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

**Montagem *de novo* do transcriptoma de teca (*Tectona grandis* L. f.)
e busca por genes relacionados ao estresse hídrico**

Tarcísio Sales Vasconcelos

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

**Piracicaba
2015**

Tarcísio Sales Vasconcelos
Engenheiro Agrônomo

**Montagem *de novo* do transcriptoma de teca (*Tectona grandis* L. f.) e busca
por genes relacionados ao estresse hídrico**

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

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

Piracicaba
2015

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

Vasconcelos, Tarcísio Sales

Montagem de novo do transcriptoma de teca (*Tectona grandis* L. f.) e busca por genes relacionados ao estresse hídrico / Tarcísio Sales Vasconcelos. - - Piracicaba, 2015.
218 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. RNA-seq 2. Lamiaceae 3. Bioinformática 4. Árvore tropical 5. Seca I. Título

CDD 634.97338
V331m

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo valioso apoio financeiro, que foi fundamental para minha manutenção durante todo o Mestrado.

À Prof.^a Dr.^a Helaine Carrer, pela orientação, compreensão e paciência.

Ao Dr. Esteban Galeano, pela ajuda nos experimentos, incentivo, apoio didático e pela contribuição financeira ao laboratório.

Ao João Gabriel Vezza Campos, pelo seu entusiasmo com a pesquisa e por todo o trabalho realizado na etapa de Blast.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas: Aline Borges, André Luiz Barboza, Ênio Tiago de Oliveira, Fernando Luiz Paffaro, Flávio dos Santos, Guilherme Kenichi Hosaka, Tânia Regina Batista e Valentina de Fátima de Martin, pelas sugestões, ajuda, convivência e amizade.

Às colegas de programa Ana Paula Preczenhak e Eveline Calderan Meneghetti, pelos almoços, discussões sobre a pós-graduação, amizade, risadas e apoio.

À secretária Maria Solizete Granzio Silva, por sua simpatia, prontidão no atendimento, e por toda a ajuda prestada com os diversos documentos.

À Dr.^a Ana Paula Jacobus e ao Dr. Jeferson Gross, pela simpatia e apoio.

Ao MSc. Albert Roy Leatherman III, por toda sua ajuda nas traduções, apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, pelo sequenciamento Illumina.

Ao Prof. Dr. Marcelo Eduardo Alves, pelas sugestões e ajuda no experimento de déficit hídrico.

Ao Dr. Marcelo Mendes Brandão, por sua valiosa ajuda no início do trabalho.

Aos colegas do programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela convivência.

Aos professores Dr. Daniel Scherer de Moura, Dr. Ricardo Ferraz de Oliveira, Dr. Marcílio de Almeida e Dr. Mário Tomazello Filho, pelo conhecimento ofertado nas disciplinas realizadas.

Ao programa de Fisiologia e Bioquímica de Plantas, pela oportunidade.

Ao querido Samuel Gustinelli Netto, pela paciência de me agüentar por todos estes anos, e pelos outros que ainda virão.

À minha mãe, Débora Sales Vasconcelos, pela energia positiva enviada à distância.

A todos os demais cuja importância se fez significativa para a conclusão deste trabalho.

MUITO OBRIGADO!

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder entusiasmo.”

Winston Churchill

“Ama-se mais o que se conquista com esforço.”

Benjamin Disraeli

“Desejo a todas as inimigas vida longa,

Para que elas vejam a cada dia mais

Nossa vitória!”

Beijinho no Ombro, Valesca Popozuda

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
LISTA DE TABELAS	19
1 INTRODUÇÃO	21
Referências	23
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
2.1 A Teca	25
2.1.1 Aspectos gerais da espécie.....	25
2.1.2 Ecologia e fenologia da teca	29
2.1.3 Biologia reprodutiva de teca	31
2.1.4 Desafios para a exploração de teca	33
2.1.4.1 Sítio florestal e tratos culturais	33
2.1.4.2 Problemas fitossanitários	34
2.1.5 Estudos genéticos em teca	36
2.2 Genômica e o Sequenciamento de DNA.....	37
2.3 As novas tecnologias de sequenciamento	41
2.4 Plataforma Solexa/Illumina (Illumina)	42
2.5 Sequenciamento de RNA (RNA-seq)	44
2.6 Reconstrução de transcriptomas	45
2.6.1 Montagem guiada por referência.....	46
2.6.2 Montagem sem referência.....	47
2.7 Expressão diferencial	47
2.8 Anotação dos transcritos	48
2.9 Estresse Abiótico em Plantas.....	50
2.9.1 Estresse por Déficit Hídrico	52
Referências	55
3 MONTAGEM <i>de novo</i> E ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE TECA	75
Resumo	75
Abstract	75
3.1 Introdução	76
3.2 Material e Métodos	77

3.2.1 Material Vegetal	77
3.2.1.1 Coleta de flores	78
3.2.1.2 Coleta de frutos e produção de plântulas	79
3.2.2 Extração de RNA total	80
3.2.2.1 Limpeza do material utilizado na extração	80
3.2.2.2 Constituição das amostras	81
3.2.2.3 Extração e avaliação da qualidade do RNA total	81
3.2.2.4 Tratamento com DNase	82
3.2.3 Construção das bibliotecas e Sequenciamento	83
3.2.4 Recursos computacionais, pré-processamento dos <i>reads</i> e montagem dos <i>contigs</i>	83
3.2.5 Anotação das sequências	85
3.2.6 Expressão Diferencial	85
3.3 Resultados e Discussão	86
3.3.1 Extração de RNA	86
3.3.2 Sequenciamento e pré-processamento dos <i>reads</i>	87
3.3.3 Montagem <i>de novo</i> do transcriptoma	92
3.3.4 Busca por sequências homólogas utilizando BLAST	93
3.3.5 Ontologia gênica e anotação funcional	94
3.3.6 Mapas metabólicos	101
3.3.7 Expressão Diferencial	111
3.4 Considerações Finais	118
Referências	118
4 ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO EM TECA E BUSCA POR GENES RELACIONADOS	121
Resumo	121
Abstract	121
4.1 Introdução	122
4.2 Material e Métodos	123
4.2.1 Material Vegetal	123
4.2.2 Estimativa do Conteúdo de Água nos Vasos	124
4.2.3 Experimento de déficit hídrico	126
4.2.3.1 Delineamento experimental	126
4.2.3.2 Condução do experimento	126

4.2.3.3 Coleta das plantas.....	127
4.2.3.4 Avaliações Fisiológicas	127
4.2.3.5 Conteúdo Relativo de Água Foliar.....	128
4.2.3.6 Conteúdo de Prolina Livre Foliar	129
4.2.3.7 Análise Estatística	129
4.2.4 Extração de DNA genômico e RNA total.....	130
4.2.5 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total.....	130
4.2.6 Síntese de cDNA.....	131
4.2.7 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)	131
4.2.8 Seleção dos Transcritos	131
4.2.9 Avaliação dos Transcritos e Desenho de <i>Primers</i>	132
4.2.10 Purificação, Sequenciamento e Validação dos Transcritos.....	133
4.3 Resultados e Discussão	133
4.3.1 Variações ambientais	133
4.3.2 Conteúdo de Água nos Vasos.....	136
4.3.3 Curva de Resposta Fotossintética à Luz	138
4.3.4 Experimento de Estresse por Déficit Hídrico	141
4.3.4.1 Avaliação da Taxa Fotossintética	142
4.3.4.2 Avaliação da Taxa Transpiratória e Condutância Estomática	149
4.3.4.4 Conteúdo Relativo de Água (CRA).....	166
4.3.4.5 Teor Foliar de Prolina	168
4.3.5 Identificação e Seleção de Transcritos relacionados ao Estresse por Déficit Hídrico.....	171
4.3.5.1 Trealose 6-Fosfato Sintase (TPS)	171
4.3.5.2 Aquaporina (Proteína Integral de Membrana Plasmática - PIP).....	177
4.3.5.3 Proteína de Ligação a Elemento Responsivo ao ABA (AREB)	181
4.3.5.4 Proteína de Ligação a Elemento Responsivo a Desidratação (DREB)	184
4.3.6 Validação das Sequências por PCR e Sequenciamento.....	188
4.4 Conclusões.....	190
Referências	190
ANEXOS	199

RESUMO

Montagem de novo transcriptoma de teca (*Tectona grandis* L. f.) e busca por genes relacionados ao estresse hídrico

A teca é uma árvore de grande importância comercial pelas características de cor e durabilidade de sua madeira. Devido a sua rusticidade e fácil adaptação ao clima, plantios de teca tornam-se cada vez mais atrativos ao redor do mundo. Contudo, esta espécie apresenta escassez de estudos genéticos moleculares a respeito tanto de sua madeira, quanto de sua tolerância às variações ambientais. Uma vez que o transcriptoma pode apresentar grande quantidade de informação a respeito dos genes expressos por um conjunto celular, neste trabalho foi realizado o primeiro transcriptoma de teca, onde foram sequenciadas flores, folhas, raízes e seedlings pela tecnologia Illumina. A montagem do transcriptoma foi realizada com o programa Trinity acima de 100 milhões de *reads* e gerou mais de 400 mil *contigs*, os quais tiveram as anotações funcionais adquiridas com o programa Blas2GO. 51% dos *contigs* foram anotados, mostrando alta similaridade com as espécies *Vitis vinifera* e *Solanum lycopersicum*; destes, 78% obtiveram anotações funcionais com o Gene Ontology, totalizando 5.165 termos para Processo Biológico, 2.846 termos para Função Molecular e 742 para Componente Celular. A expressão diferencial foi obtida com o programa edgeR a 5% de probabilidade de erro e mostrou que, para 187.315 *contigs* montados através da fusão de todas as bibliotecas sequenciadas, 18 mostraram expressão diferencial para flor, 14 para folha, 13 para raiz e 29 para seedling. Após a etapa de caracterização do transcriptoma, foi realizado um experimento de estresse por déficit hídrico em casa-de-vegetação, onde plantas de teca foram submetidas a estresse Moderado (40% de água no substrato por 20 dias), estresse Severo (20 a 40% de água por 30 dias) e tratamento controle (substrato saturado). As medições através de analisador de gases por infravermelho (IRGA) mostraram queda na fotossíntese (até 70% a menos do que o controle), na transpiração (até 77%) e na condutância estomática (até 85%) entre os tratamentos; além disto, o conteúdo relativo de água foliar caiu 13% entre o tratamento severo e o controle, e níveis de prolina livre foram até 3,5 vezes mais altos nos tratamentos de estresse. A temperatura foliar aumentou significativamente com o aumento da irradiância de fótons aplicada. A busca por genes relacionados ao estresse por déficit hídrico na biblioteca de transcritos de Raiz retornou 1.145 sequências, e destas, 4 foram caracterizadas: *TgTPS* (trealose 6-fosfato sintase), *TgPIP* (aquaporina, proteína intrínseca de membrana plasmática), *TgDREB2* (proteína de ligação a elemento responsivo a desidratação) e *TgAREB* (proteína de ligação a elemento responsivo a ácido abscísico). Apenas *TgTPS*, *TgPIP* e *TgDREB2* mostraram alto grau de conservação entre as espécies, podendo ser corretamente amplificadas via PCR e validadas por sequenciamento. Assim, com o banco de dados de transcritos obtido pelo RNA-seq, foi possível identificar genes candidatos ao estudo de características vegetativas e reprodutivas de teca, contribuindo para entender os mecanismos moleculares desta espécie florestal.

Palavras-chave: RNA-seq; Lamiaceae; Bioinformática; Árvore tropical; Seca

ABSTRACT

***De novo* assembly of teak (*Tectona grandis* L. f.) transcriptome and search for water-stress related genes**

Teak is a tree of great commercial importance by the characteristics of color and durability of its wood. Due to its hardness and easy adaptation to climate, teak plantations become increasingly attractive around the world. However, this species has a lack of molecular genetic studies on both of its wood, as their tolerance to environmental variations. Once the transcriptome can provide lots of information about the genes expressed by a cell group, this work represents the first transcriptome teak, which were sequenced flowers, leaves, roots and seedlings by Illumina technology. The transcriptome assembly was performed with Trinity program above 100 million reads and generated more than 400,000 contigs, which have acquired the functional annotations with Blas2GO program. 51% of the contigs were annotated, showing high similarity to *Vitis vinifera* and *Solanum lycopersicum*; of these, 78% had functional annotations with the Gene Ontology, totaling 5,165 terms for Biological Process, 2846 terms for Molecular Function and 742 for Cell Component. The differential expression was obtained with the edgeR program at 5% probability of error and showed that for 187,315 contigs assembled by merging all sequenced libraries, 18 showed differential expression to flower, 14 to leaf, 13 to root and 29 for seedling. After this step of characterization of the transcriptome, we performed a stress experiment by water deficit at greenhouse, where teak plants were subjected to Moderate stress (40% of water in the substrate for 20 days), Severe stress (20 to 40% water for 30 days) and control treatment (saturated substrate). Measurements by infrared gas analyzer (IRGA) showed a decrease in photosynthesis (up to 70% less than the control), transpiration (up 77%) and stomatal conductance (up 85%) between treatments; furthermore, leaf relative water content dropped 13% between the treatment control and severe, and free proline levels were up to 3.5 fold greater in stress treatments. The leaf temperature increased significantly with increasing irradiance of photons applied. The search for genes related to stress by water deficit in the root transcripts library returned 1,145 sequences, and these, 4 were characterized: *TgTPS* (trehalose 6-phosphate synthase), *TgPIP* (aquaporin, protein intrinsic of plasma membrane), *TgDREB2* (dehydration responsive element binding protein) and *TgAREB* (abscisic acid responsive element binding protein). Only *TgTPS*, *TgPIP* and *TgDREB2* showed a high degree of conservation between species, and can be properly amplified by PCR and validated by sequencing. Thus, with the database of transcripts obtained by RNA-seq, candidate genes were identified for the study of vegetative and reproductive characteristics teak, helping to understand the molecular mechanisms of this forest species.

Keywords: RNA sequencing; Lamiaceae; Bioinformatics; Tropical tree; Drought

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da área de ocorrência natural de teca (<i>Tectona grandis</i> L. f.)	25
Figura 2 - <i>Kannimara</i> , a maior e mais antiga árvore de teca existente	27
Figura 3 - Comparação da madeira de teca com a de outras espécies	28
Figura 4 - Folhas de teca.....	30
Figura 5 - Anéis de crescimento em teca, mostrando o lenho inicial (vermelho) e lenho tardio (verde)	31
Figura 6 - Flores de Teca.	31
Figura 7 - Frutos de teca.	32
Figura 8 - Danos à planta de teca causados por pragas.....	35
Figura 9 - Doenças em teca.	35
Figura 10 - Fluxo do sequenciamento de Sanger.....	38
Figura 11 - Variações no preparo das bibliotecas para sequenciamento.	40
Figura 12 - Aumento no poder de sequenciamento ao longo do tempo (parte de cima do gráfico), de acordo com cada plataforma lançada (parte de baixo do gráfico).....	41
Figura 13 - Sequenciamento na plataforma Illumina.	43
Figura 14 - Fluxograma da resposta vegetal ao estresse abiótico	52
Figura 15 - Localização dos povoamentos de Teca no bairro “Monte Alegre”, Piracicaba, SP.	78
Figura 16 - Coleta de flores.	78
Figura 17 - Sementes de teca removidas do fruto.....	79
Figura 18 - Seedlings de teca com 14 dias utilizados para a extração de RNA total.	80
Figura 19 - Plântulas de teca após 3 meses de subcultivo <i>in vitro</i>	80
Figura 20 - Resultado do Bioanalyser para as amostras de RNA extraído	86
Figura 21 - Avaliação da qualidade por base das sequências dos reads brutos e finais.....	87
Figura 22 - Avaliação da qualidade por base das sequências dos reads brutos e finais.....	88
Figura 23 - Avaliação da qualidade por base das sequências dos reads brutos e finais.	89

Figura 24 - Gráfico de Distribuição dos Termos GO para Processo Biológico (2º nível) entre as bibliotecas analisadas	96
Figura 25 - Gráfico de Distribuição dos Termos GO para Função Molecular (2º nível) entre as bibliotecas analisadas.....	97
Figura 26 - Gráfico de Distribuição dos Termos GO para Componente Celular (2º nível) entre as bibliotecas analisadas	98
Figura 27 - Representação gráfica da proporção de sequências com resultado no BLAST e com resultado no BLAST + Anotação funcional.....	99
Figura 28 - Gráfico da porcentagem de <i>contigs</i> removidos nas etapas de anotação gênica e funcional	100
Figura 29 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Flor	109
Figura 30 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Folha	109
Figura 31 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Raiz	110
Figura 32 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Seedling	110
Figura 33 - Visão geral sobre a variação no número de <i>contigs</i> ao longo das etapas de anotação.....	110
Figura 34 - <i>Heatmaps</i> para a expressão diferencial entre os tecidos.	117
Figura 35 - Localização do povoamento de Teca na “Fazenda Areão”, Piracicaba, SP.	124
Figura 36 - Croqui do experimento	126
Figura 37 - Medição com o IRGA em folha madura de teca	128
Figura 38 - Gráfico da variação ambiental da temperatura e umidade relativa para a região de Piracicaba (posto meteorológico da ESALQ/USP) e para o interior da casa de vegetação	134
Figura 39 - Gráfico da variação da pressão parcial de vapor de água média e temperatura média medidos na câmara de medição do IRGA.	135
Figura 40 - Gráfico da variação do carbono de referência e da pressão atmosférica medidos pelo IRGA.....	135
Figura 41 - Gráfico da variação do conteúdo de água nos vasos das plantas submetidas ao estresse por déficit hídrico.	137
Figura 42 - Gráfico da curva de resposta fotossintética à luz.	140
Figura 43 - Gráfico da variação da taxa fotossintética entre os tratamentos	143
Figura 44 - Gráfico da taxa fotossintética média para as leituras dos tratamentos.	143

Figura 45 - Gráficos da variação da taxa fotossintética de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico.	148
Figura 46 - Gráfico da variação da taxa transpiratória entre os tratamentos.....	151
Figura 47 - Gráfico da taxa transpiratória média para as leituras dos tratamentos.	151
Figura 48 - Gráfico da variação da condutância estomática entre os tratamentos..	152
Figura 49 - Gráfico da condutância estomática média para as leituras dos tratamentos.....	152
Figura 50 - Gráficos da variação da taxa transpiratória de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico.....	158
Figura 51 - Gráficos da variação da condutância estomática de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico.....	159
Figura 52 - Plantas de teca submetidas aos tratamentos de estresse hídrico aos 20 dias.	160
Figura 53 - Plantas de teca submetidas aos tratamentos de estresse hídrico aos 30 dias. Plantas Controle à esquerda; plantas sob estresse por déficit hídrico severo à direita	160
Figura 54 - Contraste dos extremos de observação das plantas de teca submetidas aos tratamentos de estresse hídrico aos 30 dias.	160
Figura 55 - Gráfico da variação da temperatura foliar entre os tratamentos	163
Figura 56 - Gráfico da temperatura foliar média para as leituras dos tratamentos..	163
Figura 57 - Gráficos da variação da temperatura foliar de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico.	164
Figura 58 - Conteúdo Relativo de Água, em valores médios, para as diferentes categorias de estresse hídrico.....	166
Figura 59 - Gráfico dos teores médios de Prolina livre nas folhas das plantas do experimento de estresse hídrico.	169
Figura 60 - Estrutura 3D predita da proteína <i>TgTPS</i>	173
Figura 61 - Alinhamento da sequência protéica da enzima TPS.....	175
Figura 62 - Alinhamento da sequência protéica da enzima TPS.....	176
Figura 63 - Estruturas 3D preditas para a proteína <i>TgPIP</i>	179
Figura 64 - Alinhamento da sequência protéica da PIP	180
Figura 65 - Alinhamento da sequência protéica do fator de transcrição AREB	183
Figura 66 - Estrutura 3D predita para a proteína <i>TgDREB2</i>	185
Figura 67 - Alinhamento da sequência protéica do fator de transcrição DREB.....	187

Figura 68 - Amplificação dos genes de estresse hídrico.....	189
Figura A. 1 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Flor.	203
Figura A. 2 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Folha.....	203
Figura A. 3 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Raiz.	203
Figura A. 4 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Seedling.....	203
Figura A. 5 – Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Flor.....	204
Figura A. 6 - Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Folha.....	204
Figura A. 7 - Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Raiz.	205
Figura A. 8 - Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Seedling.....	205
Figura A. 9 – Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Flor.	206
Figura A. 10 - Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Folha.....	206
Figura A. 11 - Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Raiz.....	207
Figura A. 12 - Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Seedling.	207
Figura A. 13 - Árvore filogenética apresentada pelo APGII (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003).	208

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais países plantadores de teca por continente	26
Tabela 2 - Comparação entre as tecnologias de análise do transcriptoma em larga-escala	45
Tabela 3 - Parâmetros utilizados para a filtragem dos <i>reads</i> com as ferramentas da suíte “Fastx Toolkit”	84
Tabela 4 - Desenvolvimento da limpeza dos <i>reads</i> através dos programas utilizados	91
Tabela 5 - Avaliação da montagem dos <i>contigs</i> pelo programa Trinity	92
Tabela 6 - Análise por BLAST (Blastx) dos <i>contigs</i> gerados	93
Tabela 7 - Sequências com anotação funcional e resultado no BLAST	94
Tabela 8 - Mapeamento contra a base de dados KEGG	101
Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados	103
Tabela 10 - Avaliação da montagem dos <i>contigs</i> gerados pela fusão das bibliotecas	111
Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas	112
Tabela 12 - Peso das amostras de substrato para a determinação da umidade relativa	136
Tabela 13 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da taxa fotossintética	144
Tabela 14 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da taxa transpiratória	153
Tabela 15 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da condutância estomática	154
Tabela 16 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da temperatura foliar	165
Tabela 17 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da Conteúdo Relativo de Água (CRA)	168
Tabela 18 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores de teor de prolina	170

Tabela 19 - Principais resultados do alinhamento do gene <i>TgTPS</i> através do Blastx	172
Tabela 20 - Principais resultados do alinhamento do gene <i>TgPIP</i> através do Blastx	177
Tabela 21 - Principais resultados do alinhamento do gene <i>TgAREB</i> através do Blastx	181
Tabela 22 - Principais resultados do alinhamento do gene <i>TgTPS</i> através do Blastx	184
Tabela 23 - <i>Primers</i> confeccionados para a amplificação dos genes de estresse por déficit hídrico	188
Tabela A. 1 - Conversão dos valores de peso dos vasos.	211
Tabela A. 2 - Valores da taxa fotossintética utilizados para a determinação da curva de resposta fotossintética à luz.	212
Tabela A. 3 - Estatística descritiva da taxa fotossintética e taxa transpiratória a partir dos valores obtidos para o experimento de estresse hídrico.	213
Tabela A. 4 - Estatística descritiva da condutância estomática e temperatura foliar a partir dos valores obtidos para o experimento de estresse hídrico. .	214
Tabela A. 5 - Estatística descritiva do conteúdo relativo de água foliar (CRA) e do teor de prolina foliar a partir dos valores obtidos para o experimento de estresse hídrico.....	215
Tabela A. 6 - Número de mapas metabólicos da plataforma KEGG para os transcritos da Biblioteca de Raiz referenciados para estresse hídrico.....	216

1 INTRODUÇÃO

Com o constante aumento da população mundial que, segundo relatório da ONU, pode atingir os 10 bilhões de seres humanos em 2050, fica claro que os recursos hoje disponibilizados necessitarão sofrer um grande incremento a fim de atender a todos de forma apropriada no futuro. Nesta perspectiva, o aumento na oferta de alimentos, combustíveis, medicamentos, água potável, e tantos outros recursos, deverá aumentar em cerca de 60% (FAO, 2009; UNITED NATIONS - UN, 2013). A madeira, de grande importância para a habitação, produção de fibras, extração de compostos de uso farmacêutico, e também como combustível, deverá acompanhar o ritmo de aumento na demanda. No entanto, a destruição de ecossistemas naturais para a extração de madeira é uma prática condenável e que implica diretamente na degradação da natureza através da destruição de nascentes, assoreamento de rios, extinção de espécies raras da fauna e da flora, poluição do solo e eliminação de recursos genéticos inexplorados (SCHEFFER; CARPENTER, 2003).

No Brasil, a Amazônia é um dos ecossistemas que mais sofre com a extração ilegal de madeira e com o desmatamento para aumento da fronteira agrícola. Entre 1996 e 2010, o desmatamento da Amazônia ocorria com uma taxa de 19.500 km² ano⁻¹, correspondendo a mais da metade da taxa de desmatamento de florestas tropicais de todo o mundo (MALHI et al., 2014). Este fato se reflete hoje através de fenômenos climáticos severos, sendo o mais recente, o da grande estiagem de 2013-2014 que assolou a região sudeste do país, impondo o racionamento de água à população e causando desertificação das represas (WATTS, 2014).

A introdução de espécies florestais exóticas é uma alternativa para saciar a demanda por madeira, bem como proteger as florestas naturais e as espécies arbóreas em extinção. Neste contexto, os plantios de teca (*Tectona grandis* L. f.) no Brasil tendem a fornecer uma segunda alternativa para a produção de madeira de qualidade, e então aliviar a pressão do desmatamento na Amazônia. Outras espécies exóticas já introduzidas no país obtiveram muito sucesso, como o Eucalipto e o *Pinus* (ZINN; RESCK; SILVA, 2002).

A teca é uma espécie com adaptação fácil e alta rusticidade, mas que preocupa o mercado devido ao seu crescimento secundário lento e à grande taxa de ramificação (ANGELI; STAPE, 2003). Sendo assim, o conhecimento do metabolismo

desta espécie, unido às ferramentas de biotecnologia e melhoramento genético, permite estabelecer novas expectativas para a produção.

O rápido avanço da ciência nos últimos anos transformou a genética em um campo muito fértil para novas descobertas. Com o aprimoramento das técnicas de sequenciamento de DNA, foi observada uma explosão no número de genomas publicados nos últimos anos, bem como um incremento na descoberta de novos genes relacionados a características produtivas.

A despeito de sua importância no contexto mundial, a teca ainda contribui muito pouco em termos de informação genética disponível. Poucos grupos se dedicam ao estudo genético desta espécie ao redor do mundo, sendo que a Índia, a Tailândia e a França concentram aqueles mais produtivos, os quais, no entanto, tendem a focar as pesquisas em genética de populações (KERTADIKARA; PRAT, 2005; SHRESTHA; VOLKAERT; STRAETEN, 2005). A biotecnologia de teca ainda desfruta da sua infância, trazendo uma assustadora escassez de estudos a respeito de cultura de tecidos e transformação genética.

Por estas razões, observa-se o quão urgente e necessário é um estudo profundo de caracterização desta espécie, a fim de construir uma fonte de consulta para as pesquisas nas diversas áreas, e então possibilitar um incremento real nos atributos produtivos da espécie.

As tecnologias de sequenciamento de nova geração inauguraram uma nova era na análise de transcriptomas, permitindo a popularização do estudo em larga escala e entregando àquelas espécies que outrora foram renegadas à categoria de “não-modelo”, a esperança de um futuro permeado de novas descobertas. Por esta estrada, a teca vem nutrindo o desejo pela caracterização de genes e vias metabólicas, por informações arejadas prontamente consumíveis pela biotecnologia, e pelo limiar produtivo que fará dela a espécie florestal mais lucrativa e com mais qualidades do que qualquer outra.

Objetivo

Este trabalho teve como objetivos realizar o sequenciamento, a montagem e a anotação do transcriptoma, avaliar o comportamento fisiológico de mudas submetidas ao estresse por déficit hídrico, e encontrar genes candidatos ao estudo do estresse hídrico em teca.

Objetivos Específicos

1. Realizar a coleta do material, o isolamento do RNA e sequenciamento via tecnologia Illumina;
2. Avaliar a qualidade e realizar o pré-processamento dos *reads* obtidos;
3. Proceder com a montagem das sequencias consenso sem o auxílio de genoma de referência (montagem *de novo*);
4. Adquirir as anotações gênicas e funcionais dos *contigs* através Blast e Gene Ontology;
5. Identificar os mapas metabólicos associados aos genes enzimáticos encontrados, utilizando a base de dados KEGG;
6. Realizar uma primeira identificação dos genes diferencialmente expressos em cada um dos tecidos sequenciados;
7. Submeter mudas de teca ao estresse por déficit hídrico em casa de vegetação;
8. Avaliar as respostas fisiológicas e bioquímicas das plantas submetidas ao estresse hídrico.
9. Identificar genes relacionados ao estresse hídrico nas bibliotecas sequenciadas, confeccionar *primers* específicos e realizar a amplificação e sequenciamento.
10. Caracterizar os genes identificados através da proteína traduzida com auxílio de ferramentas de bioinformática.

Referências

- ANGELI, A.; STAPE, J.L. ***Tectona grandis* (Teca)**. Piracicaba: IPEF, 2003.
Disponível em: <<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>>. Acesso em: 06 jan. 2015.
- FAO. Global agriculture towards 2050. In: HIGH-LEVEL EXPERT FORUM, 1., 2009, Rome. **How to feed the world in 2050**. Rome: FAO, 2009. p. 1–4.
- KERTADIKARA, A.W.S.; PRAT, D. Genetic structure and mating system in teak (*Tectona grandis* L. f.) provenances. **Silvae Genetica**, Berlin, v. 44, p. 2–3, 1995.
- MALHI, Y. GARDNER, T.A.; GOLDSMITH, G.R.; SILMAN, M.R.; ZELAZOWSKI, P. Tropical forests in the anthropocene. **Annual Review of Environment and Resources**, New York, v. 39, p. 125-159, 2014.

SCHEFFER, M.; CARPENTER, S.R. Catastrophic regime shifts in ecosystems: linking theory to observation. **Trends in Ecology And Evolution**, London, v. 18, n. 12, p. 648-655, 2003.

SHRESTHA, M.; VOLKAERT, H.; STRAETEN, D. van der. Assessment of genetic diversity in *Tectona grandis* using amplified fragment length polymorphism markers. **Canadian Journal of Forest Research**, Toronto, v. 35, p. 1017–1022, 2005.

UNITED NATIONS. **World population prospects: the 2012 revision**. New York, 2013. v. 2: Demographic profiles, 54 p.

WATTS, J. Brazil drought crisis leads to rationing and tensions. **The Guardian**, London, 05 Sept. 2014. Disponível em:
<<http://www.theguardian.com/weather/2014/sep/05/brazil-drought-crisis-rationing>>. Acesso em: 06 jan. 2015.

ZINN, Y.L.; RESCK, D.V.S.; SILVA, J.E. da. Soil organic carbon as affected by afforestation with *Eucalyptus* and *Pinus* in the Cerrado region of Brazil. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 166, p. 287–294, 2002.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Teca

2.1.1 Aspectos gerais da espécie

Tectona grandis Linn f., popularmente conhecida como teca, é uma espécie arbórea de grande porte, decídua, diplóide ($2n = 36$), pertencente à família Lamiaceae e são encontradas populações naturais em regiões tropicais e subtropicais do Sudeste asiático em países como Índia, Mianmar, Tailândia, Laos, e Indonésia (Ilha de Java) (GILL; BEDI; BIR, 1983; KAOSA-ARD, 1989) (Figura 1). Esta espécie tem distribuição natural descontínua entre 10 e 25°N e entre 0 e 10°S, sendo encontrada de 0 a 1300 m de altitude, em áreas com precipitação anual de 800 a 2500 mm com regime de monções e temperatura entre 2° e 42°C (GRAUDAL et al., 1999).

Figura 1 - Distribuição da área de ocorrência natural de teca (*Tectona grandis* L. f.)
Fonte: Graudal et al. (1999)

Relatos do cultivo comercial de teca indicam seu plantio desde o século XVIII, quando os britânicos demandavam grandes quantidades de madeira para a

produção de embarcações (ANGELI; STAPE, 2003). Hoje, a teca é uma espécie amplamente cultivada e economicamente muito atraente, sendo que existem povoamentos comerciais na Ásia, África, América do Sul, América Central e Oceania. Em 2010, a área global plantada de teca era de 4,346 milhões de ha, sendo 83% na Ásia, 11% na África, 6% na região tropical da América e menos de 1% na Oceania (Tabela 1). Dentre os países produtores, a Índia possui a maior área plantada, a qual é 25 vezes maior do que a área plantada no Brasil; além dos plantios comerciais, a Índia ainda dispõe de mais de 7 milhões de ha de povoamentos naturais de teca (KOLLERT; CHERUBINI, 2012).

Tabela 1 - Principais países plantadores de teca por continente

Continente	País produtor	Área plantada
<i>Ásia</i>	Índia	1.667.000 ha
	Indonésia	1.269.000 ha
	Mianmar	390.000 ha
	Tailândia	128.000 ha
<i>África</i>	Gana	214.000 ha
	Nigéria	146.000 ha
	Costa do Marfim	29.000 ha
	Benin	26.000 ha
<i>América do Sul</i>	Brasil	65.000 ha
	Equador	45.000 ha
	Argentina	10.000 ha
<i>América Central</i>	Panamá	55.000 ha
	Costa Rica	31.500 ha
	Guatemala	28.000 ha
<i>Oceania</i>	Austrália	5.000 ha
	Papua Nova Guiné	2.160 ha

Fonte: Kollert e Cherubini (2012); Maldonado e Louppe (2000)

O ciclo de rotação comercial da teca é baseado no corte aos 20-25 anos de idade (ciclo curto) ou aos 80 anos (ciclo longo); a principal vantagem do ciclo longo é a maior proporção de cerne (madeira mais nobre) em relação ao alborno, o que leva a um acréscimo significativo no lucro (ANGELI; STAPE, 2003). Devido ao corte

criminoso de árvores centenárias em áreas de ocorrência natural (portanto, árvores extremamente lucrativas), leis bastante rigorosas são aplicadas em diversos países como Índia e Tailândia estabelecendo a criação de reservas naturais de proteção à teca e impedindo sua exploração em povoadamentos não comerciais (GRAUDAL et al., 1999). A plantação mais antiga e ainda ativa de teca chama-se “*Conolly’s Plot*” (em homenagem ao colecionador inglês H. V. Conolly), datada de 1842, e fica na província de Nilambur, estado de Kerala no sul da Índia; na mesma região está a reserva ecológica de *Parambikulam*, que abriga a árvore de teca mais antiga do mundo (Figura 2), chamada *Kannimara* (“Árvore virgem” pelo dialeto das antigas tribos locais, e faz referência ao fato da teca possuir um pigmento vermelho, semelhante ao sangue, que escorre do tronco quando este é cortado), com 450 anos, cerca de 7,02 m de diâmetro e aproximadamente 39,98 m de altura (PARAMBIKULAM TIGER RESERVE, 2015).

Figura 2 - *Kannimara*, a maior e mais antiga árvore de teca existente
Fonte: Keiding (1959) apud Graudal et al. (1999)

A madeira de teca é o principal atrativo comercial desta espécie. Graças a uma ampla variedade de usos finais, indo desde a carpintaria em geral e marcenaria de móveis rústicos, até a confecção de laminados e pisos, madeiramento de construção naval e matéria-prima para artesanato, sua madeira mostra-se versátil e tecnologicamente necessária para diversos usos, sendo por isso considerada como uma “madeira nobre” (OLIVEIRA; ANGELI, STAPE, 2007). Além da sedutora coloração que vai do castanho ao dourado (Figura 3), a madeira de teca possui um baixo peso específico ($0,580 \text{ g cm}^{-3}$), densidade média (650 kg m^{-3}), estabilidade

dimensional e alta resistência a compressão, tração, flexão, corrosão por água do mar e da chuva, intempéries climáticas diversas, ataque de cupins e fungos, e envelhecimento (BAILLÈRES; DURAND, 2000; CALDEIRA, 2004; LAMPRECHT, 1990; RONDON NETO; MACEDO; TSUKAMOTO FILHO, 1998). Embora não seja a árvore com maior produção de madeira, a teca, juntamente com o mogno (*Swietenia macrophylla*), o cedro-rosa (*Cedrela odorata*) e o jacarandá (*Dalbergia sissoo*), compõe o grupo das espécies arbóreas tropicais mais atraentes no mercado de luxo (KOLLERT; CHERUBINI, 2012).

Figura 3 - Comparação da madeira de teca com a de outras espécies
Fonte: Instituto de Pesquisas Tecnológicas (2015); Moya, Bond e Quesada (2014)

A durabilidade da madeira de teca está relacionada aos seus extrativos, os quais contêm principalmente lapachol, naftoquinonas e antraquinonas, sendo que dentre estas últimas a tectoquinona representa a grande promessa para a indústria química e farmacêutica, devido ao seu poder antifúngico, bactericida, e repelente natural para cupins e outros insetos (GUERRERO-VÁSQUEZ et al., 2013; KHAN; MLUNGWANA, 1999; LUKMANDARU; TAKAHASHI, 2008; NIAMKÉ et al., 2012). Outra substância que merece destaque é o “caucho”, o qual é um poliisoprenóide semelhante ao látex que lubrifica a superfície da madeira impedindo a absorção de água e conferindo resistência a ácidos, sendo ainda muito útil na proteção de pregos e parafusos contra a ferrugem (CÁCERES FLORESTAL, 2006; YAMAMOTO; SIMATUPANG; HASHIM, 1998).

No Brasil, os plantios comerciais de teca iniciaram-se no final da década de 60, implantados pela empresa Cáceres Florestal S. A., na região de Cáceres (MT), onde as condições climáticas são semelhantes àsquelas dos países de origem da espécie (CÁCERES FLORESTAL, 2006; MATRICARDI, 1989). Devido ao sucesso nos primeiros plantios, à carência de inimigos naturais, ao rápido retorno financeiro e à fácil adaptabilidade da espécie ao clima, os plantios de teca difundiram-se nas regiões sudeste e centro-oeste do país, sendo ainda muito atrativos para os estados do Maranhão, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (COTTA, 2010; GOLFARI; CASER; MOURA, 1978;). Assim, a teca ganha destaque especialmente por ser uma alternativa na substituição de espécies nativas de grande valor econômico, diminuindo assim a pressão de exploração aos ecossistemas florestais nativos no país, dentre eles a Amazônia. Além disto, a teca ainda possui utilidade para sistemas de produção agrosilvopastoris e para a recuperação de áreas degradadas (HEALEY; GARA, 2003; MORETTI et al., 2014; RODRIGUES, 2011).

2.1.2 Ecologia e fenologia da teca

As árvores de teca são pioneiras, com rápido crescimento inicial, e exigência de luz solar direta. Os indivíduos adultos podem atingir uma altura entre 20 e 35 m e aproximadamente 0,95 m de DAP (Diâmetro a Altura do Peito, ou seja, a 1,30 m) (EMBRAPA, 2004). Possui um tronco retilíneo, cilíndrico, com baixa conicidade, revestido por uma camada superficial fina, mas com propriedades termo-isolantes, a qual confere relativa resistência ao fogo (FIGUEIREDO, 2005; FIGUEIREDO; OLIVEIRA; BARBOSA, 2005).

As folhas de teca são simples, opostas, e impressionam pelo tamanho, podendo chegar da 60 cm x 80 cm, sendo significativamente maiores em plantas jovens (CÁCERES FLORESTAL, 2006) (Figura 4a). Por ser uma folha larga e caduca, é comum a formação de um tapete de matéria orgânica (serapilheira ou liteira) acima do solo em povoamentos de teca (ROSA, 2010). Esta cobertura fornece uma proteção ao solo contra a evaporação da água e emergência de plantas daninhas, além de proteger a microfauna local e fornecer nutrientes às raízes superficiais de forma lenta e gradual (FIGUEIREDO; OLIVEIRA; BARBOSA, 2005; RODRIGUES, 2011) (Figura 4b).

Figura 4 - Folhas de teca. A: Folha de teca completamente expandida. B: Folhas secas de teca formando a serapilheira da plantação
Fonte: Figueiredo; Oliveira e Barbosa (2005); TeakMills (2015)

A fenologia de teca é rigorosamente marcada pelos meses secos e chuvosos: a partir do início da estação chuvosa em outubro, a árvore retoma o desenvolvimento dos meristemas radicular e apical, e em meados de dezembro, inicia-se o florescimento (NOBUCHI; JANMAHASATIEN; SAKAI, 1996; PALUPI; OWENS, 1998). A época de florescimento pode se estender até março ou abril, enquanto que o desenvolvimento dos frutos ocorre durante 50 dias após a fecundação (HEDEGART, 1973). Com o início da estiagem, a teca reduz seu desenvolvimento meristemático e inicia-se a queda de folhas e frutos, voltando a emitir novas brotações só na próxima estação chuvosa (NOBUCHI; JANMAHASATIEN; SAKAI, 1996).

Esta característica de sazonalidade no crescimento se reflete diretamente na morfologia da madeira de teca, onde podem ser observados anéis de crescimento verdadeiros (Figura 5), cada um representando um período de chuva-seca (DIÉ et al., 2012). Durante a época chuvosa, o câmbio vascular inicia seu processo de divisões celulares para a formação do xilema e floema secundários; neste período é formado um grande número de células xilemáticas com o lúmen largo e parede celular pouco espessa. Na estação seca, o câmbio vascular reduz sua atividade, formando um pequeno número de células xilemáticas, as quais tem o lúmen pequeno e parede celular espessa. Com isto, nos anéis de crescimento podem ser observadas duas anatomias distintas: o lenho inicial (período chuvoso) e o lenho tardio (período seco) (DIÉ et al., 2012; VASCONCELOS, 2012).

Figura 5 - Anéis de crescimento em teca, mostrando o lenho inicial (vermelho) e lenho tardio (verde)
Fonte: Tomazello-Filho (2009) apud Vasconcelos (2012)

2.1.3 Biologia reprodutiva de teca

As flores de teca têm cores que vão do branco ao creme, sem perfume, são numerosas, hermafroditas, actinomórficas, hexâmeras, com desenvolvimento protândrico, e estão dispostas em inflorescências terminais ou axilares do tipo panícula (MOHANADAS; MATHEW; INDIRA, 2002; TANGMITCHAROEN; OWENS, 1997) (Figura 6). Cada panícula pode conter 2700 ± 240 flores, sendo que a cada dia, apenas 1 a 3% florescem; a completa floração da panícula leva de 1 a 2 meses (TANGMITCHAROEN; OWENS, 1997). Apenas 1% das flores inicialmente formadas em cada inflorescência se tornarão frutos, enquanto que a queda de frutos imaturos fica entre 34 e 58% (MOHANADAS; MATHEW; INDIRA, 2002).

Figura 6 - Flores de Teca. A: Panículas no alto da árvore. B: Estrutura floral
Fonte: Garg (2008); TeakMills.com (2015)

A teca é uma espécie de polinização cruzada, no entanto grande parte de suas flores sofrem auto-polinização. A auto-polinização das flores produz uma ínfima quantidade de frutos (menos de 1%) devido a presença de mecanismos de auto-incompatibilidade, sendo então a polinização cruzada obrigatória e realizada

principalmente por insetos da família Hymenoptera, como abelhas e vespas de hábito livre, além de outros insetos das famílias Diptera e Lepidoptera (HEDEGART, 1973; MOHANADAS; MATHEW; INDIRA, 2002). As flores costumam abrir a partir das 7:00 h, com a dispersão de pólen a partir das 8:00 h e plena receptividade do estigma das 11:00 h até as 13:00 h; a partir das 15:00h o estigma colapsa e perde sua função, seguindo-se do colapso das anteras às 17:00h e queda da corola às 19:00h (HEDEGART, 1973).

Os frutos são leves, esféricos, de cor marrom, do tipo drupa e medem de 1 a 2 cm de diâmetro (CÁCERES FLORESTAL, 2006) (Figura 7). Cada fruto consiste em uma fina camada quebradiça superficial, semelhante a um balão (exocarpo), que envolve uma estrutura esponjosa ou coriácea, esférica, de textura semelhante a feltro (mesocarpo). Abaixo do mesocarpo, encontra-se um endocarpo bastante duro e lenhoso, de formato quadrangular, com quatro lóculos, podendo conter de 0 a 4 sementes, sendo uma semente o mais comum (SIVAKUMAR et al., 2002; SLATOR; CALLISTER; NICHOLS, 2013). Uma vez que raramente as sementes são extraídas do interior do fruto, sendo este diretamente plantado no substrato para a germinação, os termos “semente” e “fruto” de teca podem, muitas vezes, ser confundidos. A primeira frutificação ocorre aos 5 ou 6 anos de idade da planta, e pode gerar em torno de 0,1 a 0,5 kg de frutos por árvore (EMBRAPA, 2004; PALUPI; OWENS, 1998).

Figura 7 - Frutos de teca. A: Frutos com o exocarpo (seta). B: Frutos após a remoção do exocarpo, mostrando a aparência do mesocarpo. C: Corte longitudinal dos frutos, mostrando os lóculos (seta) e sementes (asterisco). Barra = 1 cm
Fonte: Palupi e Owens (1998)

O estabelecimento de estandes de mudas de teca por germinação tende a ser bastante desuniforme devido, entre outros fatores, à baixa taxa de germinação das sementes, o que constitui em um grande problema para a implantação de plantios

comerciais e para o melhoramento genético (FIGUEIREDO; OLIVEIRA; BARBOSA, 2005). A dormência das sementes de teca pode se estender de alguns dias, até vários anos, podendo ser quebrada por um processo repetitivo de imersão dos frutos em água quente e secagem ao sol. Slator; Callister e Nichols (2013) refutam a hipótese de necessidade de água para a quebra de dormência da semente, demonstrando que o endocarpo lenhoso é plenamente permeável e que há a necessidade de um estresse mecânico nos frutos, capaz de trincar o endocarpo e expor as sementes ao ambiente para iniciar a germinação. Por outro lado, os extrativos solúveis em água obtidos do mesocarpo dos frutos e das folhas mostraram ação inibitória da germinação quando aplicados sobre sementes de diversas culturas, evidenciando que a dormência em teca pode ser também um fenômeno químico (ABUGRE et al., 2011; DAS et al., 2012).

2.1.4 Desafios para a exploração de teca

2.1.4.1 Sítio florestal e tratos culturais

Apesar da grande adaptabilidade ambiental e rusticidade que a teca apresenta, não é raro que haja a ocorrência de plantios pouco produtivos (HALLETT et al., 2011). O fracasso em plantações de teca está bastante associado a sítios impróprios para a instalação dos plantios, como regiões com ocorrência de geadas ou com inverno rigoroso, bem como à falta de cuidados adequados para as plantas entre 5 a 10 anos (FIGUEIREDO; OLIVEIRA; BARBOSA, 2005; KAOSA-ARD, 1998).

