligam a sítios de ligação do tipo *C-repeat* (5'-CCGAC-3'), sendo importantes reguladores da expressão gênica em resposta aos estresses pela salinidade, pela seca e, principalmente, por baixas temperaturas (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012; SAKUMA *et al.*, 2002; SHI; DING; YANG, 2018). Foram encontrados seis membros deste grupo em *Arabidopsis* (HAAKE *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 1998; MEDINA *et al.*, 1999). Entre eles CBF3/DREB1A, CBF1/DREB1B e CBF2/DREB1C são rapidamente induzidos pelo frio (LIU *et al.*, 1998; MEDINA *et al.*, 1999). JIA *et al.* (2016) estudando mutantes triplos de *Arabidopsis* para supressão destes genes, *cbf1,2,3* (*cbfs*), destaca que estes apresentaram menor tolerância ao estresse por frio, à seca e à salinidade, assim como os mutantes *cbf2*, *cbf3* e *cbf1,3* (JIA *et al.*, 2016). Mais da metade dos genes COR apresentam expressão diferencial nos três diferentes mutantes, indicando a redundância entre *CBF3/DREB1A*, *CBF1/DREB1B* e *CBF2/DREB1C* (NOVILLO *et al.*, 2004).

O mutante triplo, *cbfs*, e o duplo mutante *cbf1,2* apresentam ser mais sensíveis ao congelamento após aclimação artificial do que WT e do duplo mutante *cbf1,3* (ZHAO, CHUNZHAO *et al.*, 2016). Sugerindo que CBF2/DREB1C tem maior importância que CBF3/DREB1A e CBF1/DREB1B sobre a tolerância ao congelamento. Neste mesmo trabalho, também sugere-se que sua atuação é equivalente ao caimento da temperatura (ZHAO, CHUNZHAO *et al.*, 2016). Ademais, mutantes duplos *cbf2,3* e mutantes triplos *cbfs* apresentam maior sensibilidade ao

frio, indicando que CBF3/DREB1A, assim como CBF2/DREB1C, apresentam maior importância frente ao estresse (JIA *et al.*, 2016). Isto é reforçado em outro trabalho (NOVILLO; MEDINA; SALINAS, 2007) através do enriquecimento de sítios de ligação *C-repeat* (CRT), onde maior parte dos genes *COR* foram enriquecidos por CBF2/DREB1C e CBF3/DREB1A, indicando que mais genes *COR* são alvos diretos de CBF2/DREB1C e CBF3/DREB1A do que de CBF1/DREB1B. Logo, supõe-se, que a variedade de CBFs, junto as variações dos sítios DRE/CRTs, permitem a sobrevivência e desenvolvimento de espécies vegetais em diversos ambientes frente a estresses de curta e longa duração (SHI; DING; YANG, 2018).

Além dos três CBFs induzidos pelo frio presentes em *Arabidopsis* (CBF1-3), encontra-se CBF4/DREB1D responsivo a ABA e à desidratação (MAGOME *et al.*, 2004), DREB1E/DWARF AND DELAYED-FLOWERING 1 (DREB1E/DDF1 ou CBF5) e DREB1F/DDF2 (ou CBF6) responsivos a alta salinidade (HAAKE *et al.*, 2002). Mutantes para estes genes também apresentam falhas no desenvolvimento quando superexpressados: mutantes de DREB1D/CBF4 apresentam retardo no crescimento (MAGOME *et al.*, 2004), enquanto mutantes de DREB1E/DDF1 e DREB1F/DDF2 possuem níveis reduzidos de giberilina além de fenótipos anão (QIN *et al.*, 2004).

Homólogos de CBF também são encontrados em diversas outras espécies, como em *Zea mays* (DUBOUZET *et al.*, 2003), em *Oryza sativa* (XUE; LOVERIDGE, 2004), *Eucalyptus gunni* (EL KAYAL *et al.*, 2006; NAVARRO *et al.*, 2009), *Solanum lycopersicum* (PATADE *et al.*, 2013; ZHANG, XIN *et al.*, 2004), *Brassica napus* e *Triticum aestivum* (JAGLO *et al.*, 2001), *Secale cereale* (CHO *et al.*, 2017), e até no musgo *Physcomitrella patens* (BADAWI *et al.*, 2007). O número de genes CBFs é pequeno dentro das dicotiledôneas, uma vez que podem chegar até sete em *Brassica napus*, por exemplo, enquanto em uma monocotiledônea como o trigo podem atingir até 25 genes (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012). A persistência de CBF/DREB1s em diversas espécies, indica sua importância frente aos estresses para plantas terrestres (MIZOI; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2012).

2.3.1. A via de sinalização de CBFs: “CBF regulon”.

A via de sinalização de CBFs, denominada “CBF regulon”, é complexa de tal forma, que pequenas alterações podem definir a tolerância de estresse ao frio até mesmo dentro de uma mesma espécie. É o caso da *Arabidopsis*, como demonstrado por ADAMS *et al.* (2016). Analisando 477 acessos de espécies selvagens distribuídas em diversos ambientes, identificaram que a variação das sequências de CBFs está intimamente associada às temperaturas de inverno. Espécies de *Arabidopsis* de ambientes mais quentes apresentam excesso de polimorfismos não-sinônimos em genes CBFs, além de haplotipos associados a climas mais quentes, com códons terminais prematuros e mutações no quadro de leitura (ADAMS *et al.*, 2016). Havendo a influência de pequenas alterações sobre os genes CBFs – logo, também sobre CBF regulon - dentro de uma mesma espécie capazes de gerar diferentes fenótipos de tolerância, pode-se supor que pequenas alterações também possam ser responsáveis pelos diferentes níveis de tolerância entre as diferentes espécies.

Outras mudanças que podemos encontrar em sequências gênicas de CBFs estão presentes na sua região promotora. CBFs são fatores de transcrição e, assim como os genes em que atuam, também possuem sua transcrição reguladas por demais fatores. Em *EgucBF1a* de *Eucalyptus gunni* foi encontrado três sítios de ligação ABRE (*ABA-responsive elemento*), ocasionando em sua maior expressão frente ao hormônio (EL KAYAL *et al.*, 2006). Entretanto, genes CBFs de demais espécies apresentaram ter suas expressões indiferentes a aplicação de ABA. É o caso de *ZmDREB1A* em milho (Qin *et al.*, 2004); CBF1, 2 e 3 em *Arabidopsis* (LIU *et al.*, 1998; MEDINA *et al.*, 1999).

EgucBF1b de *E. gunni* (EL KAYAL *et al.*, 2006). Os *DREB1s* em arroz (DUBOUZET *et al.*, 2003; MOON *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2008).

O etileno, apesar de ter sua relação controversa frente ao estresse por baixas temperaturas, apresenta efeito negativo sobre a transcrição de genes *CBFs* (SHI *et al.*, 2012). Em *Arabidopsis*, a superexpressão do gene de fatores de transcrição ETHYLENE INSENSITIVE3 (EIN3), regulador positivo da via de sinalização de etileno e se ligam aos sítios GCC-box, apresentaram redução de expressão de *CBFs* e genes do tipo-A *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR* (*ARR5*, *ARR7* e *ARR15*) (SHI *et al.*, 2012). Neste mesmo estudo, a superexpressão dos genes *ARRs* conferiu aos mutantes o aumento de tolerância ao congelamento, o que indica um elo entre os hormônios etileno e citocinina na resposta ao estresse.

OPEN STOMATA1 (OST1), conhecida inicialmente por sua função no fechamento de estômatos, pertence à família SNF1-RELATED PROTEIN KINASES2 (SnRK2) e é identificada como a reguladora central da sinalização sob o frio em *Arabidopsis* (DING *et al.*, 2018). Após exposição ao frio, N-MYRISTOYLTRANSFERASE1 (NMT1) promove a acilação de CLADE-E GROWTH-REGULATING2 (EGR2) que induz a atividade de OST1, fosforilando os fatores de transcrição BASIC TRANSCRIPTION FACTOR3 (BTF3) e CBF EXPRESSION 1 (ICE1) (Ye *et al.*, 2019). O fator de transcrição do tipo *MYC-like basic helix-loop-helix* (bHLH), ICE1 de *Arabidopsis*, liga-se aos sítios de ligação MYC (CANNTG) de promotores de CBF1-3 (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007; DING *et al.*, 2015), promovendo suas expressões durante o estresse ao frio. Inclusive, o mutante *ice1* de *Arabidopsis* apresenta fraca tolerância a baixas temperaturas, certamente devido à baixa expressão de genes CBF, e o contrário acontece em mutantes de superexpressão de *ICE1* (CHO *et al.*, 2017).

Também, encontra-se efeitos dos sinais de Ca^{2+} sobre genes *CBFs*. A proteína transmembrana CHILLING TOLERANCE DIVERGENCE1 (COLD1), que é acoplada a subunidade RICE G-PROTEIN α SUBUNIT1 (RGA1), atua como reguladora e está envolvida na percepção do frio em arroz (*Oryza sativa*) (GILLIHAM; ABLE; ROY, 2017). Através do aumento de atividade desta GTPase, aumenta-se o influxo de Ca^{2+} para citosol e, assim, ativando respostas de tolerância ao frio através da indução de genes *ICE1*, e indiretamente *CBFs* (GILLIHAM; ABLE; ROY, 2017).

As respostas a estresses abióticos exibem diferentes níveis frente a intensidade do estresse. Para o estresse ao frio não é diferente, *CBFs* demonstram ter relação com ativadores do tipo CAMTA (*CALMODULIN-BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATOR*) como reguladores de sua expressão em resposta a rápidos caimentos de temperatura. Em *Arabidopsis*, CAMTA3 e CAMTA5 ligam aos sítios CM2 (CGGG-box) presentes nos promotores de *CBFs* (DOHERTY *et al.*, 2009; KIDOKORO *et al.*, 2017; KIM, YONGSIG *et al.*, 2013). Aos ativadores do tipo CAMTA supõe-se que sejam o elo molecular entre o aumento de cálcio no citosol durante exposição ao frio e a atuação de CBF em resposta ao estresse (KIDOKORO *et al.*, 2017). Devido ao fato que o aumento da concentração de cálcio no citosol é sentido por CAMTA através da sua interação com as proteínas calmodulinas, aumentando sua atividade que consequentemente induz a expressão de *CBFs* e demais genes responsivos ao frio (KIDOKORO *et al.*, 2017).

Para aclimação ao frio, assim como em demais processos fisiológicos, a homeostase é de suma importância, e para tal *CBFs* também possui fatores de transcrição que os afetam negativamente. É o caso de MYB15 em *Arabidopsis*, um fator de transcrição do tipo MYB da família R2R3, que atua regulando a expressão de CBF em baixas temperaturas (AGARWAL *et al.*, 2006). Além de MYB15, fatores de transcrição bHLH, PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIFs), atuam negativamente sobre a expressão de *CBFs* em *Arabidopsis* (HARMER, 2009; THOMASHOW, 2010). Com estes fatores de transcrição PIF, expandimos a atuação de CBF diante de um novo efeito do ambiente: o ciclo circadiano.

Através do ciclo circadiano, as plantas podem prever e se antecipar a mudança de um ciclo de temperatura e luminosidade, para que assim possa responder corretamente para sua sobrevivência e permanência no ambiente (CASTILLON; SHEN; HUQ, 2007). PIFs possuem papéis fundamentais na rede de sinalização luminosa mediada por fitocromos (JIANG *et al.*, 2017). Em *Arabidopsis*, PIF4 e PIF7, durante dias longos, reprimem a transcrição de *CBF1* e *CBF2* ao se ligar às regiões G-box (CACGTG) dos respectivos promotores, como também reprimem a transcrição de *CBF3* ligando-se à região E-box (CANNNG) de seu promotor (HARMER, 2009). PIF3 de *Arabidopsis* ao ligar às ambas regiões dos promotores, reprime a expressão de *CBF1-3* na ausência de luz e também em temperaturas de congelamento (DONG; FARRÉ; THOMASHOW, 2011). Outros fatores relacionados ao ciclo circadiano também apresentam efeito sobre a transcrição de *CBFs*, é o caso de CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED (CCA1) e LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), componentes do oscilador central que demonstraram ter efeito positivo sobre a transcrição de *CBFs* de *Arabidopsis* ligando-se aos seus sítios MYB (DONG; FARRÉ; THOMASHOW, 2011). Outro exemplo seria do ativador floral e fator de transcrição SOC1 de *Arabidopsis* que inibe a expressão de *CBFs* ao ligarem aos sítios CArG-box (CWWWWWWWG), tendo efeito negativo sobre a tolerância ao congelamento (KIM, HYOUN JOUNG *et al.*, 2004).

Aumentando ainda a complexidade de *CBF regulon*, encontra-se exemplos da influência dos próprios *CBFs* entre si. Mutantes *cbf2* de *Arabidopsis* apresentaram maior tolerância ao congelamento que plantas selvagens (WT), além de maior tolerância à seca e salinidade (NOVILLO *et al.*, 2004). Este fenótipo se explica pela maior expressão de *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* em plantas de *cbf2*, indicando que *CBF2/DREB1C* tem efeito negativo sobre *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* (NOVILLO *et al.*, 2004) (Figura 3). Adicionalmente, supõe-se que *CBF3/DREB1A* também possui efeito negativo sobre *CBF2/DREB1C*, uma vez que uma expressão reduzida de *CBF3/DREB1A* no mutante *ice1* é acompanhada de maior expressão de *CBF2/DREB1C* (CHINNUSAMY *et al.*, 2003) (Figura 3).

Figura 3. Modelo proposto para a função de *CBF2/DREB1C* na aclimação ao frio e os efeitos sobre a expressão de genes *CBFs* que resultam na resposta a baixas temperaturas.

Fonte: adaptado de Novillo *et al.* (2004)(SAKUMA *et al.*, 2002).

NOVILLO *et al.* (2007) ao caracterizar linhagens antisense e de RNA de interferência (RNAi), que falham no acúmulo de mRNAs de *CBF3/DREB1A* e *CBF1/DREB1B* em *Arabidopsis*, identificaram que *CBF3/DREB1A* e

CBF1/DREB1B possuem efeito aditivo, atuando sobre um mesmo grupo de genes alvos e são, portanto, ambos necessários para a indução de *CBF regulon* e, conseqüentemente, para aclimação ao frio. Ademais, JIA *et al.* (2016) sugere que *CBF regulon* em *Arabidopsis* é composto de dois grupos gênicos: um que necessita da expressão de CBF3/DREB1A ou de CBF1/DREB1B, e outro que necessita da expressão de ambos CBF3/DREB1A e CBF1/DREB1B simultaneamente. HAAKE *et al.* (2002) ao analisar sequenciamentos de RNA (RNA-seq) de diferentes mutantes de *cbf1~3* de *Arabidopsis*, identificaram que 2/3 dos genes COR são co-regulados por dois ou três CBFs/DREBs diferentes, envolvidos principalmente na transdução de sinal celular e em processos metabólicos, e apenas 1/3 eram regulados por apenas um CBF/DREB.

Diante do exposto, fica evidente a complexidade de *CBF regulon*. Fato este que permite que toda a via seja rigidamente controlada e sincronizada para que haja a melhor resposta e no melhor momento à duração e à intensidade de baixas temperaturas, bem como de demais fatores que possam atuar concomitantemente, por exemplo, intensidade luminosa e água disponível.

3. OBJETIVO

No presente trabalho, buscou-se identificar e caracterizar os genes *CBFs/DREB1s* presentes na cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*, cultivar SP80-3280) através de:

1. Identificação no genoma da cana de genes referentes a CBFs; Isolamento e sequenciamento;
2. Comparação com homólogos de demais espécies e construção da árvore filogenética;
3. Análise de expressão diferencial de *CBFs* em cana-de-açúcar frente a diferentes tratamentos:
 - a) Exposição ao frio (8 °C) e ao congelamento (-2 °C) para análise expressão de *CBFs*;
 - b) Exposição de discos foliares a tratamento com ABA e estresses, salino e hídrico, para análise de expressão específica de *CBFs*.
4. Análise de promotores preditos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal.

Todo o material vegetal utilizado para extração de DNA e RNA foi coletado de folhas de plantas de cana-de-açúcar (SP80-3280) crescidas e mantidas em casa de vegetação por 30 dias. Estas plantas foram obtidas através da germinação de gemas de plantas cultivadas previamente na área experimental do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas do Cebtec, Depto de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, na cidade de Piracicaba, São Paulo, Brasil. Todo o material coletado foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido a -80°C.

4.2. Identificação, isolamento e sequenciamento de genes referentes a CBFs em cana de açúcar.

4.2.1. Elaboração dos iniciadores para PCR de DNA total de cana-de-açúcar.

A fim de isolar e identificar os genes CBFs em cana, elaborou-se iniciadores a partir do estudo de sequências de genes dos fatores de transcrição CBFs já identificados em outras espécies – *Zea mays* (AF450481.1), *Oryza sativa* (XM_015755426.2; XM_015755442.2; XM_015769271.2), *Triticum aestivum* (AY572831.1), *Eucalyptus gunni* (DQ241820.1; DQ241821.1), *Arabidopsis thaliana* (NM_118681.4; NM_118679.2; EF523126.1) - e de possíveis candidatos em cana-de-açúcar (CA212714.1; CA156028.1) presentes no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A comparação entre sequências e a construção dos iniciadores foi realizada a partir do alinhamento utilizando o programa MEGA-X (KUMAR *et al.*, 2018), com posterior análise dos iniciadores pelo *OligoPerfect Primer Designer* (<https://apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/>) e sua especificidade testada por *blastn* na plataforma SUCEST-FUN (<http://SUCEST-FUN.org/wsapp/>) frente ao genoma da cana (SP80-3280) (SOUZA *et al.*, 2019).