Além disto, embora a teca apresente grande tolerância ao estresse hídrico, em regiões com seca prolongada as árvores costumam crescer com porte semi arbustivo e atrofiado, enquanto que em regiões com elevada pluviosidade, as árvores sofrem um crescimento rápido em altura, adquirindo uma aparência esbelta e produzindo madeira de qualidade inferior em termos de cor, textura e densidade (KAOSA-ARD, 1998).

A teca possui uma raiz pivotante central, grossa, larga e lenhosa, a qual pode assumir aspecto tabular próximo ao colo da planta (CÁCERES FLORESTAL, 2006). Dela se originam raízes absorvedoras finas, brancas e quebradiças, as quais são muito sensíveis à falta de oxigênio e se concentram nos primeiros 30 cm do solo, não tolerando assim o estresse por alagamento. Por esta razão, regiões de pântanos e várzeas, solo compactado, bem como locais com lençol freático próximo

da superfície também são desaconselhados para o estabelecimento de novos povoamentos (FIGUEIREDO; OLIVEIRA; BARBOSA, 2005; GOMES et al., 2005; KIEHL, 1979). Aliás, a teca exige um solo profundo (sem impedimentos físicos ou químicos), permeável e muito bem drenado (preferencialmente solos francos ou franco-arenosos), com nutrição mediana ou melhor e pH maior do que 5,5 (CÁCERES FLORESTAL, 2006; EMBRAPA, 2004).

Por fim, a competição por umidade do solo e luz solar faz com que plantios de teca recém-estabelecidos sejam altamente suscetíveis ao crescimento de plantas daninhas, necessitando assim de um rigoroso controle e uso de defensivos seletivos (EMBRAPA, 2004; KAOSA-ARD, 1998).

2.1.4.2 Problemas fitossanitários

Assim como qualquer outra espécie cultivada, a teca também está sujeita ao ataque de pragas, sendo as lagartas desfolhadoras e as brocas do caule aquelas que mais causam prejuízo, muito embora não tenham grande importância em plantios brasileiros (MOURA, 2012). Dentre as principais desfolhadoras estão *Hyblaea puera* Cramer (Lepidoptera: Hyblaeidae) (Figura 8a) e *Eutectona machaeralis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae), as quais podem causar perdas de até 75% na área foliar das plantas (KULKARNI; PAUNIKAR; HUSSAINI, 2011; ROYCHOUDHURY; DADWAL, 2010; TAMBARUSSI, 2009). Em plantios iniciais, a broca-vermelha-do-café *Zeuzera coffeae* Nietner (Lepidoptera: Cossidae) pode causar a ruptura do sistema vascular, levando a redução da taxa de crescimento; já em plantios maduros de cerca de 10 anos, a broca do caule *Xyleutes ceramicus* Walker (Lepidoptera: Cossidae) (Figura 8b) causa intensa perda de qualidade da madeira, podendo ainda retardar o crescimento vegetativo da planta e levá-la a morte (CHAIGLOM, 1966; VARMA; SAJEEV; SUDHEENDRAKUMAR, 2007).

Figura 8 - Danos à planta de teca causados por pragas. A: Desfolha causada pela lagarta *Hyblaea puera*. B: Túnel escavado dentro do caule de teca pela broca *Xyleutes ceramicus*
 Fonte: Arguedas, Chaverri e Verjans (2004); Chaiglom (1963)

A ocorrência de doenças tem se apresentado como um fator preocupante para os produtores de teca. Em meados de 2011 foi publicado o primeiro caso de ferrugem em plantios brasileiros, causada pela espécie *Olivea neotectonae* (Pucciniales/Pucciniomycota), a qual até então estava restrita a Ásia e com alguns relatos na Costa Rica, México e Equador (Figura 9a). A ferrugem da teca se manifesta como pústulas alaranjadas sob as folhas (preferencialmente aquelas mais velhas), podendo levar a desfolha moderada a intensa, reduzindo assim a taxa fotossintética e afetando o crescimento da planta (PIERI et al., 2011).

Recentemente, o cancro da teca, causado pelo patógeno *Lasiodiplodia* sp (Botryosphaeraceae) tem acometido severamente diversos plantios comerciais da região Centro-Oeste, causando a morte do meristema apical e lesões no caule com o desprendimento da casca (BORGES, 2014). Outros tipos de cancro podem ainda ocorrer causados pelos patógenos *Nectria nauriticola* e *Dothiorella* sp (ARGUEDAS; CHAVERRI; VERJANS, 2004; VARGAS, 2008) (Figura 9b).

Figura 9 - Doenças em teca. A: Folha com a ferrugem *Olivea neotectonae*. B: Caule com cancro por *Dothiorella* sp.
 Fonte: Pieri et al. (2011); Vargas (2008)

2.1.5 Estudos genéticos em teca

Devido à exigência da polinização cruzada para a formação de frutos, as plantações de teca tornam-se principalmente constituídas por árvores geneticamente diversas, e assim uma grande variação genética ocorre entre indivíduos, e ainda mais entre populações distintas (KEIDING; WELLENDORF; LAURIDSEN, 1986, KJAER; SIEGISMUND; SUANGTHO, 1996). Graças a isto, grandes esforços vêm sendo feitos em termos de analisar a variabilidade genética de populações de teca, a fim de identificar aquelas que contém os indivíduos com melhor crescimento, adaptabilidade e qualidade da madeira (GRAUDAL et al., 1999). No entanto, com o aumento da demanda de madeira de teca, as populações naturais sofreram uma redução drástica nos últimos 50 anos, eliminando assim grande parte da fonte dos recursos genéticos que poderiam ser utilizados para prover melhorias nas plantações atuais, bem como ser fonte para estudos de melhorias futuras (FOFANA et al., 2009).

O uso de marcadores moleculares tem tido fundamental importância nesta análise da variabilidade genética. Inicialmente, os marcadores baseados em isoenzimas foram utilizados (KERTADIKARA; PRAT, 1995), seguidos por técnicas mais informativas a respeito do DNA, como o RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) (NARAYANAN et al., 2007; WATANABE et al., 2004) e o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (SHRESTHA; VOLKAERT; STRAETEN, 2005; SREEKANTH et al., 2012). Atualmente, os marcadores de microssatélites (SSRs ou *Simple Sequence Repeats*) têm sido amplamente empregados para esta tarefa (ALCÂNTARA; VEASEY, 2013; FOFANA et al., 2009; MINN; PRINZ; FINKELDEY, 2014; VERHAEGEN et al., 2010).

Contudo, estudos genéticos específicos a características da espécie ainda são escassos. No NCBI são listados apenas 134 genes e 9 ESTs para teca, sendo que destes, grande parte é do genoma do cloroplasto (acesso em 06/01/2015). A caracterização de genes de interesse, como o LHY (*Late Elongation Hypocotyls*) (NORLIA et al., 2008), envolvido no florescimento; o CAD (*Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase*) e PAL (*Phenylalanine Ammonia-Lyase*) envolvidos no metabolismo secundário (VASCONCELOS, 2012); e genes para normalização de experimentos de expressão gênica por PCR em tempo-real (GALEANO et al., 2014) se inserem nas poucas referências já publicadas.

Em termos de análises proteicas, Quiala et al. (2012) identificou cerca de 100 peptídeos não redundantes na primeira iniciativa de sequenciamento do proteoma de teca através de gel 2-DE e sequenciamento com MALDI-TOF-TOF. Embora a teca seja muito pouco representada em bancos de dados de genes e proteínas, cerca de 75% dos peptídeos obtidos pelos pesquisadores puderam ser corretamente identificados, valor que é compatível ao de outras espécies “órfãs” como *Pinus radiata* (66%) (VALLEDOR et al., 2008) e *Quercus* sp (80%) (JORGE et al., 2005).

2.2 Genômica e o Sequenciamento de DNA

Cada genoma se constitui no conjunto de informações hereditárias contidas no DNA de um indivíduo; sendo assim, o conhecimento do genoma é uma fonte preciosa para a compreensão dos diversos processos celulares que ocorrem em um organismo (ROBERTIS; HIB, 2010).

Com o surgimento e aprimoramento das técnicas de sequenciamento de DNA, foi observado um aumento na quantidade de informação disponível a respeito de organismos modelo e não-modelo. Isto permitiu a busca por genes de interesse para melhoria de características produtivas e qualitativas de espécies agrícolas e florestais, tais como resistência a doenças e seca, aumento do teor nutricional e acréscimo no potencial bioenergético (CHEAVEGATTI-GIANOTTO et al., 2011; LAGUDAH; DUBCOVSKY; POWELL, 2001).

O marco inicial do sequenciamento de DNA ocorreu no final dos anos 1970, quando o grupo de pesquisadores liderados por Frederick Sanger publicou aquele que seria o principal método utilizado durante os próximos 30 anos: o método do “dideoxinucleotídeo”, da “finalização de cadeia”, ou simplesmente, método “Sanger” (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). O sequenciamento de Sanger consiste em quatro reações de PCR simultâneas, sendo que em cada uma é adicionado um nucleotídeo específico sem a hidroxila no carbono 3' (dideoxinucleotídeo ou ddNTP) juntamente aos demais. O dideoxinucleotídeo, uma vez incorporado à sequência durante a amplificação, impossibilita a inserção do nucleotídeo seguinte pela DNA Polimerase. Esta finalização inesperada da cadeia ao longo da PCR produz sequências de diferentes tamanhos, as quais, através de uma laboriosa eletroforese em gel de acrilamida, permitem identificar base-a-base a sequência do fragmento amplificado.

Na mesma época surgiu o método de sequenciamento de DNA por degradação química, o qual em comparação ao método de Sanger necessitava de muito DNA purificado, envolvia digestões enzimáticas específicas e o uso de reagentes que clivavam a sequência em locais determinados (MAXAM; GILBERT, 1977).

A técnica desenvolvida por Sanger reinou inalterada por 10 anos, tendo sido aprimorada com a incorporação de marcadores fluorescentes coloridos aos ddNTPs; assim, se outrora eram necessárias quatro PCRs distintas para sequenciar um fragmento, agora esta tarefa era praticável com apenas uma única reação, possibilitando ainda o uso de sistemas automáticos para a leitura a laser da fluorescência (PROBER et al., 1987; SMITH et al., 1986) (Figura 10). Adicionalmente, foram incorporados capilares preenchidos com biopolímero que substituíam o tradicional gel de eletroforese e proporcionavam um aumento na velocidade e sensibilidade da leitura das bases (COHEN et al., 1988; HUANG; QUESADA; MATHIES, 1992).

Figura 10 - Fluxo do sequenciamento de Sanger
Fonte: Shendure e Ji (2008)

Com a evolução do sequenciamento manual para o automático e informatizado, a determinação da qualidade, que antes era verificada visualmente e sujeita a erros pelo pesquisador, tornou-se parte do processo de *base calling*. O *base calling* é o processo computacional de transformação dos picos do cromatograma produzido pela plataforma de sequenciamento, em uma sequência contínua de nucleotídeos. Diversas tentativas de desenvolver um algoritmo confiável que avaliasse a qualidade no *base calling* foram frustradas devido à falta de acurácia

(BONFIELD; STADEN, 1995; CHURCHILL; WATERMAN, 1992; LAWRENCE; SOLOVYEV, 1994). Contudo, durante o sequenciamento do genoma humano surgiu uma medida de avaliação da qualidade que é robusta e utilizada até os dias atuais: o *Phred score*. Ele avalia a altura e a precisão de cada pico do cromatograma, atribuindo o valor de qualidade (Q) através do logaritmo da probabilidade (P) daquele pico representar uma base errada (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998):

$$Q = -10 \times \log_{10} P$$

Mesmo com suas limitações, o método Sanger foi responsável por inaugurar a era do sequenciamento de genomas. Assim, foram obtidos o genoma do fago ϕ X174 (com 5.375 pb e 9 genes) (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977); o do primeiro eucarioto, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (com 13 milhões pb e 5.885 genes) (GOFFEAU et al., 1996); o do primeiro organismo multicelular, o verme *Caenorhabditis elegans* (com 100 milhões de pb e 19.000 genes) (C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM, 1998); a primeira planta, *Arabidopsis thaliana* (com 157 milhões pb e 25.498 genes) (ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000); e o genoma humano (com 3 bilhões de pb e 30.000 a 40.000 genes) (LANDER et al., 2001; VENTER et al., 2001).

O caso do genoma humano foi especialmente importante, não apenas por ter sido um projeto internacional que durou cerca de 10 anos, mas também pois foi marcado pela consolidação de uma importante modificação no preparo das bibliotecas de DNA para o sequenciamento: o *Whole Genome Shotgun*.

Inicialmente, o genoma era mapeado e partes do DNA eram fragmentadas em *clusters*, e estes, por sua vez, eram novamente fragmentados e então clonados em um cromossomo artificial de bactéria (BAC) ou de levedura (YAC), os quais eram sequenciados; esta técnica é chamada de *shotgun* hierárquico (Figura 11a). Após o sequenciamento, o genoma era montado em partes, através do alinhamento das sequências dentro de cada *cluster* (LANDER et al., 2001).

Visando a patente de genes para lucro da indústria farmacêutica, Craig Venter liderou a corrida pelo sequenciamento a frente do setor privado (Celera Genomics) utilizando a inovadora abordagem do *Whole Genome Shotgun* (WGS), ou seja, a total fragmentação do genoma (sem a hierarquização), clonagem e sequenciamento

(VENTER et al., 2001) (Figura 11b). Outros casos de WGS já haviam sido praticados anteriormente, no entanto, todos para genomas pequenos como o da bactéria *Haemophilus influenzae* (FLEISCHMANN et al., 1995) e da mosca-das-frutas (ADAMS et al., 2000). A montagem do genoma a partir desta abordagem torna-se muito mais desafiadora, principalmente devido à grande demanda de recursos computacionais.

Figura 11 - Variações no preparo das bibliotecas para sequenciamento. A: *Shotgun* hierárquico. B: *Shotgun* completo (WGS)
 Fonte: Commins, Toft e Fares (2009)

Muitos avanços ocorreram no método de Sanger ao longo dos anos, tornando possível reduzir a taxa de erros e o tempo do sequenciamento, além de aumentar o tamanho dos fragmentos sequenciados (MOROZOVA; MARRA, 2008). Hoje, o ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) é um dos sequenciadores mais modernos a utilizar o método de Sanger; ele comporta até 16 placas de 384 *wells* e é capaz de obter fragmentos de até 900 pb em apenas 3 horas com *score* Phred = 20 (APPLIED BIOSYSTEMS, 2013). Porém, devido ao elevado custo dos reagentes para processar uma amostra, o método de Sanger torna-se bastante oneroso para o sequenciamento de genomas completos. Esta limitação da plataforma Sanger pode ser superada com a emergência de novos conceitos de sequenciamento, através daquele que ficou conhecido como “*Next-Generation Sequencing*¹” – NGS (Sequenciamento de Nova Geração).

¹ Uma tradução literal do termo seria “Sequenciamento da Próxima Geração”.

2.3 As novas tecnologias de sequenciamento

As tecnologias NGS são formas rápidas e baratas para a caracterização de genomas completos, bem como do perfil de mRNAs, pequenos RNAs, regiões de fatores de transcrição, estrutura da cromatina e padrões de metilação do DNA (ANSORGE, 2009).

Todas as plataformas estão baseadas no *High Throughput Sequencing*, ou sequenciamento de alto desempenho, o qual acarretou numa explosão do poder de sequenciamento de bases em comparação com o método de Sanger (MARDIS, 2011) (Figura 12). Nele, milhões de fragmentos são sequenciados ao mesmo tempo, em paralelo (*Massively Parallel Sequencing* - MPS), gerando leituras curtas (*short reads*); além disto, estas tecnologias permitem o sequenciamento de apenas uma extremidade do fragmento (*single-ends*) ou das duas extremidades (*paired-ends*).

Figura 12 - Aumento no poder de sequenciamento ao longo do tempo (parte de cima do gráfico), de acordo com cada plataforma lançada (parte de baixo do gráfico)
Fonte: Mardis (2011) (modificado)

Dentre as principais plataformas de sequenciamento de nova geração, estão a 454 (Roche), a Illumina (Solexa/Illumina) e a SOLiD (Applied Biosystems). A primeira se fundamenta na reação de pirosequenciamento, que se dá pela emissão de sinal luminoso pela luciferase após a incorporação de uma nova base na sequência. A tecnologia Illumina utiliza a amplificação em *clusters* sobre superfície sólida, além de bases marcadas com fluorescência. A SOLiD (*Sequencing by*

Oligonucleotide Ligation and Detection), se baseia no uso da DNA Ligase para o sequenciamento, a qual catalisa a fusão de sondas marcadas com fluoróforos à sequência alvo (CARVALHO; SILVA, 2010; MARGULIES et al., 2005).

Outras tecnologias, como o Helicos Genetic Analysis System (Helicos BioSciences), Ion Torrent (Life Technologies) e o Polonator (Dover Systems) também figuram entre as plataformas comerciais utilizadas para o sequenciamento NGS (BOWERS et al., 2009; BRASLAVSKY et al., 2003; CHURCH, 2005; GLENN, 2011; KIM et al., 2007; LIU et al., 2012; METZKER, 2005). Recentemente, a 3ª geração de sequenciadores ganha destaque, graças ao chamado “sequenciamento em tempo-real”, o qual reduz a necessidade do preparo das amostras e permite o acompanhamento instantâneo de cada base que foi identificada pelo aparelho. Nesta categoria, o “Single-molecule real-time” (SMRT) da Pacific Biosciences e o Nanopore (Nanopore Technologies) despontam como as plataformas pioneiras (EID et al., 2009; GUY; PIGGOT; KHALID, 2012; HE et al., 2013; LIU et al., 2012; PACIFIC BIOSYSTEMS, 2014).

2.4 Plataforma Solexa/Illumina (Illumina)

A plataforma Solexa deu seus primeiros passos em meados de 2005, após re-sequenciar o genoma do fago ϕ X174, gerando mais de 3 milhões de bases em uma única corrida. Com o sucesso adquirido, a plataforma Solexa ganhou sua versão comercial em 2006; logo após, em 2007, a Solexa foi incorporada à Illumina, ganhando assim destaque internacional e o apreço dos principais centros de pesquisa (ILLUMINA, 2015a).

Esta tecnologia de sequenciamento inicia-se com a preparação das amostras por fragmentação e ligação a adaptadores nas extremidades 5' e 3'; os fragmentos são então depositados sobre uma superfície (*flow cell*) onde estão imobilizadas as sequências complementares aos adaptadores inseridos. Por meio de hibridização, os fragmentos se aderem à placa, onde ocorre a clonagem por PCR em “fase sólida”, produzindo milhares de cópias de um mesmo fragmento (Figura 13a). Durante esta etapa, cada fragmento pode se ligar ao adaptador da outra extremidade formando uma “ponte”. Esta amplificação produz até 200 milhões de regiões com grupos de cerca de 1.000 fragmentos idênticos (*clusters*), os quais passarão por uma desnaturação e serão sequenciados. O sequenciamento ocorre

por ciclos de incorporação de nucleotídeos terminadores marcados com fluorescência a cada um dos fragmentos que foi amplificado e desnaturado (Figura 13b). Após a lavagem dos nucleotídeos marcados não incorporados, o sinal luminoso é capturado para cada *cluster*, uma vez que cada *cluster* possui muitas sequências idênticas, cada sinal luminoso pode ser identificado com grande precisão. Com a remoção dos marcadores e do grupo terminador de cada nucleotídeo incorporado, um novo ciclo de sequenciamento pode ser realizado (MARDIS, 2008; METZKER, 2010).

Cada sequenciamento pode gerar até 3 bilhões de *reads* de cerca de 150 pb, tornando-o útil para sequenciamento desde genomas e transcriptomas, até estudos de sequenciamento populacional em larga escala (ILLUMINA, 2015b).

Figura 13 - Sequenciamento na plataforma Illumina. A: etapa de amplificação dos fragmentos através de PCR em fase sólida. B: ciclos de sequenciamento utilizando terminadores reversíveis
Fonte: Metzker (2010) (Modificado)

2.5 Sequenciamento de RNA (RNA-seq)

O termo RNA-seq se aplica a várias das plataformas de sequenciamento NGS que são capazes de gerar o perfil completo do transcriptoma. O transcriptoma, por sua vez, corresponde ao conjunto de transcritos expressos dentro de um determinado conjunto celular, podendo então ser associado aos genes funcionais daquela amostra (LICATALOSI; DARNELL, 2010).

Várias técnicas já foram desenvolvidas para caracterizar o transcriptoma completo, tanto baseando-se em hibridização com oligonucleotídeos marcados, quanto por síntese e sequenciamento de ESTs (*Expressed Sequence Tag*). Na primeira parte, encontram-se os microarranjos, os quais são uma técnica que produz dados em larga escala e que não necessita de mão-de-obra experiente; suas principais limitações são a necessidade de conhecimento prévio do genoma, a hibridização incorreta dos fragmentos e a baixa acurácia na captação do sinal fluorescente. Enquanto isto, as técnicas baseadas em ESTs, como o SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), CAGE (*Cap Analysis of Gene Expression*) e MPSS (*Massively Parallel Signature Sequencing*) também geram dados em larga escala, mas por outro lado, necessitam de mão-de-obra bem treinada, são custosas devido à necessidade de clonagens e sequenciamento, e não são capazes de distinguir isoformas de um mesmo transcrito (VELCULESCU et al., 1995; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Com isto, o RNA-seq revolucionou a transcriptômica, graças a sua facilidade, baixo custo e alta precisão, tornando assim as análises de todos os transcritos uma etapa corriqueira em várias pesquisas de expressão gênica. No geral, o RNA-seq se processa com o isolamento de uma população de transcritos (RNA total ou específico, como poli-A RNA), sua fragmentação, conversão em cDNA e ligação a adaptadores em um ou nos dois extremos; segue-se uma etapa de amplificação dos fragmentos e sequenciamento, de modo a obter os *reads* de um extremo do fragmento (*single-ends*), ou dos dois extremos (*paired-ends*). Todas as plataformas de NGS são capazes de realizar o RNA-seq, no entanto, observa-se que principalmente a 454 e a Illumina são as mais utilizadas (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Uma comparação entre as diferentes tecnologias de análise do transcriptoma podem ser vistas na Tabela 2.

Tabela 2 - Comparação entre as tecnologias de análise do transcriptoma em larga-escala

	<i>Microarranjos</i>	<i>Sequenciamento de ESTs</i>	<i>RNA-seq</i>
<i>Especificações da tecnologia</i>			
<i>Princípio</i>	Hibridização	Seq. por Sanger	Seq. alta eficiência
<i>Resolução</i>	100 pb	Uma base	Uma base
<i>Eficiência</i>	Alta	Baixa	Alta
<i>Confiança na sequência genômica</i>	Sim	Não	Em alguns casos
<i>Ruído das amostras</i>	Alto	Baixo	Baixo
<i>Aplicação</i>			
<i>Estudo simultâneo de transcritos e expressão</i>	Sim	Não	Sim
<i>Quantificação dos níveis de expressão gênica</i>	Até 100x	Não	Mais de 8.000x
<i>Habilidade de distinguir diferentes isoformas</i>	Não	Sim	Sim
<i>Habilidade de distinguir expressão alélica</i>	Não	Sim	Sim
<i>Questões práticas</i>			
<i>Quantidade de RNA requerida</i>	Alta	Alta	Baixa
<i>Custo de mapeamento de transcriptomas</i>	Alto	Alto	Relativamente Baixo

Fonte: Wang, Gerstein e Snyder (2009)

2.6 Reconstrução de transcriptomas

No final da década de 1970, Staden (1979) relatou a necessidade de programas de computador para prover a montagem de genomas; hoje, com o constante aprimoramento das técnicas de sequenciamento e a imensa quantidade de dados brutos gerados, ferramentas computacionais para a montagem de genomas e transcriptomas necessitam se tornar cada vez mais robustas e sofisticadas (GARBER et al., 2011; PASZKIEWICZ; STUDHOLME, 2010).

A montagem do transcriptoma, também referida como “reconstrução”, apresenta três grandes desafios computacionais: o primeiro, é que um gene pode ser representado por milhares de *reads*, como também por apenas alguns *reads*; o segundo é que os *reads* podem originar tanto transcritos maduros (apenas éxons), quanto também precursores de RNA que não sofreram o *splicing* completo (podem conter íntrons); por fim, os *reads* são sequências curtas, e os genes podem assumir diferentes isoformas, logo, torna-se um desafio identificar precisamente quais *reads* produzem qual isoforma (GARBER et al., 2011).

Três alternativas para a reconstrução dos transcriptomas podem ser utilizadas: uma guiada pelo genoma de referência, uma independente de genoma (montagem *de novo*), e uma mista, que utiliza no primeiro passo um genoma de referência e, apenas para os *reads* que não foram alinhados, segue com a montagem independente.

2.6.1 Montagem guiada por referência

Esta estratégia é especialmente dedicada àquelas espécies que já possuem um genoma sequenciado. Segundo Martin e Wang (2011), três passos principais ocorrem neste tipo de montagem:

1. Os *reads* são alinhados ao genoma de referência utilizando alinhadores do tipo “*splice-aware*”, os quais trabalham em duas vertentes: alinhamento por “semente-e-extensão” ou “transformadas de Burrows–Wheeler” (BWT) (BURROWS; WHEELER, 1994; LI; DURBIN, 2009; MANZINI, 2001). Os alinhadores do primeiro tipo iniciam extraindo uma “semente”, ou seja, uma pequena sequência, de cada um dos *reads*, e tentam encontrar no genoma de referência os locais onde ela pode se alinhar perfeitamente; uma vez que a semente é alinhada, o programa tenta “estender” a sequência do *read* acima da posição no genoma, utilizando para isto o algoritmo de alinhamento de Smith–Waterman (SMITH; WATERMAN, 1981). Em outra mão, os alinhadores do tipo BWT são otimizados para alinhar os *reads* cometendo uma baixa taxa de erros;

2. A sobreposição dos *reads* sobre cada *locus* é clusterizada, a fim de construir grafos que representem as diferentes isoformas.

3. O “*traversing*”, ou seja, a operação de sistematizar a visita em cada um dos nós de um grafo, é realizada para resolver todas as isoformas individuais.

Alguns programas comumente utilizados neste tipo de reconstrução são: Blat e GSNAP (alinhadores que usam o algoritmo de “semente-e-extensão”), SpliceMap, MapSplice e TopHat (alinhadores que usam o algoritmo BWT), Cufflinks, Scripture (algoritmos de sobreposição e *traversing*) (AU et al., 2010; GUTTMAN et al., 2010; KENT, 2002; TRAPNELL et al., 2010; WANG et al., 2010; WU; NACU, 2010).

2.6.2 Montagem sem referência

Com a popularização das tecnologias NGS, diversas espécies “não-modelo” estão sendo sequenciadas, mas, no entanto, não possuem qualquer referência para a montagem dos seus *reads*. Neste contexto, a reconstrução sem referência, ou *de novo*, ganha destaque. Ela trabalha em cima da “redundância” dos *reads* para criar sobreposições e assim montar os transcritos. Nesta abordagem são utilizados os grafos De Bruijn, os quais usam os *k-mers* (sequências de bases com tamanho *k*) para representar os nós; os pares de nós são conectados entre si através de uma sobreposição de sequências de exatamente (*k*-1). Alguns montadores constroem os grafos De Bruijn acima de diversos níveis de expressão e então realizam o pós-processamento pela fusão dos *contigs* (sequências contíguas ou consenso) e remoção da redundância. Esta abordagem, utilizada por programas como o Rnnotator, Multiple-k e o Trans-ABYSS, permite com que haja perda de isoformas por redundância, enquanto que outros programas, como o Trinity e o Velvet realizam a reconstrução diretamente acima do *transversing* acima dos grafos De Bruijn (GRABHERR et al., 2011; MARTIN et al., 2010; ROBERTSON et al., 2010; SURGET-GROBA; MONTOYA-BURGOS, 2010; ZERBINO; BIRNEY, 2008).

2.7 Expressão diferencial

O RNA-seq é também uma técnica quantitativa, que permite calcular o nível de expressão para determinados RNAs de forma mais precisa do que os microarranjos (GARBER et al., 2011). No entanto, para a estimativa da expressão diferencial é necessária a normalização das contagens de *reads* pelo tamanho do transcrito, a fim de encontrar uma expressão significativa entre transcritos longos (os quais podem ser mapeados por muitos *reads*) e transcritos curtos (que podem ser mapeados por poucos *reads*). Para este propósito, o RPKM (*reads* por kilobase de

transcrito, por milhão de *reads* mapeados), usado para dados do tipo single-ends, e o FPKM (fragmentos por kilobase de transcrito, por milhão de *reads* mapeados), usado para dados do tipo paired-ends, são as principais métricas que normalizam a contagem de *reads* por transcritos (GARBER et al., 2011; MORTAZAVI et al., 2008).

Diversas abordagens computacionais foram desenvolvidas para estimar a expressão diferencial entre amostras obtidas de RNA-seq. Os métodos iniciais modelavam e estimavam a abundância dos transcritos por meio da distribuição de Poisson das contagens de *reads*, o que, muitas vezes, destoava da realidade biológica entre as réplicas (JIANG; WONG, 2009; MARIONI et al., 2008; TRAPNELL et al., 2010). O programa Myrna foi um dos que apostou em uma abordagem baseada na permutação das contagens de *reads* para dados com poucas repetições (LANGMEAD; HANSEN; LEEK, 2010). Outros métodos, como o edgeR, DESeq (*Differential Expression Analysis of Count Data*) e Cuffdiff, tentam modelar a variabilidade biológica através da variação das contagens de *reads* como sendo uma função não-linear, e então utilizam diferentes abordagens paramétricas para estimar a expressão (ANDERS; HUBER, 2010; ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010; TRAPNELL et al., 2010).

2.8 Anotação dos transcritos

Uma vez montados, os transcritos necessitam ser identificados (anotados), sendo que uma alternativa corriqueira para realizar esta tarefa é pesquisar alinhamentos significativos com o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), ambientado no site do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (ALTSCHUL et al., 1990). Esta ferramenta computacional poderosa utiliza o algoritmo de Smith e Waterman (1981) para prover os diversos tipos de alinhamentos entre as “sequências consulta” e as sequências contidas nas diversas bases de dados disponíveis. Os principais “sabores²” do BLAST são: Blastn (sequência consulta de nucleotídeos contra a base de dados de sequências de nucleotídeos), Blastp (sequência de aminoácidos contra a base de dados de proteínas), Blastx (sequência de nucleotídeos traduzidos nas 6 janelas de leitura possíveis, contra a base de dados de proteínas), tBlastn (sequência de aminoácidos

² “*Flavors of Blast*”, uma expressão para distinguir os diferentes programas contidos no BLAST.

contra a base de dados de nucleotídeos traduzidos nas 6 janelas de leitura possíveis) e tBlastx (sequência de nucleotídeos traduzidos nas 6 janelas de leitura, contra a base de dados de nucleotídeos traduzidos nas 6 janelas de leitura).

Outra forma de anotar os transcritos é através de suas características funcionais, e para isto é amplamente utilizado o “Gene Ontology” (GENE ONTOLOGY CONSORTIUM, 2000). Esta ferramenta é fruto de um esforço para se criar um vocabulário controlado e unificado para os termos funcionais (termos GO), abrangendo todas as representações de genes (ontologias). Dentro dele, os termos são agrupados em três categorias principais: “Processo Biológico”, “Função Molecular” e “Componente Celular”.

Para uma forma mais abrangente de anotação, pode-se recorrer ao InterPro, o qual utiliza assinaturas de proteínas, domínios, famílias e estruturas para a classificação funcional das sequências consulta (MITCHELL et al., 2015; ZDOBNOV; APWEILER, 2001). As assinaturas do InterPro podem vir de até 11 bases de dados diferentes: CATH-Gene3D, HAMAP (*High-quality Automated and Manual Annotation of microbial Proteomes*), PANTHER (*Protein Analysis Through Evolutionary Relationships*), PFam (*Protein Family*), PIRSF (*Protein Information Resource*), PRINTS, ProDom, PROSITE, SMART (*Simple Modular Architecture Research Tool*), SUPERFAMILY e TIGRFAM.

A fim de identificar as funções e utilização das redes metabólicas representadas pelas sequências obtidas, é possível consultar o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). O KEGG é uma iniciativa da Universidade de Kyoto (Japão) para criar uma base de dados que contenha informações de genomas, vias metabólicas, substâncias químicas, e associações moleculares entre organismos (KANEHISA et al., 2004).

Para facilitar o manejo de informação e tornar o processo de anotação gênica e funcional mais amigável, diversos softwares foram lançados, dentre eles o Blast2GO, o qual é um software pago, mas que disponibiliza uma versão gratuita com menos funções (CONESA; GÖTZ, 2008); o Mercator, que é uma ferramenta online gratuita (LOHSE et al., 2014); e o Trinotate, que é gratuito e produzido pelo mesmo grupo que desenvolve o montador Trinity (<http://trinotate.sourceforge.net/>).

2.9 Estresse Abiótico em Plantas

Os vegetais são seres sésseis, desprovidos de sistema nervoso, incapazes de realizar movimentos coordenados, e que crescem e se reproduzem em um ambiente complexo, rico em fatores abióticos que variam espacialmente e temporalmente (DOLFERUS, 2014). Quando estas flutuações ambientais se intensificam e fogem dos limites que propiciavam o bem-estar vegetal (pleno crescimento e desenvolvimento), instaura-se uma condição de estresse. O estresse abiótico pode ser causado tanto por perturbações impostas por fatores climáticos adversos (excesso de luz, alta ou baixa temperatura, baixa umidade, intensidade do vento, intensa precipitação, estiagem prolongada, poluição do ar), quanto por fatores edáficos, relacionados às condições do solo (salinização, baixa disponibilidade de ar, água, nutrientes, impedimento físico, poluição por metais pesados e outros compostos tóxicos) (DOLFERUS, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2008; WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).

Tanto a adaptação, quanto a aclimação são respostas dos vegetais expressas em decorrência às perturbações do ambiente em que se situam. Enquanto a adaptação é uma característica de alteração genética de toda uma população decorrente de seleção natural, a aclimação (ou plasticidade fenotípica) corresponde a mudanças fisiológicas e morfológicas que conferem ao indivíduo a capacidade de se expor a determinado ambiente. A resistência e a tolerância ao estresse são expressões usadas para mensurar o sucesso do vegetal em sobreviver e se desenvolver dentro de um ambiente em desequilíbrio, e se traduzem biologicamente no balanço entre adaptação genética e plasticidade fenotípica (TAIZ; ZEIGER, 2008).

As flutuações ambientais causam respostas celulares complexas nas plantas, as quais podem ser divididas entre efeitos primários e secundários. Os efeitos primários modificam condições físicas e químicas da célula, as quais, uma vez alteradas, modificarão características bioquímicas, genéticas e metabólicas, produzindo assim os efeitos secundários. Diferentes tipos de estresse podem causar os mesmos efeitos primários, como no caso dos estresses por congelamento, desidratação e alta salinidade, onde ambos reduzem a pressão de turgor celular e o teor relativo de água. Os efeitos secundários iniciam os processos de degradação celular como produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, redução da

respiração e da fixação de CO₂, citotoxicidade iônica, desestabilização de membranas, proteínas e parede celular, levando, em último caso, à morte de células e tecidos (DOLFERUS, 2014; TAIZ; ZEIGER, 2008).

Pelo mesmo raciocínio, o estresse pode ser identificado como primário e secundário: enquanto o primário se refere ao desequilíbrio ambiental que provoca dano celular na planta, o secundário (como o estresse osmótico e oxidativo) corresponde à alteração celular que irá propagar internamente os efeitos destrutivos da flutuação ambiental (WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).

A resposta vegetal ao estresse abiótico envolve uma robusta rede de expressão coordenada de genes, os quais atuam em três grandes categorias: percepção do estresse, cascatas de sinalização e controle transcricional; proteção de membranas e proteínas, osmoproteção e remoção de radicais livres; e coleta e transporte de água e íons. Na primeira categoria, encontram-se as MAP quinases (*Mitogen Activated Protein Kinases*), SOS quinases (*“Salt Overly Sensitive” Serine-Threonine Kinases*), fosfolipases, fatores de transcrição como o HSF (*Heat Shock Factor*), CBF/DREB (*C-Repeat Binding Factor; Dehydration-Responsive Element Binding Factor*) e ABF/AREB (*Absciscic Acid-Responsive Element Binding Factor*). Dentro da segunda categoria, estão as proteínas de choque térmico HSP (*Heat Shock Proteins*), chaperonas, proteínas de embriogênese tardia LEA (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*), e diversas enzimas que atuam na conversão de carboidratos, biossíntese de prolina e detoxificação celular. As aquaporinas, proteínas transportadoras de membrana e transportadores de íons encontram-se na terceira categoria (GHOSH; XU, 2014; URANO et al., 2010; WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003).

De forma simplificada, a figura 14 apresenta os principais pontos da cascata das reações bioquímicas e moleculares que ocorre mediante uma situação de estresse e que levam à resistência ou tolerância do vegetal a esta perturbação.

Figura 14 - Fluxograma da resposta vegetal ao estresse abiótico

Fonte: Wang, Vinocur e Altman (2003) (modificado)

2.9.1 Estresse por Déficit Hídrico

O estresse por falta de água (ou déficit hídrico), assim como aquele por salinidade, é o que mais causa redução na produtividade de culturas agrícolas, sendo que seu controle muitas vezes é ineficaz ou pouco duradouro (FOLEY et al., 2005). Especialmente no caso de espécies florestais, estudos de Breshears et al. (2008) apontam que o aquecimento global e a gradativa escassez de água nos mananciais subterrâneos conduzem para uma redução na viabilidade de áreas para plantio de árvores.

Conforme mencionado anteriormente, os processos de resposta ao estresse por déficit hídrico se desenvolvem em múltiplos níveis moleculares, formando uma cascata de reações complexas e, muitas vezes, interligadas.

De toda a água absorvida pelas plantas (seja pelo solo, seja pela atmosfera), cerca de 97% é perdido pela corrente transpiratória, 2% atua mantendo a turgescência e expansão celular, e apenas 1% está envolvido com os processos metabólicos (TAIZ; ZEIGER, 2008). O estresse por déficit hídrico ocorre quando há baixa disponibilidade de água para a captação radicular, e também quando a umidade relativa do ar torna-se muito baixa; estes fenômenos costumam ocorrer no período de seca, ou estiagem, o qual corresponde ao fenômeno meteorológico de precipitação insuficiente para atender as demandas hídricas de um determinado ecossistema (TAIZ; ZEIGER, 2008).

O primeiro sintoma do estresse por déficit hídrico é o murchamento foliar, causado pela desidratação e perda de turgor da folha (OSAKABE et al., 2014; TAIZ; ZEIGER, 2008). Mesmo sob déficit hídrico, a planta pode recuperar o turgor foliar durante a noite, onde a umidade relativa do ar aumenta; caso o turgor das folhas não se restabeleça nem mesmo à noite, significa que o estresse hídrico foi tão intenso que levou a planta ao ponto de murcha permanente (CZYŻ; DEXTER, 2012). Juntamente com o sintoma de perda de turgor foliar, ocorre também a diminuição nos ciclos de mitose, reduzindo portanto a taxa de divisão celular. Devido a ocorrência destes dois sintomas, o número e tamanho de novas células torna-se comprometido, o que leva diretamente a redução no desenvolvimento da planta, queda no vigor vegetativo, aumento do período de juvenilidade e baixa produção em cultivos agrícolas (FAROOQ et al., 2009).

Em um estudo comparativo de Farooq et al. (2009), mostrou-se que a redução na produção das principais culturas agrícolas pode cair em cerca de 60% caso o déficit hídrico ocorra durante o período vegetativo, enquanto que, durante o período reprodutivo, esta queda pode ultrapassar os 90%.

O conteúdo relativo de água foliar (CRA) representa uma porcentagem do conteúdo de água disponível quando este tecido está plenamente túrgido, e portanto depende da disponibilidade e captação de água no solo, e também da condutividade hidráulica entre a região radicular e aérea (TAIZ; ZEIGER, 2008). Devido à variação do CRA ocorrer em função da quantidade de água no solo, esta medida torna-se um importante parâmetro prático para a determinação do grau de estresse hídrico em plantas sob condições de campo (BARBOSA, 2013).

O fechamento dos estômatos é o próximo sintoma do estresse por déficit hídrico, sendo tanto benéfico, pois ajuda a preservar a água no interior da folha,

quanto prejudicial, pois reduz, ou mesmo impede, as trocas gasosas entre o mesófilo foliar e a atmosfera. A sinalização do estresse hídrico parte de um estímulo primário oriundos das raízes, onde o ácido abscísico (ABA) é sintetizado e transportado via xilema para a parte aérea (TAIZ; ZEIGER, 2008). Ao início desta sinalização, o teor de ABA na seiva do xilema pode sofrer um acréscimo de 200 a 3.000 vezes (SCHURR; GOLLAN; SCHULZE, 1992).

O hormônio ácido abscísico tem o papel de regular diversas funções na planta, dentre elas aquelas relacionadas aos diversos tipos de estresse. Durante o estresse hídrico, o ABA promove uma alteração no fluxo de íons nas células-guarda dos estômatos, onde ocorre o aumento de Ca^{2+} e abertura de canais de efluxo de Cl^- e malato $^{2-}$. Isto ocorre por conta da ação de quinases ativadas pelo ABA, as quais inibem H^+ -ATPases e assim inativam a bomba de prótons que mantinha a hiperpolarização da membrana. A despolarização da membrana leva tanto ao fechamento de canais de entrada de íons, quanto ao efluxo de K^+ , sendo que isto induz o efluxo de H_2O da célula; conseqüentemente, ocorre a perda do turgor celular e o fechamento estomático (LI et al., 2000; PIMENTA, 2008). Outras quinases também podem responder diretamente a concentrações de CO_2 ou à luz (ELHADDAD et al., 2014). Demais mensageiros secundários do ABA como os íons de Ca^{2+} , espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 e NO, também têm sido relacionados com a ativação da cascata de reações que leva ao fechamento estomático (NEILL et al., 2008).

Enquanto isto, Li et al. (2000) provaram que a alteração de uma serina-treonina quinase ativada por ABA (AAPK) inibiu o fechamento estomático, interferindo na ativação de canais de ânions pelo ABA. O ABA também induz a produção de H_2O_2 na célula, sendo esta molécula importante para a ativação de canais de cálcio, os quais promovem o influxo e o incremento de íons Ca^{2+} no protoplasto (PEI et al., 2000). Por outro lado, Sridharamurthy et al. (2014) mostraram que o H_2O_2 também atua como regulador da mediação do ABA, atuando na fosforilase HAB1, a qual seria a responsável por inativar a quinase SnRK2.6/OST1 (*Open Stomata 1 (OST1)/Sucrose Nonfermenting 1 (SNF1)-Related Protein Kinase 2.6*); esta quinase é a responsável por iniciar o processo de abertura estomática. O óxido nítrico, NO, não somente é produzido por indução do ABA, como também atua como regulador da cascata de reação, inibindo a quinase SnRK2.6/OST1 por meio

da nitrosilação de um resíduo de cisteína próximo ao sítio catalítico (WANG et al., 2015).

O ajuste osmótico das células tende a ser o próximo passo na resposta ao estresse hídrico: o acúmulo de solutos (K^+ e Cl^-) no vacúolo leva a uma redução no potencial hídrico da célula, o que permite com que as moléculas de água tornem-se mais difíceis de serem perdidas sob a forma de vapor. Para balancear o excesso de íons no vacúolo, a célula também acumula solutos compatíveis, os quais são compostos orgânicos osmoticamente ativos (por exemplo a prolina, álcoois de açúcar, glicina-betaína, sacarose, trealose), que não interferem na ação de enzimas ou na estabilidade das membranas (TAIZ; ZEIGER, 2008).

A prolina é um aminoácido que pode atuar como molécula osmoprotetora, capaz de balancear o potencial hídrico celular, prevenir a ação nociva de moléculas tóxicas, e ainda servir como fonte de carbono e nitrogênio após o fim do período de escassez de água (TAIZ; ZEIGER, 2008). O acúmulo de prolina nas células pode ser causado tanto pela sua síntese, quanto pela ausência de sua degradação (YOSHIBA et al., 1997). Sob condições normais, o conteúdo de prolina livre nas células é da ordem de 0,2 a 0,6 mg g⁻¹ de tecido, mas este valor pode subir em até 30% sob condições de estresse (DENG et al., 2013).

A prolina pode ser sintetizada por duas rotas: a do glutamato e a da ornitina, sendo que a primeira é a via preferencial em casos de estresse. Nesta via, o glutamato sofre ação da enzima Δ^1 - pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS), formando um composto intermediário, a pirrolina-5-carboxilato (P5C); esta é convertida a prolina pela enzima Δ^1 - pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR) (YOSHIBA et al., 1997). O gene da enzima P5CS é altamente expresso em tecidos sob estresse hídrico, e sua superexpressão em plantas de tabaco e arroz mostrou um aumento significativo na tolerância ao estresse (YAMCHI et al., 2007; ZHU et al., 1998).

Referências

ABUGRE, S. APETORGBOR, A. K.; ANTWIWAA, A.; APETORGBOR, M. M. Allelopathic effects of ten tree species on germination and growth of four traditional food crops in Ghana. **International Journal of Agricultural Technology**, Bangkok, v. 7, n. 3, p. 825 – 834, 2011.

ADAMS, M. D.; CELNIKER, S. E.; HOLT, R. A.; EVANS, C. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P. G.; SCHERER, S. E.; LI, P. W.; HOSKINS, R. A.; GALLE, R. F.; GEORGE, R. A.; LEWIS, S. E.; RICHARDS, S.; ASHBURNER, M.; HENDERSON, S. N.; SUTTON, G. G.; WORTMAN, J. R.; YANDELL, M. D.; ZHANG, Q.; CHEN, L. X.; BRANDON, R. C.; ROGERS, Y. C.; BLAZEJ, R. G.; CHAMPE, M.; PFEIFFER, B. D.; WAN, K. H.; DOYLE, C.; BAXTER, E. G.; HELT, G.; NELSON, C. R.; GABOR MIKLOS, G. L.; ABRIL, J. F.; AGBAYANI, A.; AN, H.; ANDREWS-PFANNKOCH, C.; BALDWIN, D.; BALLEW, R. M.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BAYRAKTAROGLU, L.; BEASLEY, E. M.; BEESON, K. Y.; BENOS, P. V.; BERMAN, B. P.; BHANDARI, D.; BOLSHAKOV, S.; BORKOVA, D.; BOTCHAN, M. R.; BOUCK, J.; BROKSTEIN, P.; BROTTIER, P.; BURTIS, K. C.; BUSAM, D. A.; BUTLER, H.; CADIEU, E.; CENTER, A.; CHANDRA, I.; MICHAEL CHERRY, J.; CAWLEY, S.; DAHLKE, C.; DAVENPORT, L. B.; DAVIES, P.; DE PABLOS, B.; DELCHER, A.; DENG, Z.; DESLATTES MAYS, A.; DEW, I.; DIETZ, S. M.; DODSON, K.; DOUP, L. E.; DOWNES, M.; DUGAN-ROCHA, S.; DUNKOV, B. C.; DUNN, P.; DURBIN, K. J.; EVANGELISTA, C. C.; FERRAZ, C.; FERRIERA, S.; FLEISCHMANN, W.; FOSLER, C.; GABRIELIAN, A. E.; GARG, N. S.; GELBART, W. M.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GONG, F.; HARLEY GORRELL, J.; GU, Z.; GUAN, P.; HARRIS, M.; HARRIS, N. L.; HARVEY, D.; HEIMAN, T. J.; HERNANDEZ, J. R.; HOUCK, J.; HOSTIN, D.; HOUSTON, K. A.; HOWLAND, T. J.; WEI, M.; IBEGWAM, C.; JALALI, M.; KALUSH, F.; KARPEN, G.H.; KE, Z.; KENNISON, J. A.; KETCHUM, K. A.; KIMMEL, B. E.; KODIRA, C. D.; KRAFT, C.; KRAVITZ, S.; KULP, D.; LAI, Z.; LASKO, P.; LEI, Y.; LEVITSKY, A. A.; LI, J.; LI, Z.; LIANG, Y.; LIN, X.; LIU, X.; MATTEI, B.; MCINTOSH, T. C.; MCLEOD, M. P.; MCPHERSON, D.; MERKULOV, G.; MILSHINA, N. V.; MOBARRY, C.; MORRIS, J.; MOSHREFI, A.; MOUNT, S. M.; MOY, M.; MURPHY, B.; MURPHY, L.; MUZNY, D. M.; NELSON, D. L.; NELSON, D. R.; NELSON, K. A.; NIXON, K.; NUSSKERN, D. R.; PACLEB, J. M.; PALAZZOLO, M.; PITTMAN, G. S.; PAN, S.; POLLARD, J.; PURI, V.; REESE, M. G.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; SAUNDERS, R. D. C.; SCHEELER, F.; SHEN, H.; SHUE, B. C.; SIDEN-KIAMOS, I.; SIMPSON, M.; SKUPSKI, M. P.; SMITH, T.; SPIER, E.; SPRADLING, A. C.; STAPLETON, M.; STRONG, R.; SUN, E.; SVIRSKAS, R.; TECTOR, C.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, A. H.; WANG, X.; WANG, Z.; WASSARMAN, D. A.; WEINSTOCK, G. M.; WEISSENBAACH, J.; WILLIAMS, S. M.; WOODAGE, T.; WORLEY, K. C.; WU, D.; YANG, S.; ALISON YAO, Q.; YE, J.; YEH, R.; ZAVERI, J. S.; ZHAN, M.; ZHANG, G.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHENG, X. H.; ZHONG, F. N.; ZHONG, W.; ZHOU, X.; ZHU, S.; ZHU, X.; SMITH, H. O.; GIBBS, R. A.; MYERS, E. W.; RUBIN, G. M.; VENTER, J. C. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. **Science**, New York, v. 287, p. 2185 – 2915, 2000.

ALCÂNTARA, B. K.; VEASEY, E. A. Genetic diversity of teak (*Tectona grandis* L.f.) from different provenances using microsatellite markers. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 37, n. 4, p. 747 - 758, 2013.

ALTSCHUL, S. F. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403 – 410, 1990.

ANDERS, S.; HUBER, W. Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biology**, London, v. 11, p. 1-12, 2010.

ANGELI, A.; STAPE, J. L.. *Tectona grandis* (Teca). **Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**, Piracicaba, 5 maio 2003. Disponível em <<http://www.ipef.br/identificacao/tectona.grandis.asp>>, Acesso em: 6 de jan. 2015.

ANSORGE, W. J. Next-generation DNA sequencing techniques. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 25, n. 4, p. 195 – 203, 2009.

APPLIED BIOSYSTEMS. **Applied Biosystems 3730/3730xl DNA analyzer: Getting started guide**. Life Technologies, Carlsbad, 210p. 2013.

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, London, v. 408, p. 796 – 815, 2000.

ARGUEDAS, M.; CHAVERRI, P.; VERJANS, J. –M. Problemas fitosanitarios de la teca em Costa Rica. **Recursos Naturales y Ambiente**, Turrialba, n. 41, p. 130 - 135, 2004.

AU, K. F.; JIANG, H.; LIN, L.; XING, Y.; WONG, W. H. Detection of splice junctions from paired-end RNA-seq data by SpliceMap. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, n. 14, p. 4570 – 4578, 2010.

BAILLÈRES, H.; DURAND, P. Y. Non-destructive techniques for wood quality assessment of plantation grown teak. **Bois et Forêts des Tropiques**, Paris, n. 263, v. 1, p. 17-29, 2000.

BARBOSA, M. de A. **Plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) transformadas geneticamente com o gene *AtBI-1* submetidas ao déficit hídrico em casa-de-vegetação**. 2013, 82p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2013

BONFIELD, J. K.; STADEN, R. The application of numerical estimates of base calling accuracy to DNA sequencing projects. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 23, n. 8, p. 1406 – 1410, 1995.

BORGES, R. C. F. **Etiologia do cancro da teca e caracterização patogênica e molecular de *Lasiodiplodia theobromae***. 2014, 86p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade de Brasília, Brasília. 2014.

BOWERS, J.; MITCHELL, J.; BEER, E.; BUZBY, P. R.; CAUSEY, M.; EFCAVITCH, J. W.; JAROSZ, M.; KRZYMANSKA-OLEJNIK, E.; KUNG, L.; LIPSON, D.; LOWMAN, G. M.; MARAPPAN, S.; MCINERNEY, P.; PLATT, A.; ROY, A.; SIDDIQI, S.M.; STEINMANN, K.; THOMPSON, J.F. Virtual Terminator nucleotides for next generation DNA sequencing. **Nature Methods**, London, v. 6, n. 8, p. 593 – 595, 2009.

BRASLAVSKY, I.; HEBERT, B.; KARTALOV, E.; QUAKE, S.R. Sequence information can be obtained from single DNA molecules. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 100, n. 7, p. 3960 - 3964, 2003.

BRESHEARS, D. D.; MCDOWELL, N. G.; GODDARD, K. L.; DAYEM, K. E.; MARTENS, S. N.; MEYER, C. W.; BROWN, K. M. Foliar absorption of intercepted rainfall improves woody plant water status most during drought. **Ecology**, New York, v. 89, n.1, p. 41 - 47. 2008.

BURROWS, M.; WHEELER, D. J. **A Block-sorting lossless data compression algorithm**. Systems Research Center: Palo Alto, 18p. 1994.

C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM. Genome Sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. **Science**, New York, v. 282, p. 2012 – 2018, 1998.

CÁCERES FLORESTAL. **Manual do cultivo da teca**. 3ª ed. Cáceres, 2006, 32p.

CALDEIRA, B. R. P. P. **Caracterização das propriedades físico-mecânicas e determinação da percentagem de cerne da madeira de *Tectona grandis***. 2004. 84p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal e dos Recursos Naturais) - Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa. 2004.

CARVALHO, M. C. da C. G. de; SILVA, D. C. G. da. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 3, p. 735 - 744, 2010.

CHAIGLOM, D. Teak beehole borer and the control research in Thailand. **Natural History Bulletin of Siam Society**, Bangkok, v. 21, p. 157 – 160, 1966.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A.; DE ABREU, H. M. C.; ARRUDA, P.; BESPALHOK FILHO, J. C.; BURNQUIST, W. L.; CRESTE, S.; DI CIERO, L.; FERRO, J. A.; FIGUEIRA, A. V. de O.; FILGUEIRAS, T. de S.; GROSSI-DE-SÁ, M. D. F.; GUZZO, E. C.; HOFFMANN, H. P.; LANDELL, M. G. de A.; MACEDO, N.; MATSUOKA, S.; REINACH, F. de C.; ROMANO, E.; DA SILVA, W. J.; SILVA FILHO, M. de C.; ULIAN, E. C. Sugarcane (*Saccharum X officinarum*): a reference study for the regulation of genetically modified cultivars in Brazil. **Tropical Plant Biology**, New York, v. 4, p. 62 – 89, 2011.

CHURCH, G.M. The Personal Genome Project. **Molecular Systems Biology**, London, v. 1, p. 1–3, 2005.

CHURCHILL, G.A.; WATERMAN, M. S. The Accuracy of DNA sequences: estimating sequence quality. **Genomics**, New York, v. 14, p. 89 – 98, 1992.

COHEN, A. S. Rapid separation and purification of oligonucleotides by high-performance capillary gel electrophoresis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 85, p. 9660 - 9663, 1988.

COMMINS, J.; TOFT, C.; FARES, M. A. Computational biology methods and their application to the comparative genomics of endocellular symbiotic bacteria of insects. **Biological Procedures Online**, London, v. 11, p. 52 – 78. 2009.

CONESA, A.; GÖTZ, S. Blast2GO: a comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. **International Journal of Plant Genomics**, London, v. 2008, p. 1 - 12. 2008.

COTTA, T. R. **Zoanemento climatológico para o cultivo de teca no estado do Espírito Santo**. 2010. 27p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Espírito Santo, Jerônimo Monteiro. 2010.

CZYZ, E. A.; DEXTER, A. R. Plant wilting can be caused either by the plant or by the soil. **Soil Research**, Canberra, v. 50, p. 708 – 713. 2012.

DAS, C. R.; MONDAL, N. K.; ADITYA, P.; DATTA, J. K.; BANERJEE, A.; DAS, K. Allelopathic potentialities of leachates of leaf litter of some selected tree species on gram seeds under laboratory conditions. **Asian Journal of Experimental Biological Sciences**, Agra, v. 3, n. 1, p. 59 – 65, 2012.

DENG, G.; LIANG, J.; XU, D.; LONG, H.; PAN, Z.; YU, M. The relationship between proline content, the expression level of P5CS (Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase), and drought tolerance in Tibetan hulless barley (*Hordeum vulgare* var. *nudum*). **Russian Journal of Plant Physiology**, Moscow, v. 60, n. 5, p. 693 - 700. 2013.

DIÉ, A.; KITIN, P.; KOUAMÉ, F. N'G.; DEN BULCKE, J. V.; ACKER, J. V.; BEECKMAN, H. Fluctuations of cambial activity in relation to precipitation result in annual rings and intra-annual growth zones of xylem and phloem in teak (*Tectona grandis*) in Ivory Coast. **Annals of Botany**, Oxford, v. 110, p. 861 – 873, 2012.

DOLFERUS, R. To grow or not to grow: A stressful decision for plants. **Plant Science**, Limerick, v. 229, p. 247 – 261. 2014.

EID, J.; FEHR, A.; GRAY, J.; LUONG, K.; LYLE, J.; OTTO, G.; PELUSO, P.; RANK, D.; BAYBAYAN, P.; BETTMAN, B.; BIBILLO, A.; BJORNSEN, K.; CHAUDHURI, B.; CHRISTIANS, F.; CICERO, R.; CLARK, S.; DALAL, R.; DEWINTER, A.; DIXON, J.; FOQUET, M.; GAERTNER, A.; HARDENBOL, P.; HEINER, C.; HESTER, K.; HOLDEN, D.; KEARNS, G.; KONG, X.; KUSE, R.; LACROIX, Y.; LIN, S.; LUNDQUIST, P.; MA, C.; MARKS, P.; MAXHAM, M.; MURPHY, D.; PARK, I.; PHAM, T.; PHILLIPS, M.; ROY, J.; SEBRA, R.; SHEN, G.; SORENSON, J.; TOMANEY, A.; TRAVERS, K.; TRULSON, M.; VIECELI, J.; WEGENER, J.; WU, D.; YANG, A.; ZACCARIN, D.; ZHAO, P.; ZHONG, F.; KORLACH, J.; TURNER, S. Real-Time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science**, New York, v. 203, p. 133 – 138, 2009.

ELHADDAD, N.; HUNT, L.; SLOAN, J.; GRAY, J. E. Light-induced stomatal opening is affected by the guard cell protein kinase APK1b. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. 1 - 7. 2014.

EMBRAPA. **Teca (*Tectona grandis*): desenvolvimento da teca no Brasil**. Colombo, Embrapa Florestas, 2004. 6p.

EWING, B. HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 175 – 185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, New York, v. 8, p. 186 – 194, 1998.

FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N.; FUJITA, D.; BASRA, S. M. A. Planta drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 29, p. 185 – 212. 2009.

FIGUEIREDO, E. O. **Avaliação de povoamentos de teca (*Tectona grandis* L.f.) na microrregião do baixo rio Acre**. 2005, 301p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, Lavras. 2005.

FIGUEIREDO, E. O.; OLIVEIRA, L. C. de; BARBOSA, L. K. F. **Teca (*Tectona grandis* L.f.): principais perguntas do futuro empreendedor florestal**. Rio Branco: Embrapa Acre, 2005. 87 p. (Embrapa Acre. Documentos, 97).

FLEISCHMANN, R. D. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenza* Rd. **Science**, New York, v. 209, p. 496 – 512, 1995.

FOFANA, I. J.; OFORI, D.; POITEL, M.; VERHAEGEN, D. Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* L.f) in its natural range using DNA microsatellite markers. **New Forests**, Amsterdam, v. 37, p. 175 - 195. 2009

FOLEY, J. A.; DEFRIES, R.; ASNER, G. P.; BARFORD, C.; BONAN, G.; CARPENTER, S. R.; CHAPIN, F. S.; COE, M. T.; DAILY, G. C.; GIBBS, H. K.; HELKOWSKI, J. H.; HOLLOWAY, T.; HOWARD, E. A.; KUCHARIK, C. J.; MONFREDA, C.; PATZ, J. A.; PRENTICE, I. C.; RAMANKUTTY, N.; SNYDER, P. K. Global consequences of land use. **Science**, New York, v. 309, n. 5734, p. 570-574. 2005.

GALEANO, E.; VASCONCELOS, T. S.; RAMIRO, D. A.; DE MARTIN, V. de F.; CARRER, H. Identification and validation of quantitative real-time reverse transcription PCR reference genes for gene expression analysis in teak (*Tectona grandis* L.f.). **BMC Research Notes**, London, v. 7, n. 464, p. 1 – 13. 2014.

GARBER, M.; GRABHERR, M. G.; GUTTMAN, M.; TRAPNELL, C. Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. **Nature Methods**, London, v. 8, n. 6, p. 469 – 477, 2011.

GARG, J. M. **Flowers at Ananthagiri Hills, in Rangareddy district of Andhra Pradesh, India**. 2013. Disponível em <[http://en.wikipedia.org/wiki/Teak#mediaviewer/File:Teak_\(Tectona_grandis\)_flowers_in_Anantgiri,_AP_W2_IMG_8807.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/Teak#mediaviewer/File:Teak_(Tectona_grandis)_flowers_in_Anantgiri,_AP_W2_IMG_8807.jpg)>, Acesso em 6 jan. 2015.

GENE ONTOLOGY CONSORTIUM. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, London, v. 25, p. 25 – 29, 2000.

GHOSH, D.; XU, J. Abiotic stress responses in plant roots : a proteomics perspective. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 6, p. 1 – 13. 2014.

GILL, B. S.; BEDI, Y. S.; BIR, S. S. Cytopalynological studies in woody members of family Verbenaceae from north-west and central India. **Journal of the Indian Botanical Society**, Bangalore, v. 62, p. 235 – 244, 1983.

GLENN, T. C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 11, p. 759 – 769, 2011.

GOFFEAU, A.; BARRELL, G.; BUSSEY, H.; DAVIS, R. W.; DUJON, B.; FELDMANN, H.; GALIBERT, F.; HOHEISEL, J. D.; JACQ, C.; JOHNSTON, M.; LOUIS, E. J.; MEWES, H. W.; MURAKAMI, Y.; PHILIPPSSEN, P.; TETTELIN, H.; OLIVER, S. G. Life with 6000 genes. **Science**, New York, v. 274. n. 5287, p. 563 – 567. 1996.

GOLFARI, L.; CASER, R. L.; MOURA, V. P. G. **Zoneamento ecológico esquemático para reflorestamento no Brasil: 2ª aproximação**. Belo Horizonte: Centro de Pesquisa Florestal da Região do Cerrado, 1978. 66 p. (PRODEPEF. Série técnica, 11).

GOMES, J. E.; MACEDO, R. L. G.; VENTURIN, N.; MORAIS, V. de M.; SALGADO, B. G.; INÁCIO JÚNIOR, C. E.; CARVALHO, E. Resistência à penetração do solo em sistemas de plantio de *Tectona grandis* L. f (teca) no cerrado do estado de Minas Gerais. **Revista Científica Eletrônica de Engenharia Florestal**, Garça, n. 5, 18p., 2005. Disponível em <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/c0TYcYViWo4IK7E_2013-4-25-14-41-50.pdf>, acesso em 11 mar. 2015.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCALI, E.; HACHEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, London, v. 29, n. 7, p. 644 – 652, 2011.

GRAUDAL, L.; KJÆR, E. D.; SUANGTHO, V.; SAARDAVUT, P.; KAOSA-ARD, A. Conservation of genetic resources of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. In: LINN, F. **DFSC Series of Technical Notes**. Humlebaek: Danida Forest Seed Centre, 1999. p. 1 - 38.

GUERRERO-VÁSQUEZ, G. A.; ANDRADE, C. K. Z.; MOLINILLO, J. M. G.; MACÍAS, F. A. Practical first total synthesis of the potent phytotoxic (±)-Naphthotectone, isolated from *Tectona grandis*. **European Journal of Organic Chemistry**, Berlin, v. 2013, n. 27, p. 6175 – 6180, 2013.

GUTTMAN, M.; GARBER, M.; LEVIN, J. Z.; DONAGHEY, J.; ROBINSON, J.; ADICONIS, X.; FAN, L.; KOZIOL, M. J.; GNIRKE, A.; NUSBAUM, C.; RINN, J. L.; LANDER, E. S.; REGEV, A. Ab initio reconstruction of cell type-specific transcriptomes in mouse reveals the conserved multi-exonic structure of lincRNAs. **Nature Biotechnology**, London, v. 28, n. 5, p. 503 – 510, 2010.

GUY, A. T.; PIGGOT, T. J.; KHALID, S. Single-stranded DNA within Nanopores: conformational dynamics and implications for sequencing; a molecular dynamics simulation study. **Biophysical Journal**, New York, v. 103, p. 1028 – 1036, 2012.

HALLETT, J. T.; DÍAZ-CALVO, J.; VILLA-CASTILLO, J.; WAGNER, M. R. Teak plantations: economic bonanza or environmental disaster? **Journal of Forestry**, Maryland, v. 109, n. 5, p. 288 – 292.

HE, Y.; TSUTSUI, M.; SCHEICHER, R. H.; BAI, F.; TANIGUCHI, M.; KAWAI, T. Thermophoretic manipulation of DNA translocation through Nanopores. **ACS Nano**, Washington, v. 7, n. 1, p. 538 – 546, 2013.

HEALEY, S. P.; GARA, R. I. The effect of a teak (*Tectona grandis*) plantation on the establishment of native species in an abandoned pasture in Costa Rica. **Forest Ecology and Management**, Amsterdam, v. 176, p. 497 – 507, 2003.

HEDEGART, T. Pollination of teak (*Tectona grandis* L.). **Silvae Genetica**, Berlin, v. 22, n. 4, p. 124 – 128, 1973.

HUANG, X. C.; QUESADA, M. A.; MATHIES, R. A. DNA sequencing using capillary array electrophoresis. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 64, p. 2149 – 2154, 1992.

ILLUMINA. **History of Illumina Sequencing**. 2015. Disponível em <<http://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing/solexa-technology.html>>, Acesso em 14 jan. 2015.

_____. **Sequencing Systems**. 2015. Disponível em <<http://www.illumina.com/systems/sequencing.html>>, Acesso em 14 jan. 2015.

INSTITUTO DE PESQUISAS TECNOLÓGICAS: **Informações sobre madeiras**. Disponível em <http://www.ipt.br/consultas_online/informacoes_sobre_madeira>, Acesso em 6 jan. 2015.

JIANG, H.; WONG, W. H. Statistical inferences for isoform expression in RNA-Seq. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1026 – 1032, 2009.

JORGE, I.; NAVARRO, R. M.; LENZ, C.; ARIZA, D.; PORRAS, C.; JORRÍN, J. The holm oak leaf proteome: analytical and biological variability in the protein expression level assessed by 2-DE and protein identification tandem mass spectrometry *de novo* sequencing and sequence similarity searching. **Proteomics**, Weinheim, v. 5, p. 222 – 234, 2005.

KANEHISA, M.; GOTO, S.; KAWASHIMA, S.; OKUNO, Y.; HATTORI, M. The KEGG resource for deciphering the genome. **Nucleic Acids Research**, London, v. 32, p. D277 – D280, 2004.

KAOSA-ARD, A. Teak (*Tectona grandis* Linn. f.): its natural distribution and related factors. **Natural History Bulletin of the Siam Society**, Bangkok, v. 29, p. 55 – 74, 1989.

_____. Overview of problems in teak plantation establishment. In: TEAKNET; FAO. **Management of Teak Plantations**. Yangon: Unasylva, 1998. Disponível em < <http://www.fao.org/docrep/005/ac773e/ac773e00.htm#Contents> >, Acesso em 6 jan. 2015.

KEIDING, H.; WELLENDORF, H.; LAURIDSEN, E. B. **Evaluation of an International Series of Teak Provenance Trials**. Danida Forest Seed Centre, Humlebæk, 1986, 91p.

KENT, W. J. BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. **Genome Research**, New York, v. 12, p. 656 – 664, 2002.

KERTADIKARA, A. W. S.; PRAT, D. Genetic structure and mating system in teak (*Tectona grandis* L. f.) provinces. **Silvae Genetica**, Berlin, v. 44, p. 2 – 3, 1995.

KHAN, R. M.; MLUNGWANA, S. M. 5-Hydroxylapachol: a cytotoxic agent from *Tectona grandis*. **Phytochemistry**, London, v. 50, p. 439 – 442, 1999.

KIEHL, E. J. **Manual de edafologia**: relações solo-planta. São Paulo: Agronômica Ceres, 1979. 264 p.

KIM, J. B.; PORRECA, G. J.; SONG, L.; GREENWAY, S. C.; GORHAM, J. M.; CHURCH, G. M.; SEIDMAN, C. E.; SEIDMAN, J. G. Polony multiplex analysis of gene expression (PMAGE) in a mouse model of hypertrophic cardiomyopathy. **Science**, New York, v. 316, n. 5830, p. 1481 – 1484, 2007.

KJÆR, E. D.; SIEGISMUND, H. R.; SUANGTHO, V. A Multivariate study on genetic variation in teak (*Tectona grandis* (L.)). **Silvae Genetica**, Berlin, v. 45, p. 5 – 6, 1996.

KLAR, A. E. **A água no sistema solo-planta-atmosfera**. São Paulo: Nobel , 1984. 408p.

KULKARNI, N.; PAUNIKAR, S.; HUSSAINI, S. S. Susceptibility of teak skeletonizer, *Eutectona machaeralis* (Walker) to the EPN, *Heterorhabditis indica* Poinar. **World Journal of Zoology**, Nagpur, v. 6, n. 1, p. 33 – 39, 2011.

LAGUDAH, E. S.; DUBCOVSKY, J; POWELL, W. 2001. Wheat genomics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 39 n. 3-4, p. 335 - 344. 2001.

LAMPRECHT, H. **Silvicultura nos trópicos**: ecossistemas florestais e respectivas espécies arbóreas – possibilidades e métodos de aproveitamento sustentado. Eachborn: GTZ, 1990. 343 p.

LANDER, E. S.; LINTON, L. M.; BIRREN, B.; NUSBAUM, C.; ZODY, M. C.; BALDWIN, J.; DEVON, K.; DEWAR, K.; DOYLE, M.; FITZHUGH, W.; FUNKE, R.; GAGE, D.; HARRIS, K.; HEAFORD, A.; HOWLAND, J.; KANN, L.; LEHOCZKY, J.; LEVINE, R.; MCEWAN, P.; MCKERNAN, K.; MELDRIM, J.; MESIROV, J. P.; MIRANDA, C.; MORRIS, W.; NAYLOR, J.; RAYMOND, C.; ROSETTI, M.; SANTOS, R.; SHERIDAN, A.; SOUGNEZ, C.; STANGE-THOMANN, N.; STOJANOVIC, N.; SUBRAMANIAN, A.; WYMAN, D.; ROGERS, J.; SULSTON, J.; AINSCOUGH, R.; BECK, S.; BENTLEY, D.; BURTON, J.; CLEE, C.; CARTER, N.; COULSON, A.; DEADMAN, R.; DELOUKAS, P.; DUNHAM, A.; DUNHAM, I.; DURBIN, R.; FRENCH, L.; GRAFHAM, D.; GREGORY, S.; HUBBARD, T.; HUMPHRAY, S.; HUNT, A.; JONES, M.; LLOYD, C.; MCMURRAY, A.; MATTHEWS, L.; MERCER, S.; MILNE, S.; MULLIKIN, J. C.; MUNGALL, A.; PLUMB, R.; ROSS, M.; SHOWNKEEN, R.; SIMS, S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; HILLIER, L. W.; MCPHERSON, J. D.; MARRA, M. A.; MARDIS, E. R.; FULTON, L. A.; CHINWALLA, A. T.; PEPIN, K. H.; GISH, W. R.; CHISSOE, S. L.; WENDL, M. C.; DELEHAUNTY, K. D.; MINER, T. L.; DELEHAUNTY, A.; KRAMER, J. B.; COOK, L. L.; FULTON, R. S.; JOHNSON, D. L.; MINX, P. J.; CLIFTON, S. W.; HAWKINS, T.; BRANSCOMB, E.; PREDKI, P.; RICHARDSON, P.; WENNING, S.; SLEZAK, T.; DOGGETT, N.; CHENG, J.; OLSEN, A.; LUCAS, S.; ELKIN, C.; UBERBACHER, E.; FRAZIER, M.; GIBBS, R. A.; MUZNY, D. M.; SCHERER, S. E.; BOUCK, J. B.; SODERGREN, E. J.; WORLEY, K. C.; RIVES, C. M.; GORRELL, J. H.; METZKER, M. L.; NAYLOR, S. L.; KUCHERLAPATI, R. S.; NELSON, D. L.; WEINSTOCK, G. M.; SAKAKI, Y.; FUJIYAMA, A.; HATTORI, M.; YADA, T.; TOYODA, A.; ITOH, T.; KAWAGOE, C.; WATANABE, H.; TOTOKI, Y.; TAYLOR, T.; WEISSENBAACH, J.; HEILIG, R.; SAURIN, W.; ARTIGUENAVE, F.; BROTTIER, P.; BRULS, T.; PELLETIER, E.; ROBERT, C.; WINCKER, P.; ROSENTHAL, A.; PLATZER, M.; NYAKATURA, G.; TAUDIEN, S.; RUMP, A.; SMITH, D. R.; DOUCETTE-STAMM, L.; RUBENFIELD, M.; WEINSTOCK, K.; HONG, M. L.; DUBOIS, J.; YANG, H.; YU, J.; WANG, J.; HUANG, G.; GU, J.; HOOD, L.; ROWEN, L.; MADAN, A.; QIN, S.; DAVIS, R. W.; FEDERSPIEL, N. A.; ABOLA, A. P.; PROCTOR, M. J.; ROE, B. A.; CHEN, F.; PAN, H.; RAMSER, J.; LEHRACH, H.; REINHARDT, R.; MCCOMBIE, W. R.; DE LA BASTIDE, M.; DEDHIA, N.; BLÖCKER, H.; HORNISCHER, K.; NORDSIEK, G.; AGARWALA, R.; ARAVIND, L.; BAILEY, J. A.; BATEMAN, A.; BATZOGLOU, S.; BIRNEY, E.; BORK, P.; BROWN, D. G.; BURGE, C. B.; CERUTTI, L.; CHEN, H.; CHURCH, D.; CLAMP, M.; COPLEY, R. R.; DOERKS, T.; EDDY, S. R.; EICHLER, E. E.; FUREY, T. S.; GALAGAN, J.; GILBERT, J. G. R.; HARMON, C.; HAYASHIZAKI, Y.; HAUSSLER, D.; HERMJAKOB, H.; HOKAMP, K.; JANG, W.; JOHNSON, L. S.; JONES, T. A.; KASIF, S.; KASPRYZK, A.; KENNEDY, S.; KENT, W. J.; KITTS, P.; KOONIN, E. V.; KORF, I.; KULP, D.; LANCET, D.; LOWE, T. M.; MCLYSAGHT, A.; MIKKELSEN, T.; MORAN, J. V.; MULDER, N.; POLLARA, V. J.; PONTING, C. P.; SCHULER, G.; SCHULTZ, J.; SLATER, G.; SMIT, A. F. A.; STUPKA, E.; SZUSTAKOWKI, J.; THIERRY-MIEG, D.; THIERRY-MIEG, J.; WAGNER, L.; WALLIS, J.; WHEELER, R.; WILLIAMS, A.; WOLF, Y. I.; WOLFE, K. H.; YANG, S.; YEH, R.; COLLINS, F.; GUYER, M. S.; PETERSON, J.; FELSENFELD, A.; WETTERSTRAND, K. A.; MYERS, R. M.; SCHMUTZ, J.; DICKSON, M.; GRIMWOOD, J.; COX, D. R.; OLSON, M. V.; KAUL, R.; RAYMOND, C.; SHIMIZU, N.; KAWASAKI, K.; MINOSHIMA, S.; EVANS, G. A.; ATHANASIOU, M.; SCHULTZ, R.; PATRINOS, A.; MORGAN, M. J. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, London, v. 409, n. 6822, p. 860 – 921, 2001.

LANGMEAD, B.; HANSEN, K. D.; LEEK, J. T. Cloud-scale RNA-sequencing differential expression analysis with Myrna. **Genome Biology**, London, v. 11, p. 1-11, 2010.

LAWRENCE, C. B.; SOLOVYEV, V. V. Assignment of position-specific error probability to primary DNA sequence data. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 22, n. 7, p. 1272 – 1280, 1994.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 14, p. 1754 – 1760, 2009.

LI, J.; WANG, X. –Q.; WATSON, M. B.; ASSMANN, S. M. Regulation of abscisic acid - induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. **Science**, New York, v. 287, p. 300 – 303. 2000.

LICATALOSI, D. D.; DARNELL, R. B. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. **Nature Reviews**, London, v. 11, p. 75 – 87, 2010.

LIU, L.; LI, Y.; LI, S.; HU, N.; HE, Y.; PONG, R.; LIN, D.; LU, L.; LAW, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, New York, v. 2012, p. 1-11, 2012.

LOHSE, M. NAGE, A.; HERTER, T.; MAY, P.; SCHRODA, M.; ZRENNER, R.; TOHGE, T.; FERNIE, A. R.; STITT, M.; USADEL, B. Mercator: a fast and simple web server for genome scale functional annotation of plant sequence data. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 37, p. 1250 – 1258, 2014.

LUKMANDARU, G.; TAKAHASHI, K. Variation in the natural termite resistance of teak (*Tectona grandis* Linn. fil.) wood as a function of tree age. **Annals of Forest Science**, Paris, v. 65, p. 708.1 – 708.8, 2008.

MALDONADO, G.; LOUPPE, D. Challenges of teak in Côte d'Ivoire. **Unasylva**, Roma, n. 201, v. 51, p. 36 – 44, 2000

MANZINI, G. An analysis of the Burrows–Wheeler Transform. **Journal of the ACM**, New York, v. 48, n. 3, p. 407 – 430, 2001.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, London, v. 470, p. 198 – 203, 2011.

MARGULIES; M.; EGHOLM; M.; ALTMAN; W. E.; ATTIYA; S.; BADER; J. S.; BEMBEN; L. A.; BERKA; J.; BRAVERMAN; M. S.; CHEN; Y.-.; CHEN; Z.; DEWELL; S. B.; DU; L.; FIERRO; J. M.; GOMES; X. V.; GODWIN; B. C.; HE; W.; HELGESEN; S.; HO; C. H.; IRZYK; G. P.; JANDO; S. C.; ALLENQUER; M. L. I.; JARVIE; T. P.; JIRAGE; K. B.; KIM; J.-.; KNIGHT; J. R.; LANZA; J. R.; LEAMON; J. H.; LEFKOWITZ; S. M.; LEI; M.; LI; J.; LOHMAN; K. L.; LU; H.; MAKHIJANI; V. B.; MCDADE; K. E.; MCKENNA; M. P.; MYERS; E. W.; NICKERSON; E.; NOBILE; J. R.; PLANT; R.; PUC; B. P.; RONAN; M. T.; ROTH; G. T.; SARKIS; G. J.; SIMONS; J. F.; SIMPSON; J. W.; SRINIVASAN; M.; TARTARO; K. R.; TOMASZ; A.; VOGT; K. A.; VOLKMER; G. A.; WANG; S. H.; WANG; Y.; WEINER; M. P.; YU; P.; BEGLEY; R. F. & ROTHBERG; J. M. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. **Nature**, London, v. 437, p. 376 - 380, 2005.

MARIONI, J. C. MAN, C. E.; MANE, S. M.; STEPHENS, M.; GILAD, Y. RNA-seq: An assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 1509 – 1517, 2008.

MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews**, London, v. 12, p. 671 – 682, 2011.

MARTIN, J. Rnnotator: an automated *de novo* transcriptome assembly pipeline from stranded RNA-Seq reads. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 663, p. 1-8, 2010.

MATRICARDI, W. A. T. **Efeito dos fatores do solo sobre o desenvolvimento da teca (*Tectona grandis* L.F.) cultivada em Grande Cáceres – Mato Grosso**. 1989, 135p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 1989.

MAXAM, A. M.; GILBERT, W. A new method for sequencing DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 74, n. 2, p. 560 – 564, 1977.

MINN, Y.; PRINZ, K.; FINKELDEY, R. Genetic variation of teak (*Tectona grandis* Linn. f.) in Myanmar revealed by microsatellites. **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 10, p. 1435 – 1449, 2014.

MITCHELL, A.; CHANG, H. Y.; DAUGHERTY, L.; FRASER, M.; HUNTER, S.; LOPEZ, R.; MCANULLA, C.; MCMENAMIN, C.; NUKA, G.; PESSEAT, S.; SANGRADOR-VEGAS, A.; SCHEREMETJEV, M.; RATO, C.; YONG, S.-.; BATEMAN, A.; PUNTA, M.; ATTWOOD, T. K.; SIGRIST, C. J. A.; REDASCHI, N.; RIVOIRE, C.; XENARIOS, I.; KAHN, D.; GUYOT, D.; BORK, P.; LETUNIC, I.; GOUGH, J.; OATES, M.; HAFT, D.; HUANG, H.; NATALE, D. A.; WU, C. H.; ORENGO, C.; SILLITOE, I.; MI, H.; THOMAS, P. D.; FINN, R.D. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, p. 1-9, 2015.

MOHANADAS, K.; MATHEW, G.; INDIRA, E.P. **Pollination ecology of teak in Kerala**. Peechi: Kerala Forest Research Institute, 2002. 42 p.

MORETTI, M. S. Crescimento inicial de plantas de teca em monocultivo e Sistema Taungya com milho em Figueiropolis D'Oeste, estado de Mato Grosso. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 42, n. 102, p. 269 – 277, 2014.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, New York, v. 92, p. 255 – 264, 2008.

MORTAZAVI, A.; WILLIAMS, B. A.; McCUE, K.; SCHAEFFER, L.; WOLD, B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, London, v. 5, n. 7, p. 621 – 628, 2008.

MOURA, R. G. **Diversidade de himenópteros parasitoides (Hymenoptera: Chalcididae) e coleobrocas (Coleoptera: Cerambycidae) associados à cultura de *Tectona grandis* Linn. F. (Lamiaceae)**. 2012, 70p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

MOYA, R.; BOND, B.; QUESADA, H. A review of heartwood properties of *Tectona grandis* trees from fast-growth plantations. **Wood Science Technology**, Berlin, v. 48, p. 411 – 433, 2014.

NARAYANAN, C.; SHUKLA, W. N.; KUMAR, R.; MANDAL, A. K.; ANSARI, S. A. RAPD and ISSR markers for molecular characterization of teak (*Tectona grandis*) plus trees. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v. 19, n. 4, p. 218 – 225, 2007.

NEILL, S.; BARROS, R.; BRIGHT, J.; DESIKAN, R.; HANCOCK, J.; HARRISON, J.; MORRIS, P.; RIBEIRO, D.; WILSON, I. Nitric oxide, stomatal closure, and abiotic stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 59, n. 2, p. 165 – 176. 2008.

NIAMKÉ, F. B.; AMUSANT, N.; STIEN, D.; CHAIX, G.; LOZANO, Y.; KADIO, A. A.; LEMENAGER, N.; GOH, D.; ADIMA, A. A.; KATI-COULIBALY, S.; JAY-ALLEMAND, C. 4',5'-Dihydroxy-epiisocatalponol, a new naphthoquinone from *Tectona grandis* L. f. heartwood, and fungicidal activity. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 74, p. 93 – 98, 2012.

NOBUCHI, T.; JANMAHASATIEN, S.; SAKAI, M. Seasonal changes of wood formation and some characteristics of heartwood formation in teak (*Tectona grandis* L.) plantation. **Kasetsart Journal (Natural Science)**, Bangkok, v. 30, n. 2, p. 254 – 263, 1996.

NORLIA, B.; NORWATI, M.; NORWATI, A.; MOHD ROSLI, H.; NORIHAN, M. S. Isolation and characterization of *LHY* homolog gene expressed in flowering tissues of *Tectona grandis* (teak). **African Journal of Biotechnology**, Lagos, v. 7, n. 9, p. 1302 - 1308, 2008.

OLIVEIRA, L. C.; ANGELI, A.; STAPE, J. L. Teca é a nova opção na indústria mundial. **Revista da Madeira**, Brasília, v. 106, 2007. Disponível em <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1114&subject=Teca&title=Teca%20%E9%20nova%20op%E7%E3o%20na%20ind%FAstria%20mundial>, Acesso em 6 jan. 2015.

OSAKABE, Y.; OSAKABE, K.; SHINOZAKI, K.; TRAN, L. –S. P. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 5, n. 86, p. 1–8, 2014.

PACIFIC BIOSYSTEMS. **SMRT sequencing advantage**. 2014. Disponível em <<http://www.pacificbiosciences.com/products/smrt-technology/smrt-sequencing-advantage/>> Acesso em 6 jan. 2015.

PALUPI, E. R.; OWENS, J. N. Reproductive phenology and reproductive success of teak (*Tectona grandis* L. F.). **International Journal of Plant Sciences**, Chicago, v. 159, n. 5 p. 833 – 842, 1998.

PARAMBIKULAM TIGER RESERVE. Disponível em <<http://www.parambikulam.org/>>, Acesso em 6 jan. 2015.

PASZKIEWICZ, K.; STUDHOLME, D. J. *De novo* assembly of short sequence reads. **Briefings in Bioinformatics**, Oxford, v. II, n. 5, p. 457 – 472, 2010.

PEI, Z. –M.; MURATA, Y.; BENNING, G.; THOMINE, S.; KLÜSENER, B.; ALLEN, G. J.; GRILL, E.; SCHROEDER, J. I. Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. **Nature**, London, v. 406, p. 731 – 734. 2000.

PIERI, C. de; PSSADOR, M. M.; FURTADO, E. L.; CARVALHO JÚNIOR, A. A. Ferrugem da teca (*Olivea neotectonae*): novas ocorrências no Brasil e revisão do nome científico. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 37, n. 4, p. 199-201, 2011.

PIMENTA, J.A. Relações Hídricas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1–39.

PROBER, J. M.; TRAINOR, G. L.; DAM, R. J.; HOBBS, F. W.; ROBERTSON, C. W.; ZAGURSKY, R. J.; COCUZZA, A. J.; JENSEN, M. A.; BAUMEISTER, K. A systems for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. **Science**, New York, v. 238, p. 336 – 341, 1987.

QUIALA, E.; CAÑAL, M. J.; RODRÍGUEZ, R.; YAGÜE, N.; CHÁVEZ, M.; BARBÓN, R.; VALLEDOR, L. Proteomic profiling of *Tectona grandis* L. leaf. **Proteomics**, Weinheim, v. 12, p. 1039 – 1044, 2012.

ROBERTIS, E.M.F. de; HIB, J. **Bases da biologia celular e molecular**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 418p.

ROBERTSON, G.; SCHEIN, J.; CHIU, R.; CORBETT, R.; FIELD, M. JACKMAN, S. D.; MUNGALL, K.; LEE, S.; OKADA, H. M.; QIAN, J. Q.; GRIFFITH, M.; RAYMOND, A.; THIESSEN, N.; CEZARD, T.; BUTTERFIELD, Y. S.; NEWSOME, R.; CHAN, S. K.; SHE, R.; VARHOL, R.; KAMOH, B.; PHABHU, A. -L.; TAM, A.; ZHAO, Y. J.; MOORE, R. A.; HIRST, M.; MARRA, M. A.; JONES, S. J. M.; HOODLESS, P. A.; BIROL, I. *De novo* assembly and analysis of RNA-seq data. **Nature Methods**, London, v. 7, n. 11, p. 909 – 912, 2010.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139–140, 2010.

RODRIGUES, V. G. S. Produção de liteira em diferentes agrossistemas de lavouras de café arborizado em Rondônia. 2011. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 6., Araxá. **Anais**, Araxá: Consórcio Pesquisa Café, 2011. Disponível em <http://www.sapc.embrapa.br/arquivos/consorcio/spcb_anais/simposio7/224.pdf>, Acesso em 6 jan. 2015.

RONDON NETO, R. M.; MACEDO, R. L. G.; TSUKAMOTO FILHO, A. A. Formação de povoamentos florestais com *Tectona grandis* L. f. (Teca). **Boletim Técnico – Série Extensão**, Lavras, v. 7, n. 33, p. 1-29, 1998.

ROSA, T. de F. de D. **Produção de serapilheira, concentração e acúmulo de nutrientes em povoamentos de teca**. 2010, 57p. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais e Ambientais) - Faculdade de Engenharia Florestal, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá. 2010.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 74, n. 12, p. 5463 – 5467, 1977.

SCHURR, U.; GOLLAN, T.; SCHULZE, E. -D. Stomatal response to drying soil in relation to changes in the xylem sap composition of *Helianthus annuus*. II. Stomatal sensitivity to abscisic acid imported from the xylem sap. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 561 – 567. 1992.

SHENDURE, J.; JI, H. Next-generation DNA sequencing. **Nature Biotechnology**, London, v. 26, n. 10, p. 1135 – 1145, 2008.

SHRESTHA, M.; VOLKAERT, H.; STRAETEN, D. van der. Assessment of genetic diversity in *Tectona grandis* using amplified fragment length polymorphism markers. **Canadian Journal of Forest Research**, Toronto, v. 35, p. 1017 – 1022, 2005.

SIVAKUMAR, V.; PARTHIBAN, K. T.; SINGH, B. G.; GNANAMBAL, V. S.; ANANDALAKSHMI, R.; GEETHE, S. Variability in drupe characters and their relationship on seed germination in teak (*Tectona grandis* L.f.). **Silvae Genetica**, Berlin, v. 51, p. 5–6, 2002.

SLATOR, N. J.; CALLISTER, A. N.; NICHOLS, J. D. Mechanical but not physical dormancy is a cause of poor germination in teak (*Tectona grandis* L.f.). **New Forests**, Amsterdam, v. 44, p. 39 – 49, 2013.

SMITH, L. M.; SANDE, J. Z.; KAISER, R. J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C. R.; HEINER, C.; KENT, S. B. H.; HOOD, L. E. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, London, v. 321, p. 674 – 679. 1986.

SMITH, T. F.; WATERMAN, M. S. Identification of common molecular subsequences. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 147, p. 195 – 197, 1981.

SREEKANTH, P. M.; ALASUNDARAN, M.; NAZEEM, P. A.; SUMA, T. B. Genetic diversity of nine natural *Tectona grandis* L.f. populations of the Western Ghats in Southern India. **Conservation Genetics**, Berlin, v. 13, p. 1409 – 1419, 2012.

SRIDHARAMURTHY, M.; KOVACH, A.; ZHAO, Y.; ZHU, J.; XU, H. E.; SWAMINATHAN, K.; MELCHER, K., H₂O₂ inhibits ABA-signaling protein phosphatase HAB1. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. 1 - 17. 2014.

STADEN, R. A strategy of DNA sequencing employing computer programs. **Nucleic Acids Research**, London, v.6, n. 7, p. 2601 - 2610, 1979.

SURGET-GROBA, Y.; MONTOYA-BURGOS, J. I. Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. **Genome Research**, New York, v. 20, p. 1432 – 1440, 2010.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.

TAMBARUSSI, E. V. **Desenvolvimento de metodologias biotecnológicas para micropropagação, regeneração e transformação genética de teca (*Tectona grandis* L. f) visando resistência a *Hyblaea puera* L.** 2009. 122p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2009.

TANGMITCHAROEN, S.; OWENS, J. N. Floral biology, pollination, pistil receptivity, and pollen tube growth of Teak (*Tectona grandis* Linn f.). **Annals of Botany**, London, v. 79, p. 227 - 241, 1997.

TEAKMILLS.COM. 2015. Disponível em < <http://www.teakmills.com/teak-gallery.html>>, Acesso em 6 jan. 2015.

TRAPNELL, C.; WILLAMS, B. A.; PERTEA, G.; MORTAZAVI, A.; KWAN, G.; VAN BAREN, M. J.; SALZBERG, S. L.; WOLD, B. J.; PACHTER, L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nature Biotechnology**, London, v. 28, n. 5, p. 511 – 515, 2010.

URANO, K.; KURIHARA, Y.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K. ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress response. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 13, p. 132 – 138. 2010.

VALLEDOR, L.; CASTILLEJO, M. A.; LENZ, C.; RODRÍGUEZ, R.; CAÑAL, M. J.; JORRÍN, J. Proteomic analysis of *Pinus radiata* needles: 2-DE map and protein identification by LC/MS/MS and substitution-tolerant database searching. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 7, p. 2616 – 2631, 2008.

VARGAS, C. B. Relación entre la incidencia de la roya *Olivea tectonae*, el cancro *Dothiorella* sp. y el defoliador *Rhabdopterus* sp. en plantaciones de *Tectona grandis* L.f. y el índice de calidad de sitio en Panamá. **Kurú**, San Jose, v. 5, n. 13, p. 1 – 6, 2008.

VARMA, R. V.; SAJEEV, T. V.; SUDHEENDRAKUMAR, V. V. Pest susceptibility of *Tectona grandis* under intensive management practices in India. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v. 19, n. 1, p. 46 – 49, 2007.