Os genes CBFs apresentam sequências de assinaturas denominadas ETRHP e DSAWR, e resíduos recorrentes “PKKP/RAGRKKFR” no seu domínio N-terminal que atuam como sinal de localização nuclear (NLS) (EL KAYAL *et al.*, 2006; JAGLO *et al.*, 2001). Utilizando como referência, assinaturas e sequências dos resíduos recorrentes, desenhou-se iniciadores degenerados baseados no par “AP2 + signatures” utilizado por EL KAYAL *et al.* (2006) e adaptados a partir dos acessos citados anteriormente (Tabela 1). A programação da PCR utilizada para estes iniciadores também está descrita na tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores degenerados elaborados com base no par “AP2 + *signatures*”, e adaptados a partir de assinaturas características de CBFs, ETRHP e DSAWR, e de sequências referentes a resíduos recorrentes, “PKKP/RAGRKKFR”.

Iniciadores AP2

Iniciador Direto	5'- GAGACVMGSCACCCBGTGTAC – 3'	(T _m – 61,9 °C)
Iniciador Reverso	5'- CGSSGAGTCYGC GAAGTT – 3'	(T _m – 59,4 °C)
Fragmento esperado	197 pares de bases (pb)	
Programação	5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C, e 30 segundos a 72 °C; por fim, 7 minutos a 72 °C.	

Além dos iniciadores degenerados, foram elaborados iniciadores a partir dos acessos “CA212714.1” e “CA156028.1” de cana-de-açúcar, utilizando ainda as assinaturas e os resíduos recorrentes como referências (Tabela 2). Também se elaborou iniciadores com base nos acessos “DQ241820.1” e “DQ241821.1” de *Eucalyptus gunni* (Tabela 2), uma vez que um dos materiais de comparação que se utilizou foi o vetor de clonagem CBF1b - produzido a partir de um CBF isolado de *Eucalyptus gunni* (cedido pela Dra. Christiane Marque, Université de Toulouse III, Paul Sabatier, França).

Tabela 2. Iniciadores e suas respectivas programações para PCR elaborados com base nos acessos de possíveis CBFs em cana-de-açúcar, CA212714.1 e CA156028.1 (NCBI), e de CBFs em *Eucalyptus gunni*, DQ241820.1 e DQ241821.1 (NCBI) de *EguCBF1a* e *EguCBF1b*, respectivamente. Desenhados utilizando como referência assinaturas características de CBFs, ETRHP e DSAWR, e de sequências referentes a resíduos recorrentes, “PKKP/RAGRKKFR”.

Iniciadores *CBF1 S. officinarum* CA212714.1 (EST/NCBI) – Ca1

Iniciador Direto	5'- GATGGACTGGGCGTACTACG – 3'	(Tm – 60,0 °C)
Iniciador Reverso	5'- CGGGTAGTAGGTGAAGTCGC – 3'	(Tm – 59,9 °C)
Fragmento esperado	526 pb	
Programação	5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C, e 1 minuto a 72 °C; por fim, 7 minutos a 72 °C.	

Iniciadores *CBF1 S. officinarum* CA156028.1 (EST/NCBI) – Ca2

Iniciador Direto	5'- GCGGACCAAGTTCAAGGAGA – 3'	(Tm – 60,0 °C)
Iniciador Reverso	5'- CGTATCTCGTCGTGCCCTG – 3'	(Tm – 60,3 °C)
Fragmento esperado	261 pb	
Programação	5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57 °C, e 30 segundos a 72 °C; por fim, 7 minutos a 72 °C.	

Iniciadores *CBF1a E.gunnii* DQ241820.1 (EST/NCBI) – Egu1

Iniciador Direto	5'- CATCCACTTCACTCCCACCC – 3'	(Tm – 60,0 °C)
Iniciador Reverso	5'- CGAAGATGTCTTCTCGTCG – 3'	(Tm – 60,0 °C)
Fragmento esperado	586 pb	
Programação	5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 58 °C, e 1 minuto a 72 °C; por fim, 7 minutos a 72 °C.	

Iniciadores *CBF1b E.gunnii* DQ241821.1 (EST/NCBI) – Egu2

Iniciador Direto	5'- TTAGCTTCGACTTCGCCGAG – 3'	(Tm – 60,2 °C)
Iniciador Reverso	5'- ATATCTCCGCTGCATTCGG – 3'	(Tm – 60,0 °C)
Fragmento esperado	574 pb	
Programação	5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 57,5 °C, e 1 minuto a 72 °C; por fim, 7 minutos a 72 °C.	

4.2.2. Extração de fragmentos amplificados do gel de eletroforese.

Os iniciadores apresentados no item anterior foram utilizados nos PCR para as seguintes amostras: (1) DNA total e (2) cDNA total de cana-de-açúcar (SP80-3280); (3) DNA total de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), e (4) vetor de clonagem CBF1b. Os fragmentos obtidos na PCR foram identificados em gel de Agarose 1% (p/v) e TAE

1X. Os fragmentos gerados foram transferidos para tubos de 1.5 mL para extração do DNA, seguindo o protocolo e soluções presentes no kit QIAEX® II Gel *Extraction Kit* (QIAGENTM).

4.2.3. Clonagem dos fragmentos em *pJET 1.2/blunt*.

O DNA extraído e purificado do gel de eletroforese foi, então, clonado em vetores de *pJET1.2/blunt* Cloning Vector™ (*Thermo Scientific*, EUA) para identificação de fragmentos com tamanhos esperados gerados pela PCR. O vetor clonado com os fragmentos de interesse foi inserido por transformação através do choque térmico de células competentes *DH5α*™ (*Life Technologies*, EUA). Utilizou-se 1 µL da solução contendo a clonagem dos fragmentos gerados com o vetor *pJET1.2/blunt* foi adicionada ao tubo contendo 100 µL da célula competente *DH5α*™ ainda congelada. Em seguida, incubou-se primeiro por 20 minutos em gelo, em seguida por 1 minuto a 42°C e finalmente por 5 minutos em gelo. A este tubo, foi adicionado 900 µL de meio LB líquido (5 g.L-1 extrato de levedura, 10 g.L-1 cloreto de sódio, 10 g.L-1 triptona, pH 7) e mantido em rotação por 1 hora a 37°C e 220 rpm. Ao fim, centrifugou-se a 6.000 rpm por 30 segundos para retirar 700 µL e suspender o restante. Foi adicionado 50 µL a uma placa de LB com ampicilina (100 µg.L-1) e 150 µL a uma outra placa de mesma composição que foram mantidas a 37°C por 12-18 horas.

As colônias obtidas foram então testadas quanto a presença do vetor clonado por PCR com os iniciadores referentes ao vetor *pJET1.2/blunt* (Tabela 3). O resultado do PCR foi analisado em gel de eletroforese (Agarose 1% (p/v)). Os produtos de PCR selecionados foram sequenciados em um sequenciador 3100 Genetic Analyser (*Applied Biosystems*, EUA) utilizando os iniciadores do vetor (Tabela 3). A programação da PCR utilizada encontra-se na mesma tabela 3.

Tabela 3. Iniciadores referentes ao vetor *pJET1.2/blunt* e a Programação do PCR utilizados para identificar a presença do fragmento clonado e inserido em células competentes *DH5α*™.

<i>pJET1.2/blunt</i> Direto	5'	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC	3'
<i>pJET1.2/blunt</i> Reverso	5'	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG	3'
Programação	5 minutos a 94 °C; 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C, e 1 minuto a 72 °C; por fim, 7 minutos a 72 °C.		

4.3. Identificação de demais *SoCBFs* a partir da busca na plataforma SUCEST-FUN.

A partir do isolamento e sequenciamento dos fragmentos obtidos pelas PCR realizadas, pôde-se identificar no genoma da cana-de-açúcar (SP80-3280) os *contigs* “scga7_uti_cns_0089699” e “scga7_uti_cns_0019446”, utilizando-se da ferramenta *blastn* presente na plataforma SUCEST-FUN. Também por esta plataforma, pôde-se obter os genes preditos para estes *contigs*: “scga7_uti_cns_0089699.1” e “scga7_uti_cns_0019446.9”. Com os genes preditos, realizou-se sua tradução pelo programa *Translate Tool* da plataforma *Expasy* (<https://web.expasy.org/translate/>), confirmando a presença de características de CBFs como as assinaturas ETRHP e DSAWR, e os resíduos recorrentes “PKKP/RAGRKKFR” (QIN et al., 2004).

Entretanto, ambas as sequências de aminoácidos geradas possuem três alterações na assinatura DSAWR, onde Alanina é substituída por Prolina, Triptofano por Arginina, e Leucina por Arginina. Logo, buscou-se acessos com maiores semelhanças na assinatura DSAWR. Através do uso da ferramenta *blastn* da plataforma SUCEST-FUN, utilizando os genes preditos para os *contigs* citados acima e limitando a busca para o banco de dados de ESTs (*expression sequence tags*), assim, obteve-se as sequências “SCACLR1129E10.g” e “SCSFLR2031C10.g” com maiores similaridades na assinatura DSAWR.

Para facilitar a compreensão, denominou-se as sequências “scga7_uti_cns_0089699.1”, “scga7_uti_cns_0019446.9”, “SCACLR1129E10.g”, e “SCSFLR2031C10.g” como CBF1, CBF2, CBF3 e CBF4, respectivamente, como exemplificado a seguir:

“scga7_uti_cns_0089699.1”	=	<i>SoCBF1</i>
“scga7_uti_cns_0019446.9”	=	<i>SoCBF2</i>
“SCACLR1129E10.g”	=	<i>SoCBF3</i>
“SCSFLR2031C10.g”	=	<i>SoCBF4</i>

4.4. Comparação de homólogos e construção da árvore filogenética.

A comparação foi realizada pelo alinhamento de identidade de pares através de *blastn* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) entre as sequências SoCBF1, 2, 3 e 4. A partir da tradução destas sequências de nucleotídeos em sequências de aminoácidos pelo programa *Translate Tool* da plataforma *ExPASy* (<https://web.expasy.org/translate/>), pôde-se compará-los com acessos obtidos no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) através do alinhamento por Blosum65 realizado com a ferramenta Geneious Prime® 2019.2.1. Deste último alinhamento foi possível construir a árvore filogenética sob o método UPGMA utilizando esta mesma ferramenta.

Tabela 4. Acessos utilizados para comparação por alinhamento e construção de árvore filogenética com *SoCBFs* identificados e traduzidos.

Milho	<i>Zea mays</i>	AAN76804.1
Arroz	<i>Oryza sativa</i>	XP_015610912.1; XP_015610928.2; XP_015624757.1
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>	AAT76662.1
Centeio	<i>Secale cereale</i>	AAL35759.1
Cevada	<i>Hordeum vulgare</i>	AAM13419.1
Tomate	<i>Solanum lycopersicum</i>	ASK51848.1
Eucalipto	<i>Eucalyptus gunni</i>	ABB51637.1; ABB51638.1; ACF15446.1; ACF15447.1
Colza	<i>Brassica napus</i>	ACL12046.1
Arabidopsis	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP_567721.1; NP_567719.1; ABV27154.1; NP_200012.1; NP_191274.1; NP_172721.1

4.5. Análise de expressão diferencial de *CBFs* em cana-de-açúcar frente a diferentes tratamentos

4.5.1. Exposição ao frio (8 °C) e ao congelamento (-2 °C) para análise da expressão de *SoCBFs*.

Gemas de cana-de-açúcar foram colocadas para brotação e cultivadas em casa de vegetação por 30 dias, 30 plantas fenotipicamente uniformes foram submetidas a 8 °C. Cinco repetições foram utilizadas para cada tratamento (2, 4, 12 e 24 horas de exposição) e cada repetição é referente a uma planta de cana-de-açúcar. O controle consistiu em cinco repetições, plantas ainda na casa de vegetação (25 °C) no início da manhã, ou seja, não expostas ao frio (logo, denominadas 0 horas).

Como já exposto anteriormente, espera-se comportamentos variados de expressão de *CBFs* frente à intensidade do frio e ao tempo de exposição. Portanto, realizou-se adicionalmente a exposição de outras 30 plantas de cana-de-açúcar à temperatura de congelamento (-2 °C), também mantidas. Cinco repetições foram utilizadas para cada tratamento (15 e 30 minutos, 2 e 4 horas de exposição) e cada repetição é referente a uma planta de cana-de-açúcar. O controle também consistiu em cinco repetições, plantas ainda na casa de vegetação (25 °C) no início da manhã, ou seja, não expostas ao frio (logo, denominadas 0 horas).

Foram coletadas amostras de 200 mg de tecido foliar do terço médio da terceira folha totalmente expandida de todas as repetições, para ambos os experimentos. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.5.2. Exposição de discos foliares a tratamento com ABA e estresses, salino e hídrico, para análise de expressão específica de *SoCBFs*.

A fim de avaliar a especificidade da resposta dos candidatos a *CBFs*, dez discos foliares (1 cm²) coletados de folhas totalmente expandidas de cana foram incubadas em diferentes meios: 1) em água destilada suplementada com 200 mM NaCl para simular estresse salino; 2) em água destilada suplementada com ácido abscísico (ABA) (100 µM ABA); 3) em solução com manitol (200 mM manitol) para simular estresse hídrico. Todos os tratamentos foram avaliados aos 30 minutos, 2 e 24 horas no escuro e em temperatura ambiente. Os tratamentos controles consistiram em discos foliares incubados pelos mesmos períodos e condições, porém em água destilada. Cada repetição consistiu em duas amostras de discos foliares (200 mg), as quais foram congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

4.5.3. Extração total de RNA das amostras de cana-de-açúcar.

O método de extração de RNA total utilizado foi a partir do reagente TRIzol™ (*Thermo Fisher*, 15596026) seguindo o protocolo do fabricante e o RNA foi resuspendido em 20 µL de água estéril DEPC (0,01%). Em seguida, quantificou-se as amostras por sua concentração pelo espectrofotômetro do tipo *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*, EUA), e, pelo mesmo, avaliou-se a qualidade e pureza das amostras (parâmetros 260/280 e 260/230). A qualidade de possível degradação também foi avaliada em gel de eletroforese (1% de agarose (p/v)).

Ao fim, tratou-se as amostras com DNase (*RQ1 DNase*), onde foi adicionado 1 μL de *RQ1-RNase-free DNA* para até 2 μg de RNA. A solução final foi preenchida com água deionizada para obter o volume final de 8 μL . Esta, então, foi incubada a 37 °C por 30 minutos e em seguida adicionou-se 1 μL de *RQ1-DNase stop solution*. Incubou-se as amostras por 10 minutos a 65 °C, e repetiu-se a quantificação e qualificação das amostras pelo NanoDrop.

4.5.4. Síntese de DNA complementar (cDNA) e análise de expressão por PCR em tempo real (qRT-PCR).

Após o tratamento das amostras de RNA, iniciou-se a síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa. Para tal, utilizou-se o protocolo e reagentes do kit *SuperScriptTM III – First Strand* (InvitrogenTM).

Para a síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa, utilizou-se o protocolo e reagentes do kit *SuperScriptTM III – First Strand* (InvitrogenTM).

As amostras de cDNA (100 ng. μL^{-1}) foram utilizadas para análise de expressão por PCR em tempo real (qRT-PCR) em uma solução contendo 0,15 μL dos respectivos iniciadores (10 pmol. μL^{-1}) de cada gene analisado (alvo) (Tabela 4) e 6,25 μL de SYBRTM Green PCR Master Mix (*Thermo Fisher*, 4309155), completados com água deionizada para a solução final de 12,50 μL . A solução foi submetida à PCR e analisada pelo aparelho *StepOnePlusTM System* (*Applied Biosystems*, EUA). A solução controle das mesmas amostras de cDNA foi realizada com iniciadores do gene de referência *GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE (GAPDH)* (BELINTANI *et al.*, 2012; ISKANDAR *et al.*, 2004; LING *et al.*, 2014) (Tabela 4).

Essa análise foi executada com três repetições biológicas e duas técnicas de cada tratamento e de cada gene (alvos e referência). Todas as reações de PCR seguiram a mesma condição: 2 minutos a 50 °C, 2 minutos a 95 °C, seguidos de 45 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 65 °C em placas ópticas de 96 poços (*Applied Biosystems*, EUA).

Os iniciadores foram elaborados e analisados pela plataforma OligoPerfect Iniciador Designer (<https://apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/>) e sua especificidade testada por *blastn* na plataforma SUCEST-FUN (<http://SUCEST-FUN.org/wsapp/>) frente ao genoma da cana (SP80-3280).

Tabela 5. Iniciadores e seus respectivos genes alvo para reações de qRT-PCR.

Gene	Iniciadores			
<i>SoCBF1</i>	Direto	5'	GGCGACGACGGCTCCTCCT	3'
<i>SoCBF1</i>	Reverso	5'	GAACCTTGGTCCGCCCGGCTCG	3'
<i>SoCBF2</i>	Direto	5'	ACCAAGTTCAAGGAGACGCG	3'
<i>SoCBF2</i>	Reverso	5'	GAAGGTCCCCAGCCATATCC	3'
<i>SoCBF3</i>	Direto	5'	CGCTTCCTTGAAGGGGAGAG	3'
<i>SoCBF3</i>	Reverso	5'	TTGCACAAACATCCTCCCGT	3'
<i>SoCBF4</i>	Direto	5'	GAGTCGAGACCGAGCTAAGC	3'
<i>SoCBF4</i>	Reverso	5'	ATCTTGCTCTGGATCGCCTG	3'
<i>GAPDH</i>	Direto	5'	CACGGCCACTGGAAGCA	3'
<i>GAPDH</i>	Reverso	5'	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC	3'

Os valores utilizados para análise estatística consistiram numa relação do número do ciclo ao nível do limiar de fluorescência logaritimizado, denominado *cycle threshold* ou CT. A análise estatística foi realizada pelo teste “t” de Student a 95% de significância, comparando-se médias de ΔCT (CT do gene alvo – CT do gene de referência) dos tratamentos e sua diferença com as médias de ΔCT dos respectivos controles ($\Delta CT_{\text{tratamento}} - \Delta CT_{\text{controle}}$). Essa diferença é denominada $\Delta\Delta CT$, comumente utilizada para comparar o efeito de um tratamento sobre a expressão de um determinado gene alvo (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

4.6. Análise de promotores preditos.

A partir da importância da regulação transcricional de genes *CBFs*, parte da “*CBF regulon*”, sobre o processo de aclimação e tolerância ao frio e ao congelamento, buscou-se identificar a presença de sítios de ligação de fatores de transcrição nas regiões promotoras preditas de *SoCBF1* e *SoCBF2*.