VASCONCELOS, T. S. **Caracterização molecular, expressão gênica e atividade enzimática tecido-específicas das proteínas PAL e CAD durante a formação de madeira em *Tectona grandis* L. f.** 2012, 79p. Monografia (Graduação em Engenharia Agrônômica), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

VELCULESCU, V. E. ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, New York, v. 270, p. 484 – 487, 1995.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G.; SMITH, H. O.; YANDELL, M.; EVANS, C. A.; HOLT, R. A.; GOCAYNE, J. D.; AMANATIDES, P.; BALLEW, R. M.; HUSON, D. H.; WORTMAN, J. R.; ZHANG, Q.; KODIRA, C. D.; ZHENG, X. H.; CHEN, L.; SKUPSKI, M.; SUBRAMANIAN, G.; THOMAS, P. D.; ZHANG, J.; GABOR MIKLOS, G. L.; NELSON, C.; BRODER, S.; CLARK, A. G.; NADEAU, J.; MCKUSICK, V. A.; ZINDER, N.; LEVINE, A. J.; ROBERTS, R. J.; SIMON, M.; SLAYMAN, C.; HUNKAPILLER, M.; BOLANOS, R.; DELCHER, A.; DEW, I.; FASULO, D.; FLANIGAN, M.; FLOREA, L.; HALPERN, A.; HANNENHALLI, S.; KRAVITZ, S.; LEVY, S.; MOBARRY, C.; REINERT, K.; REMINGTON, K.; ABU-THREIDEH, J.; BEASLEY, E.; BIDDICK, K.; BONAZZI, V.; BRANDON, R.; CARGILL, M.; CHANDRAMOULISWARAN, I.; CHARLAB, R.; CHATURVEDI, K.; DENG, Z.; DI FRANCESCO, V.; DUNN, P.; EILBECK, K.; EVANGELISTA, C.; GABRIELIAN, A. E.; GAN, W.; GE, W.; GONG, F.; GU, Z.; GUAN, P.; HEIMAN, T. J.; HIGGINS, M. E.; JI, R.; KE, Z.; KETCHUM, K. A.; LAI, Z.; LEI, Y.; LI, Z.; LI, J.; LIANG, Y.; LIN, X.; LU, F.; MERKULOV, G. V.; MILSHINA, N.; MOORE, H. M.; NAIK, A. K.; NARAYAN, V. A.; NEELAM, B.; NUSSKERN, D.; RUSCH, D. B.; SALZBERG, S.; SHAO, W.; SHUE, B.; SUN, J.; YUAN WANG, Z.; WANG, A.; WANG, X.; WANG, J.; WEI, M.; WIDES, R.; XIAO, C.; YAN, C.; YAO, A.; YE, J.; ZHAN, M.; ZHANG, W.; ZHANG, H.; ZHAO, Q.; ZHENG, L.; ZHONG, F.; ZHONG, W.; ZHU, S. C.; ZHAO, S.; GILBERT, D.; BAUMHUETER, S.; SPIER, G.; CARTER, C.; CRAVCHIK, A.; WOODAGE, T.; ALI, F.; AN, H.; AWE, A.; BALDWIN, D.; BADEN, H.; BARNSTEAD, M.; BARROW, I.; BEESON, K.; BUSAM, D.; CARVER, A.; CENTER, A.; LAI CHENG, M.; CURRY, L.; DANAHER, S.; DAVENPORT, L.; DESILETS, R.; DIETZ, S.; DODSON, K.; DOUP, L.; FERRIERA, S.; GARG, N.; GLUECKSMANN, A.; HART, B.; HAYNES, J.; HAYNES, C.; HEINER, C.; HLADUN, S.; HOSTIN, D.; HOUCK, J.; HOWLAND, T.; IBEGWAM, C.; JOHNSON, J.; KALUSH, F.; KLINE, L.; KODURU, S.; LOVE, A.; MANN, F.; MAY, D.; MCCAWLEY, S.; MCINTOSH, T.; MCMULLEN, I.; MOY, M.; MOY, L.; MURPHY, B.; NELSON, K.; PFANNKOCH, C.; PRATTS, E.; PURI, V.; QURESHI, H.; REARDON, M.; RODRIGUEZ, R.; ROGERS, Y.; ROMBLAD, D.; RUHFEL, B.; SCOTT, R.; SITTER, C.; SMALLWOOD, M.; STEWART, E.; STRONG, R.; SUH, E.; THOMAS, R.; NI TINT, N.; TSE, S.; VECH, C.; WANG, G.; WETTER, J.; WILLIAMS, S.; WILLIAMS, M.; WINDSOR, S.; WINN-DEEN, E.; WOLFE, K.; ZAVERI, J.; ZAVERI, K.; ABRIL, J. F.; GUIGO, R.; CAMPBELL, M. J.; SJOLANDER, K. V.; KARLAK, B.; KEJARIWAL, A.; MI, H.; LAZAREVA, B.; HATTON, T.; NARECHANIA, A.; DIEMER, K.; MURUGANUJAN, A.; GUO, N.; SATO, S.; BAFNA, V.; ISTRAIL, S.; LIPPERT, R.; SCHWARTZ, R.; WALENZ, B.; YOOSEPH, S.; ALLEN, D.; BASU, A.; BAXENDALE, J.; BLICK, L.; CAMINHA, M.; CARNES-STINE, J.; CAULK, P.; CHIANG, Y.; COYNE, M.; DAHLKE, C.; DESLATTES MAYS, A.; DOMBROSKI, M.; DONNELLY, M.; ELY, D.; ESPARHAM, S.; FOSLER, C.; GIRE, H.; GLANOWSKI, S.; GLASSER, K.; GLODEK, A.; GOROKHOV, M.; GRAHAM, K.; GROPMAN, B.; HARRIS, M.; HEIL, J.; HENDERSON, S.; HOOVER, J.; JENNINGS, D.; JORDAN, C.; JORDAN, J.; KASHA, J.; KAGAN, L.; KRAFT, C.; LEVITSKY, A.; LEWIS, M.; LIU, X.; LOPEZ, J.; MA, D.; MAJOROS, W.; MCDANIEL, J.; MURPHY, S.; NEWMAN, M.; NGUYEN, T.; NGUYEN, N.; NODELL, M.; PAN, S.; PECK, J.; PETERSON, M.; ROWE, W.; SANDERS, R.; SCOTT, J.; SIMPSON, M.; SMITH, T.; SPRAGUE, A.; STOCKWELL, T.; TURNER, R.; VENTER, E.; WANG, M.; WEN, M.; WU, D.; WU, M.; XIA, A.; ZANDIEH, A.; ZHU, X. The sequence of the Human genome. **Science**, New York, v. 291, p. 1304–1351, 2001.

VERHAEGEN, D.; FOFANA, I. J.; LOGOSSA, Z. A.; OFORI, D. What is the genetic origin of teak (*Tectona grandis* L.) introduced in Africa and in Indonesia? **Tree Genetics & Genomes**, Berlin, v. 6, p. 717 – 733, 2010.

WANG, G.; DU, X.; JI, J.; GUAN, C.; LI, Z.; JOSINE, T. L. De novo characterization of the *Lycium chinense* Mill. leaf transcriptome and analysis of candidate genes involved in carotenoid biosynthesis. **Gene**, London, v. 555, p. 458 – 463. 2015.

WANG, K.; SINGH, D.; ZENG, Z.; COLEMAN, S. J.; HUANG, Y.; SAVICH, G. L.; HE, X.; MIECZKOWSKI, P.; GRIMM, S. A.; PEROU, C. M.; MacLEOD, J. N.; CHIANG, D. Y.; PRINS, J. F.; LIU, J. MapSplice: Accurate mapping of RNA-seq reads for splice junction discovery. **Nucleic Acids Research**, London, v. 38, n. 18, p. 1- 14, 2010.

WANG, W.; VINOCUR, B.; ALTMAN, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, Berlin, v. 218, p. 1 – 14. 2003.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews**, London, v. 10, p. 57 – 63, 2009.

WATANABE, A.; WIDYATMOKO, A.; RIMBAWANTO, A.; SHIRAISHI, S. Discrimination of teak (*Tectona grandis*) plus trees using selected random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. **Journal of Tropical Forest Science**, Kepong, v. 16, n. 1, p. 17 – 24, 2004.

WU, T. D.; NACU, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 7, p. 873 – 881, 2010.

YAMAMOTO, K.; SIMATUPANG, M. H.; HASHIM, R. Caoutchouc in teak wood (*Tectoca grandis* L. f.): formation, location, influence on sunlight irradiation, hydrophobicity and decay resistance. **European Journal of Wood and Wood Products**, Berlin, v. 56, p. 201 – 209. 1998.

YAMCHI, A.; RASTGAR JAZII, F.; MOUSAVI, A.; KARKHANE, A. A.; RENU, Proline accumulation in transgenic tobacco as a result of expression of Arabidopsis $\Delta 1$ -Pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) during osmotic stress. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 16, n. 1, p. 9 -15. 2007.

YOSHIBA, Y.; KIYOSUE, T.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of levels of proline as an osmolyte in plants under water stress. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 38, n. 10, p. 1095 – 1102. 1997.

ZDOBNOV, E. M.; APWEILER, R. InterProScan – an integration platform for the signature-recognition methods in InterPro. **Bioinformatics**, Oxford, v. 17, n. 9, p. 847 – 848, 2001.

ZERBINO, D.R.; BIRNEY, E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 821–829, 2008.

ZHU, B.; SU, J.; CHANG, M.; VERMA, D.P.S.; FAN, Y.-L.; WU, R. Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. **Plant Science**, Limerick, v. 139, p. 41–48, 1998.

3 MONTAGEM *de novo* E ANÁLISE DO TRANSCRIPTOMA DE TECA

Resumo

A teca é uma espécie arbórea de grande importância comercial pelas características de cor e durabilidade de sua madeira. Contudo, sofre com a escassez de estudos genéticos moleculares. Desde que o transcriptoma de uma amostra celular pode apresentar uma alta quantidade de informação dos genes expressos, neste trabalho foi realizado o primeiro transcriptoma de teca, onde foram sequenciadas flores, folhas, raízes e seedlings pela tecnologia Illumina. A partir de 100 milhões de *reads* foi realizada reconstrução *de novo* do transcriptoma com o programa Trinity. O programa Blas2GO foi utilizado para administrar os dados de anotação. Aproximadamente 51% dos *contigs* puderam ser anotados, mostrando alta similaridade com as espécies *Vitis vinifera* e *Solanum lycopersicum*. Das sequências anotadas, 78% obtiveram anotações funcionais com o Gene Ontology, totalizando 5.165 termos para Processo Biológico, 2.846 termos para Função Molecular e 742 para Componente Celular. Dentre as enzimas encontradas, as transferases, hidrolases e oxidoredutases corresponderam a mais da metade do total de sequências anotadas. A expressão diferencial foi obtida com o programa edgeR a 5% de probabilidade de erro. De 187.315 *contigs* montados através da fusão de todas as bibliotecas sequenciadas, foram encontrados *contigs* diferencialmente expressos para flor (18 *contigs*), folha (14 *contigs*), raiz (13 *contigs*) e seedling (29 *contigs*). Dentre os mais significativos: em flor, houve alta expressão para polifenol-oxidase e uma proteína relacionada ao estresse por luz; para folha, houve alta expressão de um gene relacionado à senescência, um fator de transcrição do metabolismo secundário e um gene relacionado à defesa contra patógenos; em raiz, alta expressão de um gene do metabolismo secundário; e em seedling, diversos genes de fotossíntese e metabolismo de carbono obtiveram alta expressão. A partir do banco de dados obtido, é possível identificar genes candidatos ao estudo de características vegetativas e reprodutivas de teca, tais como germinação, florescimento, desenvolvimento radicular e resistência a estresses contribuindo para entender os mecanismos moleculares desta espécie florestal.

Palavras-chave: RNA-seq; Bioinformática; Transcriptômica; Árvore tropical; Anotação gênica; Expressão gênica diferencial

Abstract

Teak is a tree species of high commercial importance for the color and durability characteristics of its wood. However, suffers with a lack of molecular genetic studies. Since the transcriptome of a cell sample can provide a high amount of information about genes expressed, in this work was done the first transcriptome of teak, which were sequenced flowers, leaves, roots and seedlings by Illumina technology. From 100 million reads was performed *de novo* transcriptome assembly with Trinity program. The Blas2GO program was used to manage the annotation data. Approximately 51% of *contigs* could be annotated, showing high similarity to the *Vitis vinifera* and *Solanum lycopersicum* species. From sequences annotated, 78% had functional annotations with the Gene Ontology, totaling 5165 terms for Biological Process, 2846 for Molecular Function terms and 742 for Cell Component. Among the

enzymes found, the transferases, hydrolases and oxidoreductases accounted for more than half of the total sequences annotated. The differential expression was taken with the edgeR program at 5% probability. Of 187315 contigs assembled by merging of all sequenced libraries, were found differentially expressed contigs to flower (18), leaf (14), root (13) and seedling (29). Among the most significant: in flower, there was high expression of polyphenol oxidase and a protein related to stress by light; for leaf, there was high expression of a gene related to senescence, a secondary metabolism transcription factor and a gene related to defense against pathogens; in root, high expression of a gene of secondary metabolism; and seedling, several genes of photosynthesis and carbon metabolism were discharged high expression. From the database obtained, it is possible to identify candidate genes to the study of vegetative and reproductive characteristics of teak, such as germination, flowering, root development and resistance to stresses, contributing to understand the molecular mechanisms of this forest species.

Keywords: RNA sequencing; Bioinformatics; Transcriptomics; Tropical tree; Gene annotation; Differential gene expression

3.1 Introdução

As plataformas de sequenciamento de DNA de nova geração permitiram um grande avanço na realização de experimentos em larga-escala, tanto nos campos da genômica, quanto da transcriptômica. A análise do transcriptoma reflete na identificação de genes funcionais, ou seja, quais genes estavam sendo expressos no momento da coleta do material biológico (MOROZOVA; MARRA, 2008). Devido ao baixo custo do sequenciamento por base, à velocidade na aquisição dos dados e à possibilidade de se processar diversas amostras ao mesmo tempo, as tecnologias NGS se popularizaram e são hoje uma das principais ferramentas no estudo de espécies “não-modelo”. A teca é uma espécie florestal de grande importância econômica em diversos países, e no Brasil vem ganhando cada vez mais espaço e admiradores. Infelizmente, a teca carece de dados genéticos moleculares específicos, tornando árdua a tarefa de descobrir genes capazes de melhorar seu crescimento, produtividade e resistência aos diversos tipos de estresse; assim, a aquisição do transcriptoma desta espécie representa a formação de sua primeira base de dados de transcritos, a qual permitirá as análises de seleção de genes candidatos, visualização de rotas metabólicas, categorização funcional e expressão gênica diferencial entre órgãos.

Objetivo

Neste capítulo, os principais objetivos foram os de realizar o sequenciamento, a montagem e a anotação do transcriptoma de teca, além de buscar a função dos transcritos e seu papel no metabolismo da espécie.

Objetivos Específicos

1. Realizar a coleta do material e o isolamento do RNA dos órgãos de teca, em quantidade e qualidade para proceder ao sequenciamento;
2. Avaliar a qualidade e realizar o pré-processamento dos *reads* obtidos;
3. Proceder com a montagem das sequências consenso sem o auxílio de genoma de referência (montagem *de novo*);
4. Submeter os *contigs* obtidos ao alinhamento contra a base de dados de proteínas com o BLAST, a fim de obter as anotações gênicas disponíveis;
5. Adquirir as anotações funcionais dos genes identificados através de mapeamento com o Gene Ontology;
6. Identificar os mapas metabólicos associados aos genes enzimáticos encontrados, utilizando a base de dados KEGG;
7. Realizar uma primeira identificação dos genes diferencialmente expressos entre cada uma das bibliotecas sequenciadas.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material Vegetal

Todo o material utilizado pertenceu ao povoamento de árvores de teca de 12 anos localizado no Campus “Luiz de Queiroz” da USP, situado no bairro “Monte Alegre”, Piracicaba, SP (Figura 15). Nesta área foram coletadas flores e frutos de árvores de 12 anos.

Figura 15 - Localização dos povoamentos de Teca no bairro “Monte Alegre”, Piracicaba, SP. Marcador amarelo: árvores de Teca de 12 anos (22°42'20.31"S; 47°37'8.88"O)

3.2.1.1 Coleta de flores

Para a coleta das flores foram inicialmente retiradas aleatoriamente inflorescências com auxílio de tesoura de poda de árvores, o “podão”, e após isto as pequenas flores e botões florais foram cuidadosamente excisados com auxílio de tesoura limpa em álcool comercial 96°GL (Figura 16). A ráquis da panícula e os frutos em início de desenvolvimento foram descartados, e o material coletado foi imediatamente imerso em nitrogênio líquido, permanecendo neste até chegar ao laboratório, quando foi então identificado e armazenado em freezer a -80°C até o momento da extração de RNA.

Figura 16 - Coleta de flores. A: Inflorescência a ser colhida da árvore (círculo vermelho). B: Inflorescência colhida, indicando as unidades florais que serão desprendidas (círculo laranja). C: Unidades menores da inflorescência, mostrando os diversos estágios de desenvolvimento das flores

3.2.1.2 Coleta de frutos e produção de plântulas

A coleta de frutos de teca ocorreu pelo recolhimento de frutos dispersos sobre a serapilheira do mesmo povoamento florestal. Todos os frutos tiveram a remoção do exocarpo e foram armazenados em frascos de vidro dentro de câmara fria a 8°C até o momento da remoção das sementes. A extração das sementes ocorreu pela escarificação dos frutos, a qual ocorreu através da ruptura do endocarpo lenhoso com auxílio de martelo e quebra-nozes, e cuidadosa remoção das sementes com pinças limpas em álcool comercial 96°GL. Foram descartadas as sementes que apresentavam traços de bolor, coloração azulada, bem como aquelas que sofreram danos durante a escarificação (Figura 17).

Figura 17 - Sementes de teca removidas do fruto. Esquerda: semente lesionada. Direita: semente intacta

Fonte: Silva (2010) (comunicação pessoal).

As sementes selecionadas foram desinfestadas com solução 75% de hipoclorito de sódio (solução comercial 2%) por 10 min, lavadas 2 vezes em água destilada estéril, uma vez em ácido cítrico 3% estéril, e então introduzidas em meio de cultura MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) dentro de tubos de ensaio (1 semente por tubo). Todos os tubos foram mantidos em sala de crescimento, com fotoperíodo de 16h e temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Após cerca de 7 dias as sementes que não mostraram germinação, ou que apresentaram contaminação por microorganismos, foram separadas e descartadas. Parte do estande restante de plântulas foi mantido em meio de cultura por mais 7 dias e então removido; os seedlings obtidos foram lavados em água destilada, e preparados para extração de RNA (Figura 18).

Figura 18 - Seedlings de teca com 14 dias utilizados para a extração de RNA total. Régua: medida em cm

Outra parte do estande foi cultivado *in vitro* por até 3 meses, a fim de estender ao máximo o comprimento das raízes e o número de folhas, e então proceder a extração de RNA (Figura 19).

Figura 19 - Plântulas de teca após 3 meses de subcultivo *in vitro*. Setas azuis: folhas utilizadas para extração de RNA total. Setas vermelhas: folhas cotiledonares descartadas. Círculo amarelo: raízes removidas para a extração de RNA total. Régua: medida em cm

3.2.2 Extração de RNA total

3.2.2.1 Limpeza do material utilizado na extração

Todos os materiais utilizados para a extração de RNA total (cadinhos e pistilos de porcelana, espátulas, frascos de vidro e tubos de plástico) foram submetidos a uma limpeza especial para inativar RNases presentes e remover traços de contaminações diversas. Os utensílios foram lavados por 20 min com solução de SDS 2% (*Sodium dodecyl sulfate*), etanol 70% e Peróxido de hidrogênio 3%, nesta ordem; por fim, foram enxaguados *overnight* com água DEPC (Dietilpirocarbonato) 0,01% estéril, sendo, por fim, esterilizados em autoclave por 20

min a 121°C. Todas as soluções preparadas utilizaram água DEPC 0,01%, inclusive as utilizadas para a limpeza.

3.2.2.2 Constituição das amostras

Foi preparado um *pool* de cada órgão, obtidos de ao menos 10 indivíduos diferentes, para constituir as diferentes amostras de RNA total extraídas. Cada amostra de órgãos vegetais foi constituída da seguinte forma:

Folhas: foram utilizadas folhas completas (limbo foliar, pecíolo, nervura central) e totalmente expandidas, posicionadas nos diversos nós da haste caulinar de plantas cultivadas *in vitro* (portanto em estado juvenil). Não foram utilizadas as folhas cotiledonares.

Flores: foram utilizadas flores completas (cálice, corola, androceu e gineceu), flores incompletas (ausência total ou parcial de um ou mais verticilos florais), botões florais em diversos níveis de desenvolvimento (fechados e em abertura parcial) e parte do pedúnculo floral. Não foi feita distinção entre flores fecundadas ou não fecundadas, ou sobre ausência ou presença de pólen.

Raízes: foi utilizada toda a porção radicular (todas as raízes encontradas na região do hipocótilo, ou seja, abaixo da inserção das folhas cotiledonares) de plantas cultivadas *in vitro* (estado juvenil).

Seedlings: foram utilizadas plântulas de teca em sua total constituição de tecidos e órgãos, sob diferentes níveis de desenvolvimento (com ou sem o desenvolvimento do meristema apical caulinar), mas sempre com as folhas cotiledonares ainda aderidas e presença da radícula.

3.2.2.3 Extração e avaliação da qualidade do RNA total

O material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido (N₂) até se obter um pó fino. Foram rapidamente separadas 2 g de tecido macerado para o isolamento de RNA total. O método de extração utilizado foi uma versão modificada do proposto por Salzman et al. (1999), e se dedica a materiais vegetais com alto conteúdo de polissacarídeos e compostos fenólicos (Anexo A). Todas as amostras de RNA total foram preservadas em freezer a -80°C.

As amostras de RNA total foram quantificadas através de espectrofotometria (NanoDrop 2000c, Thermo Scientific), sendo a concentração expressa em “ng μL^{-1} ” e observadas as relações 260/230 (que indica pureza em relação a contaminantes da extração, como clorofórmio, etanol e fenol) e 260/280 (que se refere à presença de proteínas na amostra analisada). Boas amostras foram consideradas como sendo aquelas com concentração mínima de 3 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$, e valores entre 1,8 e 2,1 para as relações 260/230 e 260/280.

A integridade do RNA total foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1%, preparado com TAE 1x (Tris base + ácido acético + EDTA) em água DEPC 0,1%, e corado com brometo de etídeo. As condições de eletroforese foram: 100 A de corrente elétrica, 5 V de tensão para cada 1 cm de distância entre os pólos da cuba, e aproximadamente 30 min de corrida.

Para determinar a qualidade das amostras através do valor de RIN³, foi realizada análise através de eletroforese microfluídica (Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent Technologies) no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia (LZT-ESALQ). O RIN é um algoritmo que analisa a relação entre os valores das subunidades ribossomais 28S e 18S e indica, em índices que vão de 1 a 10, o grau de integridade da amostra de RNA analisada (SCHROEDER et al., 2006). Para plantas não há um consenso sobre qual valor de RIN é o melhor para representar a integridade da amostra, assim, de forma geral, adota-se um RIN=7 como alto e aceitável para RNA-seq.

3.2.2.4 Tratamento com DNase

Todas as amostras de RNA total foram submetidas a tratamento com DNase (Promega), a fim de minimizar a contaminação com DNA. Para tanto, foram preparadas reações com 5 μg de RNA total, 1 μL da enzima DNase I Amp. Grade [1 U/ μL], 1 μL de tampão de reação 10X próprio para a enzima, e água DEPC 0,01% para completar o volume de 10 μL . As amostras foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente, sendo logo após adicionado 1 μL de EDTA 25 mM para parar a reação. O tratamento terminou com aquecimento a 65°C por 10 min, e resfriamento em gelo.

³ RNA Integrity Number.

3.2.3 Construção das bibliotecas e Sequenciamento

Cada biblioteca foi constituída por duas amostras biológicas (ou duas extrações de RNA total distintas, cada uma proveniente da mistura de ao menos 10 indivíduos diferentes).

A construção de todas as bibliotecas de sequenciamento foi realizada no Laboratório de Biotecnologia Animal do Departamento de Zootecnia (LZT-ESALQ). Inicialmente foi utilizando o kit “TruSeq® RNA Sample Preparation Kit v.2” (Illumina) para a depleção de RNA ribossômico, fragmentação do mRNA, síntese da fita complementar de DNA (cDNA) e da segunda fita de DNA, reparo nas extremidades dos fragmentos, adenilação da extremidade 3’ e ligação aos adaptadores. O tamanho dos fragmentos foi avaliado entre 280 pb através de eletroforese microfluídica com o kit “Agilent DNA 1000 kit” para Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). O agrupamento das bibliotecas em *clusters* de *paired-ends* foi realizado com o kit “TruSeq® PE Cluster Kit v.3” (Illumina) e a quantificação foi realizada através de PCR em tempo-real utilizando-se o kit “KAPA Library Quantification kit Illumina® platforms” (KAPA Biosystems).

O sequenciamento foi realizado no aparelho Illumina Hi-Seq 2000 utilizando-se o kit “TruSeq™ SBS kit v3 (200 cycles)” (Illumina). Não foi realizada replicata técnica.

3.2.4 Recursos computacionais, pré-processamento dos *reads* e montagem dos *contigs*

Para todas as operações de bioinformática realizadas foi utilizada uma estação de trabalho tipo Desktop equipada com processador Intel® Core™ i7-3770K (3.50 GHz) e 16 GB de memória RAM, rodando o sistema operacional Debian 6.0.9 (Squeeze) com Kernel Linux 2.6.32-5-amd64 e GNOME 2.30.2.

Após o sequenciamento das bibliotecas e aquisição dos dados, os arquivos obtidos para cada tecido, em cada posição de sequenciamento (5’ ou 3’) foram descompactados e fusionados com os aplicativos nativos do Debian. A partir de então, todos os arquivos foram carregados na plataforma Galaxy e manejados através das diversas ferramentas disponíveis. Inicialmente, a qualidade dos *reads* foi

averiguada com o auxílio do programa FastQC (versão 0.51), sendo que, para iniciar os processos de limpeza e triagem, os arquivos de *reads* passaram por uma conversão de formato com auxílio da ferramenta Groomer, para o formato “Fastq Sanger”. Acima dos arquivos convertidos foram aplicados filtros para a qualidade das bases (“Filter by Quality”, versão 1.0.0), remoção de sequências repetitivas (“Remove Sequencing Artifacts”, versão 1.0.0), e remoção de adaptadores do sequenciamento (“Clip”, versão 1.0.1), todos pertencentes à suíte de ferramentas “Fastx Toolkit”, utilizando os parâmetros listados na tabela 3.

Para eliminar o ruído natural que ocorre no sequenciamento das extremidades, os *reads* foram aparados em 20 bases de cada lado com a ferramenta Fastq Trimmer. Ao final, foi novamente analisada a qualidade dos *reads* para assegurar que os mesmos estavam aptos para a montagem.

Tabela 3 - Parâmetros utilizados para a filtragem dos *reads* com as ferramentas da suíte “Fastx Toolkit”

<i>Ferramenta</i>	<i>Parâmetro</i>	<i>Condição</i>
<i>Filter by quality</i>	Quality cut-off value	30
	Percent of bases in sequence that must have quality equal to / higher than cut-off value	60
<i>Clip</i>	Minimum sequence length	8
	Source	prebuilt
	Choose Adapter	TGTAGGCC
	enter non-zero value to keep the adapter sequence and x bases that follow it	0
	Discard sequences with unknown (N) bases	Yes
	Output options	Output both clipped and non-clipped sequences

A montagem *de novo* do transcriptoma foi realizada com o programa Trinity (versão “Trinityrnaseq_r20131110”), assumindo uma cobertura mínima de 3x e tamanho do k-mer de 25-mer (*default*). Para isto, foi utilizada a rotina manual descrita a seguir:

```
/Trinity.pl --seqType fq --JM 14G --left FORWARD.fastq --right REVERSE.fastq --output /Montagem --min_contig_length 100 --CPU 7
```

onde “FORWARD” e “REVERSE” representam os arquivos de reads 5’ e 3’, respectivamente.

A fim de verificar a montagem realizada, o arquivo de mapeamento dos *reads* ‘.bam’ gerado foi alinhado às sequências obtidas através do software Integrative Genomics Viewer (versão 2.3.34), o qual permite observar, através de gráficos e esquemas, a posição dos *reads* em cada um dos *contigs* e assim determinar visualmente a cobertura da montagem de cada sequência consenso.

3.2.5 Anotação das sequências

O arquivo “fasta” contendo as sequências montadas foi submetido ao alinhamento de sequências com a ferramenta BLASTx, utilizando a base de dados de proteínas não-redundantes do NCBI e um *e-value* máximo de 0.001. A fim de reduzir o tempo desta tarefa, foi utilizado o conceito de computação em nuvem, onde diversos computadores do Amazon Web Services (AWS, <http://aws.amazon.com>) foram alugados on-line e receberam a suíte de aplicativos BLAST+ (versão 2.2.28), bem como as bases de dados necessárias para realizar os alinhamentos. O resultado dos alinhamentos de todas as sequências foi gerado com a extensão “.xml” e então incorporado ao aplicativo Blast2GO (versão 2.7.1) juntamente com seu respectivo grupo de *contigs*.

Dentro do aplicativo Blast2GO, foram separadas as sequências que não obtiveram nenhum alinhamento significativo e mantidas todas as demais; estas últimas foram submetidas ao mapeamento contra a base de dados do Gene Ontology, buscando-se as anotações funcionais; e também com a base de dados KEGG, a fim de se obter os respectivos mapas metabólicos associados aos Enzyme Codes presentes.

3.2.6 Expressão Diferencial

Numa primeira tentativa de descobrir os transcritos pertencentes exclusivamente a cada tecido, foi realizada uma nova montagem do transcriptoma com o programa Trinity, utilizando os *reads* pré-processados de todas as bibliotecas

juntas. De posse deste novo transcriptoma, os *reads* de cada biblioteca foram mapeados com a ferramenta “align_and_estimate_abundance.pl” (nativa do pacote Trinity) utilizando-se o programa Bowtie (versão 1.0.1) e RSEM (versão 1.2.19). Logo em seguida foi utilizada a ferramenta “abundance_estimates_to_matrix.pl” para computar as contagens dos *reads* e realizar a normalização dos dados via TMM (*Trimmed Mean of M values*) (ROBINSON; OSHLACK, 2010). Utilizado o programa edgeR (versão 3.8.5), com um FDR < 0,05 (*False Discovery Rate*), foi obtida seleção dos transcritos diferencialmente expressos, os *heatmaps* com os padrões de expressão e os gráficos de log das contagens de *reads*.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Extração de RNA

O RNA foi extraído de todas as amostras pelo método de Salzman, mostrando quantidade acima de $2 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ e valores em torno de 1,6 a 2,1 e 1,8 a 2,1 para os parâmetros 260/230 e 260/280, respectivamente. Em gel de agarose todas as amostras se mostraram íntegras e sem arraste, mostrando ausência de degradação. Pela análise de eletroforese microfluídica (Bioanalyser), todas as amostras obtiveram RIN acima de 7,0, indicando qualidade suficiente para o sequenciamento (Figura 20).

Figura 20 - Resultado do Bioanalyser para as amostras de RNA extraído, onde todas as amostras mostraram RIN acima de 7,0

3.3.2 Sequenciamento e pré-processamento dos reads

No sequenciamento foram produzidos cerca de 133,58 milhões de *reads* brutos com um tamanho médio de 101 pb. Destes, aproximadamente 102,86 milhões (77%) foram recuperados após o pré-processamento, com um tamanho médio de 60 pb (Figuras 21-23).

Figura 21 - Avaliação da qualidade por base das sequências dos reads brutos e finais. A: Flor 5' bruto. B: Flor 5' final. C: Flor 3' bruto. D: Flor 3' final. E: Folha 5' bruto. F: Folha 5' final

Figura 22 - Avaliação da qualidade por base das sequências dos reads brutos e finais. A: Folha 3' bruto. B: Folha 3' final. C: Raiz 5' bruto. D: Raiz 5' final. E: Raiz 3' bruto. F: Raiz 3' final. G: Seedling 5' bruto. H: Seedling 5' final

Figura 23 - Avaliação da qualidade por base das sequências dos reads brutos e finais. A: Seedling 3' bruto. B: Seedling 3' final

A avaliação inicial da qualidade do sequenciamento evidenciou a necessidade do pré-processamento em todos os arquivos de *reads*, os quais foram manejados separadamente (arquivos 5' e 3'). Dentre os diversos parâmetros avaliados pelo programa FastQC, a qualidade das sequências medida por base se mostrou como fundamental para avaliar a eficiência dos processos de triagem e limpeza que se seguiram. Assim, as figuras 21-23 também mostram o contraste da qualidade das sequências por base entre os *reads* brutos (sem qualquer pré-processamento) e os *reads* finais (aqueles que foram submetidos à montagem dos *contigs*). Para cada gráfico, as barras amarelas correspondem à amplitude interquartílica (25% - 75%) dos valores de qualidade, enquanto que os limites em preto acima e abaixo se atribuem aos valores 10% e 90%; dentro das barras de qualidade, a linha em vermelho é o valor mediano da qualidade; por fim, entre as barras, a linha em azul representa a variação do valor médio da qualidade.

Um resumo de todas as operações de limpeza dos *reads* pode ser observado na Tabela 4. Na primeira etapa do pré-processamento, 14.122.101 *reads* foram excluídos por apresentarem 60% das bases com qualidade inferior a 30 (1 erro a cada 1000 pb de acordo com o *Illumina Quality Score*), perfazendo uma perda inicial média de 10,54%. Em seguida, a remoção das sequências altamente repetitivas (artefatos) não se mostrou como grande fonte de perda de *reads*, tendo removido em média 18 *reads* de cada biblioteca.

A operação “Clip” removeu sequências de todas as bibliotecas em todas as suas instâncias (sequências menores do que 8 bases, sequências constituídas apenas por adaptadores de sequenciamento, e sequências com bases desconhecidas), o que levou a uma perda de 3.349.922 *reads*, o que corresponde a cerca de 2,5% do montante original do sequenciamento.

Por fim, a tarefa de aparo das extremidades removeu 13.253.150 *reads* (comprimento zero de bases), num total de 9,92% do total original de *reads*. De acordo com Ness et al. (2011), é comum que haja uma perda dos *reads* por conta de baixa qualidade nos extremos, o que torna necessária a operação de aparo em ambos os lados.

Comparando-se a primeira e a última avaliação da qualidade pelo programa FastQC, observa-se que grande parte da variação da qualidade foi eliminada e a qualidade média finalizou estando acima do *score* 30 em todas as bibliotecas (Figuras 21-23).

Tabela 4 - Desenvolvimento da limpeza dos *reads* através dos programas utilizados

Processo		Flor – 5'	Flor – 3'	Folha – 5'	Folha – 3'	Raiz – 5'	Raiz – 3'	Seedling-5'	Seedling-3'
<i>Reads</i> Originais		13.725.131	13.725.131	17.947.895	17.947.895	16.248.866	16.248.866	18.871.794	18.871.794
Filter by Quality	Descartados	1.089.480 (7,93%)	1.573.927 (11,46%)	1.514.250 (8,43%)	2.234.589 (12,45%)	1.458.723 (8,97%)	2.037.638 (12,54%)	1.728.882 (9,16%)	2.484.612 (13,16%)
	Salvos	12.635.651 (92,06%)	12.151.204 (88,53%)	16.433.645 (91,56%)	15.713.306 (87,54%)	14.790.143 (91,02%)	14.211.228 (87,45%)	17.142.912 (90,83%)	16.387.182 (86,83%)
Remove Sequencing Artifacts	Descartados	19 (0%)	17 (0%)	11 (0%)	5 (0%)	24 (0%)	26 (0%)	24 (0%)	22 (0%)
	Salvos	12.635.632 (92,06%)	12.151.187 (88,53%)	16.433.634 (91,56%)	15.713.301 (87,54%)	14.790.119 (91,02%)	14.211.202 (87,45%)	17.142.888 (90,83%)	16.387.160 (86,83%)
Clip	Descartados	299.594	266.082	412.783	369.075	364.528	332.350	458.234	417.421
	(Curto)	(2,18%)	(1,93%)	(2,29%)	(2,05%)	(2,24%)	(2,04%)	(2,42%)	(2,21%)
	Descartados	22.765	7.828	39.861	11.993	34.204	10.542	48.550	14.254
	(Adaptadores)	(0,16%)	(0,05%)	(0,22%)	(0,06%)	(0,21%)	(0,06%)	(0,25%)	(0,07%)
	Descartados	31.927	19.367	40.716	24.668	35.950	21.987	40.188	25.055
	(Ns ⁴)	(0,23%)	(0,14%)	(0,22%)	(0,13%)	(0,22%)	(0,13%)	(0,21%)	(0,13%)
	Salvos	12.281.346 (89,48%)	11.857.910 (86,39%)	15.940.274 (88,81%)	15.307.565 (85,28%)	14.355.437 (88,34%)	13.846.323 (85,21%)	16.595.916 (87,94%)	15.930.430 (84,41%)
Trimmer	Descartados	1.440.342	1.400.732	1.868.346	1.772.155	1.422.725	1.384.365	2.027.092	1.937.393
	(Curto)	(10,49%)	(10,20%)	(10,40%)	(9,87%)	(8,75%)	(8,51%)	(10,74%)	(10,26%)
<i>Reads</i> Finais		10.841.004 (78,98%)	10.457.178 (76,19%)	14.071.928 (78,40%)	13.535.410 (75,41%)	12.932.712 (79,59%)	12.461.958 (76,69%)	14.568.824 (77,19%)	13.993.037 (74,14%)

⁴ Sequências que continham bases que não puderam ser corretamente determinadas durante o sequenciamento

3.3.3 Montagem *de novo* do transcriptoma

Ao todo foram gerados 503.680 *contigs*, os quais totalizaram 203,1 Mb montadas. Para os *contigs* gerados foram analisados alguns parâmetros de eficiência: número de sequências geradas, tamanho mínimo e máximo dos *contigs*, quantidade média e mediana de bases utilizadas e N50 (Tabela 5).

Tabela 5 - Avaliação da montagem dos *contigs* pelo programa Trinity

	Flor	Folha	Raiz	Seedling	Total
Número de <i>contigs</i>	135.013	129.390	132.647	106.630	503.680
Número de genes*	116.742	105.884	110.657	94.404	427.687
Tamanho do menor <i>contig</i>	101	101	101	101	101
Tamanho do maior <i>contig</i>	4.057	5.965	6.136	3.973	6.136
Tamanho médio dos <i>contigs</i>	357	452	426	373	403
Tamanho mediano dos <i>contigs</i>	206	226	228	209	217
N50	564	844	757	617	697

* O número possíveis genes é atribuído ao número de componentes gráficos gerados pelo Trinity a partir dos grafos De Bruijn, dos quais são então derivados os *contigs*. Logo, o número de genes é uma estimativa, pode ser redundante e se distanciar da realidade biológica

Tal montagem revelou uniformidade entre os tecidos, indicados pelo valor semelhante de sequências geradas nas bibliotecas de flor, folha e raiz. Embora a biblioteca de seedling tenha sido cerca de 26% menor do que as anteriores, seu N50 e o *contig* médio estiveram dentro da mesma faixa de variação, o que leva a concluir que ela também apresentou boa eficiência na montagem.

O tamanho do maior *contig* foi alto para todas as bibliotecas (acima de 1Kb), sendo o menor para seedling (3.973 pb) e o maior para raiz (6.136 pb), enquanto que o tamanho mínimo dos *contigs* foi de 101 pb para todas as bibliotecas (valor *default* inserido no programa Trinity). O tamanho médio dos *contigs* girou em torno de 400 pb, e o tamanho mediano ficou em torno de 220 pb, estando estes valores dentro do esperado, uma vez que o programa Trinity tem a característica de produzir um alto número de *contigs* curtos (GRABHERR et al., 2011) quando em comparação a outros montadores como o Velvet (ZERBINO; BIRNEY, 2008).

Alguns estudos revelam valores semelhantes para montagem *de novo* de transcriptomas. Utilizando o programa SOAP2, Wang et al. (2014) obteve valores de N50 = 90 e média de tamanho de 124 pb para um total de 783.075 *contigs* gerados a

partir de flores de crisântemo; após o enriquecimento dos dados com BLAST, estes valores subiram para $N50 = 385$ e média de tamanho de 349 pb. Por outro lado, Villarino et al. (2014) obteve valores altos de $N50 = 1505$ pb e média de tamanho dos contigs de 822 pb utilizando Trinity para montagem do transcriptoma de petúnia; utilizando o programa SOAP2 para o mesmo propósito, os valores não ultrapassaram $N50 = 720$ e média de 449 pb, sendo então o programa Trinity aquele que ofereceu a melhor montagem.

3.3.4 Busca por sequências homólogas utilizando BLAST

A etapa de BLAST utilizou o algoritmo Blastx com a base de dados de proteínas não redundantes (nr) do NCBI, retornando resultado de alinhamentos significativos para cerca de 51,63% dos *contigs* gerados entre todas as bibliotecas. Esta porcentagem de sequências anotadas ficou abaixo daquela encontrada por Xia et al. (2011), onde foi obtido 76% de sequências anotadas para *Hevea brasiliensis*. Com a incorporação dos resultados ao programa Blast2GO foi possível avaliar graficamente a consistência dos dados através da distribuição do *e-value* obtido para os alinhamentos, a similaridade média e as espécies mencionadas nos alinhamentos de maior pontuação (Top-Hit). A Tabela 6 mostra o comportamento do resultado do BLAST para cada biblioteca:

Tabela 6 - Análise por BLAST (Blastx) dos *contigs* gerados

	Contigs montados	Resultado BLAST	E-value (média)	Similaridade (média)
<i>Flor</i>	135.013	69.082	$5,19e^{-1}$	81,84%
<i>Folha</i>	129.390	66.015	$4,65e^{-1}$	79,01%
<i>Raiz</i>	132.647	66.819	$4,73e^{-1}$	80,98%
<i>Seedling</i>	106.630	58.147	$5,19e^{-1}$	82,30%

Após o BLAST, o *e-value* médio foi calculado e ficou na casa de 10^{-1} , enquanto que a similaridade média girou em torno de 80%. Apesar do *e-value* alto para todas as bibliotecas, observa-se uma grande dispersão destes valores ao longo das sequências, o que mostra que o *e-value* esteve abaixo de 10^{-5} para grande parte dos hits do BLAST (Anexo B). Da mesma forma, o valor da média de similaridade

subestima a dispersão dos dados, sendo que a maior parte dos valores esteve reunida entre 80 e 98% (Anexo C).

Por fim, ao analisar a dispersão das espécies presentes nos alinhamentos de maior pontuação do BLAST, foi possível observar que para todas as bibliotecas as principais espécies foram *Vitis vinifera* e *Solanum tuberosum*, seguidas de *Solanum lycopersicum*, *Genilsea aurea*, *Theobroma cacao* e *Populus trichocarpa* (Anexo D). Este fato ocorre pela extensa caracterização e anotação já realizada em bibliotecas de ESTs e genoma de *Vitis vinifera* (JAILLON et al., 2007), enquanto que, para *Solanum tuberosum* e *Solanum lycopersicum*, além de possuírem bibliotecas bem caracterizadas, estas espécies compartilham maior proximidade filogenética da teca: as ordens Lamiales e Solanales pertencem ao mesmo clado das Euasterídeas I (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003) (Anexo E). Outras espécies como *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata* e *Oryza sativa* aparecem em posições da parte inferior das figuras, evidenciando a sua baixa homologia com sequências de teca.

3.3.5 Ontologia gênica e anotação funcional

Após o resultado do BLAST, as sequências que não apresentaram homologia foram descartadas e as restantes foram submetidas ao mapeamento no Gene Ontology, buscando-se anotações funcionais (Tabela 7). Destas, 75,98% obtiveram termos GO, o que corresponde a cerca de 39,23% dos *contigs* originais. Ao todo, 8.753 termos GO foram assinalados, sendo 5.165 para “Processo Biológico”, 2.846 para “Função Molecular” e 742 para “Componente Celular”.

Tabela 7 - Sequências com anotação funcional e resultado no BLAST

	Resultado BLAST	Anotação Funcional
<i>Flor</i>	69.082	51.096
<i>Folha</i>	66.015	50.937
<i>Raiz</i>	66.819	50.956
<i>Seedling</i>	58.147	44.615

O enriquecimento da análise foi feito pela separação das sequências por termos GO (Figuras 24-26), revelando que dentro da seção “Processo Biológico” os

termos mais citados (com pelo menos 10.000 citações em todas as bibliotecas) foram: processo metabólico, processo celular, processo de organismo individual, resposta a estímulo, regulação biológica. Para a seção “Função Molecular” os termos mais representados foram: atividade catalítica, atividade de ligação e atividade de transporte. Na classe “Componente Celular” os termos mais representados foram: célula, organela, membrana e complexo macromolecular. Estes resultados são condizentes com outros estudos de transcriptomas de plantas (REEKSTING et al., 2014; SALGADO, 2014).

De forma geral, metade de cada biblioteca originalmente montada não pode ser anotada por nenhuma ferramenta ou base de dados, enquanto que, na porção que foi anotada, cerca de 40% (do montante original de *contigs* montados) recebeu anotações funcionais (Figura 27).

O decaimento do tamanho das sequências para cada biblioteca após cada passo da análise pode ser observado na figura 28. Neste gráfico, é possível notar que a etapa do BLAST removeu preferencialmente os *contigs* curtos (em torno de 100 a 200 pb), enquanto que o Gene Ontology removeu de forma uniforme (sempre em torno de 20%); por conta desta remoção preferencial, houve um enriquecimento de sequências grandes (acima de 1 kb) em todas as bibliotecas.

Figura 24 - Gráfico de Distribuição dos Termos GO para Processo Biológico (2º nível) entre as bibliotecas analisadas

Figura 25 - Gráfico de Distribuição dos Termos GO para Função Molecular (2º nível) entre as bibliotecas analisadas

Figura 26 - Gráfico de Distribuição dos Termos GO para Componente Celular (2º nível) entre as bibliotecas analisadas

Figura 27 - Representação gráfica da proporção de sequências com resultado no BLAST e com resultado no BLAST + Anotação funcional (a pizza cheia representa o total de sequências montadas para cada tecido)

Figura 28 - Gráfico da porcentagem de *contigs* removidos nas etapas de anotação gênica e funcional

3.3.6 Mapas metabólicos

A partir das sequências que possuíam número EC (*Enzyme Commission*) foram capturados os respectivos mapas metabólicos e assinaladas as enzimas nos passos correspondentes (Tabela 8).