Para análise dos promotores preditos para cada gene, foi utilizada sua própria sequência e 2000 pb anterior a ela, dentro dos *contigs* referentes como ilustrado na Figura 4. A sequência gerada foi analisada pela plataforma *PLACE* (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) (*Institute of Crop Sciences, NARO*, Japão) onde obteve-se os sítios de ligação presentes na região promotora de cada gene estudado.

Figura 4. Esquema representativo da sequência de nucleotídeos utilizada para análise da região promotora predita de *SoCBF1* e *SoCBF2*.

FONTE: próprio autor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Definição dos iniciadores para isolamento de genes CBFs em cana-de-açúcar.

A fim de identificar e isolar os genes CBFs em cana, elaborou-se iniciadores a partir do estudo de sequências de genes dos fatores de transcrição CBFs já identificados em outras espécies – *Zea mays* (AF450481.1), *Oryza sativa* (XM_015755426.2; XM_015755442.2; XM_015769271.2), *Triticum aestivum* (AY572831.1), *Eucalyptus gunni* (DQ241820.1; DQ241821.1), *Arabidopsis thaliana* (NM_118681.4; NM_118679.2; EF523126.1) - e de possíveis candidatos em cana-de-açúcar (CA212714.1; CA156028.1) presentes no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). A comparação entre sequências e a construção dos iniciadores (Figura 5) foi realizada a partir do alinhamento global realizado com a ferramenta Geneious Prime® 2019.2.1 com posterior análise dos iniciadores pelo OligoPerfect Primer Designer (<https://apps.thermofisher.com/apps/oligoperfect/>) e sua especificidade testada por *blastn* na plataforma SUCEST-FUN (<http://SUCEST-FUN.org/wsapp/>) frente ao genoma da cana (SP80-3280) (SOUZA *et al.*, 2019). A partir das assinaturas e das sequências dos resíduos recorrentes, desenhou-se iniciadores degenerados baseados no par “AP2 + signatures” utilizado por EL KAYAL *et al.* (2006) e adaptados a partir dos acessos citados anteriormente. Os iniciadores e suas respectivas programações utilizadas para o PCR estão descritos na Tabelas 1 e 2.

Figura 5. Alinhamento global dos acessos utilizados para elaboração dos iniciadores (Tabela 1 e 2), utilizando sequências características de genes *CBF*: “PKKP/RAGRKKFR” (amarelo), ETRHP (verde), e DSAWR (azul). *Consensus* é a sequência gerada a partir do alinhamento de sequências, contendo os aminoácidos em concordância, representados por “.”. Os *gaps*, regiões de discordâncias representadas por “-”. Destacado em cinza estão os resíduos recorrentes “PKKP/RAGRKKFR” e dentro de quadra. Acessos utilizados : *Zea mays* (AF450481.1), *Oryza sativa* (XM_015755426.2; XM_015755442.2; XM_015769271.2), *Triticum aestivum* (AY572831.1), *Eucalyptus gunni* (DQ241820.1; DQ241821.1), *Arabidopsis thaliana* (NM_118681.4; NM_118679.2; EF523126.1) - e de possíveis candidatos em cana-de-açúcar (CA212714.1; CA156028.1). Alinhamento realizado pelo programa Gencious Prime® 2019.2.1. Matrix Blossum65.

5.2. Isolamento, sequenciamento e localização no genoma da cana de genes referentes a CBFs.

A partir dos iniciadores desenhados (Tabelas 1 e 2) foi realizado o PCR com (1) DNA e (2) cDNA totais de cana-de-açúcar (SP80-3280). Para comparação, também foi utilizado amostras com (3) DNA genômico de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), com o (4) vetor de transformação CBF1b (construído a partir de *EgucBF1b*, gene CBF encontrado em *Eucalyptus gunni*), e uma (5) amostra em branco (água) como controle negativo. Os resultados obtidos

em gel de agarose 1% (p/v) estão apresentados na Figura 6. Para todas as análises, foi utilizado como marcador de tamanho molecular foi utilizado “1 Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen).

Figura 6. PCRs oriundos dos iniciadores apresentado na Tabela 1 e 2: (A) AP2, (B) Egu1, (C) Egu2, (D) Ca1, (E) Ca2; para as amostras de (1) DNA e (2) cDNA totais de cana-de-açúcar (SP80-3280), (3) DNA genômico de eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*), (4) vetor de transformação CBF1b (construído a partir de *EguCBF1b* de *Eucalyptus gunni*), e (5) amostra em branco (água).

A PCR no gel de eletroforese (Agarose 1%) apresentou os fragmentos amplificados. Para o par de iniciadores AP2 obteve-se a formação de fragmento esperado com 197 pb (Tabela 1) em DNA total de cana (1), 197 pb em cDNA total de cana (2), 197 pb em DNA total de eucalipto (3) e 197 pb no vetor de transformação CBF1b (4) (Figura 6A). Para o par Egu1 e Egu2, os fragmentos esperados ± 600 pb (Tabela 2) apenas estiveram presentes na amostra para o vetor de clonagem (4) em Egu1, não obtendo-se o mesmo resultado para as demais amostras (Figura 6B), nem mesmo para nenhuma das amostras em Egu2 (Figura 6C). Para o par de iniciadores Ca1 (Tabela 2) não houve formação de bandas em nenhuma das amostras (Figura 6D). Do par Ca2 (Tabela 2), o fragmento 261 pb (Tabela 2) esteve presente apenas no DNA total de cana (1) como demonstrado na Figura 6E.

Os fragmentos gerados para o DNA total de cana AP2 com 197 pb e Ca2 com 261 pb foram extraídos do gel e purificados, para a clonagem em vetor *pJET1.2/blunt* devido a possibilidade de que em cada banda possa haver diversos fragmentos de DNA. O produto de PCR das colônias recombinantes, oriundas da clonagem dos fragmentos gerados pelo par AP2 e o vetor *pJET1.2/blunt* tem o tamanho de banda esperado de 300 pb. Logo, obteve-se nove colônias positivas para esta clonagem (Figura 7A). O produto de PCR das colônias oriundas da clonagem dos fragmentos gerados pelo par Ca2 e o vetor *pJET1.2/blunt* tem o tamanho de banda esperado de 360 pb. Logo, obteve-se duas colônias positivas (1 e 3) para esta clonagem (Figura 7B), enquanto as demais bandas formadas, de aproximadamente 300pb, foram consideradas como oriundas de colônias falsas (2, 4, 5 e 6).

Figura 7. PCR das diferentes colônias de *Escherichia coli* DH5 α TM obtidas após clonagem de fragmentos obtidos de DNA total da PCR para o par de iniciadores (A) AP2 (tamanho esperado de 300 pb) e (B) Ca2 (360 pb) com o vetor pJET1.2/blunt. Água deionizada como controle negativo (BR – Branco). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado 1 Kb Plus Ladder.

Os produtos de PCR obtido para as colônias recombinantes 8 e 9 para o par AP2 (Figura 7A) e as colônias 1 e 3 para o par Ca2 (Figura 7B) foram purificados e sequenciados com o uso do iniciador direto do vetor pJET1.2/blunt (Tabela 3) em sequenciador automático 3100 Genetic Analyser (*Applied Biosystems*, EUA). As sequências obtidas foram alinhadas pela ferramenta *blastn* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) frente ao genoma da cana-de-açúcar (SP80-3280) anotado e presente na plataforma SUCEST-FUN (<http://SUCEST-FUN.org/wsapp/>) (*Sugarcane Functional Genomics Database*, Brasil). O produto deste alinhamento são os *contiguous* ou *contigs* (conjunto de segmentos de DNA sobrepostos que juntos representam uma região de consenso de DNA). Os resultados obtidos através do alinhamento *blastn* estão representados na Tabela 6, e ilustrados nos Anexos A e B.

Tabela 6. *Contigs* obtidos através do alinhamento por *blastn* das sequências oriundas das diferentes colônias recombinantes, ou seja, das sequências isoladas para os pares de iniciadores AP2 e Ca2.

Colônia recombinante 1 oriunda de Ca2

<i>Contigs</i>	Score (bits)	E value
scga7_uti_cns_0158306	468	E-129
scga7_uti_cns_0253622	460	E-127
scga7_uti_cns_0072162	442	E-121
scga7_uti_cns_0274913	406	E-111
scga7_uti_cns_0322533	398	E-108

Colônia recombinante 3 oriunda de Ca2

<i>Contigs</i>	Score (bits)	E value
scga7_uti_cns_0130700	472	E-130
scga7_unitig_312415	470	E-130
scga7_uti_cns_0174866	424	E-116
scga7_uti_cns_0057589	424	E-116

Colônia recombinante 8 oriunda de AP2

<i>Contigs</i>	Score (bits)	E value
scga7_uti_cns_0019446	200	4,00E-49
scga7_uti_cns_0089699	192	1,00E-46

Colônia recombinante 9 oriunda de AP2

<i>Contigs</i>	Score (bits)	E value
NA	NA	NA

Colônia recombinante 10 oriunda de AP2

<i>Contigs</i>	Score (bits)	E value
NA	NA	NA

Score em *bits* é uma medida de qualidade do alinhamento por *blastn*, sendo maiores valores mais desejados. *E-value* é o número de *bits* esperados com a mesma qualidade (score) que podem ser encontrados por acaso, valores próximos ou iguais a zero são desejados.

Os *contigs* obtidos foram novamente submetidos ao alinhamento por *blastn* - desta vez sem que se especificasse o organismo, como anteriormente com a cana-de-açúcar - a fim de encontrar sequências similares de demais espécies que já foram anotadas como *CBFs*. Para tal, selecionou-se 500 pb anterior e posterior de onde se encontra presente as sequências anteriormente isoladas dentro do respectivo *contig*. Apenas os *contigs* “scga7_uti_cns_0019446” e “scga7_uti_cns_0089699” (Anexos C e D), ambos encontrados a partir da colônia recombinante 8 de AP2 (Tabela 6), retornaram genes de espécies já anotadas como *CBFs* de demais espécies, algumas bem próximas da cana-de-açúcar como o sorgo (*Sorghum bicolor*) e o milho (*Zea mays*) (Tabela 7). Diante deste resultado, seguiu-se utilizando estes *contigs* como ferramenta para se encontrar possíveis *CBFs* em cana-de-açúcar. Os demais *contigs*, no geral, retornaram sequências ainda não caracterizadas de diversas espécies e foram descartados para as futuras análises.

Tabela 7. Sequências obtidas pelo alinhamento de "scga7_uti_cns_0089699" e "scga7_uti_cns_0019446" por *blastn* sem especificação do organismo.

Alinhamento realizado com o *contig* "scga7_uti_cns_0089699"

Sequências	Score (bits)	E value
PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> DREB protein 1G	1076	0
<i>Zea mays</i> DREB protein 1A	1014	0
PREDICTED: <i>Setaria italica</i> DREB protein 1G	887	0
PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> DREB protein 1G-like	858	0
<i>Chimonobambusa tumidissinoda</i> (CBF1)	728	0
PREDICTED: <i>Oryza sativa</i> Japonica Group DREB 1G-like	619	7,00E-173

Alinhamento realizado com o *contig* "scga7_uti_cns_0019446"

Sequências	Score (bits)	E value
PREDICTED: <i>Sorghum bicolor</i> DREB protein 1G	1007	0
<i>Zea mays</i> DREB protein 1A	922	0
PREDICTED: <i>Setaria italica</i> DREB protein 1G	798	0
PREDICTED: <i>Panicum hallii</i> DREB protein 1G-like	767	0
<i>Chimonobambusa tumidissinoda</i> (CBF1)	664	0
PREDICTED: <i>Oryza sativa</i> Japonica Group DREB 1G-like	566	E-156

Score em *bits* é uma medida de qualidade do alinhamento por *blastn*, sendo maiores valores mais desejados. *E-value* é o número de *bits* esperados com a mesma qualidade (score) que podem ser encontrados por acaso, valores próximos ou iguais a zero são desejados.

Conforme demonstrado, os *contigs* obtidos, "scga7_uti_cns_0089699" e "scga7_uti_cns_0019446", apresentam resultados promissores e, portanto, possuem potencial de conter possíveis genes *CBFs* ainda não caracterizados para a cana-de-açúcar. De fato, estas sequências apresentam domínios AP2/ERF, como esperado de genes *CBFs* (Figura 8), resultado da ferramenta *Conserved Domains Search* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) para os *contigs*.

Figura 8. Análise de domínios conservados obtidos pela ferramenta *Conserved Domains Search* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>). (A) Domínios AP2/ERF presente no *contig* "scga7_uti_cns_0019446"; e (B) "scga7_uti_cns_0089699".

Através da plataforma SUCEST-FUN, pôde-se obter os genes preditos para os *contigs* "scga7_uti_cns_0089699" e "scga7_uti_cns_0019446". Após tradução em aminoácidos pelo programa *ExPASy* (<https://web.expasy.org/translate/>), os genes preditos "scga7_uti_cns_0019446.9" e "scga7_uti_cns_0089699.1" apresentaram características de *CBFs* como as assinaturas ETRHP e DSAWR, e os resíduos recorrentes "PKKP/RAGRKKFR" (QIN *et al.*, 2004). Observou-se que nestes genes preditos quando traduzidos, possuíam três alterações na assinatura DSAWR, onde Alanina é substituída por Prolina, Triptofano por Arginina, e Leucina por Arginina. Entretanto, com apenas uma alteração comparado a ZmDREB1A de milho, uma Alanina no lugar de uma Prolina (Figura 9).

Consensus	M - - - - - X T X X X X D A G S L S D Y S S G T P S P V G G G X X X D G S S S S Y M T V S S A P P	46
Zm DREB1A	 D . A G L V Q H . T . S . S T . T S A S . S S S E Q Q S R K A A W P P . T A S S P Q Q . .	46
scga7_uti_cns_0019446.9	. L R L V P P P P A R H G H H . R A S P M - - - - -	57
scga7_uti_cns_0089699.1	. G G D	39
Consensus	K R R - A G R T K F K E T R H P V Y K G V R R R N - P G R W V C E V R E P H G K - Q R I W L G T F E T A E M A A R A H D	103
Zm DREB1A	. K . P R F R G A A V . G R R G A . L Y L A . . A	106
scga7_uti_cns_0019446.9	. .	114
scga7_uti_cns_0089699.1	. .	96
Consensus	V A A L A L R G R A A C - L N F A D S P R L L R V P P M G S - - G H D E I R R A A V A A E Q F R P A P D H Q G N V A A	160
Zm DREB1A	A . I . . . Q . . G . G R . . . P . . A . . . A . . . P S A L P . L . D A L E . V A E . Q R R S G S G S G A . D	166
scga7_uti_cns_0019446.9	 T .	171
scga7_uti_cns_0089699.1	. .	153
Consensus	E E A A D T T P L D A L P S - - - - - A T Q S V D D H P Y C I I D D R - L D - - - - - F G M Q G - - -	197
Zm DREB1A	. A T S G A S . P S S S . . L P D V S A A G S P A A A L E H V . V K A D E A V A . . L D G D V F G P D W . . D M . L E L	226
scga7_uti_cns_0019446.9	. .	208
scga7_uti_cns_0089699.1	. .	190
Consensus	- - - Y L D M A X G M L I D P P P M A G S S T S G G - D D D D D G E V K L W S - Y	233
Zm DREB1A	D A Y . A S L . E . L . V E . . . P P A A W D H . D C C . S G A A D . A . . . Y .	267
scga7_uti_cns_0019446.9	- - - H .	244
scga7_uti_cns_0089699.1	- - - Q .	226

Figura 9. Alinhamento global das sequências de aminoácidos referentes aos genes preditos "scga7_uti_cns_0019446.9" e "scga7_uti_cns_0089699.1" com a proteína ZmDREB1a de milho. Destacado em cinza estão os resíduos recorrentes "PKKP/RAGRKKFR" e dentro de quadrados, as assinaturas ETRHP e DSAWR presentes em CBFs. *Consensus* é a sequência gerada a partir do alinhamento de sequências, contendo os aminoácidos em concordância, representados por ".". Os *gaps*, regiões de discordâncias representadas por "-". Alinhamento realizado pelo programa Geneious Prime® 2019.2.1. Matrix Blosum65.

Devido a estas alterações, buscou-se acessos com maiores semelhanças na assinatura DSAWR, utilizando a ferramenta *blastn* da plataforma SUCEST-FUN, foi utilizado os genes preditos citados acima, limitando-se a busca para o banco de dados de ESTs (*expression sequence tags*), e obteve-se as sequências "SCACLR1129E10.g" e "SCSFLR2031C10.g" com maiores similaridades na assinatura DSAWR (Figura 10).

5.3. Comparação de homólogos e construção da árvore filogenética.

Genes de DREB e ERF, da família AP2/ERF, comumente não apresentam íntrons (SAKUMA *et al.*, 2002), inclusive CBFs (MEDINA *et al.*, 1999). A sequência de aminoácidos de SoCBF1 e SoCBF2 são 98% idênticas. A diferença já é maior quando analisamos as demais SoCBFs. SoCBF1 apresenta 69% e 65% de similaridade com SoCBF3 e SoCBF4, respectivamente. SoCBF2 apresenta 64% e 68% de similaridades com SoCBF3 e SoCBF4, respectivamente. Enquanto, SoCBF3 e SoCBF4 são 86% idênticos (Figura 11).