Tabela 8 - Mapeamento contra a base de dados KEGG

	<i>Sequências Mapeadas no KEGG</i>	<i>Nº de ECs</i>	<i>Mapas KEGG</i>
<i>Flor</i>	21.802	1.567	145
<i>Folha</i>	22.001	1.564	145
<i>Raiz</i>	21.391	1.554	146
<i>Seedling</i>	19.311	1.550	146

Foram assinalados em média 1.558 números de EC, distribuídos em até 146 mapas metabólicos, os quais abrangeram por volta de 20.000 sequências. Uma diversidade muito maior foi encontrada em bibliotecas de raízes de abacateiro, onde Reeksting et al. (2014) anotou cerca de 2.221 números de EC distribuídos ao longo de 273 mapas metabólicos para abacateiro. Por outro lado, Salgado (2014) encontrou apenas 134 mapas metabólicos, os quais abrangiam 5.059 *contigs* de seringueira.

A Tabela 9 lista os mapas encontrados para todas as bibliotecas. As vias metabólicas mais bem representadas dentre todas as bibliotecas analisadas foram “Metabolismo de amido e sacarose” (em média 1.251 sequências) e “Metabolismo de Purinas” (em média 1.173 sequências).

O número de ECs localizados foi semelhante entre as bibliotecas, salvo algumas exceções: para o metabolismo do ascorbato e aldarato (nº 10 na Tabela 9), onde foram localizados 21 ECs para raiz, enquanto que apenas 14/15 foram localizados para flor, folha e seedling; no ciclo do citrato (nº 35), a biblioteca de raiz apresentou apenas 7 ECs contra 16 ECs das demais bibliotecas, muito embora o número de sequências mapeadas tenha sido semelhante; para o metabolismo de esfingolípídeos (nº 121), raiz mostrou 18 ECs contra 12 ECs das outras bibliotecas, entretanto o número de sequências mapeadas para raiz, foi o menor dentre as quatro bibliotecas, ficando com 229 sequências contra 232 sequências (seedling), 262 sequências (folha) e 270 sequências (flor). Tais discrepâncias podem ocorrer

devido a diferenças tanto de expressão gênica entre os órgãos, quanto por diferentes isoformas disponíveis para uma mesma enzima.

Observando o número de sequências mapeadas por mapa metabólico de metabolismo primário, apesar destas também mostrarem acentuada semelhança entre as bibliotecas, da mesma forma ocorreram casos de diferença contrastante. O mapa da biossíntese de aminoacil tRNAs (nº 5 na Tabela 9) mostrou 265 sequências para folha, enquanto que apenas 202 para seedling. A biossíntese de ácidos graxos insaturados (nº 20), apresentou apenas 98, 101 e 115 sequências para seedling, flor e raiz, respectivamente, enquanto que folha apresentou 193 sequências; da mesma forma, o mapa da elongação de ácidos graxos (nº 48) mostrou um número acentuado de sequências para folha (125 sequências), e números reduzidos para seedling, flor e raiz (45, 51 e 62 sequências). Com uma diferença menor se destacam os mapas da glicólise/gliconeogênese (nº 61), metabolismo de nitrogênio (nº 92), fosforilação oxidativa (nº 97) e biossíntese da fenilalanina, tirosina e triptofano (nº 104).

No metabolismo secundário diversos mapas mostraram contraste no número de sequências mapeadas, sendo que o mapa da biossíntese de fenilpropanóides (nº 105 na Tabela 9), mostrou 468 sequências mapeadas para a biblioteca de raiz, contra 383 sequências para a biblioteca de flor. Uma vez que a biossíntese de fenilpropanóides é um passo-chave na transição entre os metabolismos primário e secundário, uma diferença desta magnitude indica o profundo contraste biológico que existe entre estes dois órgãos (BUCHANAN; GRUISSSEN; JONES, 2002).

Posteriormente, foi analisada a distribuição das sequências dentro das principais classes enzimáticas (oxidoredutases, hidrolases, liases, transferases, isomerases e ligases) de acordo com os ECs listados (Figuras 29-32). Em todas as bibliotecas, as transferases corresponderam a mais de 8.000 sequências, seguidas pelas hidrolases (em torno de 6.000 sequências) e oxidoredutases (cerca de 4.500 sequências). Em menor número estiveram as ligases, liases e por fim as isomerases.

Um resumo da evolução do número de sequências analisadas em cada etapa da anotação pode ser observado na Figura 33.

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continua)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
1	Aflatoxin biosynthesis	38	1	38	1	34	1	37	1
2	Alanine, aspartate and glutamate metabolism	216	26	187	26	191	26	178	26
3	alpha-Linolenic acid metabolism	189	10	306	10	201	10	157	10
4	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	428	40	415	43	425	42	377	43
5	Aminoacyl-tRNA biosynthesis	238	22	265	22	235	22	202	22
6	Aminobenzoate degradation	277	12	242	11	281	11	225	10
7	Anthocyanin biosynthesis	84	3	81	3	108	4	114	4
8	Arachidonic acid metabolism	144	9	155	9	170	9	149	9
9	Arginine and proline metabolism	304	34	277	36	290	36	268	37
10	Ascorbate and aldarate metabolism	259	14	259	15	272	21	223	15
11	Atrazine degradation	4	2	5	2	8	2	6	2
12	Benzoate degradation	49	5	89	6	49	6	37	5
13	Benzoxazinoid biosynthesis	5	1	4	1	4	1	3	1
14	beta-Alanine metabolism	179	13	168	13	202	13	162	13
15	beta-Lactam resistance	3	1	5	1	5	1	2	1
16	Betalain biosynthesis	10	3	11	3	15	3	12	3
17	Biosynthesis of ansamycins	11	1	13	1	9	1	12	1
18	Biosynthesis of siderophore group nonribosomal peptides	7	3	5	3	4	3	3	2
19	Biosynthesis of terpenoids and steroids	1	1	1	1	3	1	1	1
20	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	101	8	193	8	115	8	98	8
21	Biosynthesis of vancomycin group antibiotics	13	1	14	1	20	1	15	1
22	Biotin metabolism	83	8	68	8	68	8	66	8
23	Brassinosteroid biosynthesis	-	-	1	1	1	1	2	1
24	Butanoate metabolism	101	15	90	16	90	15	72	15

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continuação)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
25	Butirosin and neomycin biosynthesis	26	2	23	2	16	2	25	2
26	C5-Branched dibasic acid metabolism	33	3	43	3	37	3	36	3
27	Caffeine metabolism	70	3	55	3	86	3	74	3
28	Caprolactam degradation	39	5	42	4	39	4	22	4
29	Carbon fixation in photosynthetic organisms	348	21	351	21	275	21	315	21
30	Carbon fixation pathways in prokaryotes	258	19	256	19	224	19	211	19
31	Carotenoid biosynthesis	62	10	44	9	68	9	45	10
32	Chloroalkane and chloroalkene degradation	80	4	74	4	78	4	73	4
33	Chlorocyclohexane and chlorobenzene degradation	11	3	15	4	10	4	8	4
34	Citrate cycle (TCA cycle)	212	16	224	16	198	7	170	16
35	Cutin, suberine and wax biosynthesis	63	4	29	4	22	3	50	4
36	Cyanoamino acid metabolism	193	14	170	11	188	13	157	11
37	Cysteine and methionine metabolism	320	36	333	36	319	35	290	35
38	D-Alanine metabolism	12	2	15	2	19	2	15	2
39	D-Arginine and D-ornithine metabolism	5	1	7	1	13	1	6	1
40	D-Glutamine and D-glutamate metabolism	15	3	15	3	18	3	14	3
41	Diterpenoid biosynthesis	80	11	50	8	74	10	66	9
42	Drug metabolism - cytochrome P450	193	7	174	7	225	7	203	7
43	Drug metabolism - other enzymes	293	16	295	15	243	15	258	15
44	Ether lipid metabolism	110	5	129	5	113	5	98	5
45	Ethylbenzene degradation	8	1	46	1	9	1	9	1
46	Fatty acid biosynthesis	151	11	144	11	136	11	134	11
47	Fatty acid degradation	228	14	258	13	239	13	214	13

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continuação)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
48	Fatty acid elongation	51	7	125	7	62	7	45	7
49	Flavone and flavonol biosynthesis	67	5	47	5	68	6	55	5
50	Flavonoid biosynthesis	187	14	165	14	190	15	168	14
51	Fluorobenzoate degradation	6	2	6	2	5	2	4	2
52	Folate biosynthesis	39	10	40	10	37	3	45	10
53	Fructose and mannose metabolism	245	22	236	23	209	23	250	23
54	Galactose metabolism	515	19	476	20	444	20	439	19
55	Geraniol degradation	50	5	101	5	61	5	44	5
56	Glucosinolate biosynthesis	24	4	18	2	26	2	23	3
57	Glutathione metabolism	276	17	275	17	258	17	244	17
58	Glycerolipid metabolism	462	21	428	21	402	21	410	21
59	Glycerophospholipid metabolism	377	31	491	29	397	29	335	29
60	Glycine, serine and threonine metabolism	319	33	280	33	301	33	269	32
61	Glycolysis / Gluconeogenesis	481	25	430	25	389	25	389	25
62	Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	57	3	61	3	65	3	59	3
63	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	75	5	85	5	84	5	79	5
64	Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	1	1	1	1	1	1	1	1
65	Glycosaminoglycan degradation	156	4	127	4	124	4	120	4
66	Glycosphingolipid biosynthesis - ganglio series	136	3	111	3	103	3	104	3
67	Glycosphingolipid biosynthesis - globo series	74	5	77	5	70	5	72	5
68	Glycosphingolipid biosynthesis - lacto and neolacto series	4	3	5	3	5	3	6	3

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continuação)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
70	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis	10	2	8	1	5	1	10	1
71	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	292	31	316	30	285	30	235	30
72	Histidine metabolism	122	12	110	12	100	12	92	12
73	Indole alkaloid biosynthesis	35	7	36	5	38	6	44	6
74	Inositol phosphate metabolism	287	23	335	22	250	22	265	23
75	Insect hormone biosynthesis	6	2	6	2	8	2	5	2
76	Isoflavonoid biosynthesis	21	3	27	4	26	4	22	3
77	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	168	14	140	16	205	15	175	15
78	Limonene and pinene degradation	77	3	78	3	76	3	57	3
79	Linoleic acid metabolism	155	4	175	4	179	4	142	4
80	Lipoic acid metabolism	12	2	13	2	12	2	11	2
81	Lipopolysaccharide biosynthesis	25	5	31	5	22	5	31	5
82	Lysine biosynthesis	86	11	84	11	110	12	86	11
83	Lysine degradation	195	11	161	11	182	11	154	11
84	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	157	7	160	7	198	7	180	8
85	Methane metabolism	284	20	260	20	237	19	246	20
86	Monoterpenoid biosynthesis	60	14	86	12	82	11	73	12
87	mTOR signaling pathway	68	2	84	2	88	1	78	2
88	Mucin type O-Glycan biosynthesis	1	1	1	1	1	1	1	1
89	Naphthalene degradation	19	1	18	1	24	1	21	1
90	N-Glycan biosynthesis	77	15	69	14	64	15	57	13
91	Nicotinate and nicotinamide metabolism	111	11	110	12	112	12	83	10
92	Nitrogen metabolism	136	17	106	14	125	14	108	14
93	Novobiocin biosynthesis	58	5	68	5	56	5	53	5
94	One carbon pool by folate	92	14	84	14	91	14	82	14

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continuação)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
95	Other glycan degradation	199	7	172	7	163	7	165	6
96	Other types of O-glycan biosynthesis	18	2	22	3	25	3	19	3
97	Oxidative phosphorylation	297	8	294	8	279	11	203	8
98	Pantothenate and CoA biosynthesis	89	15	85	17	86	16	73	15
99	Penicillin and cephalosporin biosynthesis	12	3	12	3	12	3	10	3
100	Pentose and glucuronate interconversions	416	17	377	18	331	18	336	18
101	Pentose phosphate pathway	271	18	267	18	234	18	276	18
102	Peptidoglycan biosynthesis	31	7	31	6	28	5	35	6
103	Phenylalanine metabolism	453	26	431	26	534	24	463	23
104	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	164	26	201	27	141	26	149	26
105	Phenylpropanoid biosynthesis	383	15	380	17	468	15	430	15
106	Phosphatidylinositol signaling system	350	18	363	17	322	17	321	18
107	Phosphonate and phosphinate metabolism	19	3	51	3	40	3	20	3
108	Photosynthesis	16	2	8	2	16	2	12	2
109	Polyketide sugar unit biosynthesis	21	3	20	3	24	3	22	3
110	Porphyrin and chlorophyll metabolism	234	29	231	31	196	31	215	31
111	Primary bile acid biosynthesis	25	3	23	3	26	3	23	3
112	Propanoate metabolism	205	14	203	14	190	14	176	14
113	Purine metabolism	1191	53	1273	54	1256	54	972	52
114	Pyrimidine metabolism	505	33	569	33	494	33	419	33
115	Pyruvate metabolism	421	27	414	27	356	27	329	27
116	Retinol metabolism	119	8	98	7	158	8	134	8
117	Riboflavin metabolism	159	10	142	11	145	11	131	10
118	Secondary bile acid biosynthesis	1	1	-	-	1	1	2	1

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continuação)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
119	Selenocompound metabolism	86	11	127	11	95	11	79	11
120	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	25	4	32	5	45	3	31	6
121	Sphingolipid metabolism	270	12	262	12	229	18	232	12
122	Starch and sucrose metabolism	1301	41	1299	42	1232	42	1173	41
123	Steroid biosynthesis	77	15	79	14	104	15	73	15
124	Steroid degradation	44	3	36	2	36	3	35	2
125	Steroid hormone biosynthesis	132	11	116	9	162	11	150	11
126	Stilbenoid, diarylheptanoid and gingerol biosynthesis	31	4	27	4	33	4	30	4
127	Streptomycin biosynthesis	82	9	71	10	68	9	76	9
128	Styrene degradation	54	6	114	5	67	5	42	5
129	Sulfur metabolism	156	16	156	18	149	17	139	18
130	Synthesis and degradation of ketone bodies	30	4	15	4	19	4	17	4
131	T cell receptor signaling pathway	469	2	501	2	580	2	430	2
132	Taurine and hypotaurine metabolism	32	4	36	4	40	4	31	4
133	Terpenoid backbone biosynthesis	148	26	133	27	121	25	121	27
134	Tetracycline biosynthesis	38	1	38	1	34	1	37	1
135	Thiamine metabolism	276	8	290	9	294	8	231	8
136	Toluene degradation	27	4	23	4	20	4	12	4
137	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	109	8	105	10	132	9	114	10
138	Tryptophan metabolism	262	17	226	15	269	17	214	17
139	Tyrosine metabolism	236	25	263	25	262	23	212	23
140	Ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis	150	14	114	12	125	12	117	13

Tabela 9 - Número de mapas metabólicos referenciados na plataforma KEGG para as diversas bibliotecas de transcritos de Teca, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(conclusão)

Nº	Nome	Flor		Folha		Raiz		Seedling	
		S	E	S	E	S	E	S	E
141	Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	60	8	55	9	53	8	53	8
142	Valine, leucine and isoleucine degradation	216	20	243	21	199	19	185	19
143	Various types of N-glycan biosynthesis	62	11	49	11	46	11	49	11
144	Vitamin B6 metabolism	56	7	54	7	71	7	61	6
145	Xylene degradation	11	2	1	1	2	1	1	1
146	Zeatin biosynthesis	53	6	34	5	53	6	45	6

Figura 29 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Flor

Figura 30 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Folha

Figura 31 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Raiz

Figura 32 - Distribuição dos ECs para a biblioteca de Seedling

Figura 33 - Visão geral sobre a variação no número de *contigs* ao longo das etapas de anotação

3.3.7 Expressão Diferencial

Para se estimar os genes diferencialmente expressos entre cada tecido sequenciado, houve a necessidade de realizar uma nova montagem, a qual incluísse os *reads* de todas as bibliotecas, a fim de assegurar dois pontos: primeiro, que todas as bibliotecas pudessem contribuir com *reads* na montagem dos *contigs*, e assim, reduzir o viés desta análise; segundo, para reduzir a redundância contida no número de *contigs*, e ainda, evitar a duplicidade de identificadores de sequências.

Assim, foram fusionados todos os arquivos de *reads* 5', bem como todos os arquivos de *reads* 3', procedeu-se a montagem pelo Trinity, e o arquivo de *contigs* gerado foi avaliado (Tabela 10).

Tabela 10 - Avaliação da montagem dos *contigs* gerados pela fusão das bibliotecas

	Total
Número de <i>contigs</i>	187.315
Número de genes	161.715
Tamanho do menor <i>contig</i>	101
Tamanho do maior <i>contig</i>	6.192
Tamanho médio dos <i>contigs</i>	421
Tamanho mediano dos <i>contigs</i>	218
N50	765

Através do mapeamento e da contagem normalizada dos *reads*, foi possível definir 317 genes diferencialmente expressos, no entanto, apenas alguns apresentaram um $FDR < 0,05$: 18 genes para flor, 14 genes para folha, 13 genes para raiz e 29 genes para seedling. Após o Blastx, apenas 6 genes não obtiveram nenhum alinhamento (Tabela 11).

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas

(continua)

Flor		
Código	Gene	Expressão
c46321_g3_i2	Polyphenol Oxidase	Up
c47158_g1_i1	Alpha Tubulin 1	Up
c43498_g9_i1	Polyubiquitin	Up
c34820_g1_i1	Methionine Sulfoxide Reductase	Down
c46321_g8_i4	Polyphenol Oxidase	Up
c45608_g2_i1	Early Light-induced Protein	Up
c40773_g5_i1	Galactinol-Sucrose Galactosyltransferase 2	Up
c39018_g1_i1	Pollen allergen	Down
c46185_g3_i4	Chlorophyll A/B Binding Protein	Down
c41884_g1_i1	Late Embryogenesis Abundant Protein	Down
c29461_g1_i1	---NA---	Up
c47191_g1_i1	Ribulose-bisphosphate Carboxylase Oxygenase (small subunit)	Down
c38620_g1_i1	Carbonic Anhydrase	Down
c45630_g2_i2	Lectin	Down
c45630_g2_i1	Lectin	Down
c7890_g1_i1	---NA---	Down
c39132_g1_i1	Chlorophyll A/B Binding Protein	Down
c41577_g1_i1	Ribulose-bisphosphate Carboxylase Oxygenase Activase	Up
Folha		
Código	Gene	Expressão
c39209_g1_i3	Senescence-associated Protein	Up
c42095_g3_i1	Dehydrin	Up
c7890_g1_i1	---NA---	Down
c100307_g1_i1	Metallothionein-like Protein	Down
c39677_g1_i1	Arginine Decarboxylase	Up
c39018_g1_i1	Pathogenesis-related Protein 10	Down

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas

(continuação)

Folha		
Código	Gene	Expressão
c45630_g2_i1	Lectin	Down
c26542_g1_i1	WRKY Transcription Factor 40	Up
c38362_g1_i1	Aspartate Kinase	Up
c40782_g1_i1	Senescence-associated Protein	Down
c36355_g3_i2	Inositol Phosphorylceramide Synthase 3	Up
c41577_g1_i1	Ribulose-bisphosphate Carboxylase Oxygenase Activase	Down
c45630_g2_i2	Lectin	Down
c18664_g1_i1	---NA---	Up
Raiz		
Código	Gene	Expressão
c35721_g1_i1	Caffeoyl-O-Methyltransferase	Up
c45630_g2_i2	Lectin	Down
c46185_g3_i4	Chlorophyll A/B Binding Protein	Down
c39132_g1_i1	Chlorophyll A/B Binding Protein	Down
c47191_g1_i1	Ribulose-bisphosphate Carboxylase Oxygenase (small subunit)	Down
c46185_g3_i3	Chlorophyll A/B Binding Protein	Down
c7890_g1_i1	---NA---	Up
c40782_g1_i1	Senescence-associated Protein	Up
c41577_g1_i1	Ribulose-bisphosphate Carboxylase Oxygenase Activase	Down
c38620_g1_i1	Carbonic Anhydrase	Down
c39018_g1_i1	Pathogenesis-related Protein 10	Up
c45630_g2_i1	Lectin	Down
c37058_g1_i1	---NA---	Up

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas

(continuação)

Seedling		
Código	Gene	Expressão
c45630_g2_i1	Lectin	Up
c90652_g1_i1	Photosystem II 10 kDa polypeptide	Up
c38620_g1_i1	Carbonic Anhydrase	Up
c40449_g1_i1	Metallothionein-like Protein	Up
c57922_g1_i1	Photosystem I Reaction Center Subunit N	Up
c100613_g1_i1	Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase	Up
c40782_g1_i1	Senescence-associated Protein	Down
c45630_g2_i2	Lectin	Up
c100307_g1_i1	Metallothionein-like Protein	Up
c44269_g4_i1	Fructose-bisphosphate Aldolase	Up
c35554_g1_i1	Phospholipase D	Up
c35282_g1_i1	Serine-Glyoxylate Aminotransferase	Up
c40773_g5_i2	Galactinol-Sucrose Galactosyltransferase 2	Up
c46321_g8_i1	Polyphenol Oxidase	Up
c44269_g3_i4	Fructose-bisphosphate Aldolase	Up
c19916_g1_i1	Glycolate Oxidase	Up
c47191_g1_i1	Ribulose-bisphosphate Carboxylase Oxygenase (small subunit)	Up
c34820_g1_i1	Methionine Sulfoxide Reductase	Up
c28458_g1_i1	33kda oxygen evolving protein of photosystem ii	Up
c13768_g1_i1	Photosystem II 5 kda Protein	Up
c41577_g1_i1	Ribulose Bisphosphate Carboxylase Oxygenase Activase	Up
c42095_g3_i2	Dehydrin	Up
c45630_g1_i1	---NA---	Up
c11038_g1_i1	Photosystem I Reaction Center Subunit XI	Up
c35637_g1_i1	Protochlorophyllide Oxidoreductase	Up
c33331_g2_i1	Concanavalin a-like Lectin Protein Kinase Family Protein	Up

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos entre as bibliotecas

(conclusão)

Seedling		
Código	Gene	Expressão
c45630_g3_i1	---NA---	Up
c39132_g1_i1	Chlorophyll A/B Binding Protein	Up
c46185_g3_i3	Chlorophyll A/B Binding Protein	Up

Na biblioteca de flor observou-se alta expressão de polifenol-oxidades (c46321_g3_i2; c46321_g8_i4) e uma proteína relacionada ao estresse luminoso (c45608_g2_i1), enquanto que houve uma baixa expressão de proteínas envolvidas com a alergia ao pólen (c39018_g1_i1) e embriogênese tardia (c41884_g1_i1).

As polifenol-oxidades são enzimas que contém cobre em seu grupo prostético, localizam-se no cloroplasto e estão envolvidas com a defesa contra pragas e patógenos, controle dos níveis de oxigênio, síntese de compostos fenólicos e resposta contra danos físicos (LAX; VAUGHN, 1991; MAYER; HAREL, 1979). Em flores, seu papel pode ser tanto o de oxidar compostos para gerar atrativos aos insetos polinizadores, quando o de proteção da estrutura floral contra o ataque de herbívoros. Na biblioteca de seedling também houve alta expressão de uma polifenol-oxidase, a qual também pode estar envolvida aos processos de defesa, uma vez que as plantas em início de desenvolvimento são mais tenras e pouco lignificadas, portanto, de grande apreço por herbívoros e patógenos.

Observa-se também que, devido às flores terem sido coletadas do alto das árvores, elas estavam expostas à radiação solar plena, e portanto, submetidas ao estresse luminoso. Corroborando com esta observação, foi encontrada uma *Early light-induced protein* (ELIP), proteína relacionada ao estresse luminoso, que obteve alta expressão em flores. O papel dela é o de proteger os complexos coletores de luz (LHC) contra o dano foto-oxidativo produzido pelo excesso de luminosidade (HEDDAD et al., 2006; HUTIN, et al., 2003). Ainda é possível observar a baixa expressão de proteínas relacionadas com a fotossíntese, como as proteínas de ligação à clorofila, subunidades da Rubisco, Rubisco ativase e anidrase carbônica, o que indica que, muito embora as flores tenham todo aparato fotossintético, este só é capaz de processar pequenas taxas luminosas.

Na folha, por sua vez, foi observada tanto a alta, quanto a baixa expressão de proteínas relacionadas à senescência, c39209_g1_i3 e c40782_g1_i1, respectivamente. Curiosamente, em raiz, a mesma proteína c40782_g1_i1 (que em folha obteve baixa expressão) foi indicada com alta expressão, e em seedling, esta mesma volta a apresentar baixa expressão. As proteínas relacionadas à senescência estão envolvidas nos processos de morte celular, e podem assumir diferentes papéis na célula: RNases, proteases, lipases, remobilizadores de nutrientes, transportadores, podendo ainda estar envolvidas em processos de tradução de proteínas e como enzimas antioxidantes (ESPINOZA et al., 2007; SEO et al., 2011). Enquanto em seedling estas proteínas necessitam estar pouco expressas, por se tratar de tecidos muito jovens, em raízes e folhas ela já pode ser notada de forma mais acentuada. Assim, pode-se supor que, desde a planta jovem, estas proteínas possam estar associadas à fenologia da espécie, a qual é fortemente marcada em indivíduos adultos. Uma vez que as amostras coletadas para o sequenciamento provinham de plantas mantidas *in vitro* (portanto, sem déficit hídrico), pode-se concluir que o caráter caducifólio da teca pode também estar relacionado ao comprimento dos dias (uma vez que em épocas secas, o comprimento do dia é menor, enquanto que o contrário ocorre nas épocas úmidas).

Ainda na folha, foi encontrada alta expressão para uma proteína da família das deidrinas (*Dehydrin – DHN*), a qual confere proteção contra os estresses por seca e por frio, o que reflete a alta rusticidade da teca perante as condições adversas encontradas em campo (YANG et al., 2012).

Para raiz, a alta expressão da enzima *caffeoyl-O-methyltransferase*, envolvida na cascata de reações da rota de biossíntese de fenilpropanóides, indica a relevância destes compostos para este tecido (BUCHANAN; GRUISSEN; JONES, 2002). As raízes são naturalmente lignificadas por conta de sua alta vascularização e devido ao reforço celular indispensável para enfrentar o baixo potencial hídrico a que estão destinadas, afim para absorver água e nutrientes do solo.

Enquanto isto, a diversidade de genes altamente expressos na biblioteca de seedling reflete principalmente ao metabolismo do carbono; através de mapeamento com a base de dados KEGG, observou-se que os mapas metabólicos principalmente representados por estes genes são: “Carbon fixation in photosynthetic organisms”, (com 4 sequências representando 4 enzimas); “Methane metabolism” (com 3 sequências representando 2 enzimas); “Glycolysis / Gluconeogenesis” (com 3

sequências representando 2 enzimas); “Gloxylate and dicarboxylate metabolism” (com 3 sequências representando 3 enzimas) e “Fructose and mannose matabolism” (com 2 sequências representando 1 enzima).

Por fim, pela observação dos *heatmaps* é possível observar quais dos genes obtiveram alta expressão em cada tecido (em vermelho), e quais aqueles que apresentavam baixa expressão (em verde) (Figura 34).

Figura 34 - *Heatmaps* para a expressão diferencial entre os tecidos. A: Expressão de flor x folha+seedling+raiz. B: Expressão de folha x flor+seedling+raiz. C: Expressão de raiz x flor+folia+seedling. D: Expressão de seedling x folha+flor+raiz

3.4 Considerações Finais

O RNA-seq é uma ferramenta poderosa na caracterização de transcriptomas, tendo fornecido para a teca 503.680 sequências de transcritos distribuídos ao longo de quatro órgãos biologicamente distintos, o que perfaz uma boa cobertura do panorama transcricional desta espécie. A etapa de anotação gênica permitiu a identificação de 260.063 transcritos, dos quais 84.505 representavam enzimas cobrindo em torno de 145 mapas metabólicos. Além disto, foi possível identificar genes diferencialmente expressos que confirmam eventos da fenologia da teca e exposição a condições ambientais. A montagem *de novo* de transcriptomas é possível em espécies que não possuem genoma de referência, e ainda revela alta semelhança com a realidade biológica da amostra. O transcriptoma de amostras biológicas contrastantes pode revelar um número semelhante de genes anotados, no entanto, a etapa de expressão diferencial permite distinguir quais são aqueles com maior e menor expressão em cada tecido/órgão. Por fim, de posse de uma poderosa base de dados de genes funcionais, é possível e praticável selecionar genes candidatos para pesquisas de resistência a patógenos, aumento da produtividade e resistência aos estresses por seca, frio, luz e excesso de sais.

Referências

ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, p. 399 – 436. 2003.

BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L.; **Biochemistry & molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2002. 1408p.

ESPINOZA, C.; MEDINA, C.; SOMERVILLE, S.; ARCE-JOHNSON, P. Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 12, p. 3197–3212. 2007.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACHOEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, London, v. 29, n. 7, p. 644 – 652. 2011.

HEDDAD, M.; NORÉN, H.; REISER, V.; DUNAEVA, M.; ANDERSSON, B.; ADAMSKA, I. Differential expression and localization of Early Light-Induced Proteins in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 142, p. 75 – 87. 2006.

HUTIN, C. NUSSAUME, L.; MOISE, N.; MOYA, I.; KLOPPSTECH, K.; HAVAUX, M. Early light-induced proteins protect *Arabidopsis* from photooxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 100, n. 8, p. 4921 – 4926. 2003.

JAILLON, O.; AURY, J.; NOEL, B.; POLICRITI, A.; CLEPET, C.; CASAGRANDE, A.; CHOISNE, N.; AUBOURG, S.; VITULO, N.; JUBIN, C.; VEZZI, A.; LEGEAI, F.; HUGUENEY, P.; DASILVA, C.; HORNER, D.; MICA, E.; JUBLOT, D.; POULAIN, J.; BRUYÈRE, C.; BILLAULT, A.; SEGURENS, B.; GOUYVENOUX, M.; UGARTE, E.; CATTONARO, F.; ANTHOUARD, V.; VICO, V.; DEL FABBRO, C.; ALAUX, M.; DI GASPERO, G.; DUMAS, V.; FELICE, N.; PAILLARD, S.; JUMAN, I.; MOROLDO, M.; SCALABRIN, S.; CANAGUIER, A.; LE CLAINCHE, I.; MALACRIDA, G.; DURAND, E.; PESOLE, G.; LAUCOU, V.; CHATELET, P.; MERDINOGLU, D.; DELLEDONNE, M.; PEZZOTTI, M.; LECHARNY, A.; SCARPELLI, C.; ARTIGUENAVE, F.; PÈ, M.E.; VALLE, G.; MORGANTE, M.; CABOCHE, M.; ADAM-BLONDON, A.; EISSENBAACH, J.; QUÉTIER, F.; WINCKER, P. The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature**, London, v. 449, n. 7161, p. 463 – 467. 2007.

LAX, A. R.; VAUGHN, K. C. Colocalization of polyphenol oxidase and photosystem II proteins. **Plant Physiology**, Washington, v. 96, p. 26 – 31. 1991.

MAYER, A. M.; HAREL, E. Polyphenol oxidases in plants. **Phytochemistry**, London, v. 18, p. 193 – 215. 1979.

MOROZOVA, O.; MARRA, M. A. Applications of next-generation sequencing technologies in functional genomics. **Genomics**, New York, v. 92, p. 255 – 264. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 15, n. 3, p. 473 – 497. 1962.

NESS, R. W.; SIOL, M. BARRETT, S. C. H. *De novo* sequence assembly and characterization of the floral transcriptome in cross- and self-fertilizing plants. **BMC Genomics**, London, v. 12, n. 298, p. 1- 13. 2011.

REEKSTING, B. J.; COETZER, N.; MAHOMED, W.; ENGELBRECHT, J.; VAN DEN BERG, N. *De novo* sequencing, assembly, and analysis of the root transcriptome of *Persea americana* (Mill.) in response to *Phytophthora cinnamomi* and flooding. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 1- 16, 2014.

ROBINSON, M. D.; OSHLACK, A. A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. **Genome Biology**, London, v. 11, p. 1–9, 2010.

SALGADO, L. R. **Montagem de novo e análise do transcrito de *Hevea brasiliensis* por RNA-seq e busca por marcadores moleculares**. 2014, 155p. Tese (Doutorado em Genética) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2014.

SALZMAN, R. A.; FUJITA, T.; ZHU-SALZMAN, K.; HASEGAWA, P. M.; BRESSAN, R. A. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. **Plant Molecular Biology Reporter/ ISPMB**, New York, v. 17, p. 11-17. 1999.

SCHROEDER, A.; MUELLER, O.; STOCKER, S.; SALOWSKY, R.; LEIBER, M.; GASSMANN, M.; LIGHTFOOT, S.; MENZEL, W.; GRANZOW, M.; RAGG, T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 3, p. 1 – 14. 2006.

SEO, P. J.; PARK J. –M.; KANG, S. K.; KIM, S. –G.; PARK, C. –M. An Arabidopsis senescence-associated protein SAG29 regulates cell viability under high salinity. **Planta**, Heidelberg, v. 233, p. 189 – 200. 2011.

SILVA, L. A. da. Relatório de iniciação científica. 2010. 14p. Comunicação pessoal.

VILLARINO, G.H.; BOMBARELY, A.; GIOVANNONI, J. J.; SCANLON, M. J.; MATTSON, N. S. Transcriptomic analysis of *Petunia hybrida* in response to salt stress using high throughput RNA sequencing. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1–13, 2014.

WANG, Y.; HUANG, H.; MA, Y.; FU, J.; WANG, L.; DAI, S. Construction and de novo characterization of a transcriptome of *Chrysanthemum lavandulifolium*: analysis of gene expression patterns in floral bud emergence. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Amsterdam, v. 116, p. 297 – 309. 2014.

XIA, Z.; XU H.; ZHAI, J.; LI, D.; LUO, H.; HE, C.; HUANG, X. RNA-Seq analysis and de novo transcriptome assembly of *Hevea brasiliensis*. **Plant Molecular Biology**, Amsterdam, v. 77, n. 3, p. 299 – 208. 2011.

YANG, Y.; HE, M.; ZHU, Z.; LI, S.; XU, Y.; ZHANG, C.; SINGER, S. D.; WANG, Y. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. **BMC Plant Biology**, London, v. 12, n. 140, p. 1-17, 2012.

ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome Research**, New York, v. 18, p. 821–829, 2008.

4 ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO EM TECA E BUSCA POR GENES RELACIONADOS

Resumo

O estresse por déficit hídrico é um fenômeno cada vez mais comum e preocupante, pois causa prejuízo tanto na produção de culturas agrícolas, quanto na produção florestal. De difícil compreensão, este tipo de estresse leva à ativação de diversas cascatas de reação, as quais induzem a expressão de inúmeros genes relacionados com produção de moléculas osmorreguladoras, sinalizadores moleculares, abertura ou fechamento de canais de íons, fechamento de estômatos, abscisão foliar e resposta ao dano celular oxidativo. A teca é uma árvore tropical que necessita da alternância entre estações chuvosas e secas para produzir uma madeira de alta qualidade. Contudo, sua rusticidade quanto ao estresse por déficit hídrico não é bem conhecida. Para observar o comportamento de plantas de teca sob déficit hídrico foi realizado um experimento em casa-de-vegetação com três intensidades de estresse (Moderado, Severo e Controle), assistido pela leitura de parâmetros fisiológicos com um analisador de gases por infravermelho (IRGA). Em ambos os tratamentos de déficit hídrico houve redução na taxa fotossintética, taxa transpiratória e condutância estomática em relação ao controle. Também em relação ao controle, o conteúdo relativo de água foliar foi mais baixo para o tratamento severo, e níveis de prolina livre nas folhas foram estatisticamente maiores quanto mais intenso fosse o estresse. Tais alterações fisiológicas e bioquímicas foram acompanhadas da redução no vigor de crescimento, o que é indicativo de que em situações de intensa e prolongada escassez de água, haverá redução na produtividade em plantios de teca. Para se estudar alguns genes relacionados ao estresse por déficit hídrico foram selecionados, via RNA-seq, transcritos obtidos de raízes de plantas cultivadas *in vitro*. Ao todo, 1145 transcritos apresentaram anotação funcional referente ao estresse hídrico, e destes, quatro foram selecionados: *TgTPS* (trealose 6-fosfato sintase), *TgPIP* (aquaporina, proteína intrínseca de membrana plasmática), *TgDREB2* (proteína de ligação a elemento responsivo a desidratação) e *TgAREB* (proteína de ligação a elemento responsivo a ácido abscísico). A caracterização destes genes mostrou domínios protéicos bem conservados para a *TgTPS*, *TgPIP* e *TgDREB2*, e ainda foi possível obter uma predição da estrutura 3D da proteína traduzida. O *TgAREB* não se apresentou como uma boa escolha, pois não foi encontrada conservação do domínio e, na etapa de validação da sequência, não foi possível obter alinhamentos significativos através do programa Blastx. *TgTPS*, *TgPIP* e *TgDREB2* mostraram-se como uma possibilidade de estudo do estresse por déficit hídrico em teca, podendo futuramente ser utilizados em experimentos de expressão gênica ou de superexpressão para prover maior resistência frente à escassez de água.

Palavras-chave: Seca; Lamiaceae; Genômica funcional; Prolina; Assimilação de carbono

Abstract

Drought stress is an increasingly common and worrying phenomena because it causes loss both in the production of agricultural crops, as in forest production. Difficult to understand, this type of stress leads to activation of various reaction

cascades, which induce the expression of several genes related to production of osmotic regulation molecules, molecular signaling, opening and closing of ion channels, stomatal closure, leaf abscission and response to oxidative cellular damage. Teak is a tropical tree that needs the alternation of rainy and dry seasons to produce a high-quality wood. However, its hardiness about water-stress is not well known. To observe the behavior under drought, teak plants were in a greenhouse experiment with three stress intensities (Moderate, Severe and Control), assisted by the reading of physiological parameters with an infrared gas analyzer (IRGA). In both water deficit treatments there was reduction in photosynthetic rate, transpiration rate and stomatal conductance compared to the control. Also in relation to control, leaf relative water content was lower for Severe treatment, and leaf free proline levels were higher more intense as it was the stress. These physiological and biochemical changes were accompanied by a reduction in growth vigor, which indicates that in severe and prolonged water shortage situations, will be reduction in yield teak plantations. To study some genes related to drought stress, were selected through RNA-seq, transcripts obtained from roots of plants growing *in vitro*. Altogether, 1145 transcripts showed functional annotation related to water stress, and of these, four were selected: *TgTPS* (trehalose 6-phosphate synthase), *TgPIP* (aquaporin, protein intrinsic of plasma membrane), *TgDREB2* (dehydration responsive element binding protein) and *TgAREB* (abscisic acid responsive element binding protein). The characterization of these genes showed protein domains well kept for *TgTPS*, *TgPIP* and *TgDREB2*, and was even possible to obtain the predict 3D structure of the translated protein. *TgAREB* did not appear as a good choice because it was not found the domain of conservation and in the sequence validation step, it was not possible to obtain significant alignments through Blastx program. *TgTPS*, *TgPIP* and *TgDREB2* appeared as a chance to study stress by water deficit in teak, which can be used in future experiments of gene expression or overexpression to provide greater resistance against water shortages.

Keywords: Drought; Lamiaceae; Functional genomics; Proline, Carbon uptake

4.1 Introdução

Os vegetais possuem mecanismos de adaptação às alterações ambientais que permitiram sua evolução desde os locais úmidos e alagados, até as regiões desérticas do planeta. O estresse abiótico se traduz como as perturbações do ambiente que acarretam em modificações complexas no metabolismo vegetal e na sua resposta ao crescimento e em produtividade. Estas perturbações, como excesso de luz, radiação UV, frio, calor, salinidade, falta ou excesso de água e nutrientes, ou presença de compostos tóxicos como arsênio, chumbo, mercúrio, esgoto, dentre outros, levam a uma resposta tanto duradoura quanto complexa da planta, a fim de resistir ou tolerar tal estresse (TAIZ; ZEIGER, 2008). O estresse por déficit hídrico costuma ser o mais comum e afetar a produção agrícola e florestal em maior intensidade e em grande parte do mundo.

A teca apresenta-se como uma espécie arbórea de alta rusticidade, suportando o estresse hídrico com elevada resistência, mesmo que haja queda na qualidade da madeira, redução do crescimento e abscisão foliar. A identificação de genes relacionados ao estresse por déficit hídrico em teca permite compreender melhor como ocorre o fenômeno da resistência nesta espécie, e assim possibilitar o uso de ferramentas de biotecnologia tanto para aumentar a tolerância a este estresse, quanto para prover a resistência a outras espécies mais suscetíveis.

Objetivo

Neste capítulo, os principais objetivos foram avaliar fisiológica e bioquimicamente plantas de teca submetidas ao estresse por déficit hídrico, e identificar genes relacionados à resistência contra este estresse.

Objetivos Específicos

1. Submeter plantas de teca ao experimento de estresse hídrico em casa de vegetação;
2. Monitorar os parâmetros de taxa fotossintética, condutância estomática, taxa transpiratória e temperatura foliar nas plantas durante o experimento;
3. Avaliar o conteúdo relativo de água nas folhas e o teor de prolina livre foliar nas plantas após o experimento;
4. Identificar, selecionar e caracterizar genes relacionados ao estresse por déficit hídrico;
6. Validar os genes encontrados através de PCR.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Material Vegetal

Foram utilizadas mudas de teca com 10 meses de idade, providas de germinação de sementes livremente coletadas dentro do povoamento florestal instalado na Fazenda Areão, Campus “Luiz de Queiroz” da USP, em Piracicaba, SP (Figura 35).

Figura 35 - Localização do povoamento de Teca na “Fazenda Areão”, Piracicaba, SP. Marcador: árvores de Teca (22°41'43.1736" S, 47°38'35.0304" O)

As plantas foram adquiridas no mês de junho, portanto, em plena época de dormência da planta. Após a aquisição, todas as mudas foram re-embaladas em vasos de 8 L contendo substrato vegetal a base de casca de *Pinus* (marca “Spanhol”). Foi aplicada uma adubação no envase com 20 g de NPK 04 – 14 – 08, e 20 g de Calcário Dolomítico (PRNT = 80). Além disto, a cada 15 dias foi realizada uma pulverização com solução de manutenção foliar contendo micronutrientes (marca “Dimmy”), e tratamento preventivo contra ácaros, pulgões e mosca-branca com veneno comercial para jardinagem amadora (marca “Dimmy”).

As plantas foram mantidas em casa-de-vegetação, com incidência máxima de luminosidade de $\approx 200 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ao meio-dia), temperatura máxima para a ativação dos exaustores de 27°C, e umidade controlada por cortina de água automática. Em todos os vasos foi realizada irrigação diária até a completa saturação do substrato.

As mudas encontraram-se aptas para iniciar os experimentos após o início de setembro, quando reativaram seu desenvolvimento. Nesta ocasião, foi realizada a limpeza nas plantas, onde foram removidas brotações laterais e folhas secas.

4.2.2 Estimativa do Conteúdo de Água nos Vasos

Para garantir um controle no conteúdo de água disponível no vaso foi aplicado um método gravimétrico (por peso) para se determinar a faixa mais aproximada possível para o conteúdo de água em cada vaso (KLAR,1984).

Inicialmente, uma pequena quantidade de substrato foi coletada, saturada com água e mantida em repouso até que não houvesse mais gotejamento. Este

substrato foi então homogeneizado e pequenas amostras foram coletadas em placas de Petri, imediatamente pesadas (Peso saturado – PS_{saturado} – ou a 100% da capacidade de absorção de água) e então desidratadas a 65°C em estufa com circulação forçada de ar, até se obter peso constante (cerca de 4 dias). Todas as amostras de substrato foram novamente pesadas (Peso seco – PS_{seco} – ou a 0% da capacidade de absorção de água). Pela diferença entre os pesos foi obtido o peso máximo de água que aquelas amostras de substrato conseguiram armazenar ($PA_{100\%}$):

$$PS_{\text{saturado}} - PS_{\text{seco}} = PA_{100\%}$$

Com o peso da água foi deduzida a umidade relativa do substrato, a qual foi convencionada a constante K para converter o peso saturado em peso de água contida:

$$\frac{PA_{100\%}}{PS_{\text{saturado}}} = K$$

De posse desta constante K, para o peso de cada vaso com planta saturado de água (PV_{saturado}) foi descoberto o peso da água contida (100%, ou $PV_{A100\%}$) e calculado o peso da água a 40% ($PV_{A40\%}$); pela diferença entre o peso do vaso saturado pelo peso da água contida foi descoberto o peso do vaso “seco” (PV_{seco}), o qual, adicionado do peso da água a 40% resultou no peso do vaso com 40% de água ($PV_{40\%}$):

$$PV_{\text{saturado}} * K = PV_{A100\%}$$

$$PV_{A100\%} * 0,4 = PV_{A40\%}$$

$$PV_{\text{saturado}} - PV_{A100\%} = PV_{\text{seco}}$$

$$PV_{\text{seco}} + PV_{A40\%} = PV_{40\%}$$

4.2.3 Experimento de déficit hídrico

4.2.3.1 Delineamento experimental

Foram realizados 3 tratamentos de déficit hídrico (5 repetições), e observados os efeitos de 3 irradiâncias de P.A.R. (*Photosynthetically Active Radiation*) acima de 15 plantas de teca, sendo ambos os tratamentos locados sob o delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC). Cada parcela foi constituída por uma leitura obtida com o aparelho LCpro-SD Leaf Chamber & Soil Respiration Analysis System (ADC BioScientific), o qual é um analisador infravermelho de gases (IRGA); cada tratamento foi constituído por um número variável de repetições. Os tratamentos de déficit hídrico foram:

Moderado = Conteúdo de água no vaso em torno de 40% por 20 dias;

Severo = Conteúdo de água no vaso em torno de 40% por 20 dias, e depois diminuindo até 20% dentro de mais 10 dias;

Controle = Conteúdo de água no vaso sempre mantido em 100%, durante o tempo máximo de duração do experimento.

As plantas foram aleatorizadas na bancada da estufa conforme o seguinte sorteio (Figura 36):

Exaustor ✕	Moderado	Controle	Controle	Moderado	Controle	Moderado	Severo		Cortina d'água ●
	Moderado	Severo	Severo	Moderado	Controle	Controle	Severo	Severo	

Figura 36 - Croqui do experimento

As irradiâncias de P.A.R. avaliadas foram obtidas através da análise da curva de resposta fotossintética à luz, cuja elaboração está descrita no item 4.2.3.4 desta seção.

Pela combinação das leituras dos tratamentos de Déficit Hídrico x Irradiância foram deduzidos outros 9 tratamentos, também avaliados sob delineamento inteiramente casualizado (DIC).

4.2.3.2 Condução do experimento

Tendo-se o teor de água que cada vaso deveria adquirir para se iniciar o experimento, as plantas tiveram sua irrigação suspensa para que ocorresse o consumo natural da água do vaso. Foram realizadas pesagens aproximadamente a

cada 2 dias para verificar a porcentagem de água em cada vaso e, à medida que os vasos atingiam 40%, estes eram submetidos ao respectivo tratamento do experimento. Uma vez sob tratamento, foi obtido o peso dos vasos antes de cada leitura e então realizada a reposição de água a fim de manter os 40% estipulados para cada vaso.

Durante o experimento a adubação foi suspensa, a fim de evitar a salinização do substrato e assim deturpar os resultados das análises a serem realizadas. Quanto ao controle de pragas, este foi mantido apenas para as plantas que apresentavam algum tipo de infestação.

4.2.3.3 Coleta das plantas

Ao fim do tempo experimental, cada planta foi cuidadosamente removida do vaso e suas raízes foram rapidamente lavadas em água para remoção do excesso de substrato. Foram removidas todas as raízes de cada planta com auxílio de tesoura limpa em álcool comercial 96°GL; as raízes foram identificadas, congeladas em nitrogênio líquido e então armazenadas em freezer -80°C. Tal material deverá permanecer armazenado no freezer até que se realizem experimentos de expressão gênica específicos.

As folhas foram separadas da haste caulinar e identificadas para análises posteriores; para cada conjunto de folhas e haste foi obtida uma fotografia, a qual passou por tratamento digital com o software PhotoFiltre (versão 7.1.2) a fim de uniformizar o fundo na cor preta e adicionar a barra de comparação.

4.2.3.4 Avaliações Fisiológicas

Foram tomadas leituras a cada 2 dias com o IRGA. Dos diversos parâmetros medidos pelo aparelho, foram selecionados para observação: “taxa fotossintética”, “taxa de transpiração”, “condutância estomática” e “temperatura foliar”. Todas as leituras foram realizadas nas folhas do primeiro par de folhas completamente expandidos logo abaixo do ápice, com temperatura e umidade ambiente (Figura 37).

Figura 37 - Medição com o IRGA em folha madura de teca

Para se determinar a qual intensidade luminosa seriam realizadas as medições, foi preparada uma curva de saturação de luz antes do início do experimento. Assim, foram tomadas as leituras de taxa fotossintética para cada uma das seguintes densidades de fótons: 0, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800 e 2000 μmol de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Pela plotagem dos valores de fotossíntese em função da intensidade luminosa foi adquirida uma curva de saturação de luz, e nesta foi observada a intensidade que correspondia aos picos de fotossíntese e a faixa de saturação.

Antes de ser obtida a leitura do IRGA, foi determinado por sorteio se a leitura seria completa, ou seja, em todas as irradiâncias determinadas, ou parcial, ou seja, em apenas uma irradiância. Isto foi necessário para reduzir o tempo de coleta dos dados na casa de vegetação e assim mitigar a variação ambiental entre as amostras. Por conta deste sorteio, o número de leituras por plantas ficou desbalanceado.

4.2.3.5 Conteúdo Relativo de Água Foliar

O conteúdo relativo de água foliar (CRA) foi avaliado a partir da coleta de 3 discos foliares (aproximadamente 2 cm de diâmetro) das mesmas folhas utilizadas para as medições do IRGA, evitando-se nervuras e áreas amareladas. Estes discos foram imediatamente pesados (Peso atual, P_A). Depois, todos os discos foram mantidos durante pelo menos 24h em água destilada estéril dentro de geladeira a 8°C, e então cuidadosamente secos e pesados (Peso túrgido, P_T). Em seguida, os discos foram desidratados a 60°C em estufa, até atingirem peso constante (Peso

seco, P_s). O conteúdo relativo de água (CRA) foi expresso em porcentagem (%) e pode ser calculado a partir da fórmula:

$$CRA = \frac{P_A - P_s}{P_T - P_s} \times 100$$

4.2.3.6 Conteúdo de Prolina Livre Foliar

Foi observado o conteúdo de prolina em amostras de folhas utilizando-se o protocolo proposto por Bates et al. (1973) com modificações.

Aproximadamente 1 g do órgão macerado foi adicionado a 10 mL de ácido sulfosalicílico 3%; a mistura foi agitada vigorosamente nas mãos, centrifugada a 6.000g por 10 min e o sobrenadante foi utilizado para a determinação da prolina.

Cada reação consistia em 2 mL do sobrenadante adicionados a 2 mL de ninidrina-ácida (1,25 g de ninidrina, 30 mL de ácido acético glacial e 20 mL de ácido fosfórico 6M) e 2 mL de ácido acético glacial. A mistura foi preparada em tubos de vidro com tampa de rosca, homogeneizada em agitador tipo vórtex e incubada a 100°C por 1 h. Logo após, todos os tubos foram esfriados em gelo por 10 min e 4 mL de tolueno foram adicionados, seguido de agitação vigorosa para a extração do cromóforo na fase sobrenadante. Esta fase foi então utilizada para leitura de absorbância a 520 nm, utilizando como branco uma reação preparada com ácido sulfosalicílico 3% puro no lugar da solução do tecido.

Os valores de absorbância adquiridos foram convertidos em teor de prolina com auxílio de uma curva-padrão de prolina (em $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$). O teor de prolina foi expresso em “ $\mu\text{g de prolina} \times \text{g de tecido}^{-1}$ ” através da conversão dos dados pela seguinte expressão:

$$\frac{\mu\text{g de prolina}}{\text{g de tecido}} = \frac{\left(\frac{\mu\text{g de prolina}}{\mu\text{L}} \times \mu\text{L de tolueno} \right)}{\left(\text{g de tecido} \times \frac{2 \text{ mL usados na reação}}{10 \text{ mL ácido sulfosalicílico}} \right)}$$

4.2.3.7 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi averiguada através dos testes de Kolmogorov-Smirnov, Crámer-von Mises, Anderson-Darling, Kuiper, Watson, Lilliefors e Shapiro-Wilk, todos com $\alpha = 5\%$ de probabilidade. A homogeneidade das variâncias foi observada pelo teste de Bartlett com $\alpha = 5\%$ e $\alpha = 1\%$ de probabilidade. A análise da

variância foi realizada através dos testes F (para dados que atendem todos os pressupostos da ANOVA) e Kruskal-Wallis (teste não paramétrico), ambos com $\alpha = 5\%$ e $\alpha = 1\%$ de probabilidade. Para a análise do contraste de médias da ANOVA, foi utilizado o teste t de Student e o teste de Tukey com $\alpha = 5\%$ e $\alpha = 1\%$ de significância e, para avaliar contrastes entre o tratamento controle e os demais, foi utilizado o teste de Dunnett bilateral a $\alpha = 5\%$ e $\alpha = 1\%$ de significância. O contraste de médias para a análise de variância com Kruskal-Wallis foi feito pelo teste de Dunn e pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK), utilizando-se $\alpha = 5\%$ e $\alpha = 1\%$ de significância. Todas as análises foram realizadas com o auxílio dos softwares BioEstat (versão 5.0), Assistat (versão 7.7 beta) (SILVA; AZEVEDO, 2002) e Action (versão 2.8.29.357.515, apoiado sobre o software R, versão 3.0.2, e Microsoft Excel, versão 2013).

4.2.4 Extração de DNA genômico e RNA total

Amostras de folhas, flores, raízes e seedlings previamente congeladas (as mesmas descritas na seção 3.2.1) foram maceradas em nitrogênio líquido e cerca de 100 mg foram utilizados para a extração de RNA. Enquanto isto, para a extração de DNA genômico foram maceradas apenas amostras de folhas, e utilizados 100 mg para a extração.

Para a extração de RNA total foi utilizado o reagente comercial TRIzol® (Invitrogen), seguindo-se o protocolo descrito no Anexo F.

Para a extração de DNA genômico foi utilizado o protocolo proposto por Doyle e Doyle (1990), descrito no Anexo G.

4.2.5 Quantificação e avaliação da qualidade do RNA total

Todas as amostras de RNA total foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1%, onde foram observadas as duas bandas características do RNA ribossômico (40S e 60S) e a banda relacionada aos demais RNAs presentes. A seguir, as amostras foram quantificadas por meio de espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific), sendo a concentração expressa em “ng μL^{-1} ” e ainda observadas as relações 260/230 e 260/280, as quais deveriam estar entre 1,8 e 2,0 para boa qualidade.

4.2.6 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total que apresentaram boa qualidade foram diretamente utilizadas para a síntese da fita complementar de DNA (cDNA).

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit comercial Super Script™ III First-strand Synthesis (Invitrogen), seguindo-se as instruções do fabricante. O passo de síntese do cDNA foi realizado com o anelamento do *primer* oligo dT acima do mRNA.

4.2.7 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

Todas as reações de PCR foram conduzidas em termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller (MJ Research) ou GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems), utilizando-se para cada amostra: 50 ng de DNA ou 600 ng de cDNA, 0,5 µL de mix de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) [100 µM], 1 µL de cada um dos *primers* [10 pmol], 0,3 µL de *Taq* Polimerase [1U µL⁻¹], 10% do volume de tampão de reação, água Milli-Q estéril para completar um volume final de 25 µL.

Os programas de amplificação envolviam 2 minutos de aquecimento a 94°C, seguidos de 35 a 40 ciclos com aquecimento a 94°C por 30s, resfriamento até a temperatura de anelamento dos *primers* utilizados por 45s, e extensão a 72°C por 1 a 2 min, dependendo do tamanho do fragmento; finalizava-se com 20 min de extensão final a 72°C e armazenamento refrigerado a 4°C.

O produto de PCR foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 2%, utilizando-se como referência o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

4.2.8 Seleção dos Transcritos

A separação dos transcritos que seriam utilizados para a confecção de *primers* e validação biológica do experimento do RNA-seq (Capítulo 3) foi realizada dentro do programa Blast2GO, utilizando-se como fonte a biblioteca de transcritos de Raiz (previamente referida no Capítulo 3). Os transcritos candidatos foram identificados através de seleção automática utilizando-se o termo GO mais representativo para estresse hídrico, e também por busca manual daqueles genes

comumente referidos na literatura. Assim, para cada gene escolhido foi listada uma série de transcritos relacionados, e destes foi escolhido aquele que combinava o menor *e-value* possível, a maior similaridade, o maior tamanho da sequência de nucleotídeos e a proteína traduzida com o menor número de *stop-codons*.

4.2.9 Avaliação dos Transcritos e Desenho de *Primers*

Foi realizada uma pesquisa no NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) pelas as sequências (em nucleotídeos e aminoácidos) dos genes escolhidos, dando-se preferência àquelas de plantas. Logo após, todas as sequências em aminoácidos e nucleotídeos foram alinhadas juntamente com os transcritos previamente selecionados, utilizando o programa Clustal Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e, com o auxílio da ferramenta “Jalview” foi realizada uma análise dos alinhamentos e identificadas as regiões conservadas de alta similaridade entre as espécies.

A sequência dos transcritos foi traduzida a proteína através da ferramenta *Translate Tool* (<<http://web.expasy.org/translate/>>), algumas informações da proteína formada foram obtidas pelo programa *ProtParam* (<<http://web.expasy.org/protparam/>>) e a respectiva estrutura protéica 3D foi construída por homologia com programa *SWISS-MODEL* (<<http://swissmodel.expasy.org/>>), sendo todos estes programas presentes no portal “*ExPASy Bioinformatics Resource Portal*” (<<http://www.expasy.org/>>). Os domínios proteicos foram obtidos através do programa “*Protein Family - PFAm*” (<<http://pfam.sanger.ac.uk/>>). Adicionalmente, foram recrutadas do programa Blast2GO as informações extraídas pela ferramenta “*InterProScan*”, a fim de gerar um enriquecimento dos dados.

A partir de então, foram desenhados *primers* específicos para cada transcrito utilizando os programas online OligoPerfect™ Designer (<<https://tools.lifetechnologies.com/>>) e Primer-BLAST (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>>).

Os *primers* foram avaliados através do programa Beacon Designer (<<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>>), e para se confrontar os *primers* com as espécies passíveis de serem amplificadas foi também utilizado o programa Primer-BLAST (NCBI). Os *primers* foram confeccionados contendo entre

21 e 23 nucleotídeos, sem nucleotídeos degenerados, e produzindo um produto de até 200 pb (tamanho limite para seu uso em PCR em tempo-real).

4.2.10 Purificação, Sequenciamento e Validação dos Transcritos

Para cada par de *primers* desenhado foi realizada uma reação de PCR (acima de DNA genômico e de cDNA de Teca), e os produtos que mostraram amplificação no tamanho esperado foram cuidadosamente recortados do gel de agarose, pesados e purificados com o kit comercial QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN).

O material purificado foi avaliado em gel de agarose 2% e quantificado por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific). Acima de cada amostra purificada foi realizada uma diluição 1:10 e, acima desta, uma nova PCR foi praticada, a fim de confirmar a integridade e pureza do fragmento.

Os fragmentos purificados foram sequenciados pelo método de Sanger (Applied Biosystems 3100 Genetic Analyzer), e o resultado foi comparado aos transcritos originais, bem como às sequências de outras espécies, através de alinhamento com o programa Clustal Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Variações ambientais

A compreensão dos fenômenos fisiológicos que ocorrem na planta submetida ao estresse hídrico depende, em grande parte, da análise conjunta dos dados climatológicos do local em que ocorreu o estresse. Muito embora o conteúdo de água disponível na região radicular da planta seja, à primeira vista, o agente causador do estresse hídrico, é necessário também observar a temperatura do ar e a umidade relativa da atmosfera, pois tais fatores tanto agravam, quanto atenuam os sintomas do estresse.

Durante o período experimental ocorreram amplas variações na temperatura e umidade relativa média, além de grande amplitude térmica (diferença entre a temperatura máxima e mínima), tanto na região de Piracicaba, quanto dentro da casa de vegetação (Figura 38). A temperatura média oscilou de 22,2 a 29,4°C, tendo como máximo 38,6°C em Piracicaba e 42°C dentro da casa de vegetação, e como

mínimo 14,3°C em Piracicaba e 14°C dentro da casa de vegetação. Enquanto que a temperatura mínima da casa de vegetação acompanhou a variação da temperatura mínima de Piracicaba, o oposto ocorreu com a temperatura máxima, que esteve em grande parte do tempo maior dentro da casa de vegetação do que em Piracicaba. A umidade relativa variou de 50,8% (em um dia com temperatura máxima de 38,2°C) a até 91,8% (em um dia com temperatura máxima de 27,2°C).

Figura 38 - Gráfico da variação ambiental da temperatura e umidade relativa para a região de Piracicaba (posto meteorológico da ESALQ/USP) e para o interior da casa de vegetação

Além disto, foram também obtidos os valores da temperatura na câmara de medição, a pressão parcial de vapor d'água, o teor de carbono atmosférico (carbono de referência para o cálculo da taxa fotossintética) e a pressão atmosférica no momento de cada leitura do IRGA (Figuras 39 e 40), os quais indicam precisamente a quais condições ambientais foram adquiridos os valores da taxa fotossintética, taxa transpiratória, condutância estomática e temperatura foliar.

Figura 39 - Gráfico da variação da pressão parcial de vapor de água média e temperatura média medidos na câmara de medição do IRGA. As barras representam o erro padrão da média

Figura 40 - Gráfico da variação do carbono de referência e da pressão atmosférica medidos pelo IRGA. As barras representam o erro padrão da média

Um fator ambiental que afeta intimamente o estresse por déficit hídrico é a evapotranspiração: o fenômeno físico da dinâmica da água através do sistema solo-planta-atmosfera; por meio dela são estimadas as perdas de água conjuntas da planta (através da transpiração) e do solo (por meio da evaporação) (SENTELHAS; ANGELOCCI, 2009). À medida em que a pressão parcial de vapor da atmosfera cai e a temperatura do ar aumenta, o comportamento da evapotranspiração torna-se mais intenso. Isso ocorre devido à transição das moléculas de água do estado líquido para o gasoso após a absorção de energia térmica (calor) suficiente para atingir o calor latente de vaporização (44 kJ mol^{-1} , a 25°C), o qual tende a diminuir

conforme a temperatura aumenta (TAIZ; ZEIGER, 2008). A pressão parcial do vapor d'água indica o quanto de água, em seu estado gasoso, está presente no ar, e com isto, relaciona-se linearmente com a umidade relativa (CARVALHO; SILVA, 2006).

Por sua vez, o CO₂ atmosférico varia amplamente entre o dia (onde há o consumo pelas plantas e organismos fotossintetizantes) e a noite (onde ocorre aumento pela respiração mitocondrial dos vegetais e por ação de microorganismos decompositores). Além disto, a ação antrópica tem cada vez mais alterado o comportamento da variação do CO₂ atmosférico, principalmente por conta da emissão por motores de combustão, indústrias, fertilizantes e pecuária (SILVA JÚNIOR et al., 2004). Durante o experimento, o CO₂ atmosférico variou de 394,1 vpm (volume por milhão) a 418,7 vpm.

4.3.2 Conteúdo de Água nos Vasos

A umidade relativa média foi obtida no valor de 0,542761, o qual foi utilizado como coeficiente de transformação dos valores de peso do vaso para conteúdo de água contido no mesmo (Tabela 12). Por esta conversão foi estimada a capacidade máxima de retenção de água em cada vaso, e a partir desta, o conteúdo de água para cada tratamento.

Tabela 12 - Peso das amostras de substrato para a determinação da umidade relativa

Amostra	Peso Saturado (g)	Peso Seco (g)	Conteúdo de Água (g)	Umidade relativa (%)
1	24,42	12,29	12,13	0,496724
2	22,86	10,52	12,34	0,539808
3	20,87	8,51	12,36	0,592238
4	30,07	12,46	17,61	0,585634
5	36,13	17,65	18,48	0,511486

De posse dos pesos dos vasos de antes do início do experimento, foram calculados os valores do conteúdo de água que cada vaso deveria adquirir (Anexo H), seguindo-se do consumo natural da água pelas plantas até atingir o nível de 40%. Uma vez a 40%, as plantas foram submetidas aos tratamentos e o peso dos

vasos foi medido regularmente (Figura 41), seguido da respectiva reposição de água e leitura com o IRGA.

Figura 41 - Gráfico da variação do conteúdo de água nos vasos das plantas submetidas ao estresse por déficit hídrico. Cada barra representa uma leitura

O conteúdo de água de 40% foi suficiente para ocasionar redução dos processos fisiológicos avaliados, enquanto que a queda até cerca de 20% foi capaz de agravar a situação, reduzindo ainda mais os parâmetros avaliados.

O substrato para produção de mudas corresponde ao meio físico, substituto ao solo, pelo qual as plantas podem garantir sua sustentação e também assegurar sua nutrição, além de oferecer uma quantidade de água e oxigênio suficiente para o desenvolvimento das raízes, pH compatível com os tratos da espécie, e ausência de elementos químicos ou físicos que inibam o crescimento vegetal ou ofereçam toxidez (GUERRINI; TRIGUEIRO, 2004). O uso do substrato envasado para o cultivo de plantas é bastante distinto da condição de campo, uma vez que a dinâmica do perfil do solo é muito mais heterogênea, havendo variações físico-químicas e biológicas tanto entre níveis de profundidade, quanto em sítios distintos de plantio (ZORZETO, 2011).

Dentre as características físicas do substrato, a capacidade de retenção de água corresponde à distribuição volumétrica entre macro e microporos, sendo estes os responsáveis por armazenar ar e água, respectivamente. O substrato se

assemelha a uma esponja ao ser preenchido por água: em um primeiro momento, todo o excesso de água drena, liberando os macroporos, os quais tornam-se preenchidos por ar, sendo este um estado que se assemelha à capacidade de campo dos solos, ou seja, corresponde à saturação do solo com água; no segundo momento, a água que ocupa dos microporos de maior diâmetro tende a ser consumida pelas raízes e, à medida que o consumo de água avança, poros de menor diâmetro tendem a ser explorados, e, com isto, mais energia é necessária para a absorção de água. Em um determinado ponto do conteúdo de água do substrato, mesmo havendo água retida, as raízes não conseguirão absorver a ponto de atender suas necessidades hídricas, pois a energia necessária para absorção (potencial hídrico da raiz) não será maior do que a energia que “prende” a água às partículas do substrato (potencial matricial do substrato). Nesta situação, a planta entra em murcha permanente, ou seja, não consegue restabelecer o turgor foliar à noite (MINER, 1994; ZORZETO, 2011). De forma geral, Abad et al. (1993) determina que condições ótimas de crescimento vegetal podem ser obtidas com 20 a 30% de água facilmente disponível, entre 4 a 10% de água de reserva e 24 a 40% de água total disponível para as plantas.

Conforme se observa na figura 41, as plantas sob estresse “Moderado” estiveram submetidas a um conteúdo de água cerca de 60% menor do que a capacidade máxima do substrato, enquanto que aquelas sob estresse “Severo” estiveram a um conteúdo de água ainda menor, entre 60 a 80% a menos da capacidade máxima. Com isto, é possível presumir que o conteúdo de água no substrato tornou-se um ponto restritivo ao crescimento radicular e desenvolvimento vegetal.

4.3.3 Curva de Resposta Fotossintética à Luz

A curva de resposta fotossintética à luz foi deduzida a partir da média das leituras da taxa fotossintética de 4 plantas, e teve como objetivo localizar as melhores intensidades luminosas para as demais etapas do estudo.

Ao se observar o gráfico principal da figura 42, nota-se que se formam dois picos distintos na evolução da taxa fotossintética: o primeiro a 1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ de P.A.R. (ou 1217 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ na folha), e o segundo, de menor amplitude, a 1800 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (ou 1565 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ na folha). A

taxa fotossintética mostrou indícios de estabilização a partir dos 400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (ou 347 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ na folha), indicando que a partir desta intensidade luminosa, a disponibilidade de CO_2 torna-se o fator limitante do aumento da taxa fotossintética (faixa rosa do gráfico da figura 39). Embora as folhas de plantas C_3 comumente obtenham uma saturação fotossintética em irradiâncias entre 500 e 1.000 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, a teca apresentou a saturação em uma irradiância menor, o que pode ser indicativo da aclimação ao ambiente da casa de vegetação, o qual permitia a entrada de até 200 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ da radiação solar.

Com a plotagem de uma linha de tendência polinomial de 2º grau e estudo de sua equação, foi observado que o valor máximo de fotossíntese (A_{max}) pode ser adquirido ao se aplicar 1410 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, produzindo uma assimilação de carbono em torno de 21,93 μmol de $\text{CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. No entanto, em plantas C_3 , o comportamento natural da taxa fotossintética não tende a decrescer com o aumento da irradiância; assim, os limites da função quadrática tornam-se pouco confiáveis à medida que se avança com o aumento da irradiância além do pico máximo de fotossíntese (TAIZ; ZEIGER, 2013). Devido a isto, foi deduzida também uma curva de tendência logarítmica (logaritmo natural), a qual se assemelha à distribuição hiberbólica retangular, mencionada por Prado e Moraes (1997) como aquela que melhor se ajusta à variação da taxa fotossintética. Observando-se o índice de determinação R^2 das duas funções (quadrática e logarítmica), nota-se que ambas se ajustaram devidamente aos dados ($R^2 > 0,96$), além de que as duas mostraram boa sobreposição, indicando que há uma baixa discrepância entre os dois modelos de estudo.

Figura 42 - Gráfico da curva de resposta fotossintética à luz. Cada ponto corresponde à média da leitura de 4 plantas; as barras verticais correspondem ao desvio padrão em relação à média; a linha vermelha é a tendência quadrática da taxa fotossintética em relação à irradiância da P.A.R. incidente na folha; a linha verde é a tendência logarítmica da taxa fotossintética em relação à irradiância da P.A.R. incidente na folha; a região sombreada em azul corresponde à faixa aproximada da limitação da fotossíntese por luz; a região sombreada em rosa corresponde à faixa aproximada da limitação da fotossíntese por CO_2 ; as setas azuis indicam as irradiâncias de P.A.R. selecionadas para as medições nas demais análises. No detalhe está o gráfico de resposta fotossintética à luz apenas com os valores lineares da faixa inicial de variação; a seta vermelha indica o ponto de compensação de luz

Em povoamentos florestais, a irradiância solar direta da P.A.R. pode atingir $2.000 \mu\text{mol de f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ no alto do dossel, e permanece em cerca de $10 \mu\text{mol de f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ na parte inferior da floresta (TAIZ; ZEIGER; 2013). Os resultados obtidos pela curva de resposta fotossintética à luz estão de acordo com o h\u00e1bito pioneiro da teca, a qual n\u00e3o se desenvolve devidamente sob luz filtrada, podendo ainda ser considerada uma planta de sol.

Um par\u00e2metro comumente relacionado \u00e0s caracter\u00edsticas ecofisiol\u00f3gicas da fotoss\u00edntese de plantas \u00e9 o ponto de compensa\u00e7\u00e3o de luz. Este determina a irradi\u00e2ncia de P.A.R. capaz de equilibrar as taxas de CO_2 emitidas pela respira\u00e7\u00e3o mitocondrial com aquelas absorvidas pela fotoss\u00edntese. Em plantas de sol, o ponto de compensa\u00e7\u00e3o de luz tende a ser obtido com 10 a $20 \mu\text{mol de f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, enquanto que para plantas de sombra, ele fica entre 1 a $5 \mu\text{mol de f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$

(TAIZ; ZEIGER; 2013). Uma vez que, para a construção da curva de resposta fotossintética à luz foram utilizadas irradiâncias de P.A.R. superiores a 50 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, não foi possível determinar com exatidão o ponto de compensação da luz da teca. Assim, foram utilizados os valores iniciais de variação da taxa fotossintética para a confecção de um gráfico com tendência linear, onde a reta ($R^2 = 0,92$), ao cruzar o eixo X (irradiância da P.A.R.), indicou o valor estimado do ponto de compensação de luz como sendo $\Gamma = 8,26 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Este valor do ponto de compensação de luz é inferior ao relatado para citros e amendoim, onde giram em torno de 12 a 50 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (ERISMANN; MACHADO; GODOY, 2006; HABERMANN et al., 2003; MACHADO et al., 2005). Através da equação da reta, foi obtida também a eficiência quântica aparente de $\Phi = 0,0672 \mu\text{mol}$ de $\text{CO}_2 \times \mu\text{mol}$ de fótons $^{-1}$; pelo inverso deste valor é possível estabelecer que a incorporação de 1 μmol de CO_2 necessita de 14,8 μmol s de fótons. Com isto, a teca mostrou uma eficiência quântica semelhante a de várias espécies como *Pilea microphylla* ($\Phi = 0,065$), *Araucaria heterophylla* ($\Phi = 0,079$), *Citrus* spp. ($\Phi = 0,03$ a $\Phi = 0,05$), *Picea abies* ($\Phi = 0,084$), *Betula pendula* ($\Phi = 0,09$) e *Ginkgo biloba* ($\Phi = 0,092$), sendo uma média para as plantas C_3 de $\Phi = 0,0891 \pm 0,0009$ (BJÖRKMAN; DEMMING, 1987; LONG et al., 1993).

Foram escolhidos 3 valores de P.A.R. para a realização das medições posteriores, visando obter o perfil fisiológico mais significativo e abrangente possível. Assim, as leituras para o experimento de estresse hídrico foram realizadas a 1000 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (ou 869 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ na folha, correspondendo a fase de saturação de luz), 1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (ou 1217 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ na folha, atribuída ao pico máximo da taxa fotossintética), e 1800 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (ou 1565 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ na folha, correspondendo ao segundo pico da taxa fotossintética).

Os valores brutos deste experimento podem ser consultados no Anexo I.

4.3.4 Experimento de Estresse por Déficit Hídrico

Durante o experimento foi gerada uma grande quantidade de informação, a qual será apresentada nas próximas seções na forma de gráficos. Contudo, como esta forma de apresentação reduz a acurácia da leitura dos valores e pode induzir a

erro de interpretação, os valores também estão apresentados na forma de tabelas, disponíveis para consulta nos Anexos J, K e L.

4.3.4.1 Avaliação da Taxa Fotossintética

A taxa fotossintética das plantas submetidas ao estresse hídrico moderado foi cerca de 58,07% menor do que aquela das plantas controle. Para as plantas em estresse hídrico severo, a queda foi ainda maior, de 70,21%. Em relação à P.A.R., a taxa fotossintética que mais diminuiu foi a obtida na irradiância de 1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, caindo em média 63,02% e 74,2% em relação ao tratamento controle, para os tratamentos de estresse moderado e severo, respectivamente.

Uma vez que os valores não seguem distribuição normal, o valor da mediana é preferível para tornar as análises mais confiáveis, pois leva em consideração toda a variabilidade dos dados. Através dos gráficos das figuras 43 e 44, é possível visualizar o comportamento da taxa fotossintética para todos os tratamentos. Na figura 43, observa-se que o comportamento do valor médio sempre permaneceu próximo ao valor mediano, permitindo assim com que a média, e seu respectivo erro padrão, possam ser observados como uma redução dos valores do experimento (Figura 44).

Os dados não apresentaram homogeneidade das variâncias, o que exigiu que a análise estatística da variância fosse feita tanto pelo teste F, quanto pelo método de Kruskal-Wallis (Tabela 13).

A análise da variância mostrou que houve diferença estatística significativa entre os tratamentos ($p < 0,0001$) para ambos os testes aplicados e, pelo contraste de médias, foi possível separar as leituras em dois grupos: o grupo das plantas sem estresse hídrico (grupo “Controle”, ou tratamentos T1, T2 e T3), e o grupo das plantas com estresse hídrico (grupos “Moderado” e “Severo”, ou tratamentos T4 a T9). No primeiro grupo não houve diferença de médias pelos testes de Tukey e de Dunn, entretanto, houve diferença entre a irradiância mais baixa (1000 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$) com a irradiância mediana (1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$) pelos testes t e SNK. Em outra mão, o segundo grupo mostrou diferenças principalmente para os tratamentos de estresse “Severo” nas irradiâncias de 1000 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (T7) e 1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (T8) contra o tratamento de estresse “Moderado” na irradiância de 1800 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ (T6). Os tratamentos de estresse T4,

T5 e T9 não diferiram dos outros tratamentos de estresse, apresentando um comportamento mediano da taxa fotossintética.

Figura 43 - Gráfico da variação da taxa fotossintética entre os tratamentos

Figura 44 - Gráfico da taxa fotossintética média para as leituras dos tratamentos. As barras representam o erro padrão da média

Tabela 13 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da taxa fotossintética

HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS					
Bartlett		X ² = 155,73 **		P < 0,01	
NORMALIDADE DOS DADOS					
Kolmogorov-Smirnov		D = 0,1207 **		P < 0,01	
Cramér-von Mises		ω ² = 2,2707 **		P < 0,01	
Anderson-Darling		A ² = 13,2993 **		P < 0,01	
Kuiper		V = 0,2334 **		P < 0,01	
Watson		U ² = 1,8620 **		P < 0,01	
Lilliefors		D = 0,1189 **		P < 0,01	
Shapiro-Wilk		W = 0,8829 **		P < 0,01	
ANÁLISE DA VARIÂNCIA					
ANOVA (F)		F = 47,4728 **		P < 0,0001	
Kruskal-Wallis		H = 224,1199 **		P < 0,0001	
CONTRASTE DE MÉDIAS					
Déficit Hídrico + Irradiância ¹	Média ²	Tukey	t	Dunn	SNK
T1 - Controle + 1000	7,3960	a	a	a	a
T2 - Controle + 1400	8,6942	a	b	a	b
T3 - Controle + 1800	8,1719	a	ab	a	ab
T4 - Moderado + 1000	3,1297	b	cd	b	cd
T5 - Moderado + 1400	3,2766	b	cd	b	cd
T6 - Moderado + 1800	3,7648	b	c	b	c
T7 - Severo + 1000	2,2718	b	d	b	d
T8 - Severo + 1400	2,1973	b	d	b	d
T9 - Severo + 1800	2,6046	b	cd	b	cd

¹ Valor da irradiância em μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ² Valor da média em $\mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ^{**} Nível de significância $\alpha = 0,01$

O valor da fotossíntese máxima (A_{max}) anteriormente citado (Figura 42) foi semelhante ao alcançado para a irradiância de $1400 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ em plantas controle, obtendo-se $21,53 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Figura 43). Entretanto, o comportamento da taxa fotossintética nestas plantas foi bastante amplo, atingindo o valor de $29,86 \mu\text{mol CO}_2 \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ na irradiância de $1000 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$, e o

valor mínimo de 0 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ nas irradiâncias de 1000 e 1800 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$; estes últimos podem indicar tanto valores atípicos, quanto erros de leitura do aparelho. No entanto, através dos valores médios, a irradiância de 1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ mostrou a maior taxa fotossintética, de 8,69 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; a maior irradiância mostrou um comportamento mediano dentre as três, atingindo 8,14 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Estes valores são próximos aos estudos de Oliveira et al. (2002), onde foi obtido o valor médio de 10,1 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth), e superiores aos encontrados por Sanches (2012), onde a fotossíntese máxima de pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) atingiu 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, ambos sob tratamento sem déficit hídrico.

Para os tratamentos de estresse hídrico houve uma amplitude muito menor na variação dos valores (Figura 43), sendo que a taxa fotossintética atingiu o valor máximo de 10,41 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na irradiância de 1800 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ entre os tratamentos de estresse hídrico “Moderado”, e 8,88 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ na irradiância de 1000 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ para o estresse hídrico “Severo”. Pela análise do valor médio da taxa fotossintética, a tendência foi a de que as irradiâncias maiores (1800 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) exibissem os maiores valores, sendo 3,73 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ e 2,64 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ os valores encontrados para os tratamentos de estresse “Moderado” e “Severo”, respectivamente. Por meio da análise estatística, foi observado que a taxa fotossintética obtida em plantas do tratamento T6 foi superior àquelas dos tratamentos T7 e T8, muito embora, não foi observada diferença significativa dentro dos diferentes tratamentos de déficit hídrico. Pelo contraste de médias com teste SNK, observa-se ainda que o tratamento T4 também diferiu dos tratamentos T7 e T8, além dos tratamentos “Controle” (T1, T2 e T3), o que indica que na irradiância de 1000 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, tomada aqui como aquela que promove a saturação da taxa fotossintética, houve diminuição significativa da fotossíntese por conta do conteúdo de água reduzido no solo. Por outro lado, a irradiância de 1400 μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, tomada como aquela que produz a fotossíntese máxima, não mostrou diferença significativa dentro dos tratamentos de estresse hídrico, apenas entre estes e o tratamento controle, indicando que o estresse hídrico afeta tanto a saturação da fotossíntese, como também sua capacidade de atingir o valor máximo, contudo, não afeta esta capacidade entre diferentes intensidades de estresse.

Uma vez que a intensidade de $1400 \mu\text{mol de f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ corresponde ao pico m\u00e1ximo da taxa fotossint\u00e9tica, observa-se que o metabolismo energ\u00e9tico das plantas foi alterado por conta do estresse h\u00eddrico e acarretou em uma redu\u00e7\u00e3o na taxa fotossint\u00e9tica (TAIZ; ZEIGER, 2008). Pelo mesmo motivo, a irradi\u00e2ncia de $1800 \mu\text{mol de f\u00f3tons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ pode ter agravado a capacidade fotossint\u00e9tica, j\u00e1 reduzida por conta do estresse h\u00eddrico severo, levando ent\u00e3o \u00e0 fotoinibi\u00e7\u00e3o dos fotossistemas por conta do excesso de f\u00f3tons incidentes (BAKER, 1993; TAIZ; ZEIGER, 2008).

A satura\u00e7\u00e3o da fotoss\u00edntese em plantas C_3 depende principalmente da disponibilidade de luz solar, a qual \u00e9 captada e transformada em energia qu\u00edmica pelos fotossistemas I e II, mediante uma cadeia transportadora de el\u00e9trons na membrana dos tilac\u00f3ides do cloroplasto, e depende inicialmente da oxida\u00e7\u00e3o de mol\u00e9culas de \u00e1gua pelo Complexo de Evolu\u00e7\u00e3o de Oxig\u00eanio (CEO) gerando $\text{O}_2 + \text{H}^+ + \text{e}^-$ (TAIZ; ZEIGER, 2008).

A fotoinibi\u00e7\u00e3o \u00e9 um fen\u00f4meno comum em plantas sob estresse ambiental, podendo ser causada tanto pelo estresse por d\u00e9ficit h\u00eddrico, quanto por altas e baixas temperaturas e estresse salino (ADIR et al., 2003; MURATA et al., 2007). A inibi\u00e7\u00e3o da fotoss\u00edntese por conta do excesso de f\u00f3tons incidentes leva \u00e0 dissipac\u00e3o do excesso de energia luminosa capturada atrav\u00e9s de sua convers\u00e3o em energia t\u00e9rmica (calor); mol\u00e9culas de \u00e1gua naturalmente absorvem este calor e convertem-se \u00e0 forma gasosa, a qual \u00e9 liberada pelo poro estom\u00e1tico e assim ajuda a regular a temperatura foliar (TAIZ; ZEIGER, 2008). As plantas em estresse h\u00eddrico tendem a acumular solutos org\u00e2nicos para reduzir o potencial h\u00eddrico da \u00e1gua, assim, as mol\u00e9culas de \u00e1gua presentes necessitam absorver uma quantidade muito maior de energia para uma regula\u00e7\u00e3o efetiva da temperatura. Em \u00faltimo caso, a dissipac\u00e3o do excesso de f\u00f3tons acaba sendo realizada por uma via t\u00f3xica, gerando a forma\u00e7\u00e3o de esp\u00e9cies reativas de oxig\u00eanio (ROS; O_2^- , $^1\text{O}_2^*$, H_2O_2 ou $\bullet\text{OH}$), as quais causam danos celulares, sendo primeiramente aquele que atinge a prote\u00edna D1, localizada no interior do fotossistema II, e assim impede a captura de f\u00f3tons, induzindo a fotoinibi\u00e7\u00e3o (ASADA, 1999; TAIZ; ZEIGER, 2008).

A prote\u00edna D1 localiza-se no cerne do fotossistema II, formando um heterod\u00edmero com a prote\u00edna D2, o qual se liga a 4 mol\u00e9culas de clorofila α e duas mol\u00e9culas de feofitina (DWIVEDI; BHARDWAJ, 1995). As prote\u00ednas D1 e D2 se unem atrav\u00e9s de um \u00e1tomo de Ferro e duas pontes de histidina, sendo este ponto o s\u00edtio de acoplamento da plastoquinona, a mol\u00e9cula que ir\u00e1 transferir o poder redutor

do fotossistema II até o citocromo *b₆f*, durante a transferência de elétrons pela membrana do tilacóide (TAIZ; ZEIGER, 2008; DWIVEDI; BHARDWAJ, 1995). A proteína D1 é codificada pelo gene *psbA*, o qual é fortemente conservado entre as espécies (> 90%) e está situado no genoma do cloroplasto (TRIVEDI; NATH; SANE, 1994). A síntese da D1 é ativada por luz, enquanto que sua inibição ocorre a nível pós-transcricional por conta de altas concentrações de ROS no cloroplasto (MURATA, et al., 2007; TAKAHASHI; MURATA, 2008). A fixação de CO₂ pelo ciclo de Calvin (fase bioquímica da fotossíntese) pode regular a geração de ROS, uma vez que o consumo de ATP e NADPH impede o uso de elétrons para a formação de ROS: caso a taxa de fixação de CO₂ reduza, uma limitação no uso de NADPH pode gerar seu acúmulo, o que leva à indisponibilização de NADP⁺ como aceptor de elétrons no fotossistema I, guiando, portanto, os elétrons da cadeia transportadora para a produção de H₂O₂ (TAKAHASHI; MURATA, 2008).

O excesso de fótons pode provocar uma alteração conformacional no sítio da plastoquinona localizado na proteína D1 (DWIVEDI; BHARDWAJ, 1995; JANSEN; MATTOO; EDELMAN, 1999). Esta alteração impede que a plastoquinona possa se ligar ao sítio e então ser reduzida, levando a um acúmulo de plastoquinona na membrana do tilacóide. A alteração sofrida pela D1 é prontamente identificada por proteases, as quais digerem a D1 e desativam o fotossistema II (DWIVEDI; BHARDWAJ, 1995). A proteína D1 encontra-se naturalmente fosforilada em sua forma ativa; Kato e Sakamoto (2014) mostraram que existe uma relação de dependência entre a fosforilação da proteína D1 e seu *turnover*, indicando que as proteases que digerem a D1 danificada podem também digerir a D1 íntegra, desde que ela não esteja fosforilada. Wittenberg et al. (2014) demonstrou que a inibição de uma dissulfeto isomerase (PDI), responsável por regular a montagem da D1 após a tradução do *psbA* mRNA, leva a uma redução da fotoinibição e maior produção de D1 sob alta irradiância de fótons.

Um segundo momento da análise da taxa fotossintética foi a observação do seu comportamento individualizado tanto pela irradiância da P.A.R., quanto pelos tratamentos de estresse hídrico (Figura 45).

Figura 45 - Gráficos da variação da taxa fotossintética de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico. A: Gráfico da variação da taxa fotossintética bruta em função da irradiância da P.A.R.; B: Gráfico da taxa fotossintética média de acordo com a irradiância da P.A.R.; C: Gráfico da variação da taxa fotossintética bruta em função do tratamento de estresse hídrico; D: Gráfico da taxa fotossintética média de acordo com o tratamento de estresse hídrico. As barras representam o erro padrão da média

A análise estatística dos dados da taxa fotossintética ordenados por irradiância (tratamentos I1, I2 e I3) não mostrou haver diferença significativa, entretanto, observa-se uma tendência ascendente de aumento da taxa fotossintética conforme ocorre o aumento da irradiância. A distribuição dos valores brutos de fotossíntese mostrou uma grande variação dentro de todas as irradiâncias, atingindo o valor máximo de $29,86 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ no tratamento I1. Observando-se o valor médio, nota-se que houve uma diferença de cerca de 11% entre a irradiância menor e a maior, sendo 9% entre I1 e I2, e 2% entre I2 e I3.

Por outro lado, o comportamento da fotossíntese ordenado por tratamento de déficit hídrico (tratamentos S1, S2 e S3) mostrou diferença estatística significativa, sendo que os três tratamentos diferiram entre si em todos os testes de contraste de médias; além disto, pelo teste de Dunnett, ambos os tratamentos de estresse hídrico S2 e S3 diferiram do tratamento “Controle” S1 com $p < 0,01$.

Embora os valores da taxa fotossintética tenham sido amplos para o tratamento S1, uma variação muito menor pode ser observada para os tratamentos S2 e S3. A tendência decrescente na taxa fotossintética pode ser visualizada através da figura 45d, onde a queda na fotossíntese foi de 58,3% entre os tratamentos S1 e S2, 29,3% entre S2 e S3, e cerca de 70,5% entre S1 e S3.

4.3.4.2 Avaliação da Taxa Transpiratória e Condutância Estomática

A transpiração foliar (E) é uma medida direta da condutância estomática (g_s), uma vez que, quando maior for a dilatação do poro estomático, maior poderá ser o escape de água na forma de vapor através deste. Por conta disto, a taxa transpiratória e a condutância estomática serão analisadas juntas.

Assim como para a fotossíntese, a taxa transpiratória e a condutância estomática das plantas submetidas aos tratamentos de estresse hídrico variaram bastante. Para o estresse hídrico “Moderado”, a transpiração foi cerca de 64,79% menor do que aquela das plantas controle, enquanto que para o estresse hídrico “Severo”, a redução foi de 76,56%. Para a condutância estomática, os tratamentos de estresse “Moderado” reduziram cerca de 74,78%

em relação ao Controle, e para o estresse “Severo”, houve queda de 84,34%. Portanto, de forma geral, as variações na condutância estomática foram mais intensas do que para a taxa transpiratória.

A respeito da densidade de fótons, para ambos os tratamentos de estresse “Moderado” e “Severo”, a taxa transpiratória e a condutância estomática que mais diminuíram foram aquelas obtidas à irradiância de 1400 $\mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, reduzindo em média 67,48% e 78,48% da taxa transpiratória, bem como 76,23% e 86,06% da condutância estomática, respectivamente, em relação ao tratamento controle (Figuras 47 e 49).

Pela distribuição dos dados, os maiores valores para a taxa transpiratória e condutância estomática foram encontrados para tratamento T3 (Controle + 1800 $\mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), sendo 8,55 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para transpiração e 0,41 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para condutância estomática. O tratamento T3 ainda obteve os maiores valores medianos, com 4,23 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para transpiração e 0,11 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para condutância estomática; e os maiores valores médios, com 4,53 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para transpiração e 0,133 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ para condutância estomática (Figuras 46 e 48).

Os menores valores de taxa transpiratória foram observados para todos os tratamentos de estresse “Severo” (T7, T8 e T9), onde foi encontrada transpiração nula. A condutância estomática mínima também foi nula nestes tratamentos, e adicionalmente nos tratamentos T1, T4, T5 e T6. Além disto, os menores valores medianos e médios para taxa transpiratória estiveram no tratamento T7, sendo 0,74 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ o valor mediano, e 0,79 $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ o valor médio. Enquanto isto, a condutância estomática mediana de menor valor foi observada nos tratamentos T7 e T8, sendo de 0,01 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, e o menor valor médio coincidiu com a taxa transpiratória, sendo observado no tratamento T7 com o valor de 0,015 $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Da mesma forma que os dados de taxa fotossintética, os valores da taxa transpiratória e condutância estomática também não obedeceram a distribuição normal e não apresentaram homogeneidade de variâncias, todavia indicaram diferença estatística significativa pela análise da variância com os testes F e de Kruskal-Wallis $p < 0,0001$ (Tabelas 14 e 15).