Score:445 bits(1145), Expect:4e-166, Method:Compositional matrix adjust., Identities:221/226(98%), Positives:221/226(97%), Gaps:3/226(1%)		A	
SoCBF1	1	MDAGSLSDYSSGTPSPVGGGGGDDSSSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGV	60
SoCBF2	22	MDAGSLSDYSSGTPSPVGGGGGDDSSSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGV	78
SoCBF1	61	RRINPGRWVCEVREPHGKQRIWLGTFTETAEMAARAHDAALALRGAACLNADSPRLLRV	120
SoCBF2	79	RRINPGRWVCEVREPHGKQRIWLGTFTETAEMAARAHDAALALRGAACLNADSPRLLRV	138
SoCBF1	121	PPMKGSGHDEIRRAAAVAEEQFRPADHQGNVAAEEAADTTPDALPSATQSVDDHPYCII	180
SoCBF2	139	PPMKGSGHDEIRRAAAVAEEQFRPADHQGNVAAEEAADTTPDALPSATQSVDDHPYCII	198
SoCBF1	181	DDRDLFGQGYLDMAQMLIDPPPMAGSSTSGGDDDDGGEVKLWSY	226
SoCBF2	199	DDRDLFGQGYLDMAQMLIDPPPMAGSSTSGGDDDDGGEVKLWSY	244
Score:117 bits(294), Expect:2e-38, Method:Compositional matrix adjust., Identities:62/96(65%), Positives:73/96(76%), Gaps:2/96(2%)		C	
SoCBF1	27	SSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRR-NPGRWVCEVREPHGK-QRIWLGT	84
SoCBF4	27	SS + TV ++PPKR AGRTKF+ETRHPV++GVRRR N GRWVCEVR P + R+WLGT	86
SoCBF1	85	FETAEMAARAHDAALALRGAACLNADSPRLLRV	120
SoCBF4	87	FDTAEAAADRAHDAVLAIAAGAGACLNADSGWLV	122
Score:97.8 bits(242), Expect:8e-38, Method:Compositional matrix adjust., Identities:61/90(68%), Positives:73/90(77%), Gaps:2/90(2%)		E	
SoCBF2	49	YMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRR-NPGRWVCEVREPHGK-QRIWLGTETA	106
SoCBF3	33	HQTVMTSPPKRPAGRTKFKETRHPVFLGVRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGRLWLGTFTA	92
SoCBF2	107	EMAARAHDAALALRGAACLNADSPRLLRV	136
SoCBF3	93	EAAARAHDAALALRGAACLNADSAWLL	122
Score:99.8 bits(247), Expect:1e-30, Method:Compositional matrix adjust., Identities:63/91(69%), Positives:73/91(80%), Gaps:4/91(4%)		B	
SoCBF1	31	YMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRR-NPGRWVCEVREPHGKQ--RIWLGTFT	87
SoCBF3	33	HQTVMTSPPKRPAGRTKFKETRHPVFLGVRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGRLWLGTFTA	91
SoCBF1	88	AEMAARAHDAALALRGAACLNADSPRLLRV	118
SoCBF3	92	AEMAARAHDAALALRGAACLNADSAWLL	122
Score:115 bits(289), Expect:2e-37, Method:Compositional matrix adjust., Identities:61/96(64%), Positives:72/96(75%), Gaps:2/96(2%)		D	
SoCBF2	45	SSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRR-NPGRWVCEVREPHGK-QRIWLGT	102
SoCBF4	27	SSEHHQTVMTSPPKRPAGRTKFKETRHPVFLGVRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGRLWLGT	86
SoCBF2	103	FETAEMAARAHDAALALRGAACLNADSPRLLRV	138
SoCBF4	87	FDTAEAAADRAHDAVLAIAAGAGACLNADSGWLV	122
Score:195 bits(496), Expect:3e-69, Method:Compositional matrix adjust., Identities:105/122(86%), Positives:110/122(90%), Gaps:2/122(1%)		F	
SoCBF3	1	MCPIKKEMSTESSGLAASWSPSPSTSSSEHQTVMTPPKRPAGRTKFKETRHPVFLG	60
SoCBF4	1	MCPIKKEMSAESS-ASVSWPLSSPS-TSSEHQTVMTPPKRPAGRTKFKETRHPVFLG	58
SoCBF3	61	VRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGRLWLGTFTAEMAARAHDAALALRGAACLNADSAW	120
SoCBF4	59	VRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGRLWLGTFTAEMAARAHDAALALRGAACLNADSGW	118
SoCBF3	121	LL	122
SoCBF4	119	VL	120

Figura 11. Alinhamento por identidade de pares da sequência de aminoácidos de SoCBF1 com, SoCBF2 (A), SoCBF3 (B) e SoCBF4 (C); SoCBF2 com SoCBF3 (D) e SoCBF4 (E); SoCBF3 com SoCBF4 (F). Alinhamento realizado através da ferramenta *blastp* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Podemos observar estas disparidades também, quando analisamos a árvore filogenética e suas proximidades com proteínas CBFs de demais espécies (Figura 12). Nota-se que do ramo B partem proteínas CBFs anotadas para espécies de monocotiledôneas, e do ramo A, espécies de dicotiledôneas (A1) e monocotiledôneas (A2). SoCBF3 e 4 estão posicionados distantes de SoCBF1 e 2 dentro da árvore. SoCBF3 e SoCBF4 encontram-se no ramo B2 junto a ZmDREB1A de milho (*Zea mays*), OsDREB1A de arroz (*Oryza sativa* L.) e SgCBF1A de sorgo (*Sorghum bicolor*). Enquanto SoCBF1 e SoCBF2 partem do ramo A2 junto a OsDREB1G de arroz, SgCBF1C e SgCBF1G de sorgo.

Figura 12. Árvore filogenética de proteínas CBFs de diferentes espécies, incluindo SoCBFs aqui estudados. Os ramos que incluem SoCBFs estão destacados em vermelho.

Sua construção foi feita a partir do alinhamento global das sequências de aminoácidos: ZmDREB1A de *Zea mays* (AAN76804.1); OsDREB1A (XP_015610912.1), OsDREB1B (XP_015610928.2) e OsDREB1G (XP_015624757.1) de *Oryza sativa*; TaCBF1 (AAL37944.1) e 2 (AAT76662.1) de *Triticum aestivum*; ScCBF de *Secale cereale* (AAL35759.1); HvCBF2 de *Hordeum vulgare* (AAM13419.1); SlCBF3 de *Solanum lycopersicum* (ASK51848.1); EguCBF1a (ABB51637.1), 1b (ABB51638.1), 1c (ACF15446.1), 1d (ACF15447.1) de *Eucalyptus gunni*; BnDREB2-2 de *Brassica napus* (ACL12046.1); AtCBF1 (NP_567721.1), 2 (NP_567719.1), 3 (ABV27154.1), 4 (NP_200012.1), 5 (NP_191274.1) e 6 (NP_172721.1) de *Arabidopsis thaliana*; CaCBF1B de *Capsicum annuum* (AY368483), PaDREB1 de *Prunus avium* (AB080966), GhDREB1A de *Gossypium hirsutum* (AY321150); SgCBF1A (AFP33239.1), SgCBF1B (XP_002462689.2), SgCBF1C (XP_002436386.1) e SgCBF1G (XP_002454484.2) de *Sorghum bicolor*; além de SoCBF1, 2, 3 e 4 de *Saccharum spp.* aqui estudados. ZmDREB2A (QAA78761.1), de milho, foi utilizado como “outgroup”.

5.4. Análise de expressão diferencial de CBFs em cana-de-açúcar frente a diferentes tratamentos.

5.4.1. Em condições de estresse ao frio

A fim de caracterizar os diferentes *SoCBFs* obtidos quanto seu padrão de expressão sob condições de estresse a baixas temperaturas, realizou-se PCR em tempo real com iniciadores desenhados para cada sequência obtida (Tabela 4). O cDNA foi confeccionado a partir de RNA extraído de folhas de plantas submetidas a diferentes tratamentos de baixa temperatura, quanto sua intensidade (8°C e -2°C) e tempo de exposição (respectivamente 0, 2, 4, 12 e 24 horas; e 0, 15 e 30 minutos, 2 e 4 horas de exposição). Todas as plantas, em ambos os experimentos. Todas as

plantas analisadas tiveram expressão diferencial frente exposição ao congelamento (-2°C) (Figura 13) e ao frio (8°C) (Figura 14), entretanto, com padrões distintos ao longo do tempo de exposição.

SoCBF1, *SoCBF3* e *SoCBF4* tiveram indução/aumento da expressão (ou seja, expressão relativa maior que 1,00 referente ao do controle) logo aos 15 minutos de exposição ao congelamento. Observou-se que em alguns casos houve inibição/repressão da expressão (expressão relativa menor que 1,00 referente ao do controle), como em *SoCBF2* e *SoCBF3* após 2 horas de exposição ao congelamento.

SoCBF1 apresentou valores próximos de expressão relativa, $3,7\pm0,37$, $4,6\pm0,48$, e $4,4\pm0,61$, frente exposição ao congelamento (-2°C) por 15 minutos, 30 minutos e 2 horas, respectivamente, seguidos de um pico de $12,2\pm0,66$ de expressão relativa após 4 horas (Figura 13A).

SoCBF2 não apresentou expressão diferencial após 15 minutos ($1,1\pm0,57$ de expressão relativa) e 30 minutos ($1,1\pm0,57$) de exposição ao congelamento, e demonstrou uma repressão da expressão ($0,1\pm0,36$), ou seja, expressão relativa menor que o controle após 2 horas, seguida de um pico de $3,9\pm0,30$ após 4 horas (Figura 13B).

SoCBF3 possui um pico inicial de $12,0\pm0,44$ de expressão relativa após 15 minutos ao congelamento, seguido de uma redução para $6,2\pm0,62$ após 30 minutos, acompanhada de uma repressão de expressão ($0,5\pm0,35$) após 2 horas, com aumento subsequente para $11,2\pm0,47$ após 4 horas (Figura 13C).

SoCBF4 possui picos seguidos de quedas de expressão frente ao congelamento, sendo o primeiro pico de $5,3\pm0,44$ de expressão relativa após 15 minutos, seguido de uma queda para $2,2\pm0,69$ após 30 minutos; e um novo pico de $4,7\pm0,74$ após 2 horas, seguido de uma nova queda para $1,6\pm0,31$ de expressão relativa 4 horas de exposição (Figura 13D).

Figura 13. Análise de expressão de genes *SoCBFs* em plantas de cana-de-açúcar expostas a temperatura de congelamento (-2°C) por qRT-PCR. (A) *SoCBF1*, (B) *SoCBF2*, (C) *SoCBF3* e (D) *SoCBF4*. Análise estatística realizada pelo teste “t” de Student comparando-se as médias de cada tratamento individualmente com médias do controle (0 horas). *Diferença estatística a 95% de significância ($p\text{-valor} < 0,05$).

SoCBF1 demonstrou pico de $81,95 \pm 0,12$ de expressão relativa após 2 horas de exposição ao frio (8°C) que se reduz para $26,14 \pm 0,38$ após 4 horas, $27,78 \pm 0,46$ após 12 horas e atinge nível basal ($0,71 \pm 0,46$) após 24 horas, ou seja, não é estatisticamente diferente ao controle (Figura 14A).

SoCBF2 possui pico de $188,81 \pm 0,36$ de expressão relativa após 2 horas de exposição ao frio, mas sua expressão reduz gradualmente ao longo do tempo para $45,47 \pm 0,44$ após 4 horas, $16,37 \pm 0,55$ após 12 horas e atinge nível basal ($1,00 \pm 0,68$) após 24 horas (Figura 14B).

Opostamente à *SoCBF2*, *SoCBF3* tem sua expressão aumentada gradualmente ao longo do tempo com $18,47 \pm 0,29$ de expressão relativa após 2 horas de exposição ao frio, $80,37 \pm 0,71$ após 4 horas, e atinge um pico de $142,79 \pm 0,42$ após 12 horas, seguida de uma redução drástica da expressão relativa para $3,22 \pm 0,86$, nível próximo, após 24 horas de exposição ao frio (Figura 14C).

SoCBF4 possui indução de $17,72 \pm 0,20$ de expressão relativa após 2 horas de exposição ao frio, seguido de redução para $8,54 \pm 0,05$ após 4 horas (Figura 14D). Atinge o pico de $73,41 \pm 0,38$ de expressão relativa após 12 horas com subsequente redução para $36,43 \pm 0,31$ após 24 horas (Figura 14D).

Figura 14. Análise de expressão de genes *SoCBF*s em plantas de cana-de-açúcar expostas ao frio (8°C) por qRT-PCR. (A) *SoCBF1*, (B) *SoCBF2*, (C) *SoCBF3* e (D) *SoCBF4*. Análise estatística realizada através do teste “t” de Student comparando-se as médias de cada tratamento individualmente com o controle (0 horas). *Diferença estatística a 95% de significância ($p\text{-valor} < 0,05$).

SoCBF1 e *SoCBF2* possuem comportamento de expressão frente ao frio (8 °C) similares a *CBF1* de *Arabidopsis thaliana* (NOVILLO *et al.*, 2004) e *BNDREB1-5* de colza (*Brassica napus*) (ZHAO, TONG JIN *et al.*, 2006), com o pico após 2 horas de exposição ao frio e queda subsequente (NOVILLO *et al.*, 2004; ZHAO, TONG JIN *et al.*, 2006). Também similares a *ZmDREB1A* em milho (*Zea mays*) (QIN *et al.*, 2004) e *EguCBF1a* em eucalipto (*Eucalyptus gunni*) (EL KAYAL *et al.*, 2006; NAVARRO *et al.*, 2009). Ambos atingem níveis basais após 24 horas de exposição com a queda subsequente após um pico, mas *ZmDREB1a* e *EguCBF1a* possuem seus picos de expressão após maior tempo de exposição, após 4 horas a 4 °C (EL KAYAL *et al.*, 2006; NAVARRO *et al.*, 2009; QIN *et al.*, 2004). Semelhantes também a *CBF2* e *CBF3* de *Arabidopsis thaliana* (NOVILLO *et al.*, 2004) e *TaCBF1* em trigo (*Triticum aestivum*) (JAGLO *et al.*, 2001), mas estes apresentam pico de expressão anteriormente ao período de 2 horas.

SoCBF3 possui o mesmo padrão de expressão em *OsDREB1A* (DUBOUZET *et al.*, 2003), *OsDREB1F* (WANG *et al.*, 2008), *OsDREB1G* (MOON *et al.*, 2019) em arroz (*Oryza sativa* L.), *EguCBF1c* e *EguCBF1d* de eucalipto (*Eucalyptus gunni*) (NAVARRO *et al.*, 2009), e em *BNDREBII-1* de colza (*Brassica napus*) (ZHAO, TONG JIN *et al.*, 2006) quando submetidos a 4 °C. *SoCBF4* possui padrão de expressão similar a *LeCBF* de tomate (*Lycopersicon esculentum*), cultura que também é deficiente de estratégias de aclimação assim como a cana-de-açúcar (ZHANG, XIN *et al.*, 2004).

SoCBF1 e *SoCBF2* possuem padrões de expressão similares, um pico de expressão às 2 horas que se reduz gradualmente. *SoCBF3* possui um padrão oposto, um aumento gradual que atinge seu pico tardiamente, às 12 horas. *SoCBF4* não possui padrão similar, mas também atinge seu pico de expressão às 12 horas. A similaridade entre *SoCBF1* e *SoCBF2* indica para a possibilidade de compartilharem das mesmas funções frente a 8 °C, e possivelmente são suprimidos e/ou inibidos por *SoCBF3* e *SoCBF4* à medida que exposição ao estresse se prolonga.

5.4.2. Em condições de estresse salino, hídrico e ABA.

A análise de expressão dos discos foliares submetidos a diferentes tempos (30 minutos, 2 e 24 horas) em diferentes tratamentos de água destilada suplementada com ácido abscísico ABA (100 µM); suplementada com cloreto de sódio (200 mM NaCl) para simular estresse salino; e com manitol (200 mM) para simular estresse hídrico foram realizadas para todos os genes, exceto *SoCBF3* devido a limitação do aparelho em analisar maiores valores de CT, como obtidos para este gene.

SoCBF1 tem sua expressão reprimida ($0,47 \pm 0,17$ de expressão relativa) em meio salino após 2 horas, sendo indiferente após 30 minutos ($0,77 \pm 0,29$) e após 24 horas ($1,24 \pm 0,3$) ao tratamento, ou seja, não se diferenciou estatisticamente dos controles nas mesmas condições (Figura 15A). *SoCBF2* possui pico de $18,36 \pm 0,18$ de expressão relativa após 30 minutos frente ao tratamento, seguido de redução para $2,33 \pm 0,09$ após 2 horas e subsequente repressão de sua expressão ($0,04 \pm 0,37$) após 24 horas (Figura 15B). *SoCBF4* apresenta expressão relativa de $14,52 \pm 0,43$ após 30 minutos, $3,81 \pm 0,30$ após 2 horas e $12,61 \pm 0,42$ após 4 horas frente ao tratamento (Figura 15C).

SoCBF1, 2 e 4 tiveram suas expressões reprimidas em meios enriquecidos com ácido abscísico (ABA) (Figura 15). *SoCBF1* teve expressão reduzida frente à ABA para $0,07 \pm 0,36$ após 30 minutos e $0,07 \pm 0,07$ após 2 horas, e foi indiferente ao tratamento ($0,79 \pm 0,20$) após 24 horas (Figura 15A). *SoCBF2* sofreu repressão de sua expressão em todos os tempos: $0,22 \pm 0,23$ de expressão relativa após 30 minutos, $0,12 \pm 0,05$ após 2 horas e $0,02 \pm 0,17$ após 24 horas (Figura 15B). *SoCBF4* teve sua expressão reduzida para $0,08 \pm 0,29$ após 30 minutos, $0,37 \pm 0,37$ após 2 horas e $0,08 \pm 0,37$ para 24 horas (Figura 15C).

SoCBF1 teve sua expressão reduzida em meio suplementado com manitol em todos os tempos de análise: para $0,07 \pm 0,29$ após 30 min; $0,03 \pm 0,51$ após 2 horas; e $0,24 \pm 0,15$ após 24 horas de exposição (Figura 15A). A expressão *SoCBF2* não sofreu alterações frente ao tratamento após 30 minutos ($1,76 \pm 0,49$ de expressão relativa) e 2 horas ($1,26 \pm 0,12$), apenas após 24 horas com redução de expressão relativa para $0,00 \pm 0,45$ (Figura 15B). *SoCBF4* sofreu redução de expressão relativa frente ao manitol para $0,17 \pm 0,17$ após 30 minutos, e $0,37 \pm 0,42$ após 24 horas, sendo indiferente ao tratamento, $1,32 \pm 0,11$, após 2 horas de exposição (Figura 15C).

Figura 15. Análise de expressão de genes *SoCBFs* em plantas de cana-de-açúcar expostas a diferentes tratamentos (Controle em cinza, NaCl em azul, ABA em vermelho e Manitol em amarelo). por qRT-PCR para os genes (A) *SoCBF1*, (B) *SoCBF2*, (C) *SoCBF4* e (D).

Análise estatística realizada através do teste “t” de Student comparando-se as médias de cada tratamento individualmente com médias do respectivo controle. *Diferença estatística a 95% de significância ($p\text{-valor} < 0,05$).

ZmDREB1A de milho (QIN *et al.*, 2004) e *OsDREB1A* de arroz (DUBOUZET *et al.*, 2003) apresentam expressão induzida a 250 mM de NaCl. Assim como *EguCBF1s*, especialmente *EguCBF1c* que apresentou expressão 3x maior que os demais de sua espécie (*Eucalyptus gunni*) a 200 mM de NaCl (EL KAYAL *et al.*, 2006; NAVARRO *et al.*, 2009). Os *CBFs* em cana-de-açúcar aqui estudados apresentaram indução frente ao tratamento salino (Figura 16), exceto *SoCBF1* (Figura 16A). *SoCBF1* tem sua expressão reprimida para $0,47 \pm 0,17$ em meio salino após 2 horas, sendo indiferente nos demais tempos de análise para o tratamento (Figura 15A). *CBF1-3* de *Arabidopsis* também tem sua expressão indiferente ao tratamento com 250 mM de NaCl (LIU *et al.*, 1998; MEDINA *et al.*, 1999) assim como *LeCBF* de tomate (ZHANG, XIN *et al.*, 2004).

CBFs apresentam ter suas expressões indiferentes a aplicação de ABA (SHI; DING; YANG, 2018). Assim como *ZmDREB1A* em milho (Qin *et al.*, 2004); *CBF1*, 2 e 3 em *Arabidopsis* (LIU *et al.*, 1998; MEDINA *et al.*, 1999).

EguCBF1b de *E. gunni* (EL KAYAL *et al.*, 2006) *OsDREB1s* em arroz (DUBOUZET *et al.*, 2003; MOON *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2008), e *LeCBF* em tomate (ZHANG, XIN *et al.*, 2004), todos a 100 mM ABA. Entretanto, *SoCBF1*, 2 e 4 tiveram sua expressão reprimidas em meios enriquecidos com ácido abscísico (ABA) na maior parte dos tempos de análise, (Figura 16). Na mesma concentração, também há exemplos de *CBFs* influenciados por ABA, entretanto induzidos por sua aplicação, são eles *EguCBF1a*, *EguCBF1c* e *EguCBF1d*, de *E. gunni* (NAVARRO *et al.*, 2009).

Efeito similar para os *SoCBFs* aqui estudados é apresentado para *ZmDREB1A* com menor acúmulo de seus transcritos frente à seca quando comparados ao controle (Qin *et al.*, 2004). No entanto, em *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999) e arroz (DUBOUZET *et al.*, 2003; MOON *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2008), seus genes *CBFs* apresentaram-se indiferentes a aplicação de 200 mM de manitol. Contraditoriamente, em *E. gunni*, este tratamento induziu a expressão de seus genes *EguCBF1s* (NAVARRO *et al.*, 2009).

5.4.3. Análise de promotores preditos.

Através da ferramenta *tblastn* do SUCEST-FUN, utilizando uma sequência de aminoácidos contendo apenas as assinaturas ETRHP/DSAWR e os resíduos recorrentes “PKKP/RAGRKKFR” de genes *CBFs* (EL KAYAL *et al.*, 2006; JAGLO *et al.*, 2001) encontrou-se 37 possíveis genes *CBFs* em cana-de-açúcar (SP80-3280). Porém, este resultado só é possível ao pesquisar sobre a biblioteca de ESTs. Ao utilizar esta mesma sequência frente ao genoma, obtemos apenas os *contigs* já encontrados: “scga7_uti_cns_0089699” e “scga7_uti_cns_0019446”. Isto se explica pelo fato de o genoma da cana ainda não estar completamente anotado. Devido a esta limitação, pôde-se analisar a região promotora predita apenas para os genes *SoCBF1* e *SoCBF2*. Uma vez que apenas destes dois foi possível encontrar os *contigs* onde estão inseridos (“scga7_uti_cns_0089699” e “scga7_uti_cns_0019446”, respectivamente) e, portanto, a sequência anterior à região codificadora do gene.

Analisando a região promotora destes genes, encontra-se sítios de ligação que indicam a influência de fatores de transcrição sobre os genes, que podem inibir ou impulsionar sua expressão. Por exemplo, *EguCBF1a* - que é responsivo ao frio, à salinidade, à seca e ao ácido abscísico – possui na sua região promotora predita cinco sítios MYB, oito sítios MYC e três elementos responsivos a ABA (ABRE) (EL KAYAL *et al.*, 2006).

Sequências MYC são sítios de ligação de ICE1, fator de transcrição característico de genes *CBFs* (CHINNUSAMY *et al.*, 2003). Sítios MYB são característicos de fatores responsivos ao estresse hídrico e envolvidos na sinalização por ácido abscísico (ABE *et al.*, 2003). ABREs são sítios de ligação de fatores ABFs (fatores de ligação ABRE) que regulam a expressão de genes envolvidos a diversos estresses sob influência do hormônio ABA (BUSK & PAGÈS, 1998; NAKASHIMA *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 1996).

Assim como *EguCBF1a*, *SoCBF1* e 2 possuem sítios MYC, ABRE e MYB (EL KAYAL *et al.*, 2006). *SoCBF1* possui 4 sítios ABRE, 11 sítios MYC e 6 sítios MYB (Figura 16A e Tabela 8); e *SoCBF2* possui 5 sítios ABRE, 7 sítios MYC e 6 sítios MYB (Figura 16B e Tabela 8). Além de dois sítios GCCC-box e seis sítios CM2 presentes em *SoCBF1-2* (Figura 16 e Tabela 8); e dois sítios CArG-box presentes em *SoCBF1* (Figura 16A e Tabela 8).

Sítios GCCC-box são referentes aos fatores EIN3, que inibem a transcrição de *CBFs* durante o congelamento em *Arabidopsis* (SHI *et al.*, 2012). Sítios CM2 são referentes a fatores de transcrição do tipo CAMTA, reguladores da expressão de *CBFs* em resposta a rápidos caimentos de temperatura em *Arabidopsis* (DOHERTY *et al.*, 2009; KIDOKORO *et al.*, 2017; KIM, YONGSIG *et al.*, 2013). Sítios CArG-box são referentes a fatores SOC1, envolvidos no ciclo circadiano e inibem a expressão de *CBFs* durante o congelamento em *Arabidopsis* (SEO *et al.*, 2009). Ambos *SoCBF1-2* apresentam o sítio TATABOX a 80 pb anteriores ao códon de iniciação (ATG).

Tabela 8. Sítios de ligação presentes na região promotora predita de *SoCBF1* e *SoCBF2*.

Motifs	SoCBF1		SoCBF2	
	Locus		Locus	
ABRE	1-7	347-353	304-310	438-444
	137-143	891-895	648-654	1879-1895
			1899-1905	
MYC	42-47	246-251	345-350	547-552
	477-483	733-738	947-952	1475-1550
	745-750	758-763	1686-1691	1743-1748
	797-802	1541-1546	1947-1952	
	1604-1609	1733-1738		
	1781-1786			
MYB	369-374	651-656	670-675	740-744
	985-990	1358-1363	910-914	1289-1294
	1487-1492	1497-1503	1421-1424	1432-1437
CM2	71-76	1301-1306	276-281	1491-1496
	776-781	1751-1756	365-370	1704-1709
	967-972	1881-1886	447-451	1713-1718
			1232-1237	1863-1868
GCCBOX	717-723	1492-1497	182-187	1421-1426
CARGBOX	508-517	568-577		
TATABOX	1949-1955		1911-1917	
Códon de Iniciação	2041-2043		1950-1952	

A presença destes sítios de ligação nas regiões promotoras preditas é condizente com o padrão de expressão apresentado por *SoCBF1* e *SoCBF2* (Figuras 11, 12 e 13). Por exemplo, a maior presença de sítios MYC é condizente com a maior influência das baixas temperaturas sobre estes genes do que dos demais estresses, assim como vemos em *CBFs* de demais espécies. A menor expressão de *SoCBF1* e *SoCBF2* nos primeiros tempos de análise durante o congelamento explica-se pelas presenças dos sítios GCCC-box, demonstrando uma possível interferência do etileno através do fator de transcrição EIN3 como observado em *Arabidopsis* para temperaturas abaixo de 0 °C (SHI *et al.*, 2012). Curiosamente, às menores expressões durante o congelamento também se pode creditar à presença dos sítios MYC, este que além de alvos de ICE1 também podem ser alvos de fatores PIFs, que reduzem a expressão de *CBFs* de *Arabidopsis* em temperaturas abaixo de 0 °C e na ausência de luz (JIANG *et al.*, 2017).

Ambos *SoCBF1-2* apresentam seus picos de expressão logo na primeira avaliação, após 2 horas de exposição frente ao frio (Figura 14A-B), condizente com a presença de sítios CM2, estes que são alvos de fatores CAMTA, responsivos ao rápido caimento de temperatura, induzindo a expressão de *CBFs* em *Arabidopsis* (KIDOKORO *et al.*, 2017).

Aos sítios ABRE e MYB, credita-se a influência do estresse salino, principalmente sobre *SoCBF2*, e do estresse hídrico, principalmente sobre *SoCBF1* (CHEN *et al.*, 2020). Também, a influência negativa de ABA sobre

SoCBF1-2 está relacionada aos sítios ABRE (BUSK & PAGÈS, 1998; NAKASHIMA *et al.*, 2006; SHEN *et al.*, 1996) e aos sítios MYB que participam das respostas ao estresse hídrico e salino, também envolvidos na via de sinalização de ABA (CHEN *et al.*, 2020). Salvo, *EguCBFs* de eucalipto, *CBFs* de demais espécies são comumente indiferentes à aplicação de ABA (como exposto no Item 5.4.2). Inclusive, na revisão de SHI; DING; YANG (2018) não é apresentado sobre a presença de sítios ABRE em genes *CBFs*.

Ressalta-se, que o ABA é um hormônio tipicamente relacionado ao estresse vegetal e é sabido que atua sobre ambos os sítios (CHEN *et al.*, 2020). ABA tem atuação fundamental durante o estresse hídrico, promovendo o fechamento dos estômatos, inclusive na cana-de-açúcar (VIEIRA *et al.*, 2013). Consequentemente, este hormônio atua de forma a reduzir a assimilação de CO₂ e a produção de fotoassimilados, logo, reduzindo o acúmulo de massa e de sacarose na cultura (PINCELLI; SILVA, 2012). Com os resultados aqui apresentados, que a aplicação de ABA e o estresse hídrico atuam negativamente sobre a expressão de *SoCBFs*, estabelece-se um elo destes genes com processos característicos da maturação da cana-de-açúcar.

Outro elo apresentado neste trabalho, é a presença de dois sítios CArGBOX em *SoCBF1* (Figura 16A e Tabela 8), conhecidos alvos do fator de transcrição SOC1 que inibe a expressão de genes *CBFs* durante o congelamento em *Arabidopsis* (SEO *et al.*, 2009). A presença destes sítios pode explicar as menores expressões de *SoCBF1* nas primeiras horas de análise frente ao congelamento (Figura 13A) e permite fazer a relação entre *CBFs* e a maturação da cana-de-açúcar. A superexpressão de genes *CBFs* em *Arabidopsis* levou ao fenótipo de florescimento tardio, acompanhado da maior expressão de *FLOWERING LOCUS C* (FLC), este que atua inibindo a expressão de *SOC1*. Logo, pode-se supor que, de acordo com a intensidade da baixa temperatura e do tempo de exposição, *SOC1* possa atuar negativamente sobre genes *SoCBFs*, promovendo assim o florescimento da cana-de-açúcar, processo este que é indesejável aos produtores por diminuir a qualidade da produção (VIEIRA *et al.*, 2013). De fato, existe uma relação de baixas temperaturas com o florescimento da cana-de-açúcar. Temperaturas mínimas abaixo de 18 °C atrasam a iniciação floral e o desenvolvimento das panículas (ARALDI *et al.*, 2010).

A

AACGCGT GCTCGGATCCGCTTGTCTCCATGCGCTCTTCGA CAGGTG GGGGAGCTTGGGGCGTGGGCCTAGCGTGCTAGGGT CCGCT CGTTAGCCAAGTGTTGCGGCTATGCGGTGGCCGGGTCAAGGTCGCC CACG 140
 CGC CCCCAGCGTGAGGAAGACGTCATCGTGACTTCCCTTCAGGCCATTGATATGAATCAGGTTTTCAGAGAGTTTCTGACGATTCTCTAGAGCATGCTGT CAAATG GCAGCTTCTACGTACCGAACAGCGTTGAC 280
 AAATCCCGAAGAAGTTGAGAATTCACGGGAGTCCACGAGGAGAAGAATCAAACAGTAACACTCT CTTACGTGGG TACGTATGTACT CCGTTA TGAGCAATCCACCGAGCAGTATATACGAGCCTTGACTCAGTGGC 420
 AGATCCAGGATTCTAAACTTGGGTATTCTCAAGTTCGAAAAAATCAATCCATAC CATATG TTCAAGGTTAAAAATAGTTTACACA CAAATATATG ATACCGATAATAAAAACAAAAAGTAGTCAAATAACTAATTT 560
 TTCAGCT CTAATAATATG CATGAAACAACCTAATAAAGGGAACCTACAAAGTACTCTAATTTAGCTTTAACTTTAGGATCTTCAATTTTGCAAAACCAAAATAGATCTACAGGAATACATATCCACTATTTAGTATTAC 700
 GATTAAATTAGAACTAATAAACCAATAGCAATA CACGTG CAGCTA CACGTG CGCTGTG CAGCTG CAGCCCGTGTAG CCGCG CGCCGACGACTGCC CACGTG CCAAGAGCCCTGGAT GCCGCC CACCGGTCAACAGGTT 840
 ATTAGATTAGAGATCGGGGATTGGAGATCGATTTGGAGATTGGAGAGGT ACCTG AGAACCGGTGGCCGTGGACTGAGGAGCGGTGTTGGTCACGGTCAGGGAGGCCACGGCTCTGAAGGAGTAT GCGCGG ACTGCGAA 980
 CCTGCTACCTGGAGGTGTTATGGGCTAGTGGGCAGACTGGAAGTTGGAGCGAGGCCAAGAGGCCAGATTTATTGGCTGTGGGCTGATATGACGTGATGAGAAACAGAGAAAAATCAAATATACATTGTATATTT 1120
 AAGTACTACATACATATATACTTAAGAATGTACAAAAAGTTGGGTATTCTGGGAATACACAGGCATCACTGTAGATCCGCCATGCTTGACTACGACTACAGTATGTAGGAATGGATTGATTGAGCAGCAGCCA 1260
 AGCAGCGGTTTCAGCGCGACGCTCTTGTAGCAAGGCAG GCGCG CAACCTGCGGGCGTGCACTGCCAGCCAGCGTGCCTATTATCCATC CCGTTG AAAACGAACAGGCCGCGCATCTCTGGAAGCCGAGC 1400
 CTTAACGCCAGCGATACGCCGAGTGCCTCTCCCTACCGTACGTACCATCATGGGTGATCTGGAACCCCGAGACCAAGTCCAATA TAACT GCCGCC TAACCA ACCGTGGAGTGGGATCTCTGCGTGGCCCCATCCGAT 1540
 CACTTG CACCGTCCAGCGCTTCCGTCTCGCAGGAGTACGCATCAAACCTACCGCCTCACT CACTTG AGAGTTCGCTCCCTCTCAAGCGCTCACGCCTTTCCACACACATCGTGTACGCGAAAGAGCAGCCAGCC 1680
 CTGACTACTAGTAGCTTAGCGCCAACAGCAGCGAAGGAAGCCAGCGGCC CACTTG GATCCCATGCCT GCGCGT CCCCCTCCCGGCCCGCGAGCTC CAGCTG GTTCCGATCCAGCAAAACCTCCGAGCCGACGAG 1820
 CAAGCCCTCTCACCAGAGTCCGAGCCCCCGCCGACACATAAGTCGACTACCTGGCTGGCGCTCCCGAGCCGCA CCGCGT GGAACAGTG CACGCG CACGTGCTCTC CACGCG TAACC TATATA CCGGC 1960
 CACCTTCCCTCCAATTTCAAATCAAATGCTCCGACTCGTTCCTCTCCCCAGCTGCCACACACCCGCGCTTACCC ATG GACGCCGATCCTTGAGCGACTACTCTCTGGGACGCCGTCCCCTGTGCGCGCGCGC 2100