Figura 46 - Gráfico da variação da taxa transpiratória entre os tratamentos

Figura 47 - Gráfico da taxa transpiratória média para as leituras dos tratamentos. As barras representam o erro padrão da média

Figura 48 - Gráfico da variação da condutância estomática entre os tratamentos

Figura 49 - Gráfico da condutância estomática média para as leituras dos tratamentos. As barras representam o erro padrão da média

Tabela 15 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da condutância estomática

HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS					
Bartlett		$X^2 = 399,466^{**}$		$P < 0,01$	
NORMALIDADE DOS DADOS					
Kolmogorov-Smirnov		$D = 0,2038^{**}$		$P < 0,01$	
Cramér-von Mises		$\omega^2 = 6,4648^{**}$		$P < 0,01$	
Anderson-Darling		$A^2 = 35,7233^{**}$		$P < 0,01$	
Kuiper		$V = 0,40^{**}$		$P < 0,01$	
Watson		$U^2 = 5,4938^{**}$		$P < 0,01$	
Lilliefors		$D = 0,2038^{**}$		$P < 0,01$	
Shapiro-Wilk		$W = 0,7832^{**}$		$P < 0,01$	
ANÁLISE DA VARIÂNCIA					
ANOVA (F)		$F = 62,99^{**}$		$P < 0,0001$	
Kruskal-Wallis		$H = 280,63^{**}$		$P < 0,0001$	
CONTRASTE DE MÉDIAS					
Déficit Hídrico + Irradiância ¹	Média ²	Tukey	t	Dunn	SNK
T1 - Controle + 1000	0,090	a	a	a	a
T2 - Controle + 1400	0,122	b	b	a	b
T3 - Controle + 1800	0,133	b	b	a	b
T4 - Moderado + 1000	0,024	c	cd	b	c e
T5 - Moderado + 1400	0,029	c	cd	b	c e
T6 - Moderado + 1800	0,036	c	c	b	c
T7 - Severo + 1000	0,015	c	d	b	d
T8 - Severo + 1400	0,017	c	cd	b	de
T9 - Severo + 1800	0,023	c	cd	b	cd

¹ Valor da irradiância em μmol de fótons $\text{s}^{-1} \text{m}^{-2}$ ² Valor da média em $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ^{**} Nível de significância $\alpha = 0,01$

O contraste de médias da taxa transpiratória destacou a diferença dos valores dos tratamentos Controle contra os tratamentos de estresse hídrico, tendo o tratamento T1 diferido de todos os demais pelos testes de Tukey, t e SNK, mas não diferiu do tratamento T2 pelo teste de Dunn. Tal diferença mostrou que a irradiância teve papel crucial no aumento da taxa transpiratória,

e este evento pode estar relacionado com o aumento da dissipação do excesso de fótons pela absorção de sua energia por moléculas de água, as quais são vaporizadas e intensamente liberadas pelo estômato, promovendo assim o arrefecimento do mesofilo foliar (TAIZ; ZEIGER, 2008).

A condutância estomática mostrou um contraste de médias semelhante ao da taxa transpiratória, onde o tratamento T1 também diferiu de todos os demais, exceto pelo teste de Dunn. Neste caso, o contexto biológico está relacionado à abertura progressiva do estômato mediante o aumento da iluminação (PIMENTA, 2008).

Dentro dos tratamentos de estresse hídrico, a transpiração do tratamento T6 diferiu daquela dos tratamentos T7 e T8 pelo teste de Tukey, e adicionalmente àquelas dos tratamentos T4 e T9 pelo teste t; pelo teste de Dunn, houve apenas a diferença do tratamento T6 contra o tratamento T7. Uma vez que o tratamento T6 está sob influência de alta irradiância ($1800 \mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), a tendência de aumento da transpiração se repete, e desta forma contrasta diretamente contra o tratamento T4 por este estar sob uma irradiância amena ($1000 \mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), e também contra os tratamentos de estresse “Severo”, tanto por estes estarem com o conteúdo de água foliar restrito, quanto por conta do fenômeno de fechamento estomático que se manifesta em decorrência do estresse hídrico (PIMENTA, 2008; SCHULZE, 1993). Na mesma situação, o comportamento da condutância estomática, foi mais atenuado, indicando contraste do tratamento T6 contra os tratamentos T7 (pelo teste t e SNK) e T8 (apenas pelo teste SNK). Pelos testes de Tukey e de Dunn, houve contraste da condutância estomática apenas entre o grupo de tratamentos Controle contra os grupos de tratamentos de estresse.

Os tratamentos de estresse “Moderado” não diferiram entre si quanto à taxa transpiratória pelo teste SNK, da mesma maneira que os tratamentos de estresse “Severo”; no entanto, por este mesmo teste estatístico, os dois grupos de estresse diferiram entre si. Com relação à condutância estomática, entretanto, não foi observado o mesmo contraste.

Ao se observar em detalhe a variação da transpiração e da condutância estomática sob o efeito separado dos tratamentos de estresse hídrico ou da irradiância (Figuras 50 e 51), é possível observar que tais parâmetros variam conforme as variações ambientais. Quanto mais severo o nível de estresse

hídrico, menores foram os valores da transpiração e condutância estomática, havendo diferença significativa. Pelo contraste de médias, os três tratamentos de estresse hídrico diferiram entre si ($p = 0,01$) quanto a taxa transpiratória e condutância estomática. Adicionalmente, pelo teste de Dunnett, ocorreu também a diferença estatística entre os tratamentos de estresse hídrico “Moderado” e “Severo” contra o tratamento “Controle”.

Houve uma tendência de incremento nos valores de transpiração e condutância estomática conforme maior fosse a irradiância aplicada (Figuras 50b e 51b), a qual também mostrou diferença estatística significativa, tanto entre a irradiância menor ($1000 \mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) e a maior ($1800 \mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$), quanto entre a menor e as duas posteriores ($1400 \mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ e $1800 \mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$).

As variações observadas na taxa transpiratória e na condutância estomática são ocasionadas principalmente pelo fechamento dos estômatos. Os estômatos são estruturas localizadas nas folhas com a capacidade de estabelecer comunicação e trocas gasosas entre o mesófilo foliar e o meio ambiente, sendo constituídos por duas células-guarda, células subsidiárias e ostíolo (fenda ou poro estomático) (ALQUINI et al., 2006).

O fechamento estomático é um fenômeno que pode ocorrer por diversos fatores, como pela falta de luz, excesso de CO_2 atmosférico, baixa umidade relativa do ar, alta temperatura, carência nutricional, doenças ou estresse hídrico; este último tem sido mais estudado por conta das limitações que implica na produção de cultivos agrícolas (KLAR, 1984). Brodribb e Holbrook (2003) mostram que o fechamento estomático durante o processo de desidratação foliar é função, primeiramente, da queda na condutividade hidráulica, a qual está relacionada ao potencial hídrico da folha.

Sanches (2012) observou uma forte redução na taxa transpiratória, fotossíntese e condutância estomática em plantas de *Bauhinia forficata* Link submetidas a tratamentos de redução do turno de rega e onde foram tomadas leituras a diferentes intensidades de irradiância de fótons. Em conjunto, o mesmo autor notou redução na área foliar e no desenvolvimento das plantas submetidas ao turno de rega mais demorado (15 dias sem rega).

O comportamento dos resultados da taxa transpiratória e da condutância estomática estão de acordo com aqueles obtidos para teca por Rajendrudu e

Naidu (1997). Estes pesquisadores observaram uma queda significativa na transpiração, condutância estomática e fotossíntese em árvores submetidas ao estresse hídrico; contudo, os valores eram completamente restabelecidos após um turno de irrigação. Além disto, foi observada uma redução de 40% no crescimento das plantas sob estresse. Com isto, é possível deduzir que a teca é uma espécie tolerante ao estresse hídrico, e que plantios devem ser evitados em regiões com histórico de estiagens prolongadas, sob o risco de baixas taxas de crescimento da planta e quebra na produtividade.

O contraste do desenvolvimento das plantas submetidas aos tratamentos de estresse hídrico pode ser observado pelas figuras 52, 53 e 54. As plantas submetidas ao estresse hídrico severo tiveram uma redução no desenvolvimento muito mais intensa do que aquelas submetidas ao estresse hídrico moderado. Além disto, é possível observar a perda no vigor de crescimento e na turgescência foliar das plantas submetidas aos tratamentos de estresse contra as plantas do tratamento Controle (Figura 54).

Figura 50 - Gráficos da variação da taxa transpiratória de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico. A: Gráfico da variação da taxa transpiratória bruta em função da irradiância da P.A.R.; B: Gráfico da taxa transpiratória média de acordo com a irradiância da P.A.R.; C: Gráfico da variação da taxa transpiratória bruta em função do tratamento de estresse hídrico; D: Gráfico da taxa transpiratória média de acordo com o tratamento de estresse hídrico. As barras representam o erro padrão da média

Figura 51 - Gráficos da variação da condutância estomática de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico. A: Gráfico da variação da condutância estomática bruta em função da irradiância da P.A.R.; B: Gráfico da condutância estomática média de acordo com a irradiância da P.A.R.; C: Gráfico da variação da condutância estomática bruta em função do tratamento de estresse hídrico; D: Gráfico da condutância estomática média de acordo com o tratamento de estresse hídrico. As barras representam o erro padrão da média

Figura 52 - Plantas de teca submetidas aos tratamentos de estresse hídrico aos 20 dias. Plantas Controle, esquerda; Plantas sob estresse por déficit hídrico moderado, direita

Figura 53 - Plantas de teca submetidas aos tratamentos de estresse hídrico aos 30 dias. Plantas Controle à esquerda; plantas sob estresse por déficit hídrico severo à direita

Figura 54 - Contraste dos extremos de observação das plantas de teca submetidas aos tratamentos de estresse hídrico aos 30 dias. A: planta submetida ao estresse hídrico severo; B: planta sob tratamento controle

4.3.4.3 Temperatura Foliar

A temperatura foliar mostrou uma variação contida entre 30,2°C (T1) e 43,9°C (T6), acompanhando assim a temperatura registrada na câmara de medição do IRGA, e mostrando alguns valores superiores às temperaturas observadas no posto meteorológico da ESALQ (Figuras 38, 55 e 56).

Embora seja observado um aumento na temperatura média da folha conforme ocorre o aumento da irradiância da P.A.R., deve-se notar que além dos valores obtidos serem muito próximos entre si, também os erros padrão das médias muitas vezes se sobrepõem (Figuras 56 e 57b).

Para os valores de temperatura foliar houve homogeneidade das variâncias, enquanto que o pressuposto da normalidade dos dados continuou não sendo atendido (Tabela 16). Pela análise estatística da variância, os tratamentos diferiram entre si tanto pelo teste F ($p < 0,05$), quanto pelo teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). O contraste de médias por Tukey e por Dunn não mostrou evidências de haver diferença entre os tratamentos, enquanto que os testes t e SNK indicaram principalmente a diferença das médias entre os tratamentos realizados a 1800 $\mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (T3 e T9) contra todos aqueles realizados a 1000 $\mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ (T1, T4 e T7). Esta diferença se manteve quando os valores de temperatura foliar foram analisados apenas em função da irradiância (figura 57b); neste caso, o teste de Tukey mostrou haver diferença entre a irradiância de 1000 $\mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ contra as demais.

A participação do efeito do estresse hídrico nos valores de temperatura foliar foi discreta, sendo que tanto não houve diferença estatística entre os tratamentos, quanto os valores médios estiveram contidos sob uma amplitude de apenas 0,3°C (Controle = $37,26 \pm 0,2459^\circ\text{C}$; Moderado = $37,14 \pm 0,3444^\circ\text{C}$; Severo = $37,0 \pm 0,2195^\circ\text{C}$) (Figura 57d). Em oliveiras (*Olea europaea* L.), Çamoğlu (2013) encontrou valores crescentes de temperatura foliar à medida que o estresse hídrico tornava-se mais severo; aliado a este fato, ele observou que o fechamento estomático das folhas e a redução na transpiração também se agravavam com o aumento da temperatura. Por outro lado, a redução no metabolismo energético das plantas submetidas ao estresse hídrico pode acarretar em uma alteração na dissipação de energia sob a forma de calor, e

com isto, tais plantas podem apresentar uma redução sutil na temperatura foliar. Este comportamento, no entanto, difere daquele das plantas termogênicas, onde o metabolismo respiratório é o responsável por elevar a temperatura da planta (geralmente, em inflorescências) acima da temperatura do ar (JONES; LEINONEN, 2003; KÜCHMEISTER et al., 1998; KNUTSON, 1977).

As plantas possuem uma faixa térmica de cerca de 10°C que proporciona o seu crescimento e desenvolvimento ótimos; a exposição prolongada a temperaturas extremas, como aquelas acima de 45°C, oferece desde o risco de lesão nos tecidos por desnaturação protéica e rompimento de membranas, a até mesmo a morte do indivíduo, caracterizando o estresse térmico (TAIZ; ZEIGER, 2008).

O estresse térmico inibe diretamente a fotossíntese e a respiração dos vegetais, sendo a primeira mais prejudicada do que a segunda. Isto ocorre tanto por conta da instabilidade causada nas proteínas do cloroplasto, quanto por causa da difusão do CO₂ no interior dos tecidos, a qual diminui conforme aumenta a temperatura (WEISS, 1981). Embora a Rubisco seja, até certo ponto, estável em altas temperaturas, a Rubisco ativase torna-se instável logo no início do estresse térmico (FELLER et al., 1998). A redução na carboxilação leva à produção de H₂O₂, o qual irá atuar tanto no fechamento estomático, quando no *turnover* da proteína D1 do fotossistema II, conforme mencionado anteriormente. Por conta disto, observa-se que o aumento da temperatura foliar também implica em fotoinibição.

O aumento da temperatura foliar também causa o aumento no teor de moléculas de sinalização com a função de aumentar a capacidade antioxidante da célula (WAHID et al., 2007). A expressão de *Heat Shock Proteins* (HSP) é uma estratégia para a adaptação a altas temperaturas, uma vez que estas proteínas auxiliam a montagem de outras proteínas e oferecem proteção contra a desnaturação (VIERLING et al., 1991). Plantas de regiões áridas e semi-áridas podem acumular grandes quantidades de HSPs (WAHID et al., 2007).

Figura 55 - Gráfico da variação da temperatura foliar entre os tratamentos

Figura 56 - Gráfico da temperatura foliar média para as leituras dos tratamentos. As barras representam o erro padrão da média

Figura 57 - Gráficos da variação da temperatura foliar de acordo com a irradiância da P.A.R. e com o tratamento de estresse hídrico. A: Gráfico da variação da temperatura foliar bruta em função da irradiância da P.A.R.; B: Gráfico da temperatura foliar média de acordo com a irradiância da P.A.R.; C: Gráfico da variação da temperatura foliar bruta em função do tratamento de estresse hídrico; D: Gráfico da temperatura foliar média de acordo com o tratamento de estresse hídrico. As barras representam o erro padrão da média

Tabela 16 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da temperatura foliar

HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS					
Bartlett		X ² = 12.59 ^{ns}		P > 0,05	
NORMALIDADE DOS DADOS					
Kolmogorov-Smirnov		D = 0,1465 **		P < 0,01	
Cramér-von Mises		ω ² = 2,4455 **		P < 0,01	
Anderson-Darling		A ² = 14,6137 **		P < 0,01	
Kuiper		V = 0,2566 **		P < 0,01	
Watson		U ² = 2,4310 **		P < 0,01	
Lilliefors		D = 0,1465 **		P < 0,01	
Shapiro-Wilk		W = 0,9311 **		P < 0,01	
ANÁLISE DA VARIÂNCIA					
ANOVA		F = 2,1957 *		P = 0,0261	
Kruskal-Wallis		H = 19,6015 *		P = 0,0120	
CONTRASTE DE MÉDIAS					
Déficif Hídrico + Irradiância ¹	Média ²	Tukey	t	Dunn	SNK
Controle + 1000	36,60	a	b de	a	a c
Controle + 1400	37,66	a	abcd	a	ab
Controle + 1800	38,09	a	a	a	b
Moderado + 1000	36,68	a	bcde	a	a c
Moderado + 1400	37,39	a	abcde	a	abc
Moderado + 1800	37,98	a	ab	a	ab
Severo + 1000	36,34	a	e	a	c
Severo + 1400	37,42	a	abcde	a	abc
Severo + 1800	37,78	a	abc	a	b

¹ Valor da irradiância em $\mu\text{mol de fótons s}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ² Valor da média em °C* Nível de significância $\alpha = 0,05$ ** Nível de significância $\alpha = 0,01$

4.3.4.4 Conteúdo Relativo de Água (CRA)

O conteúdo relativo de água (CRA) nas folhas das plantas que não sofreram estresse hídrico foi o que mais variou, indo de 58,46% a 81,96%, com média $72,62 \pm 1,87\%$. O CRA das plantas controle foi 11% menor do que aquele das plantas submetidas ao estresse hídrico “Moderado”, o qual obteve valor médio de $81,6 \pm 0,47\%$. As plantas sob estresse hídrico “Severo” tiveram os menores valores de CRA, sendo o mínimo de 52,07%, máximo de 78,51% e média $63,05 \pm 1,96\%$. Houve uma diferença de 13,17% entre os valores do CRA das plantas controle e sob estresse “Severo”. As variações do CRA podem ser observadas na Figura 58.

Figura 58 - Conteúdo Relativo de Água, em valores médios, para as diferentes categorias de estresse hídrico. As barras representam o erro padrão da média ($n = 15$)

A análise estatística dos valores de CRA mostrou tanto a ausência de homogeneidade de variâncias, quanto de normalidade dos dados; devido a isto, a análise da variância foi realizada pelos testes F e de Kruskal-Wallis, apresentando diferença significativa para ambos (Tabela 17). Pelo contraste de médias, todos os tratamentos diferiram entre si pelos testes de Tukey, t e SNK; pelo teste de Dunn, não houve diferença estatística entre o tratamento “Controle” e o tratamento “Severo”; por Dunnett, ambos os tratamentos diferiram do tratamento Controle.

Husen (2010) verificou que árvores de teca com suspensão de rega de 20 dias mostraram uma redução de cerca de 50% no CRA em relação às árvores com

plena disponibilidade de água; este valor foi rapidamente recuperado após um turno de rega. Em seedlings de seringueira, houve uma queda de 20% do CRA após 9 dias sem rega, quando comparado ao tratamento controle (com rega); esta queda no CRA foi positivamente correlacionada ao aumento de malondialdeído (MDA), o qual é um produto tóxico da peroxidação de lipídeos da célula e, por sua vez, se correlacionada positivamente com o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS)(WANG, 2014).

Em híbridos de *Populus deltoides* x *Populus nigra*, Guo, Zhang e Huang (2010) mostraram haver uma variação significativa do CRA entre clones submetidos a 30% da água da capacidade de campo, e aqueles submetidos a 40 e 50% da capacidade de campo. Além disto, foi observada queda no vigor de crescimento e aumento da atividade de enzimas antioxidantes (SOD – Superóxido dismutase; APX – Ascorbato peroxidase; POD – Peroxidase; e CAT – Catalase).

O aumento do CRA das plantas sob tratamento de estresse “Moderado” sobre aquelas em tratamento “Controle” pode ser explicado pela alta taxa transpiratória destas últimas, aliada à alta temperatura máxima do dia da coleta (41°C no dia 01/11/2014, figura 38), o que pode ter ocasionado um surto transpiratório das folhas durante o preparo do material e obtenção das fotos. Este fato também explica a grande variabilidade do CRA nas plantas controle, uma vez que tanto as plantas sob estresse “Moderado”, quanto as sob estresse “Severo”, permaneceram com seus estômatos fechados no dia da coleta, e portanto sofreram um impacto menor da temperatura e umidade do ar sobre a taxa transpiratória. Lawlor e Cornic (2002) afirmam que plantas bem hidratadas possuem um CRA próximo de 100%; no entanto, uma vez que a transpiração excede a absorção de água, o turgor foliar é perdido rapidamente, levando à queda no CRA, redução no volume celular e ao fechamento dos estômatos. Os autores ainda mostram que a queda no CRA pode ser correlacionada positivamente com a redução na taxa fotossintética e com o aumento de solutos compatíveis.

Tabela 17 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores da Conteúdo Relativo de Água (CRA)

HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS						
Bartlett		X ² = 22,73 **		P < 0,01		
NORMALIDADE DOS DADOS						
Kolmogorov-Smirnov		D = 0,16282 **		P < 0,01		
Cramér-von Mises		ω ² = 0,25465 **		P < 0,01		
Anderson-Darling		A ² = 1,49529 **		P < 0,01		
Kuiper		V = 0, 25965 **		P < 0,01		
Watson		U ² = 0,23317 **		P < 0,01		
Lilliefors		D = 0,1406 *		P < 0,05		
Shapiro-Wilk		W = 0,90496 **		P < 0,01		
ANÁLISE DA VARIÂNCIA						
ANOVA		F = 34,1528 **		P < 0,0001		
Kruskal-Wallis		H = 30,9434 **		P < 0,0001		
CONTRASTE DE MÉDIAS						
Déficit Hídrico	Média ¹	Dunnett	Tukey	t	Dunn	SNK
Controle	72,62		a	a	a	a
Moderado	81,60		b	b	b	b
Severo	63,05		c	c	a	c

¹ Valor da média em %* Nível de significância $\alpha = 0,05$ ** Nível de significância $\alpha = 0,01$

4.3.4.5 Teor Foliar de Prolina

O teor de prolina livre nas células da folha foi cerca de 1,3 vezes maior nas plantas em estresse “Moderado” em relação às plantas controle, e cerca de 3,5 vezes maior para as plantas em estresse “Severo” (Figura 59). Ocorreu uma variação muito intensa nos valores do teor de prolina entre as repetições de cada tratamento, elevando o erro padrão a ponto de sobrepor as leituras. Com isto, o teor de prolina das plantas controle foi de $80,91 \pm 31,81 \mu\text{g} \times \text{g tecido}^{-1}$, para as plantas sob estresse “Moderado” foi de $110,47 \pm 10,16 \mu\text{g} \times \text{g tecido}^{-1}$, e para as plantas em estresse “Severo” foi de $280,62 \pm 122,96 \mu\text{g} \times \text{g tecido}^{-1}$.

A variação média dos teores de prolina esteve dentro do esperado: teor alto para o estresse “Severo”, seguido de teor mediano para o estresse “Moderado”, e

um teor reduzido para as plantas controle. Um fator que pode ter contribuído para o aumento do ruído nesta análise é a presença de pigmentos naturais na teca, os quais apresentam a mesma coloração que a reação de determinação do teor de prolina livre. Assim, a adaptação do método para as amostras de teca torna-se necessária a fim de, possivelmente, reduzir a variabilidade das leituras.

Figura 59 - Gráfico dos teores médios de Prolina livre nas folhas das plantas do experimento de estresse hídrico. As barras representam o erro padrão da média (n = 5)

A análise estatística do teor de prolina foi realizada com os dados transformados por $\log_{10}(x)$, sendo que após esta transformação os dados atenderam a todos os pressupostos da análise de variância (Tabela 18). No entanto, não houve diferença estatística significativa entre os tratamentos pelos testes F e Kruskal-Wallis; ao se realizar o contraste de médias, o teste t mostrou-se discrepante, e apresentou diferença entre o tratamento “Controle” e o tratamento de estresse “Severo”. Pelo teste de Dunnett, apenas o tratamento de estresse “Severo” foi diferenciado do tratamento “Controle”.

Tabela 18 - Análise estatística do experimento de estresse hídrico em função dos valores de teor de prolina

HOMOGENEIDADE DAS VARIÂNCIAS						
Bartlett		X ² = 6,20538 ^{ns}		P > 0,01		
NORMALIDADE DOS DADOS						
Kolmogorov-Smirnov		D = 0,1974 ^{ns}		P > 0,1		
Cramér-von Mises		ω ² = 11768 ^{ns}		P > 0,05		
Anderson-Darling		A ² = 60378 ^{ns}		P > 0,05		
Kuiper		V = 0,38844 *		P < 0,025		
Watson		U ² = 0,11655 *		P < 0,05		
Lilliefors		D = 0,19740 ^{ns}		P > 0,1		
Shapiro-Wilk		W = 0,93261 ^{ns}		P = 0,29838		
ANÁLISE DA VARIÂNCIA						
ANOVA		F = 3,4687 ^{ns}		P = 0,0638		
Kruskal-Wallis		H = 2,0600 ^{ns}		P = 0,3570		
CONTRASTE DE MÉDIAS						
Déficit Hídrico	Média ¹	Dunnett	Tukey	t	Dunn	SNK
Controle	80,91		a	a	a	a
Moderado	110,47		a	ab	a	a
Severo	280,62		a	b	a	a

¹ Valor da média em $\mu\text{g x g tecido}^{-1}$ * Nível de significância $\alpha = 0,05$

Em estudos de estresse hídrico de teca realizados por Castro et al. (2007) foi mostrado um aumento significativo de 220,53% no teor de prolina foliar após as plantas permanecerem 9 dias sem água; concomitantemente, houve um aumento no teor de carboidratos solúveis, os quais cresceram 323,15%. Para Husen (2010), dois clones distintos de teca mostraram acréscimos no teor de prolina foliar de 82,09% e 87,09% após 20 dias sem rega. Com isto, observa-se que este mecanismo de tolerância ao estresse hídrico em teca pode assumir grande variabilidade entre indivíduos, fato que pode ser explicado pela variação genética causada pelo cruzamento de árvores por polinização aberta, o qual deduz a existência tanto de indivíduos mais tolerantes, quanto de indivíduos mais suscetíveis ao estresse hídrico.

Sanches (2012) também observou uma grande variação nos teores de prolina de folhas e raízes de pata-de-vaca, sendo que o maior teor foi aquele obtido nas plantas de estresse hídrico mais intenso (30 dias sem água), sendo de 64 $\mu\text{mol} \times \text{g}$ tecido seco⁻¹. Intrigantemente, em mogno (*Swietenia macrophylla*), não houve diferença estatística nos teores de prolina, seja nas folhas ou nas raízes, e sob quaisquer tratamentos de estresse hídrico; isto pode indicar um maior grau de suscetibilidade desta espécie ao estresse hídrico (HORTA, 2012 apud SANCHES, 2012).

4.3.5 Identificação e Seleção de Transcritos relacionados ao Estresse por Déficit Hídrico

Acima da biblioteca de Raiz foram selecionados aqueles transcritos que apresentavam o termo GO “Response to stress” (0006950) e/ou o termo GO “Response to water deprivation” (0009414). Foram encontrados 1145 transcritos relacionados ao estresse por déficit hídrico, os quais estavam classificados dentro de 63 mapas metabólicos, com destaque para o metabolismo de glicerolípídeos (8 enzimas e 30 sequências), metabolismo da galactose (6 enzimas e 23 sequências), glicólise/gliconeogênese (6 enzimas e 17 sequências), metabolismo da fenilalanina (3 enzimas e 24 sequências) e metabolismo do amido e sacarose (4 enzimas e 24 sequências). Todos os mapas metabólicos podem ser consultados no Anexo M.

A partir das sequências identificadas, foram selecionados os genes da trealose 6-fosfato sintase (*TgTPS*), o qual está relacionado à biossíntese de trealose, um importante carboidrato com função osmorregulatória; uma aquaporina de membrana plasmática (*TgPIP*), relacionada à entrada de moléculas de água e outras substâncias para o interior da célula; e dois fatores de transcrição relacionados ao estresse por déficit hídrico: DREB2 (*TgDREB2*), o qual é ativado pela desidratação celular, e AREB (*TgAREB*), ativado pela presença de ABA.

4.3.5.1 Trealose 6-Fosfato Sintase (TPS)

Esta enzima catalisa a penúltima reação na biossíntese da trealose (um carboidrato formado por duas moléculas de glicose), a qual atua como importante agente osmoprotetor em diversas espécies, e ajuda na tolerância ao estresse hídrico

e térmico. A reação catalisada é a união de D-glicose 6-fosfato com UDP-D-glicose, gerando α,α -trealose 6-fosfato, UDP e H^+ . Comumente, esta enzima apresenta duas famílias enzimáticas: EC 2.4.1.15 - α,α -trehalose-phosphate synthase (UDP-forming) e EC 3.1.3.12 - Trehalose-phosphatase (DELORGE et al., 2014). Em microorganismos, a síntese de trealose é realizada em dois estágios, os quais são catalizados pelas enzimas OtsA e OtsB, respectivamente uma glicosil-transferase e uma trealose-fosfatase (DE SMET et al., 2000).

Em teca, foi selecionado um transcrito de 1.904 pb para ser analisado e representar uma isoforma do gene *TgTPS*. O alinhamento via Blastx desta sequência contra a base de dados de proteínas não-redundantes (nr) do NCBI retornou hits com alta identidade e e-value bastante significativo (e-value $\equiv$ 0) (Tabela 19).

Tabela 19 - Principais resultados do alinhamento do gene *TgTPS* através do Blastx

Descrição	E-value	Identidade	Acesso
Glycosyl transferase family 20 family protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	0	81%	XP_002304347.1
Alpha,alpha-trehalose-phosphate synthase [UDP-forming] 5 [<i>Morus notabilis</i>]	0	80%	EXB66534.1
Trehalose-6-phosphate synthase, putative [<i>Ricinus communis</i>]	0	82%	XP_002527658.1
Trehalose phosphatase/synthase 5 isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]	0	80%	XP_007040643.1
Trehalose-6-phosphate synthase domain protein [<i>Medicago truncatula</i>]	0	78%	KEH44193.1
Putative trehalose phosphatase/synthase 5 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	0	75%	NP_567538.1
Trehalose-6-phosphate synthase like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	0	75%	CAB10557.1
Trehalose-6-phosphate synthase [<i>Ginkgo biloba</i>]	0	74%	AAX16014.1
Trehalose-6-phosphate synthase, putative [<i>Brassica oleracea</i>]	0	74%	ABD65165.1

A tradução da sequência de nucleotídeos para aminoácidos mostrou a presença de apenas 2 *stop-codons* e duas ORFs, sendo uma bastante longa com 555 aminoácidos, e outra com 44 aminoácidos. A proteína formada possuiu 632

aminoácidos, sendo 74 resíduos carregados negativamente, e 72 resíduos carregados positivamente. O peso molecular aproximado da proteína foi de 71.061,0 g mol⁻¹, e o ponto isoelétrico teórico foi dado a pH = 6,80. A fórmula deduzida da proteína foi C₃₁₇₇H₅₀₁₇N₈₆₅O₉₁₅S₃₄.

Acima da sequência protéica foram identificados os domínios “Glicosil-transferase 20”, cobrindo uma região de 244 aminoácidos, e “Trealose-fosfatase”, cobrindo 236 aminoácidos.

Para a visualização 3D da proteína (Figura 60) foi utilizado o *template* “1gz5.1.A” obtido a partir de difração de raios – X a 2,43 Å de aproximação para a enzima glicosil-transferase (OtsA) de *Escherichia coli*, a qual compreende o primeiro domínio da trealose 6-fosfato sintase (GIBSON et al., 2002). Este template mostrou uma similaridade de 31,25% com a sequência da TgTPS.

Figura 60 - Estrutura 3D predita da proteína TgTPS, mostrando o domínio glicosil-transferase e os parâmetros de montagem do modelo

Em seguida, foi realizado o alinhamento da sequência protéica da TgTPS junto com a sequência das espécies *Arabidopsis thaliana* (NP_567538.1), *Brassica oleracea* (ABD65165.1), *Ginkgo biloba* (AAX16014.1), *Medicago truncatula* (KEH44193.1), *Morus notabilis* (EXB66534.1), *Populus trichocarpa* (XP_002304347.1), *Ricinus communis* (XP_002527658.1) e *Theobroma cacao*

(XP_007040643.1), onde foi possível observar o alto grau de conservação dos resíduos na região dos domínios protéicos (Figuras 61 e 62).

A TPS ganha destaque graças à sua ação contra o estresse por déficit hídrico onde, em plantas superexpressando o gene da TPS ocorre o aumento na resistência ao estresse sem que haja alteração fenotípica significativa (DELORGE et al., 2014).

A superexpressão do gene da TPS em *Arabidopsis* resultou em plantas com aumento do tamanho e número das folhas por roseta, bem como no número de tricomas, além de um atraso no florescimento; também foi observada tolerância ao estresse por déficit hídrico e também a presença fenótipos insensíveis a glicose e ABA (AVONCE et al., 2004). Lyu et al. (2013) mostrou que a superexpressão da TPS de *E. coli* em tomateiro aumentou a resistência e a fotossíntese deste mediante estresse salino, sem que houvesse o surgimento de fenótipos aberrantes. Também em tomateiro, Rivero et al. (2014) demonstrou ocorrer um aumento natural na expressão do gene da TPS em folhas de plantas submetidas ao estresse por salinidade e temperatura, embora não tenha ocorrido aumento na expressão quando os estresses foram aplicados separadamente. A aplicação exógena de trealose em folhas também mostrou a capacidade de restabelecer plantas após um período de estresse (LUO et al., 2014).

A superexpressão do gene *AtTPS1* em plantas de tabaco proporcionou uma melhor aclimatização das plantas em solução hidropônica contendo cádmio e cobre, enquanto que também foi notada uma maior expressão da enzima catalase, em relação às testemunhas (MARTINS et al., 2014).

Bae et al. (2005) e Schluepmann et al. (2004) se contradizem à respeito da ação da trealose sobre as alterações na expressão de genes relacionados ao estresse. Enquanto que uma maior expressão gênica de genes relacionados ao estresse abiótico foi associada ao aumento da expressão da TPS por Schluepmann et al. (2004), Bae et al. (2005) mostrou que houve a repressão de diversos genes também associados ao estresse, dentre eles: peroxidase-2 (PRXR2), endoquitinase básica (PR), endo-1,3-endo- β -glucanase (BGL1), lipooxygenase 2 (LOX2), quitinase-like 1 (CTL1), subunidade A da ATP sintase vacuolar, ferritina (*AtFER1*), gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase citossólica (GAPDHc), proteína integral de membrana plasmática (PIP1C), cisteína proteinase (RD21A), e 5'-adenosilsulfato redutase (APR1) (IORDACHESCU; IMAI, 2008).

Figura 61 - Alinhamento da sequência protéica da enzima TPS, indicando o domínio Glicosil-transferase (retângulo verde) e a porcentagem de identidade (tons de azul)

Figura 62 - Alinhamento da sequência proteica da enzima TPS, indicando o domínio Glicosil-transferase (retângulo verde), domínio Trealose-fosfatase (retângulo laranja) e a porcentagem de identidade (tons de azul)

4.3.5.2 Aquaporina (Proteína Integral de Membrana Plasmática - PIP)

A família das “*Major Intrinsic Proteins*” (MIP), hoje conhecidas como aquaporinas, é constituída por proteínas de 23-31 kDa que regulam canais e poros membranares quanto à passagem de água e pequenos solutos neutros como glicerol, uréia, formamida, além de amônia e CO₂. Esta família é constituída de quatro grupos: proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIPs), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), nodulinas intrínsecas de membrana plasmática (NIPs) e pequenas proteínas intrínsecas de membrana (SIPs) (MAUREL et al., 2008).

Para a *TgPIP* foi selecionado um transcrito com 1.301 pb, o qual, através do Blastx mostrou alinhamentos significativos (e-value $\equiv$ 0) para diversas espécies vegetais (Tabela 20).

Tabela 20 - Principais resultados do alinhamento do gene *TgPIP* através do Blastx

Descrição	E-value	Identidade	Acesso
Water channel protein [<i>Nicotiana excelsior</i>]	0	93%	BAA20074.1
Aquaporin PIP1;3 [<i>Quercus petraea</i>]	0	93%	AFH36341.1
Aquaporin [<i>Iris x hollandica</i>]	0	92%	BAF44223.1
Aquaporin protein 7 [<i>Camellia japonica</i>]	0	92%	AHI54567.1
Plasma membrane intrinsic protein 1B [<i>Theobroma cacao</i>]	0	91%	XP_007051783.1
Aquaporin 1 [<i>Gossypium hirsutum</i>]	0	90%	ABD63904.1
Plasma membrane intrinsic protein [<i>Olea europaea</i>]	0	93%	ABB13429.1
Plasma membrane intrinsic protein 1;4 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	0	92%	NP_567178.1
Plasma membrane aquaporin 1 [<i>Hevea brasiliensis</i>]	0	90%	ACV66985.1

A tradução da sequência de aminoácidos mostrou a presença de 5 *stop-codons* e duas ORFs, sendo uma com 287 aminoácidos, e outra com 64 aminoácidos. Ao todo, a proteína gerada apresentou 428 aminoácidos, sendo 25 resíduos carregados negativamente, e 47 resíduos carregados positivamente. O peso molecular aproximado da proteína foi de 46.700,7 g mol⁻¹, e seu ponto isoelétrico teórico foi a pH = 9,57. A fórmula deduzida da proteína foi C₂₁₃₇H₃₃₃₀N₅₆₄O₅₆₇S₂₂.

Na sequência protéica foi identificado o domínio “Major Intrinsic Protein”, abrangendo uma região central de 230 aminoácidos.

Para a visualização 3D da proteína (Figura 63) foram utilizados dois *templates* “1z98.1.A” e “4jc6.2.D”, obtidos a partir de difração de raios – X a 2,10 e 2,15 Å de aproximação, propostos para a aquaporina SoPIP2 de espinafre (*Spinacia oleracea*) (FRICK et al., 2013; TÖRNROTH-HORSEFIELD et al., 2006). O *template* “1z98.1.A” apresentou similaridade de 73,13%, e o *template* “4jc6.2.D” apresentou similaridade de 74,71% à sequência protéica da TgPIP.

Logo em seguida, foi obtido o alinhamento da sequência protéica da TgPIP em conjunto às PIPs de *Arabidopsis thaliana* (NP_567178.1), *Camellia japonica* (AH154567.1), *Gossypium hirsutum* (ABD63904.1), *Hevea brasiliensis* (ACV66985.1), *Iris x hollandica* (BAF44223.1), *Nicotiana excelsior* (BAA20074.1), *Olea europaea* (ABB13429.1), *Quercus petraea* (AFH36341.1) e *Theobroma cacao* (XP_007051783.1), sendo então possível de visualizar elevada conservação dos resíduos na região do domínio protéico (Figura 64).

As aquaporinas apresentam um papel chave na dinâmica da condutividade hidráulica da água entre as raízes, caule e folhas, especialmente em situações de alterações ambientais, e assim favorecem uma melhor eficiência no uso e distribuição da água entre os órgãos e tecidos da planta (MOSHELION et al., 2014).

Estudos mostram uma regulação acentuada da expressão de PIPs mediante indução por ácido abscísico (ABA). Em raízes de arroz, uma forte indução de diversas PIPs foi observada em resposta ao déficit hídrico, especialmente em cultivares de sequeiro que exibem alta produção de ABA (LIAN et al., 2003). Além disto, plantas transgênicas de tabaco com inibição de PIP1 e plantas transgênicas de *Arabidopsis* com inibição de PIP1 e PIP2 mostraram baixos potenciais de água na folha em relação ao controle mediante estresse hídrico (MARTRE et al., 2002; SIEFRITZ et al., 2002). Por fim, a expressão de PIPs também pode ser alterada

mediante estresses por salinidade, frio, carência de nutrientes e falta de oxigenação (alagamento) (LIU et al., 2005; ZHU et al., 2005; YU et al., 2006).

Figura 63 - Estruturas 3D previstas para a proteína TgPIP, mostrando os parâmetros de montagem do modelo

Figura 64 - Alinhamento da sequência protéica da PIP, indicando o domínio Major Intrinsic Protein (retângulo rosa) e a porcentagem de identidade (tons de azul)

4.3.5.3 Proteína de Ligação a Elemento Responsivo ao ABA (AREB)

Uma das principais rotas de resposta ao estresse por déficit hídrico é através do ácido abscísico, via elementos responsivos ao ABA (ABRE). As proteínas de ligação a elementos responsivos ao ABA (AREB), bem como fatores de transcrição associados aos ABRE (ABF), pertencem a uma subfamília de fatores de transcrição do tipo “Zíper de Leucina” (bZIP) e são exclusivos de vegetais (SEKI et al., 2007). Os AREBs contêm quatro domínios conservados, sendo três na extremidade N-terminal, e um na extremidade C-terminal; este último é o responsável pela ligação ao DNA e às proteínas, sendo ativado por fosforilação (FURIHATA et al., 2006).

Para o gene *TgAREB* foi selecionado um transcrito com 895 pb; por meio do Blastx ele mostrou alinhamentos significativos (e-value $\leq 0,01$) (Tabela 21).

Tabela 21 - Principais resultados do alinhamento do gene *TgAREB* através do Blastx

Descrição	E-value	Identidade	Acesso
AREB-like protein [<i>Solanum lycopersicum</i>]	8.0e-07	85%	NP_001234596.1
ABA responsive element-binding protein [<i>Solanum torvum</i>]	1e-06	86%	AFA37978.1
AREB-like protein [<i>Solanum nigrum</i>]	1e-06	85%	AHA43415.1
Abscisic acid responsive element-binding protein 2 [<i>Populus suaveolens</i>]	1e-06	83%	ABF29696.1
Abscisic acid responsive elements-binding factor 2 isoform 1 [<i>Theobroma cacao</i>]	2e-06	80%	XP_007017213.1
ABA-responsive element binding factor 4 [<i>Brassica napus</i>]	0.003	69%	AGG35957.1
Abscisic acid responsive element-binding factor 1 family protein [<i>Populus trichocarpa</i>]	0.003	69%	XP_006384405.1
Abscisic acid responsive elements-binding factor 3 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	0.010	74%	NP_567949.1
ABA-responsive element binding protein 1 [<i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>vulgaris</i>]	0.001	73%	CAP66259.1

Infelizmente, a tradução para aminoácidos mostrou 18 *stop-codons*, sendo esta uma quantidade grande para uma proteína com 280 aminoácidos. Nesta proteína foram identificadas 5 ORFs com os tamanhos de 7, 9, 10, 32 e 55 aminoácidos. Ao todo, a proteína gerada apresentou 30 resíduos carregados negativamente, e 30 resíduos carregados positivamente. O peso molecular aproximado da proteína foi de 32.684,0 g mol⁻¹, e seu ponto isoelétrico teórico foi a pH = 7,11. A fórmula deduzida da proteína foi C₁₄₆₁H₂₂₈₂N₃₈₄O₄₁₄S₂₆.

Na sequência protéica foi identificado o domínio bZIP, abrangendo uma região central de 33 aminoácidos. Para sequências de AREB de outras espécies, o tamanho do domínio fica em torno de 52 aminoácidos (Figura 65). Não foi possível identificar um modelo compatível para a visualização 3D da proteína, portanto, em seguida, foi obtido o alinhamento da sequência protéica do *TgAREB* juntamente com os AREBs de *Beta vulgaris* (CAP66259.1), *Populus suaveolens* (ABF29696.1), *Solanum lycopersicum* (NP_001234596.1), *Solanum nigrum* (AHA43415.1) e *Theobroma cacao* (XP_007017213.1). Neste alinhamento, o domínio protéico bZIP mostrou-se pouco conservado entre todas as espécies (Figura 65).

A caracterização de AREBs de *Populus* mostrou que, dos genes encontrados, 11 são preferencialmente expressos em folhas, enquanto que outros dois são exclusivos de raízes; após aplicação exógena de ABA, 8 genes foram mais expressos, enquanto que 6 tiveram transcrição reduzida (Ji et al., 2013). Em *Arabidopsis*, a superexpressão de AREB/ABF mostrou não somente que estes estão relacionados à sinalização por ABA, como também na sinalização por glicose (ABDEEN et al., 2010). Hong et al. (2013) também observou que, em seedlings de amendoim (*Arachis hypogaea*), a expressão de *AhAREB* foi intensificada pela ação de polietilenoglicol, NaCl, ácido giberélico (GA), ácido abscísico (ABA) e ácido salicílico (SA).

Orellana et al. (2010) mostrou que, das duas isoformas do AREB de tomateiro (*SIAREB1* e *SIAREB2*), apenas uma, *SIAREB1*, apresentava alta expressão em folhas e raízes mediante os estresses hídrico e salino. A superexpressão de *SIAREB1* mostrou afetar diversos genes relacionados ao estresse oxidativo, proteínas de transferência de lipídeos (LTPs), reguladores da transcrição e proteínas abundantes da embriogênese tardia (LEAs), além de genes relacionados ao estresse abiótico, como inibidores de proteases, enzimas catabólicas e proteínas associadas à patogênese.

Figura 65 - Alinhamento da sequência protéica do fator de transcrição AREB, indicando o domínio bZIP (retângulo vermelho) e a porcentagem de identidade (tons de azul)

4.3.5.4 Proteína de Ligação a Elemento Responsivo a Desidratação (DREB)

Os DREBs (*Dehydration-Responsive Element-Binding Proteins*) pertencem à família ERF (*Ethylene-Responsive Element-Binding Factor*), a qual é uma subfamília de fatores de transcrição AP2/EREBP. Eles possuem um domínio AP2 (Apetala2), seguido por um domínio CRT/DRE (*C-Repeat/Dehydration Responsive Element*), sendo por isso também associados aos genes CBF (*C-Repeat Binding Factor*) (AGARWAL et al., 2006).

Para esta proteína, foi selecionado um transcrito de 556 pb para representar o gene *TgDREB2*. Através do alinhamento por Blastx deste gene contra a base de dados de proteínas não-redundantes (nr) do NCBI, foram obtidos hits com alta identidade e e-value significativo (e-value $\leq 10^{-5}$) (Tabela 22).

Tabela 22 - Principais resultados do alinhamento do gene *TgTPS* através do Blastx

Descrição	E-value	Identidade	Acesso
DREB2 [<i>Solanum lycopersicum</i>]	2e-22	49%	ADZ15315.1
dehydration responsive element binding transcription factor [<i>Morus notabilis</i>]	3e-22	51%	AHJ25962.1
DREB2A [<i>Salicornia brachiata</i>]	6e-20	49%	ADD92167.1
DREB2-like protein [<i>Chrysanthemum vestitum</i>]	5e-19	88%	ABR23508.1
dehydration responsive element binding protein 2A [<i>Vigna unguiculata</i>]	6e-19	90%	AEO50757.2
DRE-binding protein 2 [<i>Leymus qinghaicus</i>]	1e-18	76%	AFO12477.1
DRE-binding protein 2 [<i>Populus trichocarpa</i>]	2e-18	89%	ABO48361.1
DRE-binding protein 2A;2 [<i>Glycine max</i>]	3e-18	89%	AFU35563.1
DREB2A [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	4e-17	84%	AAU93685.1

A tradução da sequência de aminoácidos não mostrou *stop-codons* e a única ORF presente possuía 139 aminoácidos. No total, a proteína apresentou 185 aminoácidos, sendo 31 resíduos carregados negativamente, e 24 resíduos carregados positivamente. O peso molecular aproximado da proteína foi de 20.245,2 g mol⁻¹, e seu ponto isoelétrico teórico foi a pH = 5,24. A fórmula deduzida da proteína foi C₈₆₁H₁₃₆₁N₂₅₅O₂₉₄S₈.

Na sequência protéica foi identificado o domínio “AP2 - Apetala2”, posicionado nos primeiros 49 aminoácidos.

Para a visualização 3D da proteína foi utilizado o *template* “3gcc.1.A”, o qual foi obtido a partir de NMR de parte do fator de transcrição ERF de *Arabidopsis* (ALLEN et al., 1998) (Figura 66). A similaridade entre a sequência do modelo e o TgDREB2 foi de 70,18%.