B

TCGGATTGATCAGTAAGGACCACCAACATACGCTCTCTTCCATCCTTGCCCCAGATATCTCGAGAGAAGTTGATCGAGATTGGATTGATGTCTATCCTATCAGAGCTCTCGCTGGAAAATAATCCTTAGGCCTGAAG 140
 GACCGAGCTTGACAGATCCAGCAGTGTGCTTCCCGCC GCCGCC CCGGAGTCAAGGTGGAACCTTAACCTCACTTCGTTGGTGGGGAACGGATGACCTATAGCTGGACAAAGAAAGTTACCAACTCCTCTT CCGCG 280
 GGATCAAATCCGAGCCAGCCG CACGCGT GCTCAGATCCGCTTGTCTCCGTGGCGTCCCCGA CAGGTG GGGGAGCTTGGGGG GCGCGG GCCTGATGTGCTGGGTGCGCTGTTAGCCAAGTGGGTGCGGCTATGGC 420
 GGTGGGTGAAGTGCCT CACGCG CCGCGA GCGTGAGGAAGCGTCATCGCGACTTCCCTTCAGGCCATTGATATGAATCAGGTATTTCAAGAGAGTTCGTACGATTCTCTAGAGCATGCTGT CAAATG GCAGCTTC 560
 TACGTACCGAACAGCGTTGACAAATCCCGAAGAAGTTGAGAATTCACGGGAGTCCACGAGGAGAAGAATTAACACAGTAACACTCT CTTACGTGGG TACGTATGTACT CCGTTA CGAGCAAGGTAATAAATAGCGTATA 700
 GCGGTTGGTAGCGGATTAGCTGCGAGGTAGCAGATTGC GGATA GCGGGCGATATTGCGGACGATAAGTTCTAATAGCGGCACCAATAATCCATATAATTTAAGTACATATATCAAGAATAATGAGTATAAATAATT 840
 TTAATTTTCATAGCCGATGCGTGAGTATTTGAATTTGGGTGTGAGTCATAGTGGCTGGACTAATTAG GGATA TTTGCTTCATGCTATTACGGCTGCTACGCG CAATTG CGGCCACAATATCGCCCCGCTATTCAGA 980
 ATTGCGGGCGCAAAGTTTCAGGATGCAAAATTCAGAGCGTACCTCATAGCGATAGCGGCAATGACCGCTACCGCTATTGCGGGTGCATTAACGGCCGCTACCGCCGCTATTTATTACCTTGTTACGAGCAATCCACC 1120
 GGAGCAGTATATACGAAGCCTTGACTACGACTACTAGTACGTAGGAATGGATTGATTGAGCAGCAGCAAGCAGCGGTTTGCAGCGGACGCTCTTGTAGCAAGGCAT GCGCG CAACCTGCGGGCGTGCACTGCCTG 1260
 CCAAGCCAGCGGTGCGCATTTATCCAT CCGTTG AAAACGAACCAACAGGCCGCCATCTGGAAGCCGGAGCCTTAACGCCAGCATACCGGGGTGCTCTCCCTACCGTACGTACCATCATGGGTGATCTGGAAA 1400
 CCCCAGACCAAGTCCAATA TAACT GCCGCC TAA CAACTG GAGTGGGATCTCTGCGTGGCCCCCTCCGAT CACTTG CACCGTCCG GCGCGT GCGGCGTGACAGAAATCCCACGTATCCGTCTCGCAGAGTGCG 1540
 CATCAAATACCAAGCCTCACTCGAGAGTTCCGTCCCTCTCAAGCGCTCAGGCCTTTTCAACACATCGCCATCAGCGAAAGAGCCCTACTAGACTAGTACGTTAGCGCCCAACAGCAGCAAGGAAGCCAGG 1680
 CCGCC CACTTG GATCCCATGCCT GCGCGT CCGCGCT CCCCCTCCCGGCCCGCGAGCTC CAGCTG GTTCCGACCCAGCAAAACCTCCGAGCCCGACGAGCAAGCCCTCTACCCGAAGTCCCGAACCCCCCGCCGA 1820
 CCCATCAAGTCGACTACCTGGCTGGCGCTCCCGAGCCGCA CCGCGT GGAACAGTG CACGCG CACGTGCTCTC CACGCG TAACC TATATA CCGCCACCTTTCCCTCAAATTTCAAATCAAATGCTCCGACT 1960
 GCCACGGCCACCACACCCGCGCTTACCC ATG GACGCCGATCCTTGAGCGACTACTCTCTGGGACGCCGTCCCCTGTGCGGCGGCGGCGACGCTCTCTCTGCTGATACGAGGTGCTGCGCGCGCGCC 2100

Figura 16. Análise da região promotora predita para (A) *SoCBF1* e (B) *SoCBF2* e seus respectivos sítios de ligação: ABRE (vermelho), MYC (rosa), CM2 (amarelo), MYB (azul), CArGBOX (dourado), GCCCBOX (cinza), TATABOX (ciano) e Códon de iniciação (verde).

6. CONCLUSÕES.

A cana-de-açúcar apresenta diversos genes do tipo *CBFs*, *SoCBFs*, que são distintos quanto sua sequência de nucleotídeos e aminoácidos, quanto sua região promotora e sobre seus padrões de expressões aos diferentes estímulos.

SoCBFs são responsivos e impulsionados pelo estresse ao salino (200 mM NaCl), ao congelamento (-2 °C) e, principalmente, ao frio (8 °C).

Os padrões de expressão *SoCBFs* frente ao frio e ao congelamento são distintos de acordo com o tempo de exposição ao tratamento, o que indica diferentes papéis de *SoCBFs* em resposta a estes estresses.

SoCBFs são responsivos e reprimidos durante o estresse hídrico (200 mM) e à aplicação de ácido abscísico (100 mM ABA).

A atuação de ABA e o estresse hídrico inibindo a expressão de *SoCBFs*, junto ao efeito positivo de baixas temperaturas, estabelece um elo entre *SoCBFs* sobre a maturação da cana-de-açúcar, processo este que é impulsionado pelo inverno seco e frio de regiões tropicais e subtropicais.

As regiões promotoras preditas de *SoCBF1* e *SoCBF2* contém os sítios de ligação ABRE, MYB, MYC, CM2, GCCC-box e CArG-box. Que estão condizentes com os seus padrões de expressão aos tratamentos estudados.

A presença do sítio CArG-box na região promotora predita de *SoCBF1* aponta para uma possível influência deste gene sobre o florescimento da cana-de-açúcar, logo, também sobre sua maturação.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, identificou-se pela primeira vez genes do tipo CBF, referentes a fatores de transcrição chave para resposta ao frio em plantas, em cana-de-açúcar. A tradução destes genes em sequências de aminoácidos permitiu sua comparação com CBFs presentes em outras espécies, bem como construir uma árvore filogenética que demonstrou as disparidades e diversidade de genes CBFs em cana-de-açúcar. Também pela primeira vez, caracterizou-se SoCBFs quanto aos seus padrões de expressão frente a estresses ao frio (8 °C), ao congelamento (-2 °C), salino (200 mM NaCl) e hídrico (200 mM manitol), como também à aplicação de ácido absísico (100 mM ABA), estabelecendo-se uma relação com a presença de sítios de ligação nas regiões promotoras preditas de SoCBF1 e SoCBF2.

SoCBFs demonstram indução de expressão frente ao estresse salino, ao estresse por congelamento (-2 °C) e principalmente ao estresse pelo frio (8 °C), o que é condizente com o que é apresentado em demais espécies. Contraditoriamente, também são responsivos ao estresse hídrico e à aplicação de ABA com redução da expressão, o que não é comum para estes genes em outras espécies. Entretanto, a análise da região promotora de SoCBF1 e SoCBF2 indicam a presença de sítios ABRE e MYC, presentes em genes responsivos tanto a ABA quanto ao estresse hídrico.

ABA influencia processos de assimilação de CO₂ e acúmulo de fotoassimilados quando induz o fechamento estomático frente ao estresse hídrico. Este estresse é característico do inverno em regiões tropicais e subtropicais junto ao estresse por baixas temperaturas. Período este responsável para a maturação da cana-de-açúcar, induzindo o acúmulo de sacarose nos colmos. Logo, supõe-se que SoCBFs, sob a influência de ABA, atuem durante esta estação de modo a mediar as respostas frente aos estímulos do ambiente que acarretam a maturação da cultura.

Outro indício dos efeitos de SoCBFs sobre a maturação encontrado neste trabalho é a presença de sítios CArG-Box na região promotora de SoCBF1. Estes sítios de ligação são alvos do fator de transcrição SOC1, envolvido no ciclo circadiano, que inibe a expressão de CBFs em *Arabidopsis* de modo a promover o florescimento.

Os resultados aqui presentes indicam para a importância de genes SoCBFs na cana-de-açúcar, ainda não devidamente explorados pela comunidade científica, frente ao estresse por baixas temperaturas que, apesar de não ser limitante para produção em maior parte do território brasileiro, está envolvido no processo de maturação e produtividade da cultura.

Seria precipitado tirar conclusões da atuação específica de cada SoCBF, mas devido aos diferentes padrões de comportamento aos diferentes tratamentos podemos inferir que cada SoCBF possui sua respectiva função frente aos estresses do ambiente. Torna-se relevante avaliar a expressão dos genes *SoCBFs* em demais tratamentos, compostos de dois fatores ou mais, para que se melhor compreenda sua complexidade e regulação frente a diferentes estímulos do ambiente agindo concomitantemente. Bem como, é de interesse avaliar genes-alvos destes fatores de transcrição dentro da cultura, a fim de se entender como estão envolvidos no direcionamento dos processos de desenvolvimento. Ademais a produção de plantas com superexpressão destes genes, bem como com deleções, em cana-de-açúcar, permitirá análises detalhadas de toda sua via de atuação e regulação. Além de esclarecer a que nível, como e em quais situações temos a regulação de *SoCBFs* pelo ácido absísico.

REFERÊNCIAS

- ABE, Hiroshi *et al.* Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, v. 15, n. 1, p. 63–78, 2003.
- ADAMS, William W. *et al.* Habitat temperature and precipitation of Arabidopsis Thaliana ecotypes determine the response of foliar vasculature, photosynthesis, and transpiration to growth temperature. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, n. 1026, p. 1–18, 2016.
- AGARWAL, Manu *et al.* A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of CBF genes and in acquired freezing tolerance. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 49, p. 37636–37645, 2006.
- AKHTAR, S.; WAHID, A.; RASUL, E. Emergence, growth and nutrient composition of sugarcane sprouts under NaCl salinity. *Biologia Plantarum*, v. 46, p. 113–116, 2003.
- ALEXANDER, Alex G. Studies on trehalase in saccharum spp. leaf and storage tissues. *Plant and Cell Physiology*, v. 14, n. 1, p. 157–168, 1973.
- ARALDI, Rosilaine *et al.* Florescimento em cana-de-açúcar. *Ciência Rural*, v. 40, n. 3, p. 694–702, 2010.
- AUGUSTINE, Sruthy Maria *et al.* Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (Saccharum spp. hybrid). *Plant Cell Reports*, v. 34, p. 247–263, 2015.
- BADAWI, Mohamed *et al.* The CBF gene family in hexaploid wheat and its relationship to the phylogenetic complexity of cereal CBFs. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 277, n. 5, p. 533–554, 2007.
- BELINTANI, N. G. *et al.* Improving low-temperature tolerance in sugarcane by expressing the ipt gene under a cold inducible promoter. *Biologia Plantarum*, v. 56, n. 1, p. 71–77, 2012.
- BUSK, Peter K.; PAGÈS, Montserrat. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology*, v. 37, p. 425–435, 1998.
- CAI, Wenju *et al.* Increasing frequency of extreme El Niño events due to greenhouse warming. *Nature Climate Change*, v. 4, n. 2, p. 111–116, 2014.
- CARDOZO, Nilceu Piffer; SENTELHAS, Paulo Cesar. *Climatic effects on sugarcane ripening under the influence of cultivars and crop age. Scientia Agricola*. [S.l: s.n.], 2013
- CASTILLON, Alicia; SHEN, Hui; HUQ, Enamul. *Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. Trends in Plant Science*. [S.l: s.n.], 2007
- CHEN, Kong *et al.* Absciscic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 62, n. 1, p. 25–54, 2020.
- CHINNUSAMY, Viswanathan *et al.* ICE1: A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in arabidopsis. *Genes and Development*, v. 17, p. 1043–1054, 2003.
- CHINNUSAMY, Viswanathan; ZHU, Jianhua; ZHU, Jian Kang. *Cold stress regulation of gene expression in plants. Trends in Plant Science*. [S.l: s.n.], 2007
- CHO, Sungkyung *et al.* Accession-dependent CBF gene deletion by CRISPR/Cas system in arabidopsis. *Frontiers in Plant Science*, v. 8, p. 1910, 2017.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira Cana-de-açúcar. *Companhia Nacional de Abastecimento*, v. 7, n. 3, p. 12–18, 2020.
- COOK, Daniel *et al.* A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 42, p.

15243–15248, 2004.

D'HONT, A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana. *Cytogenetic and Genome Research*, v. 109, n. 1–3, p. 27–33, 2005. Disponível em: <<https://www.karger.com/DOI/10.1159/000082378>>.

D'HONT, Angélique *et al.* Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics. *Molecular and General Genetics*, v. 250, p. 405–413, 1996.

DA SILVA BARROS, Timóteo Herculino *et al.* Influence of Sugarcane Genotype and Soil Moisture Level on the Arbuscular Mycorrhizal Fungi Community. *Sugar Tech*, v. 21, p. 505–519, 2019.

DEVARUMATH, R. M. *et al.* Genomic Landscapes of Abiotic Stress Responses in Sugarcane. *Genomics Assisted Breeding of Crops for Abiotic Stress Tolerance*. [S.l: s.n.], 2019. p. 225–240.

DIAS, Nildo da Silva; BLANCO, Flavio F. Efeitos dos sais na planta. *Manejo da Salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e Aplicados*. [S.l: s.n.], 2010. p. 130–141.

DING, Yanglin *et al.* OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in arabidopsis. *Developmental Cell*, v. 32, n. 3, p. 278–289, 2015.

DOHERTY, Colleen J. *et al.* Roles for Arabidopsis CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *Plant Cell*, v. 21, n. 3, p. 972–984, 2009.

DONG, Malia A.; FARRÉ, Eva M.; THOMASHOW, Michael F. Circadian clock-associated 1 and late elongated hypocotyl regulate expression of the C-repeat binding factor (CBF) pathway in arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 17, p. 7241–7246, 2011.

DU, Y. C.; NOSE, Akihiro; WASANO, K. Effects of chilling temperature on photosynthetic rates, photosynthetic enzyme activities and metabolite levels in leaves of three sugarcane species. *Plant, Cell and Environment*, v. 22, n. 3, p. 317–324, 1999.

DU, Yu Chun; NOSE, Akihiro; WASANO, Kikuo. Thermal characteristics of C4 photosynthetic enzymes from leaves of three sugarcane species differing in cold sensitivity. *Plant and Cell Physiology*, v. 40, n. 3, p. 298–304, 1999.

DUBOUZET, Joseph G. *et al.* OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant Journal*, v. 33, n. 4, p. 751–763, 2003.

EL KAYAL, Walid *et al.* Expression profile of CBF-like transcriptional factor genes from Eucalyptus in response to cold. *Journal of Experimental Botany*, v. 57, n. 10, p. 2455–2469, 2006.

FINKA, Andrija *et al.* Plasma membrane cyclic nucleotide gated calcium channels control land plant thermal sensing and acquired thermotolerance. *Plant Cell*, v. 24, n. 8, p. 3333–3348, 2012.

FUJIMOTO, Susan Y. *et al.* Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, v. 12, n. 3, p. 393–404, 2000.

GILLIHAM, Matthew; ABLE, Jason A.; ROY, Stuart J. Translating knowledge about abiotic stress tolerance to breeding programmes. *Plant Journal*, v. 90, n. 5, p. 898–917, 2017.

GONG, Zhizhong *et al.* Plant abiotic stress response and nutrient use efficiency. *Science China Life Sciences*, v. 63, n. 5, p. 635–674, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11427-020-1683-x>>.

HAAKE, Volker *et al.* Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, v. 130, n. 2, p. 639–648, 2002.

HARMER, Stacey L. The circadian system in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, v. 60, p. 357–377, 2009.

ISKANDAR, Hayati M *et al.* Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22, n. 4, p. 325–337, 2004. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1007/BF02772676>>.

- JAGLO-OTTOSEN, Kirsten R. *et al.* Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science*, v. 280, n. 5360, p. 104–106, 1998.
- JAGLO, K. R. *et al.* Components of the Arabidopsis C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in Brassica napus and other plant species. *Plant Physiology*, v. 127, p. 910–917, 2001.
- JANNOO, N. *et al.* Molecular investigation of the genetic base of sugarcane cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 99, n. 1–2, p. 171–184, 1999.
- JIA, Yuxin *et al.* The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in Arabidopsis. *The New phytologist*, v. 212, n. 2, p. 345–353, 2016.
- JIANG, Bochen *et al.* PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 114, n. 32, p. E6695–E6702, 2017.
- KHONGHINTAISONG, J. *et al.* Rooting and Physiological Trait Responses to Early Drought Stress of Sugarcane Cultivars. *Sugar Tech*, v. 20, p. 396–406, 2018.
- KIDOKORO, Satoshi *et al.* Different cold-signaling pathways function in the responses to rapid and gradual decreases in temperature. *Plant Cell*, v. 29, n. 4, p. 760–774, 2017.
- KIM, Hyoun Joung *et al.* A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in Arabidopsis thaliana. *Nature Genetics*, v. 36, p. 167–171, 2004.
- KIM, Yongsig *et al.* Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of Arabidopsis. *Plant Journal*, v. 75, n. 3, p. 364–376, 2013.
- KUMAR, Sudhir *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, v. 35, n. 6, p. 1574–1549, 2018.
- LAMERS, Jasper; VAN DER MEER, Tom; TESTERINK, Christa. How Plants Sense and Respond to Stressful Environments. *Plant Physiology*, v. 182, n. 4, p. 1624–1635, 2020.
- LEMBKE, Carolina Gimiliani *et al.* Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. *Plant Molecular Biology*, v. 79, n. 4–5, p. 461–477, 2012.
- LING, Hui *et al.* Comprehensive Selection of Reference Genes for Gene Expression Normalization in Sugarcane by Real Time Quantitative RT-PCR. *PLOS ONE*, v. 9, n. 5, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097469>>.
- LIU, Qiang *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell*, v. 10, p. 1391–1406, 1998.
- MAGOME, Hiroshi *et al.* Dwarf and delayed-flowering 1, a novel Arabidopsis mutant deficient in gibberellin biosynthesis because of overexpression of a putative AP2 transcription factor. *Plant Journal*, v. 37, n. 5, p. 720–729, 2004.
- MARCOS, Fernanda C.C. *et al.* Drought tolerance of sugarcane is improved by previous exposure to water deficit. *Journal of Plant Physiology*, v. 223, p. 9–18, 2018.
- MARUYAMA, Kyonoshin *et al.* Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiology*, v. 150, n. 4, p. 1972–1980, 2009.
- MEDINA, Joaquín *et al.* The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*, v. 119, n. 2, p. 463–470, 1999.

- MESA, Leyanis *et al.* Ethanol production from sugarcane straw using different configurations of fermentation and techno-economical evaluation of the best schemes. *Renewable Energy*, v. 156, p. 377–388, 2020.
- MIZOI, Junya; SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. *AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. [S.l: s.n.], 2012
- MOISÉS, Ailton *et al.* Estudo de susceptibilidade à geada para a cultura da cana-de- açúcar. *Ciência, Tecnologia & Ambiente*, v. 3, n. 1, p. 43–50, 2016.
- MOON, Seok Jun *et al.* Ectopic expression of OsDREB1G, a member of the OsDREB1 subfamily, confers cold stress tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science*, v. 10, n. 297, p. 1–11, 2019.
- MUNNS, Rana; TESTER, Mark. *Mechanisms of salinity tolerance. Annual Review of Plant Biology*. [S.l: s.n.], 2008
- NAKASHIMA, Kazuo *et al.* Transcriptional regulation of ABI3- and ABA-responsive genes including RD29B and RD29A in seeds, germinating embryos, and seedlings of Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, v. 60, n. 1, p. 51–68, 2006.
- NAVARRO, M. *et al.* Complementary regulation of four Eucalyptus CBF genes under various cold conditions. *Journal of Experimental Botany*, v. 60, n. 9, p. 2713–2724, 2009.
- NOGUEIRA, Fábio T.S. *et al.* RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature. *Plant Physiology*, v. 132, n. 4, p. 1811–1824, 2003.
- NOVILLO, Fernando *et al.* CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 101, n. 11, p. 3985–3990, 2004.
- NOVILLO, Fernando; MEDINA, Joaquín; SALINAS, Julio. Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 104, n. 52, p. 21002–21007, 2007.
- OLSEN, Addie Nina *et al.* *NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse. Trends in Plant Science*. [S.l: s.n.], 2005
- ÖRVAR, Björn Lárus *et al.* Early steps in cold sensing by plant cells: The role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal*, v. 23, n. 6, p. 785–794, 2000.
- PATADE, Vikas Yadav *et al.* Cold tolerance in Osmotin transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) is associated with modulation in transcript abundance of stress responsive genes. *SpringerPlus*, v. 2, n. 117, 2013.
- PATADE, Vikas Yadav; BHARGAVA, Sujata; SUPRASANNA, Penna. Halopriming imparts tolerance to salt and PEG induced drought stress in sugarcane. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 134, n. 1–2, p. 24–28, 2009.
- PEARCE, Roger S. *Plant freezing and damage. Annals of Botany*. [S.l: s.n.], 2001
- PEREIRA, Leticia B. *et al.* Prospecting Plant Growth-Promoting Bacteria Isolated from the Rhizosphere of Sugarcane Under Drought Stress. *Current Microbiology*, v. 76, n. 11, p. 1345–1354, 2019.
- PINCELLI, Renata Passos; SILVA, Marcelo De Almeida. Alterações Morfológicas Foliares Em Cultivares De Cana-De-Açúcar Em Resposta À Deficiência Hídrica Leaf Morphological Changes in Sugarcane Cultivars in Response To Water Deficit. *Bioscience Journal*, v. 28, n. 4, p. 546–556, 2012.
- PORTER, John R. *et al.* Food security and food production systems. *Climate Change 2014 Impacts, Adaptation and Vulnerability: Part A: Global and Sectoral Aspects*. [S.l: s.n.], 2015. p. 485–533.
- QIN, Feng *et al.* Cloning and functional analysis of a novel DREB1/CBF transcription factor involved in cold-responsive gene expression in *Zea mays* L. *Plant and Cell Physiology*, v. 45, n. 8, p. 1042–1052, 2004.
- QUINT, Marcel *et al.* Molecular and genetic control of plant thermomorphogenesis. *Nature Plants*, v. 2, n. 1, p. 15190, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nplants.2015.190>>.

- RAJKOWITSCH, Lukas *et al.* RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biology*. [S.l: s.n.], 2007
- RIÑO-PACHÓN, Diego Mauricio; MATTIELLO, Lucia. Draft genome sequencing of the sugarcane hybrid SP80-3280. *F1000Research*, v. 6, n. 0, p. 861, 2017.
- RODRIGUES, Fabiana Aparecida; DE LAIA, Marcelo Luiz; ZINGARETTI, Sonia Marli. Analysis of gene expression profiles under water stress in tolerant and sensitive sugarcane plants. *Plant Science*, v. 176, n. 2, p. 286–302, 2009.
- RODY, Hugo V.S. *et al.* Genome survey of resistance gene analogs in sugarcane: Genomic features and differential expression of the innate immune system from a smut-resistant genotype. *BMC Genomics*, v. 20, n. 809, p. 1–17, 2019.
- RUELLAND, Eric *et al.* Chapter 2 Cold Signalling and Cold Acclimation in Plants. *Advances in Botanical Research*. [S.l: s.n.], 2009
- S. SANGHERA, Gulzar *et al.* Engineering Cold Stress Tolerance in Crop Plants. *Current Genomics*, v. 12, n. 1, p. 30–43, 2011.
- SAKUMA, Yoh *et al.* DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 290, n. 3, p. 998–1009, 2002.
- SCHMITTGEN, Thomas D.; LIVAK, Kenneth J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols*, v. 3, p. 1101–1108, 2008.
- SEO, Eunjoo *et al.* Crosstalk between cold response and flowering in Arabidopsis is mediated through the flowering-time gene SOC1 and its upstream negative regulator FLC. *Plant Cell*, v. 21, n. 10, p. 3185–3197, 2009.
- SHEN, Qingxi; ZHANG, Pengnian; HO, Tuan Hua David. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*, v. 8, n. 7, p. 1107–1119, 1996.
- SHI, Yiting *et al.* Ethylene signaling negatively regulates freezing tolerance by repressing expression of CBF and type-A ARR genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, v. 24, p. 2578–2595, 2012.
- SHI, Yiting; DING, Yanglin; YANG, Shuhua. Molecular Regulation of CBF Signaling in Cold Acclimation. *Trends in Plant Science*, v. 23, n. 7, p. 623–637, 2018.
- SILVEIRA, Neidiquele M. *et al.* Encapsulation of S-nitrosoglutathione into chitosan nanoparticles improves drought tolerance of sugarcane plants. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, v. 84, p. 38–44, 2019.
- SILVEIRA, Neidiquele M. *et al.* Evidence towards the involvement of nitric oxide in drought tolerance of sugarcane. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 115, p. 354–359, 2017.
- SOUZA, Glaucia Mendes *et al.* Assembly of the 373k gene space of the polyploid sugarcane genome reveals reservoirs of functional diversity in the world's leading biomass crop. *GigaScience*, giz129, v. 8, n. 12, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/gigascience/giz129>>.
- STOCKINGER, Eric J.; GILMOUR, Sarah J.; THOMASHOW, Michael F. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 3, p. 1035–1040, 1997.
- THIRUGNANASAMBANDAM, Prathima P; HOANG, Nam V; HENRY, Robert J. The Challenge of Analyzing the Sugarcane Genome. *Frontiers in Plant Science*, v. 9, p. 616, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2018.00616>>.
- THOMASHOW, Michael F. Molecular basis of plant cold acclimation: Insights gained from studying the CBF cold response pathway. *Plant Physiology*, v. 154, p. 571–577, 2010.

- VIEIRA, Gustavo Haddad Souza *et al.* Época De Interrupção Da Irrigação Na Cultura Da Cana-De-Açúcar. *Irriga*, v. 18, n. 3, p. 426, 2013.
- VILELA, Mariane de Mendonça *et al.* Analysis of Three Sugarcane Homo/Homeologous Regions Suggests Independent Polyploidization Events of *Saccharum officinarum* and *Saccharum spontaneum*. *Genome Biology and Evolution*, v. 9, n. 2, p. 266–278, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/gbe/evw293>>.
- WANG, Qiuyun *et al.* Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology*, v. 67, n. 6, p. 589–602, 2008.
- WARDLAW, Ian F. &Responses of Plants to Environmental Stresses&. J. &span class="sc"&Levitt&/span&. Academic Press, New York, 1972. xiv, 698 pp., illus. \$32.50. Physiological Ecology. *Science*, v. 177, n. 4051, p. 786 LP – 786, 1 set. 1972. Disponível em: <<http://science.sciencemag.org/content/177/4051/786.1.abstract>>.
- XUE, Gang Ping; LOVERIDGE, Carl W. HvDRF1 is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant Journal*, v. 37, n. 3, p. 326–339, 2004.
- YE, Keyi *et al.* BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE2 Negatively Regulates the Stability of Transcription Factor ICE1 in Response to Cold Stress in *Arabidopsis*. *The Plant cell*, v. 31, n. 11, p. 2682–2696, 2019.
- ZARKA, Daniel G. *et al.* Cold Induction of *Arabidopsis* CBF Genes Involves Multiple ICE (Inducer of CBF Expression) Promoter Elements and a Cold-Regulatory Circuit That Is Desensitized by Low Temperature. *Plant Physiology*, v. 133, n. 2, p. 910–918, 2003.
- ZHANG, Shu Zhen *et al.* Expression of the *Grifola frondosa* trehalose synthase gene and improvement of drought-tolerance in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 48, n. 4, p. 453–459, 2006.
- ZHANG, Xin *et al.* Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant *Arabidopsis*. *Plant Journal*, v. 39, n. 6, p. 905–919, 2004.
- ZHAO, Chunzhao *et al.* Mutational evidence for the critical role of CBF transcription factors in cold acclimation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 171, p. 2744–2759, 2016.
- ZHAO, Duli; LI, Yang Rui. Climate Change and Sugarcane Production: Potential Impact and Mitigation Strategies. *International Journal of Agronomy*, v. 2, p. 1–10, 2015.
- ZHAO, Tong Jin *et al.* Regulating the drought-responsive element (DRE)-mediated signaling pathway by synergic functions of trans-active and trans-inactive DRE binding factors in *Brassica napus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2006.
- ZHAO, Xiaowen; JIANG, Yuke; *et al.* Effects of Drought-Tolerant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane on Bacterial Communities in Soil. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 2020.
- ZHAO, Xiaowen; LIU, Qi; *et al.* Response of Soil Fungal Community to Drought-Resistant Ea-DREB2B Transgenic Sugarcane. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 2329, 2020.
- ZHU, Jian Kang. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>>.

ANEXOS

ANEXO A. *Contigs* obtidos através do uso da ferramenta *blastn* das seqüências obtidas frente ao genoma de cana-de-açúcar (SP80-3280).

Score em *bits* é uma medida de qualidade do alinhamento por *blastn*, sendo maiores valores mais desejados. *E-value* é o número de *bits* esperados com a mesma qualidade (score) que podem ser encontrados por acaso, menores valores são desejados.

ANEXO B. *Contigs* obtidos através do alinhamento por *blastn* das sequências obtidas para as colônias recombinantes oriundas de AP2 frentes ao genoma da cana-de-açúcar (SP80-3280).

Score em *bits* é uma medida de qualidade do alinhamento por *blastn*, sendo maiores valores mais desejados. *E-value* é o número de *bits* esperados com a mesma qualidade (score) que podem ser encontrados por acaso, menores valores são desejados.

ANEXO C. Parte do “scga7_uti_cns_0019446” obtido através de *blastn* frente ao genoma da cana-de-açúcar (SP80-3280) utilizando as sequências obtida a partir de colônias recombinantes para o par *AP2*. Em azul está o gene encontrado nesta sequência, *SoCBF2*.

```
>scga7_uti_cns_0019446
ggaactctcaagatcacggttaccatgcatgcattatgcaattacatctctagctccaaattaaacgaccaaact
gagaaaactcagtccttctgcttctcctgatcacccctttatcagaagagcagggatatattaacagtacggagtagc
gacgaactgaagggaaagggcaaccggtacatttcaccggcactactagattcttcccaggctgtacaggggaag
ttatttgcccaatgcaatctagtagcttgcttcaaattgcgcgcgataggtcatcagtagctccagagcttgacct
cacggtcgtcgtcgtcgtcgcgccactggtggacgaaccagccatcggtgggtggatcaatgagcatcccatgcg
ccatgtcgaggtacccctgcatcccgaaagtcgagcctgtcgtcgataatgcagtagcgggtgggtcatcgacgctct
gcgtcgcgctaggaaggcatccagcggtgtggtatctgcgcctcctcggcgggccacattgccctgatgatcag
gcgcggggcggaactgctccgcgcgcacggcgggcgcccggcgatatctcgtcatgcccggagcccatcggcggca
ccctgaggaggcgcgggcagtcggcggaagttgaggcaggcgcgcgccccgcagcgtgagcgcgcgacgctcgt
gcgcgcgcgcgcgccatctcggcggtctcgaagggtccccagccatatccgctgcttgccgtgcgggtccccgcacct
cgcagacccacctcccggggttcctccgcgcacgccttgtacacggggtgcgcgctctccttgaacttggtcc
gccccggtcgcgcgttgggcgggcgccgacgacaccgtcatgtacgacgaggaggagccgtcgcgcgcgcgcgcga
caggggacggcggtcccagaggagtagtcgctcaaggatccggcggtccatgggtgaagcgcggggtgtgggtggc
cgtggcgagctgggggaggaggaacgagtcggagcatttgatttgaaatttgagggaagggtggcggttatat
aggtttagcgcgtggagagcgacgtggccgcgtgactgttcccacgcggtgcggctcgggaggcgccagccaggt
agtgcgacttgatgggtcgggcggggggttcgggacttcgggtgagagggttgctcgtcgggctcggagggttt
gctgggtcggaaaccagctggagctcgcggggccggggacggggacgcgcgggacgcgcaggcatgggatccaagt
gggcgcctgggcttccttcgctgctgttgggcgctaagctactagtctagtagggctcttctcgtgatggcgat
gtgtgttgaaaaggcgtgacgccttgagaggggacgggacggaactctcagtagaggctggtagtttgatgcgca
ctcgtgcgagacggatagcgtgggattctctgcacgcgcgcgcggaccggtgcaagtgatcggagggggcc
acgcagag
```

ANEXO D. Parte do “scga7_uti_cns_0089699” obtido através de *blastn* frente ao genoma da cana-de-açúcar (SP80-3280) utilizando as sequências obtida a partir de colônias recombinantes para o par *AP2*. Em azul está o gene encontrado nesta sequência, *SoCBF1*.

```
>scga7_uti_cns_0089699
cgggtgaaaacgaaccaggccggccatctctggaagccggagccttaacgccagcgatacgcgagtcgctctcc
ctcaccgtacgtaccatcatgggtgatctggaaaccccgagaccaagtccaatataactgccgcctaaccaaccg
tggagtgggatcctctgctggccccatccgatcacttgcaccgggtccagcgcggttcggtctcgcacgagtacgc
atcaaactaccagcctcacttcacttgagagttccgtccctctcaaggcgtcacgccttttccacacacatcgc
tgtcagcgaaaagagcagccagccctgactactagtagcttagcgcccaacagcagcggaaggaagcccaggcgggc
cacttggatcccatgctcgcgctccccgtccccggccccgcgagctccagctgggtccgatccagcaaacctc
cgagcccgacgagcaagccctctcaccggaagtcgccgagcccccgcccgacacatcaagtgcgactacctggct
ggcgctcccgagccgcaccgctgggaacagtgcacgcggccacgtcgctctccacgcgctaacctatataacc
cgccacctttccctccaaatttcaaataaatgctccgactcggttcctcctccccagctcgccacacaccgcg
cttcacccatggacgcgggactccttgagcgactactcctctgggacgcgcgtccctgtcgggcgggcgggcgggcg
gcgacgacgggtcctcctcgctcgatgacgggtgtcgctcggcgcgcgccaagcgggcgagccgggaggaccaagt
tcaaggagacgcgggcaccccggtgtacaagggcggtgcggcgagggaaccccgggaggtgggtctgcgaggtgcggg
agccgcacggcaagcagcggtatggctcgggaccttcgagaccgcgagatggcgggcgcgcgcgacgacgtcg
ccgcgctcgcgctgcggggcgcgccgcctgcctcaacttcgcccactcgccgcgcctcctcaggggtgcgcgcga
tgggctccgggcatgacgagatacgcggggcgccgcgctggcgggcgagcagttccgaccggcgccctgatcatc
agggcaatgtggccgagggagggcggcagataccacaccgctggatgccttgccctagcgcgacgcagagcgctcg
atgaccaccgctactgcattatcgacgacaggctcgacttcgggatgcaggggtacctcgacatggcgcaagggga
tgctcattgatccaccaccgatggctgggttcgtccaccagtggcgggcgacgatgacgacgacggtgaggtcaagc
tctggagctactgatgaccgatcgcgcgcatgtgaagcaagctactagcttgcatgggcaaataaacttcctgt
acagcctcgggaagaatctagtagtacgggtcaaagtaccgggttgccctttcccttcagttcgtccgtactccg
tactgttaataataccctgctcttctgataaaggtgatcaggagaagcagaagactgagttttctcagtttggtc
gtttaatttgagctagagatgtaattgcataatgcatgcatggtaacgggtgatcttgagagttccatcagcagc
acttgtaataagccgcaaaagcatggggcttcattgatggatttgggaatggcctgatgggtatattattgatgct
gcattgagaacttggcttgggtcagggatcagaaactataatccttctgaaaacctgggtacccacgcacctgatc
atgaagctccaaccgctctaagttcatgtggttcaaatccttactataaatgctaca
```

ANEXO E.

Sequências de aminoácidos utilizadas para confecção da árvore filogenética.

*Arabidopsis thaliana***AtCBF1 (NP_567721.1)**

MNSFSAFSEMFSGDYEPQGGDYCPTLATSCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVQRNSGKWVSEVREPNNKKTRIWLGTFTQAEEMAARAHDA
ALALRGRSACLNFAADSAWRLRIPESTCAKDIQKAAAEALAFQDETCTTTNNHGLDMEETMVEAIYTPSEQSEAFYMDDEETMFGMPTLLD
NMAEGMLLPPSPVQWNHNYDGEVDGDDVSLWSY

AtCBF2 (NP_567719.1)

MNSFSAFSEMFSGDYESPSSGGDYSPKLATSCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVQRNSGKWVCELREPNNKKTRIWLGTFTQAEEMAARAH
VAAIALRGRSACLNFAADSAWRLRIPESTCAKEIQKAAAEALNFQDEMCHMTTDAHGLDMEETLVEAIYTPESQDAFYMDDEEAMLGMS
LLDNMAEGMLLPPSPVQWNYNFDVEGDDVSLWSY

AtCBF3 (ABV27154.1)

MSSFSAFSEMFSGDYESSISSGGDIPTLASSCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVRRNSGKWVCEVREPNNKKTRIWLGTFTQAEEMAARAH
AALALRGRSACLNFAADSAWRLRIPESTCAKDIQKAAAEALAFQDEMCDVTTDHGFDMEETLVEAIYTAEQSENAFYMHDEAMFEMPSLLA
NMAEGMLLPLPSVQWNNHNEVDGDDDDVSLWSY

AtCBF4 (NP_200012.1)

MNPFYSTFPDSFLSISDHRSPVSDSESCPKKLASSCPKKRAGRKKFRETRHPIYRGVQRNSGKWVCEVREPNNKSRIWLGTFTPTVEMAARAH
DVAALALRGRSACLNFAADSAWRLRIPESTCPKEIQKAAAEAMAFQNETTTEGSKTAAEAEAAAGEGVREGERRAEQNGGVFYMDDEALL
GMPNFFENMAEGMLLPPPEVGNHNDGVDGVDVSLWSFDE

AtCBF5 (NP_191274.1)

MENDDITVAEMKPKKRAGRRIFKETRHPYRGVRRRDGDKWVCEVREPIHQRRVWLGTPTADMAARAHDAVAVLALRGRSACLNFAADSA
WRLPVPASTDPDITRTAAEAEMFRPPEFSTGITVLPASEFDTSDGAVAGMMMLRAEELMSPPRSIDMNTSVVDEEMCYEDLSLWS
Y

AtCBF6 (NP_172721.1)

MNNDIILAEMRPKKRAGRRVFKETRHPYRGIRRRNGDKWVCEVREPTHQRRVWLGTPTADMAARAHDAVAVLALRGRSACLNFAADSA
WRLPVPESNDPDVIRRVAAEAEMFRPVDLESGITVLPAGDDVDLFGSGSGSGSGSEERNSSSYGFGDYEEVSTTMMRLAEGPLMSPPR
SYMEDMTPTNVYTEEMCYEDMSLWSYRY

*Brassica napus***BnDREB2-2 (ACL12046.1)**

MTSFAFSEMLGSEYESTLSGEYCPTLAASCPKKPAGRKKFRETRHPIYRGVRLRNSGKWVCEVREPNNKSRIWLGTFTLAEIAARAHDAVAI
ALRGKSACLNFAADSAWRLRIPESTCPKDIQKAAAEAAVAFQAEINDTTKDHGLDVEETIVEAIFTEENSDFYMDDEEESMFGMPTLLASMAE
GMLLPPSPVQFEYNYDFDGD TDVSLWSY

*Capsicum annuum***CaCBF1B (AY368483)**

MNIFRSYSDPLTESSSSSDSIYSPNRAIFSDEEVLASNNPKKPAGRKKFRETRHPYRGVVRKNSGKWVCEVREPNNKSRIWLGTFTPTAEM
AARAHDAVAIALRGRSACLNFAADSAWRLPVPASDTKDIQKAAAEAAEFRLKLEGISKESSSTPESMFFMDEEALFCMPGLLTNMAEGL
MLPPPQCAEIGDHVETADADTPLWSYSI

*Eucalyptus gunni***EguCBF1a (ABB51637.1)**

MNPFSSSHPNSCRNFNAEPPSDSRATLGNFSHKEVLLASHHPKKRAGRKKFRETRHPYRGVRLRDSGKWVCEVREPIKKSRIWLGTFTPT
VEMAARAHDAVAVLALRGRSACLNFAADSAWRLPVPASADTKEIQKAAARAAEFQSVESDVMMSGDEKKLRSEEGVFYDEEDIFGMPGLLAD
MAEGMLLSPPKWGGDIYGGEGEGLNLAHTSLWSYSI

EguCBF1b (ABB51638.1)

MNSSSYSHPNFSFDFAEPPFSLLSHDRSAAPGNFSGEEVRLASDHPPKKPAGRKKFRETRHPYRGVRLRDSGKWVCEVREPRKKSRIWL
TFPTADMAARAHDAVAVLALRGRSACLNFAADSAWRLPVPASPNTKDIQKAAAKAAEFQLVESEDVMSGNEKKLHSEEGVLYDEEDIFGMP
GLLANMAEGMLLSPPECSDIYAGLDDGNL DAYTSLWSYSI

EguCBF1c (ACF15446.1)

MNHFFSSYSDPSSCILDFAEASSSSPLSDGRSAMAPGNFSDDEEVLLASHLPKKRAGRKKFQETRHPYRGVRRRSSGKWVCEVREPDKKSGI
WLDTFPTAEMAARAHNVAALALWGRSACLNFAADSAWRLPAPASADAKDIQKAAQAQAAEFRAESEAEDVMSGYERKPPSEEGMLYDDE
DVFGMPGLLTNMAEGMLLPPQCGGDGYGGEDGNL DAYVSLWSYSI

EguCBF1d (ACF15447.1)

MAAPGNFPDEEVLASHHPKKRAGRKKFRETRHPYRGVRLRDSGKWVCEVREPRKKSRIWLGTFTPTVEMAARAHDAVAVLALRGRSACLN
FVDSAWRLPVPASADTKEIQKAAAKAAVAFQVSESEDVMSGDEKKSPEEGMLFDDDEDVFGMPGLLTNMAEGMLLPPRCGGDGYGG
EDGNL DAYVSLWSYSI

<p><i>Gossypium hirsutum</i></p> <p>GhDREB1A (AY321150) MDFVVDYDMVDSGVSSEGTDRPVNFSDEYVMLASSYPKRPAGRKKFRETRHPVYRGVRRRNPGKWVSEVREPNNKSRIWLGTFPKAD MAARAHDAALALRGKSACLNFAADSAWKLVPASSDPKDIQKTVAEVAETFRTAEHSSGNSRNDAKRSENTEMEKGFYLDDEALFGTQRFW ANMAAGMMMSPPRSGHDGGWEEHVEDDYVPLWSYSI</p>
<p><i>Hordeum vulgare</i></p> <p>HvCBF2(AAM13419.1) MDTVAAWPQFEGQDYMTVWPPEEQEYRTVWSEPPKRRAGRIKQETRHHPVYRGVRRRGKVGQWVCELRVPVSRGYSRLWLGTFANPEM AARAHDAALALSGHDACLNFAADSAWRMMPVHATGSFRLAPAQEIKDAVAVALEVFQGGHPADACTAEGSTTPITSSDLSGLDDEHWIGG MDAGSYYASLAQGMLEPPAAGGWREDDGEHDDGFSTSTSLWSY</p>
<p><i>Oryza sativa</i></p> <p>OsDREB1A (XP_015610912.1) MCGIKQEMSGESSGSPCSSASAEQHQTVWVAPPKRPAGRTKFRETRHPVFRGVRRRGNAGRWVCEVRVPGRRGCRLWLGTFDTAEGA ARAHDAAMLAINAGGGGGGACLNFAADSAWLLAVPRSYRTLADVRHAVAEEVDFRRRLADDALSATSSSTTPSTPRTDDEESAATD GDESSPASDLAFELDLVSDMGWDLYYASLAQGMLEPPSAALGDDGDAILADVPLWSY</p> <p>OsDREB1B (XP_015610928.2) MEVEEAAYRTVWSEPPKRPAGRTKFRETRHPVYRGVRRRGGRPGAAGRWVCEVRVPGARGSRLWLGTFATAEAAAARAHDAALALGRGA ACLNFAADFAWRMPPVPASAALAGARGVRDPVAVAVEAFQRQSAAPSSPAETFANDGDEEANKDVLPAAAEVFDAGAFELDDGFRFGG MDAGSYYASLAQGLLEPPAAGAWWEDGELAGSDMPLWSY</p> <p>OsDREB1G (XP_015624757.1) MDVSAALSSDYSGTSPVAADADDGSSAYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHVPFKGVRRRNPGRWVCEVREPHGKQRIWLGTFETAEMA ARAHDAALALGRGAACLNFAADSPRRLRVPPIGASHDDIRRAAAEAAEFRRPPDESNAATEVAAAASGATNSNAEQFASHPYEVMDDGL DLGMQGYLDMAQGMILIDPPPMAGDPAVSGGEDDNDGEVQLWSY</p>
<p><i>Prunus avium</i></p> <p>PaDREB1 (AB080966) MDMFFSQLSDSVDQPSQLLSDASVTTRGASCDGDVILASSRPKKRAGRRVFKETRHHPVYRGVRRRNNDKWVCEMREPNNKKKSRIWLGTY PTAEAAARAHDAALAFRGKLACINFAADSAWRLVPASMDTMDIRRAAAEAAEGFRPVFEFGGVCSSGDEKERMVVQVEENKKGSVNL ERSRSLSLSYWDEEEVFHMPRLHDMAEGLLLSPSQCLGGYMNLDMDGTADADVKLWSFSI</p>
<p><i>Secale cereale</i></p> <p>ScCBF (AAL35759.1) MDAADAGSPRFGHRTVCSEPPKRPAGRTKFKETRHPLYRGVRRRGRGLGQWVCEVRVPGAQGYRLWLGTFTTAEAAARAHDSAVLALLDR AACLNFAADSAWRMLPVLAAAGSSRFSSAREIKDAVAVAVVEFQRQRPVSTSETADGEKDVQGSPPRSELSTSSDLLDEHWFSGMDAGSYYA SLAQGMLEPPAARAWSEDGGEYSGVHTPLWN</p>
<p><i>Sorghum bicolor</i></p> <p>SgCBF1A (AFP33239.1) MDMGRLLQQHQHATCSSSTSTASSTSSSEQTIKAVVWSPSSSSSQPPKRPAGRTKFRETRHPVYRGVRRRGAAGRWVCEVRVPGKRG RLWLGTYLAAESAARAHDAAMLALGRGGAAGCLNFPDASWLLAVPPSAISGLDDARRAALEAVAEFQRRFGAAAAAAGGCGSVDEATS GVSAPPLSTSSLPGISSGSPAPAPELEQVPVKANETATALDGDVFEADWFGDMDMELDVYYASLAEGLLVEPPAPAAAWDHGDCCDAG ADVALWSY</p> <p>SgCBF1B (XP_002462689.2) MAIYTFPAAFRSFHSPSSTAPSIPARLPHTLLTKLLIFSESAMDTPSPSPTSSAGHDEYRTVWSAPPKKPAGRTKFRETRHPVY RGVRRRGTGLRWVCEVRVPGGRGSRLWLGTFTTPELAARAHDAALALSRGACLNFAADSAWLLPPLMPAALSAPELASARE VKDAVAEAVEAFRCSVAEPTLSSPPNDTADDEEEEDDDDDAVSSPGAVPWNDVAFEFEDVFRFGGMVDAGSYYASLAQGL LVDPPDAAGAWREDVVHATADTVLWSY</p> <p>SgCBF1C (XP_002436386.1) MEYGVADDYGYGYGGYDDQQLPSSSSVDGDEYATVLSAPPKRPAGRTKFRETRHPVYRGVRRRGPAGRWVCEVREPNNKS RIWLGTFATAEAAAARAHDAALALGRGAACLNFAADSAWLLRVDPATLATPDDIRRAAIQLAEDSSSSTPDASAAAAAVAVASSA SVGQATPSSSAYQAGDDATGAAMYGAEYAAAAMYAGMDFDHSYYDGMVGGNEWQSAGSSGWHSNVDAGDDEGAG DMSLWSYY</p> <p>SgCBF1G (XP_002454484.2)</p>

MLRHTELLPPARHGHHTTRPSPMDAASFSDYSSGTPSPVGGVSGGVDGDDGGSSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRRNP GRWVCEVREPHGKQRIWLGTFETAEMAARAHDAALALRGRAACLNFADSPRLRVPPMGSGHDEIRRAAAVAADQFRPAPDRQGNVAT AEEAADTTPLDATTQSVDDPYCIIDRLDFGMQGYLDMAQGMILIDPPPAGSSTSGGDDDDGGEVKLWSY
<p><i>Solanum lycopersicum</i></p> <p>SICBF3 (ASK51848.1) MFYSDPRIESCSSFDSIRANHSDEEVILASNNPKPAGRKKFRETRHPVYRGVVRKNSGKWVCEVREPNNKTRIWLGTFTAEMAARAHDA AAIALGRSACLNFAADSAWRLPTPDSSDTKDQKAAQAAEIRPLKSEEEESVVKDQSTTPDDMFFMDEEALFCMPGLLTNMAEGLMVPP PQCTEMGDHVEADDMPLWSYI</p> <p><i>Saccharum hybrid cultivar SP80-3280</i></p> <p>SoCBF1 MDAGSLSDYSSGTPSPVGGGGGGDDGSSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRRNPGRWVCEVREPHGKQRIWLGTFETA MAARAHDAALALRGRAACLNFAADSPRLRVPPMGSGHDEIRRAAAVAEAEQFRPAPDHQGNVAEEAADTTPLDALPSATQSVDDHPYCI DDRLDFGMQGYLDMAQGMILIDPPPAGSSTSGGDDDDGGEVKLWSY</p> <p>SoCBF2 MLRLVPPPPARHGHHTTRASPMDAGSLSDYSSGTPSPVGGGGGGSSSSYMTVSSAPPKRRAGRTKFKETRHPVYKGVRRRNPGRWVCEVR EPHGKQRIWLGTFETAEMAARAHDAALALRGRAACLNFAADSPRLRVPPMGSGHDEIRRAAAVAEAEQFRPAPDHQGNVAEEAADTTPL DALPSATQSVDDHPYCIIDRLDFGMQGYLDMAHGMILIDPPPAGSSTSGGDDDDGGEVKLWSY</p> <p>SoCBF3 MCPIKKEMSTESSGLAASSWPSASPSTSEHQTWVTSPPKRPAGRTKFKETRHPVFLGVRRRGNAGRWWCEVRVPGRRGCRLWLGTFTD TAEAAAAAHDAAMLAIAGAGACLNFAADSAWLLAGRSRTASPTYARRSPRPWRLPSAPRRGGGCRDTNARSATSFAPSTWATRRRFLEG ESLSGQRHGRMFVQVGWFNGL</p> <p>SoCBF4 MCPIKKEMSAESSASVSSWPLSSPSTSEHHQTWVTSPPKRPAGRTKFKETRHPVFRGVRRRGNAGRWWCEVRVPGRRGCRLWLGTFTDA EAADRAHDAVMLAIAGAGACLNFAADSGWVLTVAGLVLRRLGPTRCLRGRGLFPASCFGGCFLW</p> <p><i>Triticum aestivum</i></p> <p>TaCBF1 (AAL37944.1) MDTAAAGSPREGHRTVCSEPPKRPAGRTKFKETRHPVLYRGVRRRGRGLQWVCEVRVGAQGYRLWLGTFTTAEMAARAHDSAVLALLDR AACLNFAADSAWRMLPVLAAGSSRFSSAREIKDAVAIAVLEFQRQRPVSTSEMHDEKDAQGSPTSELSTSSDLLDEHWFEGMDAGSYA SLAQGMLEPPSARTWSEDGGEYSAYVTPLWN</p> <p>TaCBF2 (AAT76662.1) MDAADAASPCDGHRTVWSEPPKRPAGRTKFKETRHPVLYRGVRRRGPAWRVCEVRVLGMRGSRLWLGTFTTAEMAARAHDAAVLALSG RAACLNFAADSAWRMLPVLAGPFSTAKEIKDAVAVAVLAFQRQHRVASMAPLSPARTTDDKEIDGSPAPSALFMSELLNEHWFEGMDAG SFYSEGLFMESPDTRPWREDLELCGVETPPWSYLF</p> <p><i>Zea mays</i></p> <p>ZmDREB1A (AAN76804.1) MDTAGLVQHATSSSTSTASSSSSEQSRKAAWPPSTASSPQQPPKRPAGRTKFKETRHPVFRGVRRRGAAGRWWCEVRVPGRRGARL WLGTYLAAEAARAHDAAILALQGRGAGRLNFPDSARLLAVPPPSALPGLDDARRAALEAVAEFQRRSGSGGADEATSGASPPSSPSLP DVSAAGSPAAALEHVPKADAEVALDLGDVFGPDWFGDMGLELDAYYASLAEGLLVEPPPPAAWDHGDCCDSGAADVALWSY</p> <p>ZmDREB2A (QAA78761.1) MDRVPPPVSMQVAAMQRHQQQQFVHHLQQVHQGTQHEQPPPHQNGSSSSGGRTGGGRKCCPLRRSRKGCMMKGKGGPDNQQC PFRGVRQRTWGWVAEIREPNRGARLWLGTFGSALEAARAYDAAARTLYGDCARLNLQLVPPSAAAAAGGGGPAVVASPSPTVAGPA AAAGGHNCHHQYLQQQHAMAAPMMVMHSSCCSADGSSSNSDSISNSSSPVTTAASPAYSHHQTTFQTPAPPPSCGAMTMAAAAPHV QGFHVGGDDTTTAMAMHRHQQMMRELAEAPLHQEADDFDFVTRLPKAEDFGLQGFQEVAPEVFDAAAGIWDHAAAWPEPTMMIDS GAQPQQQLVPL</p>