Figura 66 - Estrutura 3D predita para a proteína TgDREB2, mostrando também os parâmetros de montagem do modelo

Após a aquisição da estrutura protéica, foi obtido o alinhamento da sequência do TgDREB2 junto com os DREB2s de *Arabidopsis thaliana* (AAU93685.1), *Chrysanthemum vestitum* (ABR23508.1), *Leymus qinghaicus* (AFO12477.1), *Malus domestica* (AFJ14632.1), *Pisum sativum* (ADL27988.1), *Populus trichocarpa* (ABO48361.1), *Solanum lycopersicum* (ADZ15315.1) e *Vigna unguiculata*

(AEO50757.2), sendo então possível de visualizar elevada conservação dos resíduos na região do domínio protéico (Figura 67).

A respeito da importância do DREB, Liang et al. (2014) mostrou que em chicória (*Cichorium intybus*), dois DREBs foram induzidos por diferentes vias de sinalização, sendo C/DREB1a fortemente afetado por ácido abscísico, enquanto que C/DREB1b teve alta expressão durante exposição a baixa temperatura; além disso, apenas C/DREB1a obteve alta expressão em folhas, enquanto que C/DREB1b foi fortemente expresso apenas nas raízes. Estudos realizados com uva (*Vitis vinifera*) mostraram que os DREBs podem regular a expressão de genes de diversas vias metabólicas como metabolismo de glucanas, transporte de lipídeos, sistema de endomembranas, estrutura da parede celular e outros (ZHAO et al., 2013).

Plantas de soja superexpressando *AtDREB1a* apresentaram bom número de sementes, vagens e vagens com semente quando expostas ao estresse por déficit hídrico tanto em campo, quanto em casa de vegetação (ROLLA et al., 2014).

Embora o foco inicial dos estudos com DREB tenha sido acima de plantas herbáceas, em árvores já foram caracterizados DREBs de *Populus euphratica* (CHEN; XIA; YIN, 2009), *Populus nigra* (CHU et al., 2014), *Populus alba* (MAESTRINI et al., 2009), *Caragana korshinskii* (WANG et al., 2010), *Eucalyptus* (NAVARRO et al., 2009, 2011) e *Prunus persica* (ARTLIP et al., 2013; WISNIEWSKI et al., 2011).

Figura 67 - Alinhamento da sequência protéica do fator de transcrição DREB, indicando o domínio AP2 (retângulo lilás) e a porcentagem de identidade (tons de azul)

4.3.6 Validação das Sequências por PCR e Sequenciamento

Para realizar a amplificação de um fragmento dos genes selecionados para estudo, foi confeccionado um par de *primers* acima de cada sequência (Tabela 23). Uma vez que estes *primers* flanqueiam uma região menor do que 200 pb dentro de cada gene, eles também permitem a determinação do nível de expressão destes genes por meio da técnica de PCR quantitativa (ou Real-time qPCR).

Após a PCR, todos os genes mostraram amplificação tanto acima de DNA genômico, quanto de cDNA de seedling e de flor (Figura 68). No entanto, não foi possível amplificar os quatro genes acima do cDNA de folha e raiz. Esta contradição pode ser explicada por conta de uma possível baixa expressão destes genes nos órgãos de folha e raiz sob ausência de estresse por déficit hídrico. Os genes *TgPIP* e *TgAREB* mostraram duas bandas na PCR acima de DNA, com os tamanhos aproximados de 300 pb e 500 pb para *TgPIP* e 200 pb e 1300 pb *TgAREB*.

Tabela 23 - *Primers* confeccionados para a amplificação dos genes de estresse por déficit hídrico

Gene	Nome	Orientação	Sequência	Tamanho	Amplicon
<i>TgTPS</i>	qTPSf	Forward	ATGTTTGAGGCGATAATGAGTGC	23	158 pb
<i>TgTPS</i>	qTPSr	Reverse	GAGGCATCAGCAAGGCTTTGAA	22	
<i>TgDREB2</i>	qDREB2f	Forward	ATGGGTGGCTGAGATTAGAGAG	22	183 pb
<i>TgDREB2</i>	qDREB2r	Reverse	AGCGAAGAGGAGTCATTAGTGC	22	
<i>TgAREB</i>	qAREBf	Forward	CAGGCATACACTATGGAGTTGG	22	197 pb
<i>TgAREB</i>	qAREBr	Reverse	GAATGCTACATCACCGCTTACCA	23	
<i>TgPIP</i>	qPIPf	Forward	TCTTGGAGCAGCAATCATCTACA	23	140 pb
<i>TgPIP</i>	qPIP r	Reverse	ACCTGGACTTGAATGGAATGG	21

Figura 68 - Amplificação dos genes de estresse hídrico. M: Marcador de peso molecular 1 Kb; 1 e 2: TgTPS acima de DNA; 3: TgTPS acima de cDNA de flor; 4: TgTPS acima de cDNA de seedling; 5: controle negativo do gene TgTPS; 6 e 7: TgDREB2 acima de DNA; 8: TgDREB2 acima de cDNA de flor; 9: TgDREB2 acima de cDNA de seedling; 10: controle negativo do gene TgDREB2; 11 e 12: TgAREB acima de DNA; 13: TgAREB acima de cDNA de flor; 14: TgAREB acima de cDNA de seedling; 15: controle negativo do gene TgAREB; 16 e 17: TgPIP acima de DNA; 18: TgPIP acima de cDNA de flor; 19: TgPIP acima de cDNA de seedling; 20: controle negativo do gene TgPIP. Setas vermelhas indicam a altura de 1000 pb. Setas pretas indicam a altura aproximada de 150 pb

O sequenciamento dos amplicons mostrou alinhamento significativo por Blastx para *TgTPS* (DNA e cDNA), *TgPIP* (DNA – banda menor -, e cDNA) e *TgDREB2* (DNA e cDNA).

Pelo resultado do Blast, bem como pelas análises realizadas anteriormente, observa-se que o gene *TgAREB* não representa uma boa escolha para experimentos futuros de avaliação da expressão gênica em teca. Apesar do *TgAREB* ter mostrado uma tênue homologia com o AREB de outras espécies, ainda é necessária a localização de um transcrito que represente melhor este gene em teca. Uma questão associada a isto, é o fato de que *TgAREB* foi identificado por RNA-seq através de uma biblioteca de raízes cultivadas *in vitro*, e portanto, sem estresse hídrico; com isto, o transcrito do *TgAREB* não só poderia estar com um número extremamente reduzido de cópias, como também pode ter sido sequenciado com erros e/ou montado com uma baixa cobertura de *reads*.

Com isto, os genes *TgTPS*, *TgPIP* e *TgDREB2* podem ser utilizados para experimentos futuros de expressão gênica em órgãos e tecidos submetidos ao estresse hídrico em teca.

4.4 Conclusões

- O estresse por déficit hídrico em teca causa redução no desenvolvimento e produtividade das plantas, uma vez que reduz a condutância estomática e o conteúdo de água das folhas e desencadeia processos que levam à redução na transpiração e fotossíntese.
- A prolina atua como um agente osmorregulador nas células da folha de plantas submetidas ao estresse por déficit hídrico, aumentando seu teor conforme se intensifica o estresse.
- A temperatura da folha reflete a dissipação do excesso de fótons absorvidos, mostrando aumento conforme maior for a densidade de fluxo de fótons incidente.
- Os genes *TPS*, *PIP* e *DREB2* representam pontos-chave no processo de resposta ao estresse hídrico, e podem ser estudados em teca através dos genes *TgTPS*, *TgPIP* e *TgDREB2*.
- A tecnologia de RNA-seq permite a seleção de genes para o estudo do estresse abiótico em plantas mesmo acima de bibliotecas construídas a partir de tecidos e órgãos onde qualquer perturbação ambiental esteve ausente.
- O estudo fisiológico, bioquímico e genético do estresse por déficit hídrico em árvores tropicais é cada vez mais necessário, uma vez que as alterações climáticas tendem a se tornarem mais intensas, a demanda por madeira e subprodutos é crescente e, tanto a produtividade, quanto a rusticidade das principais espécies arbóreas comerciais ainda é fator limitante para o aumento da produção.

Referências

ABAD, M.; MARTINEZ, P. F.; MARTINEZ, J. Evaluación agrónomica de los substratos de cultivo. **Actas de Horticultura**, Villaviciosa, Espanha, v. 11, p.141-154. 1993.

ABDEEN, A.; SCHNELL, J.; MIKI, B. Transcriptome analysis reveals absence of unintended effects in drought-tolerant transgenic plants overexpressing the transcription factor ABF3. **BMC Genomics**, London, v. 11, n. 69, p. 1–21, 2010.

ADIR, N.; ZER, H.; SHOCHAT, S.; OHAD, I. Photoinhibition – a historical perspective. **Photosynthesis Research**, Dordrecht, v. 76, p. 343 – 370. 2003.

AGARWAL, P.K.; AGARWAL, P.; REDDY, M.; SOPORY, S.K. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, New York, v. 25, n. 12, p. 1263 – 1274. 2006.

ALLEN, M. D.; YAMASAKI, K.; OHME-TAKAGI, M.; TATENO, M.; SUZUKI, M. A novel mode of DNA recognition by a β -sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. **The EMBO Journal**, London, v. 17, n.18, p. 5484 – 5496. 1998.

ALQUINI, Y.; BONA, C.; BOEGER, M.R.T.; COSTA, C.G. da; BARROS, C.F. Epiderme. In: APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S.M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa: UFV, 2006. p. 30–40.

ARTLIP, T. S.; WISNIEWSKI, M. E.; BASSETT, C. L.; NORELLI, J. L. CBF gene expression in peach leaf and bark tissues is gated by a circadian clock. **Tree Physiology**, Oxford, v. 33, p. 866 – 877. 2013.

ASADA, K. The water-stress cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess fotons. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Oxford, v. 50, p. 601 – 639.

AVONCE, N.; LEYMAN, B.; MASCORRO-GALLARDO, J.O.; VAN DIJCK, P.; THEVELEIN, J. M.; ITURRIAGA, G. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiology**, Washington, v. 136, p. 3649 – 3659. 2004.

BAKER, N. R. Light-use efficiency and photonhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. In: SMITHM J. A. C.; GRIFFITHS, H. **Water deficit plant responses from cell to community**. Oxford: Bios Scientific Publ. 1993. p. 221-235.

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and soil**, The Hague, v. 39, p. 205 – 207, 1973.

BJÖRKMAN, O.; DEMMIG, B. Photon yield of O₂ evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. **Planta**, Heidelberg, v. 170, p. 489 – 504. 1987.

BRODRIBB, T. J.; HOLBROOK, N. M. Stomatal closure during leaf dehydration, correlation with other leaf physiological traits. **Plant Physiology**, Washington, v. 132, n. 4, p. 2166 – 2173. 2003.

CARVALHO, D.F. de; SILVA, L.D.B da. **Hidrologia**: evaporação e transpiração. Seropédica: UFRJ, 2006, 14p. Disponível em <<http://www.ufrj.br/institutos/it/deng/leonardo/downloads/APOSTILA/HIDRO-Cap6-ET.pdf>>, acesso em 08 mar. 2015.

CASTRO, D. da S. SANTOS, A. O. dos; LOBATO, A. K. da S.; GOUVEA, D. D. S.; OLIVEIRA NETO, C. F. de; CUNHA, R. L. MORAES da; COSTA, R. C. L. da. Concentrações de prolina e carboidratos solúveis totais em folhas de Teca (*Tectona grandis* L.f) submetida ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 921 – 923. 2007.

CHEN, J.; XIA, X.; YIN, W. Expression profiling and functional characterization of a DREB2-type gene from *Populus euphratica*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Paris, v. 378, p. 483 – 487. 2009.

DE SMET, K. A. L.; WESTON, A.; BROWN, I. N.; YOUNG, D. B.; ROBERTSON, B. D. Three pathways for trehalose biosynthesis in mycobacteria. **Microbiology**, London, v. 146, p. 199 – 208. 2000.

DELORGE, I.; JANIÁK, M.; CARPENTIER, S.; VAN DIJCK, P. Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants. **Frontiers in plant science**, Lausanne, v. 5, p. 1–9, 2014.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Rockville, v. 12, p. 13-15. 1990.

DWIVEDI, U.; BHARDWAJ, R. D1 protein of photosystem II: The light sensor in chloroplasts. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 20, n. 1. P. 35 – 47. 1995.

ERISMANN, N. de M.; MACHADO, E. C.; GODOY, I.; J. de. Capacidade fotossintética de genótipos de amendoim em ambiente natural e controlado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 7, p. 1099 – 1108. 2006.

FELLER, U.; CRAFTS-BRANDNER, J. S.; SALVUCCI, M. E. Moderately high temperatures inhibit ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) activase-mediated activation of Rubisco. **Plant Physiology**, Washington, v. 116, p. 539 – 546. 1998.

FRICK, A.; JÄRVÅ, M. EKVALL, M.; UZDAVINYS, P.; NYBLOM, M.; TÖRNROTH-HORSEFIELD, S. Mercury increases water permeability of a plant aquaporin through a non-cysteine-related mechanism. **Biochemical Journal**, London, v. 454, p. 491 – 499. 2013.

FURIHATA, T.; MARUYAMA, K.; FUJITA, Y.; UMEZAWA, T.; YOSHIDA, R.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Absciscic acid-dependent multisite phosphorylation regulates the activity of a transcription activator AREB1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New York, v. 103, p. 1988 – 1993. 2006.

GIBSON, R. P.; TURKENBURG, J. P.; CHARNOCK, S. J.; LLOYD, R.; DAVIES, G. J. Insights into trehalose synthesis provided by the structure of the retaining glucosyltransferase OtsA. **Chemistry & Biology**, Paris, v. 9; p. 1337 – 1346. 2002.

GUERRINI, I. A.; TRIGUEIRO, R. M. Atributos físicos e químicos de substratos compostos por biossólidos e casca de arroz carbonizada. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, p. 1069 – 1076. 2004

GUO, X. –Y.; ZHANG, X. –S.; HUANG, Z. –Y. Drought tolerance in three hybrid poplar clones submitted to different watering regimes. **Journal of Plant Ecology**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 79 – 87. 2010.

HABERMANN, G.; MACHADO, E. C.; RODRIGUES, J. D.; MEDINA, C. L. CO₂ assimilation, photosynthetic light response curves, and water relations of ‘Pêra’ sweet orange plants infected with *Xylella fastidiosa*. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, Campos dos Goytacazes, v. 15, n. 2, p. 79 – 87. 2003.

HONG, L.; HU, B.; LIU, X.; HE, C. Y.; YAO, Y.; LI, X. L.; LI, L. Molecular cloning and expression analysis of a new stress-related AREB gene from *Arachis hypogaea*. **Biologia Plantarum**, Berlin, v. 57, n. 1, p.56 - 62. 2013.

HUSEM, A. Growth characteristics, physiological and metabolic responses of teak (*Tectona grandis* Linn. f.) clones differing in rejuvenation capacity subjected to drought stress. **Silvae Genetica**, Berlin, v. 59, p. 2 – 3. 2010.

IORDACHESCU, M.; IMAI, R. Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. **Journal of Integrative Plant Biology**, Shanghai, v. 50, n. 10, p. 1223 – 1229. 2008.

JANSEN, M. A. K.; MATTOO, A. K.; EDELMAN, M. D1-D2 protein degradation in the chloroplast. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 260, p. 527 – 535. 1999.

JI, L.; WANG, J.; YE, M.; LI, Y.; GUO, B.; CHEN, Z.; LI, H.; AN, X. Identification and characterization of the *Populus* AREB/ABF Subfamily. **Journal of Integrative Plant Biology**, Shanghai, v. 55, n. 2, p. 177 – 186. 2013.

JONES H. G.; LEINONEN I. Thermal imaging for the study of plant water relations. **Journal of Agricultural Meteorology**, v. 59, p. 205 – 217. 2003.

KATO, Y.; SAKAMOTO, W. Phosphorylation of photosystem II core proteins prevents undesirable cleavage of D1 and contributes to the fine-tuned repair of photosystem II. **The Plant Journal**, Oxford, v. 79, p. 312 – 321. 2014.

KLAR, A. E. **A água no sistema solo-planta-atmosfera**. São Paulo: Nobel , 1984. 408p.

KNUTSON, R. M. Plants in heat. **Natural History**, London, v. 88, p. 42 – 47. 1979.

KÜCHMEISTER, H.; WEBBER, A. C.; SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I.; GOTTSBERGER, G. A polinização e sua relação com a termogênese em espécies de Arecaceae e Annonaceae da Amazônia Central. **Acta Amazonica**, Petrópolis, v. 28, n. 3, p. 217 – 245. 1998.

LAWLOR, D. W.; CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant, Cell and Environment**, Oxford, v. 25, p. 275 – 294. 2002.

LIAN, H.L.; YU, X.; YE, Q.; DING, X.S.; KITAGAWA, Y. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. **Plant Cell Physiology**, Oxford, v. 45, p.481 – 489. 2004.

LIANG, M.; CHEN, D.; LIN, M.; ZHENG, Q.; HUANG, Z.; LIN, Z.; ZHAO, G. Isolation and characterization of two DREB1 genes encoding dehydration-responsive element binding proteins in chicory (*Cichorium intybus*). **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 73, p. 45 – 55. 2014.

LIU, F.; VANTOAI, T.; MOY, L. P.; BOCK, G.; LINFORD, L. D.; QUACKENBUSH, J. Global transcription profiling reveals comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Washington, v. 137, p. 1115 – 1129. 2005.

LONG, S. P.; POSTL, W. F.; BOLHÁR-NORDENKAMPF, H. R. Quantum yields for uptake of carbon dioxide in C₃ vascular plants of contrasting habitats and taxonomic groupings. **Planta**, Heidelberg, v. 189, p. 226 – 234. 1993.

LUO, Y.; GAO, Y. M.; WANG, W.; ZOU, C. J. Application of trehalose ameliorates heat stress and promotes recovery of winter wheat seedlings. **Biologia Plantarum**, Berlin, v. 58, n. 2, p. 395 – 398. 2014.

LYU, J. I.; MIN, S. R.; LEE, J. H.; LIM, Y. H.; KIM, J. –K.; BAE, C. –H.; LIU, J. R. Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, New York, v. 112, p. 257 – 262. 2013.

MACHADO, E. C.; SCHMIDT, P. T.; MEDINA, C. L.; RIBEIRO, R. V. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 12, p. 1161 – 1170. 2005.

MAESTRINI, P.; CAVALLINI, A.; RIZZO, M.; GIORDANI, T.; BERNARDI, R.; DURANTE, M.; NATALI, L. Isolation and expression analysis of low temperature-induced genes in white poplar (*Populus alba*). **Journal of Plant Physiology**, Paris, v. 166, p. 1544 – 1556. 2009.

MARTINS, L. L.; MOURATO, M. P.; BAPTISTA, S.; REIS, R.; CARVALHEIRO, F.; ALMEIDA, A. M.; FEVEREIRO, P.; CUYBERS, A. Response to oxidative stress induced by cadmium and copper in tobacco plants (*Nicotiana tabacum*) engineered with the trehalose-6-phosphate synthase gene (AtTPS1). **Acta Physiologiae Plantarum**, Berlin, v. 36, p. 755 – 765, 2014.

MARTRE, P.; MORILLON, R.; BARRIEU, F.; NORTH, G.B.; NOBEL, P.S.; CHRISPEELS, M.J. Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. **Plant Physiology**, Washington, v. 130, p.2101 – 2110. 2002.

MAUREL, C.; VERDOUCQ, L.; LUU, D.-T.; SANTONI, V. Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 59, p. 595 – 624. 2008.

MINER, J. A. **Sustratos: Propiedades y caracterización**. Madrid, Barcelona e México: Ediciones Mundi-Prensa, 1994. 172 p.

MOSHELION, M.; HALPERIN, O.; WALLACH, R.; OREN, R.; WAY, D. A. Role of aquaporins in determining transpiration and photosynthesis in water-stressed plants: crop water-use efficiency, growth and yield. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, p. 1 - 9. 2014.

MURATA, N.; TAKAHASHI, S.; NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Photoinhibition of photosystem II under environmental stress. **Biochimica et Biophysica Acta**, Paris, v. 1767, p. 414 – 421. 2007.

NAVARRO, M.; AYAX, C.; MARTINEZ, Y.; LAUR, J.; KAYAL, W. E.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C. Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. **Plant Biotechnology Journal**, v. 9, p. 50 – 63. 2011.

NAVARRO, M.; MARQUE, G.; AYAX, C.; KELLER, G.; BORGES, J. P.; MARQUE, C.; TEULIÈRES, C. Complementary regulation of four *Eucalyptus* CBF genes under various cold conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 9, p. 2713 – 2724. 2009.

OLIVEIRA, M. A. J. de; BOVI, M. L. A.; MACHADO, E. C.; GOMES, M. M. de A.; HABERMANN, G.; RODRIGUES, J. D. Fotossíntese, condutância estomática e transpiração em pupunheira sob deficiência hídrica. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 59, n. 1, p. 59 – 63. 2002.

ORELLANA, S.; YAÑEZ, M.; ESPINOZA, A.; VERDUGO, I.; GONZÁLEZ, E.; RUIZ-LARA, S.; CASARETTO, J. A. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 33, p. 2191 - 2208. 2010.

PIMENTA, J.A. Relações Hídricas. In: KERBAUY, G.B. **Fisiologia vegetal**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1–38.

PRADO, C. H. B. A.; MORAES, J. A. P. V. Photosynthetic capacity and specific leaf mass in twenty woody species of Cerrado vegetation under field conditions. **Photosynthetica**, Prague, v. 33, n. 1, p. 103 – 112. 1997.

RAJENDRUDU, G.; NAIDU, C. V. Leaf gas exchange capacity in relation to leaf position on the stem in field grown teak (*Tectona grandis* L.f.). **Photosynthetica**, Prague, v. 34, n. 1, p. 45 - 55. 1997.

RIVERO, R. M.; MESTRE, T. C.; MITTLER, R.; RUBIO, F.; GARCIA-SANCHES, F.; MARTINEZ, V. The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. **Plant, Cell & Environment**, Oxford, v. 37, p. 1059 – 1073. 2014.

ROLLA, A. A. de P.; CARVALHO, J. de F. C.; FUGANTI-PAGLIARINI, R.; ENGELS, C.; DO RIO, A.; MARIN, S. R. R.; OLIVEIRA, M. C. N. de; BENEVENTI, M. A.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; FARIAS, J. R. B.; NEUMAIER, N.; NAKASHIMA, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; NEPOMUCENO, A. L. Phenotyping soybean plants transformed with rd29A:AtDREB1A for drought tolerance in the greenhouse and field. **Transgenic Research**, Paris, v. 23, p. 75 – 87. 2014.

SANCHES, R.F.E. **Relações hídricas e respostas ao deficit hídrico da espécie *Bauhinia forficata* Link: mecanismos de manutenção do status hídrico**. 2012. 78 p. Dissertação (Mestrado em Fisiologia e Bioquímica de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2012.

SENTELHAS, P. C.; ANGELOCCI, L. R. **Evapotranspiração – Definições e Conceitos**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2009. 47 slides: color. Disponível em <http://www.lce.esalq.usp.br/aulas/lce306/Aula8.pdf>, acesso em 8 de março de 2015.

SIEFRITZ, F.; TYREE, M. T.; LOVISOLO, C.; SCHUBERT, A.; KALDENHOFF, R. PIP1 plasma membrane aquaporins in tobacco: from cellular effects to function in plants. **Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 869 – 876. 2002.

SILVA JÚNIOR., R. S. da. MOURA, M. A. L.; MEIXNER, F. X.; KORMANN, R.; LYRA, R. F. da F.; NASCIMENTO FILHO, M. F. do. Estudo da concentração de CO₂ atmosférico em área de pastagem na região amazônica. **Revista Brasileira de Geofísica**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p. 259 – 270. 2004.

SILVA, F. DE A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.4, n.1, p. 71-78, 2002.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918 p.

TAKAHASHI, S.; MURATA, N. How do environmental stresses accelerate photoinhibition? **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 13, n. 4, p. 178–182, 2008.

TÖRNROTH-HORSEFIELD, S.; WANG, Y.; HEDFALK, K.; JOHANSON, U.; KARLSSON, M.; TAJKHORSHID, E.; NEUTZE, R.; KJELLBOM, P. Structural mechanism of plant aquaporin gating. **Nature**, London, v. 439, p. 688 – 694. 2006.

TRIVEDI, P. K.; NATH, P.; SANE, P. V. Characterization of the *psbA* gene from chloroplasts of *Populus deltoides*. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, London, v. 3, p. 97 – 102. 1994.

VIERLING, E. The roles of heat shock proteins in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 42, p. 579 – 620. 1991.

WAHID, A.; GELANI, S.; ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Heat tolerance in plants: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, Paris, v. 61, p. 199–223, 2007.

WANG, L. –f. Physiological and molecular responses to drought stress in rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 83, p. 243 – 249. 2014.

WANG, X.; DONG, J.; LIU, Y.; GAO, H. A novel dehydration-responsive element-binding protein from *Caragana korshinskii* is involved in the response to multiple abiotic stresses and enhances stress tolerance in transgenic tobacco. **Plant Molecular Biology Reporter**, Berlin, v. 28, p. 664 – 675. 2010.

WEISS, E. Reversible heat-inactivation of the Calvin cycle: a possible mechanism of the temperature regulation of photosynthesis. **Planta**, Berlin, v. 151, p. 33 – 39. 1981.

WISNIEWSKI, M.; NORELLI, J.; BASSETT, C.; ARTLIP., T.; MACARISIN, D. Ectopic expression of a novel peach (*Prunus persica*) CBF transcription factor in apple (*Malus X domestica*) results in short-day induced dormancy and increased cold hardiness. **Planta**, Heidelberg, v. 233, p. 971 – 983. 2011.

WITTENBERG, G.; LEVITAN, A.; KLEIN, T.; DANGOOR, I.; KEREN, N.; DANON, A. Knockdown of the *Arabidopsis thaliana* chloroplast protein disulfide isomerase 6 results in reduced levels of photoinhibition and increased D1 synthesis in high light. **The Plant Journal**, Oxford, v. 78, p. 1003 – 1013. 2014.

YU, X.; PENG, Y. H.; ZHANG, M. H.; SHAO, Y. J.; SU, W. A.; TANG, Z. C. Water relations and expression analysis of plasma membrane intrinsic proteins in sensitive and tolerant rice during chilling and recovery. **Cell Research**, London, v. 16, p. 599 – 608. 2006.

ZHAO, T.; XIA, H.; LIU, J.; MA, F. The gene family of dehydration responsive element-binding transcription factors in grape (*Vitis vinifera*): genome-wide identification and analysis, expression profiles, and involvement in abiotic stress resistance. **Molecular Biology Reports**, London v. 41, p. 1577 – 1590. 2014.

ZHU, C.; SCHRAUT, D.; HARTUNG, W.; SCHAFFNER, A.R. Differential responses of maize *MIP* genes to salt stress and ABA. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, p. 2971 – 2981. 2005.

ZORZETO, T.Q. **Caracterização física e química de substratos para plantas e sua avaliação no rendimento do morangueiro (*Fragaria x ananassa* Duch.)**. 2011. 96 p. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 2011.

ANEXOS

Anexo A

Protocolo modificado de extração de RNA total (SALZMAN et al., 1999)

1. Macerar 2 g de tecido e adicionar 10 mL do tampão de extração*;
2. Agitar vigorosamente por 1 min;
3. Adicionar 1 volume de clorofórmio : álcool isoamílico (24:1) e agitar por 20 min;
4. Centrifugar à 16.000 *g* por 10 min a 4°C;
5. Transferir a fase superior para outro tubo;
6. Repetir os passos 3 e 4 de duas a três vezes;
7. Remover o sobrenadante para um novo tubo;
8. Adicionar duas vezes (do volume coletado) de etanol 100% e 0,1 vez (do volume coletado) de NaCl 5M;
9. Precipitar *overnight* a -2°C;
10. Centrifugar a 16.000 *g* por 10 min a 4°C;
11. Ressuspender o *pellet* em 10 mL de água DEPC 0,1%;
12. Adicionar uma vez (do volume) de fenol saturado em TE (pH 8,0): clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1) e agitar por 10 min a temperatura ambiente;
13. Centrifugar a 13.000 *g* por 10 min à temperatura ambiente;
14. Transferir a fase superior para um novo tubo;
15. Repetir os passos 12 a 14 mais duas a três vezes;
16. Adicionar à fase superior duas vezes (do volume coletado) de etanol 100% e 0,1 vez (do volume coletado) de NaCl 5M;
17. Precipitar *overnight* a -2°C;
18. Centrifugar a 16000 *g* por 15 min a 4°C;
19. Ressuspender o *pellet* em 500 µL de água DEPC 0,1%;
20. Completar o volume para 1 mL com água DEPC 0,1% e adicionar 333 µL de LiCl 8M;
21. Precipitar por 3 h em ambiente refrigerado;
22. Centrifugar a 12000 *g* por 20 min a 4°C;
23. Lavar o *pellet* com etanol 80% (preparado com água DEPC 0,1%);
24. Remover o etanol e ressuspender o pellet em 50 µL de água DEPC 0,01% ou água Milli-Q estéril.

*Tampão de extração (SALZMAN et al., 1999):

Reagente	Concentração
Tiocianato de guanidina	4M
Tris-HCl pH 8,0	100mM
Citrato de sódio pH 8,0	25mM
Sarcosina N-lauril	0,5%
PVP solúvel	1%
β-mercaptoetanol	2%
Água DEPC 0,1 %	Completar o volume

Anexo B

Distribuição do e-value para as bibliotecas de RNA-Seq.

Figura A. 1 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Flor

Figura A. 2 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Folha

Figura A. 3 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Raiz

Figura A. 4 – Gráfico da distribuição do e-value para a Biblioteca de Seedling

Anexo C

Distribuição dos valores de Similaridade média para as bibliotecas do RNA-Seq.

Figura A. 5 – Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Flor

Figura A. 6 - Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Folha

Figura A. 7 - Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Raiz

Figura A. 8 - Gráfico da distribuição da similaridade das sequências para a Biblioteca de Seedling

Anexo D

Distribuição das espécies nos Top-hits para as bibliotecas do RNA-Seq.

Figura A. 9 – Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Flor

Figura A. 10 - Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Folha

Figura A. 11 - Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Raiz

Figura A. 12 - Gráfico da Distribuição das espécies nos Top-hits da Biblioteca de Seedling

Anexo E

Figura A. 13 - Árvore filogenética apresentada pelo APGII (ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP, 2003). Retângulo em vermelho mostra a proximidade entre as ordens Lamiales e Solanales

Anexo F

Protocolo de extração de RNA total com reagente TRIzol® (Invitrogen™)

1. Macerar as amostras em Nitrogênio Líquido até obter um pó fino;
2. Coletar cerca de 100 mg em um tubo plástico de 1,5 mL;
3. Adicionar 1 mL de TRIzol® e agitar vigorosamente por 1 min;
4. Certificar-se que todo o material vegetal foi ressuspensionado no reagente;
5. Centrifugar a 12.000 g por 10 min a 4°C;
6. Coletar cuidadosamente a fase sobrenadante e transferi-la para um novo tubo;
7. Adicionar 200 µL de Clorofórmio puro e agitar vigorosamente;
8. Incubar a temperatura ambiente por 5 min
9. Centrifugar a 12.000g por 10 min a 4°C;
10. Repetir os passos 6 a 9 mais 2 vezes;
11. Coletar cuidadosamente a fase sobrenadante e transferi-la para um novo tubo;
12. Adicionar 300 µL de Isopronanol e misturar cuidadosamente por inversão;
13. Incubar a temperatura ambiente por 10 min;
14. Centrifugar a 12.000g por 10 min a 4°C;
15. Descartar cuidadosamente o sobrenadante;
16. Adicionar 1 mL de etanol 75% (preparado com água DEPC 0,1%) bem gelado
17. Inverter o tubo cerca de 30 vezes;
18. Centrifugar a 6.500g por 5 min a 4°C;
19. Descartar cuidadosamente o sobrenadante;
20. Secar o pellet em temperatura ambiente;
21. Adicionar 20 µL de água DEPC 0,01% gelada sobre o pellet;
22. Ressuspender lentamente o pellet;
23. Manter refrigerado durante o uso e armazenar em freezer -80°C.

Anexo G

Protocolo modificado para extração de DNA genômico (DOYLE; DOYLE, 1990)

1. Macerar o tecido em nitrogênio líquido e coletar 100 mg para a extração;
2. Adicionar 700 μL de tampão CTAB e 7 μL de β -mercaptoetanol (10% do volume de tampão CTAB);
3. Agitar vigorosamente em vórtex;
4. Incubar a 60°C por 30 s;
5. Adicionar 15% (do volume de tampão CTAB) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
6. Agitar vigorosamente em vórtex;
7. Centrifugar a 10.000 g , por 3 min, a 4°C;
8. Coletar o sobrenadante e transferir para novo tubo;
9. Adicionar 15% (do volume coletado) de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1);
10. Agitar vigorosamente em vórtex;
11. Centrifugar a 10.000 g , por 3 min, a 4°C;
12. Repetir os passos 8 a 11 mais duas vezes;
13. Coletar o sobrenadante e transferir para novo tubo;
14. Adicionar 3 μL de RNase [10 mg/ml];
15. Incubar a 37°C por 20 min;
16. Adicionar 70% (do volume) de isopropanol;
17. Misturar cuidadosamente por inversão;
18. Centrifugar a 13.000 g , por 15 min, a 4°C;
19. Descartar o sobrenadante;
20. Lavar o pellet com 500 μL de etanol 70%;
21. Centrifugar a 13.000 g , por 5 min, a 4°C;
22. Secar o pellet em temperatura ambiente;
23. Ressuspender o pellet em 30 μL de água Milli-Q estéril;
24. Verificar a integridade da amostra através de eletroforese em gel de agarose;
25. Armazenar em freezer -20°C.

Anexo H

Tabela A. 1 - Conversão dos valores de peso dos vasos

Vaso	Pesagem	Peso (kg)	Média (kg)	Peso da água (100%)(kg)	Peso da água (40%)(kg)	Peso do Vaso com 40% de água
3	1	7,547	7,619	4,135	1,654	5,138
	2	7,638				
	3	7,672				
4	1	7,562	7,656	4,155	1,662	5,163
	2	7,685				
	3	7,720				
12	1	7,767	7,888	4,281	1,712	5,319
	2	7,959				
	3	7,937				
17	1	7,053	7,155	3,883	1,553	4,825
	2	7,180				
	3	7,232				
18	1	7,232	7,295	3,959	1,584	4,919
	2	7,299				
	3	7,354				
23	1	7,796	7,880	4,277	1,711	5,314
	2	7,892				
	3	7,952				
25	1	8,083	8,130	4,412	1,765	5,482
	2	8,146				
	3	8,160				
26	1	8,004	8,054	4,371	1,748	5,431
	2	8,056				
	3	8,101				
29	1	7,890	7,980	4,331	1,732	5,381
	2	7,991				
	3	8,059				
30	1	7,699	7,796	4,231	1,693	5,257
	2	7,847				
	3	7,842				

Anexo I

Tabela A. 2 - Valores da taxa fotossintética utilizados para a determinação da curva de resposta fotossintética à luz

P.A.R. Emitida	P.A.R. Incidente na Folha	Planta 1	Planta 2	Planta 3	Planta 4	Média	Desvio Padrão
0	0	-0,27	0,92	-0,11	-0,58	-0,01	0,65
50	43	2,60	2,83	2,04	1,78	2,31	0,49
60	52	3,68	3,06	3,03	3,18	3,24	0,30
70	60	6,04	3,57	3,47	0,37	3,36	2,32
80	69	4,58	4,11	3,96	1,61	3,57	1,33
90	78	4,93	4,65	4,25	6,01	4,96	0,75
100	86	4,80	5,09	4,79	6,46	5,29	0,80
200	173	9,17	7,96	8,64	5,09	7,72	1,82
400	347	10,09	13,13	12,33	12,09	11,91	1,29
600	522	15,46	16,36	14,50	14,46	15,20	0,90
800	695	17,76	17,69	15,83	13,46	16,19	2,02
1000	869	16,85	18,53	16,59	16,96	17,23	0,88
1200	1044	18,41	14,79	16,82	17,78	16,95	1,58
1400	1217	21,04	23,96	17,29	18,83	20,28	2,90
1600	1391	15,14	16,88	17,35	14,44	15,95	1,39
1800	1565	18,64	20,07	17,57	18,85	18,78	1,03
2000	1739	15,67	20,25	17,58	14,95	17,11	2,37

Anexo J

Tabela A. 3 - Estatística descritiva da taxa fotossintética e taxa transpiratória a partir dos valores obtidos para o experimento de estresse hídrico

Tratamentos	Fotossíntese ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)								Transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)							
	Max	Min	Q1	Q2	Q3	Média	SD	Erro	Max	Min	Q1	Q2	Q3	Média	SD	Erro
T1	29,86	0	3,91	7,30	10,25	7,39	5,02	0,51	7,57	0,24	1,64	3,29	4,30	3,14	1,68	0,17
T2	21,53	2,36	6,22	8,41	10,38	8,69	3,49	0,48	8,13	1,18	2,99	3,96	5,15	4,10	1,58	0,21
T3	15,47	0	5,91	8,22	10,26	8,17	3,41	0,46	8,55	1,26	3,40	4,23	5,81	4,53	1,64	0,22
T4	9,70	0,11	1,68	2,46	4,23	3,12	2,09	0,24	3,52	0,24	0,63	1,00	1,58	1,13	0,62	0,07
T5	8,89	0	1,89	2,64	4,52	3,27	2,41	0,42	3,31	0,22	0,92	1,36	1,82	1,37	0,71	0,12
T6	10,41	0	2,16	3,66	4,70	3,76	2,55	0,45	4,55	0,14	1,04	1,64	2,28	1,67	0,96	0,17
T7	8,88	0	0,79	1,97	3,40	2,27	1,86	0,19	2,84	0	0,44	0,74	1,10	0,79	0,50	0,05
T8	8,73	0	0,91	2,13	3,01	2,19	1,79	0,23	3,04	0	0,51	0,82	1,19	0,87	0,59	0,07
T9	8,27	0	0,57	2,08	4,24	2,60	2,25	0,29	3,13	0	0,40	0,90	1,51	1,05	0,80	0,10
S1	29,86	0	5,66	8,02	10,34	7,94	4,29	0,30	8,55	0,24	2,64	3,69	4,91	3,76	1,74	0,12
S2	10,41	0	1,71	2,75	4,50	3,30	2,27	0,19	4,55	0,14	0,68	1,21	1,81	1,31	0,76	0,06
S3	8,88	0	0,81	2,06	3,45	2,34	1,95	0,13	3,13	0	0,43	0,79	1,23	0,89	0,63	0,04
I1	29,86	0	1,59	3,20	6,35	4,40	4,13	0,25	7,57	0	0,63	1,19	2,53	1,76	1,54	0,09
I2	21,53	0	1,91	3,58	7,41	4,82	3,99	0,33	8,13	0	0,84	1,44	3,31	2,17	1,84	0,15
I3	15,47	0	1,95	4,33	7,70	4,91	3,76	0,31	8,55	0	0,90	1,94	3,63	2,47	2,00	0,16

Max = Valor máximo; Min = Valor mínimo; Q1 = Primeiro Quartil (25%); Q2 = Segundo Quartil ou Mediana (50%); Q3 = Terceiro Quartil (75%); SD = Desvio Padrão da Média; Erro = Erro Padrão da Média. T1 a T9 = Tratamentos de estresse hídrico x irradiância. S1 a S3 = Tratamentos de estresse hídrico; I1 a I3 = Observações acima da irradiância

Anexo K

Tabela A. 4 - Estatística descritiva da condutância estomática e temperatura foliar a partir dos valores obtidos para o experimento de estresse hídrico

Tratamentos	Condutância Estomática (mol m ⁻² s ⁻¹)								Temperatura Foliar (°C)							
	Max	Min	Q1	Q2	Q3	Média	SD	Erro	Max	Min	Q1	Q2	Q3	Média	SD	Erro
T1	0,33	0	0,04	0,08	0,13	0,091	0,066	0,0067	42,8	30,2	33,8	36,9	39,3	36,59	3,26	0,3335
T2	0,37	0,02	0,06	0,1	0,16	0,122	0,073	0,0101	43,2	30,7	33,4	38,9	40,8	37,65	3,63	0,4989
T3	0,41	0,02	0,08	0,11	0,17	0,133	0,077	0,0107	43,7	31,2	33,9	39,2	41,2	38,08	3,58	0,4926
T4	0,09	0	0,01	0,02	0,04	0,024	0,019	0,0023	43,2	30,9	33,1	36,7	40,6	36,67	3,80	0,4448
T5	0,10	0	0,01	0,02	0,04	0,030	0,025	0,0044	43,6	31,3	32,9	38,0	41,3	37,39	4,24	0,7511
T6	0,12	0	0,01	0,03	0,04	0,036	0,031	0,0056	43,9	31,7	33,4	38,5	42,1	37,97	4,24	0,7617
T7	0,08	0	0	0,01	0,02	0,015	0,015	0,0016	41,2	30,8	33,5	36,7	39,0	36,33	2,99	0,3138
T8	0,09	0	0	0,01	0,02	0,017	0,018	0,0023	41,6	31,2	33,8	38,6	39,8	37,24	3,20	0,4168
T9	0,09	0	0	0,02	0,04	0,023	0,023	0,0031	42,1	31,6	34,2	39,2	40,6	37,78	3,25	0,4239
S1	0,41	0	0,06	0,1	0,15	0,110	0,073	0,0052	43,7	30,2	33,7	37,7	40,0	37,26	3,49	0,2459
S2	0,12	0	0,01	0,02	0,04	0,028	0,024	0,0021	73,9	30,9	33,1	37,7	40,8	37,14	4,01	0,3444
S3	0,09	0	0	0,01	0,03	0,018	0,019	0,0013	42,1	30,8	33,7	37,5	39,8	37,00	3,17	0,2195
I1	0,33	0	0,01	0,02	0,06	0,045	0,054	0,0034	43,2	30,2	33,5	36,8	39,4	36,52	3,32	0,2063
I2	0,37	0	0,01	0,04	0,08	0,058	0,068	0,0057	43,6	30,7	33,4	38,5	40,3	37,42	3,59	0,2993
I3	0,41	0	0,01	0,04	0,09	0,067	0,072	0,0061	43,9	31,2	34,0	39,0	41,0	37,93	3,58	0,2999

Max = Valor máximo; Min = Valor mínimo; Q1 = Primeiro Quartil (25%); Q2 = Segundo Quartil ou Mediana (50%); Q3 = Terceiro Quartil (75%); SD = Desvio Padrão da Média; Erro = Erro Padrão da Média. T1 a T9 = Tratamentos de estresse hídrico x irradiância. S1 a S3 = Tratamentos de estresse hídrico; I1 a I3 = Observações acima da irradiância

Anexo L

Tabela A. 5 - Estatística descritiva do conteúdo relativo de água foliar (CRA) e do teor de prolina foliar a partir dos valores obtidos para o experimento de estresse hídrico

Tratamentos	Conteúdo Relativo de Água Foliar (%)							
	Max	Min	Q1	Q2	Q3	Média	SD	Erro
S1	81,96	58,46	69,11	74,05	77,44	72,62	7,25	1,87
S2	85,08	78,83	80,27	81,47	82,74	81,60	1,83	0,47
S3	78,51	52,07	57,33	63,91	66,26	63,05	7,58	1,96
Teor de Prolina Foliar ($\mu\text{g} \times \text{g tecido}^{-1}$)								
S1	159,24	14,53	25,74	48,78	156,07	80,91	71,13	31,81
S2	129,94	71,53	114,23	114,25	122,38	110,47	22,72	10,16
S3	752,70	96,10	107,86	155,93	290,54	280,62	274,95	122,96

Max = Valor máximo; Min = Valor mínimo; Q1 = Primeiro Quartil (25%); Q2 = Segundo Quartil ou Mediana (50%); Q3 = Terceiro Quartil (75%); SD = Desvio Padrão da Média; Erro = Erro Padrão da Média. S1 a S3 = Tratamentos de estresse hídrico

Anexo M

Tabela A. 6 - Número de mapas metabólicos da plataforma KEGG para os transcritos da Biblioteca de Raiz referenciados para estresse hídrico, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continua)

Nº	Nome	S	E
1	Glycerolipid metabolism	30	8
2	Phenylalanine metabolism	24	3
3	T cell receptor signaling pathway	24	2
4	Drug metabolism - cytochrome P450	24	2
5	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	24	2
6	Starch and sucrose metabolism	24	4
7	Galactose metabolism	23	6
8	Glutathione metabolism	19	3
9	Pyruvate metabolism	18	3
10	Glycolysis / Gluconeogenesis	17	6
11	beta-Alanine metabolism	17	3
12	Pentose and glucuronate interconversions	16	3
13	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	16	6
14	Carotenoid biosynthesis	16	3
15	Tyrosine metabolism	16	2
16	Ether lipid metabolism	14	2
17	Glycerophospholipid metabolism	14	2
18	Glycine, serine and threonine metabolism	13	4
19	Arginine and proline metabolism	12	2
20	Oxidative phosphorylation	12	2
21	Fatty acid degradation	11	2
22	mTOR signaling pathway	11	1
23	Tryptophan metabolism	11	2
24	Drug metabolism - other enzymes	11	2
25	Chloroalkane and chloroalkene degradation	10	1

Tabela A. 6 - Número de mapas metabólicos da plataforma KEGG para os transcritos da Biblioteca de Raiz referenciados para estresse hídrico, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(continuação)

Nº	Nome	S	E
26	Purine metabolism	10	5
27	Limonene and pinene degradation	10	1
28	Valine, leucine and isoleucine degradation	10	1
29	Lysine degradation	10	1
30	Ascorbate and aldarate metabolism	10	1
31	Histidine metabolism	10	2
32	Phenylpropanoid biosynthesis	9	2
33	Selenocompound metabolism	9	2
34	Fructose and mannose metabolism	8	2
35	Tropane, piperidine and pyridine alkaloid biosynthesis	7	1
36	Isoquinoline alkaloid biosynthesis	7	1
37	Pentose phosphate pathway	6	3
38	Cysteine and methionine metabolism	5	3
39	Methane metabolism	4	2
40	Riboflavin metabolism	4	2
41	Caprolactam degradation	4	2
42	Sulfur metabolism	4	2
43	Phosphatidylinositol signaling system	4	2
44	Inositol phosphate metabolism	4	2
45	Sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis	3	2
46	Steroid biosynthesis	3	2
47	Terpenoid backbone biosynthesis	3	2
48	Thiamine metabolism	3	1
49	Novobiocin biosynthesis	3	1
50	Phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis	3	2
51	Biotin metabolism	2	1
52	Streptomycin biosynthesis	2	1

Tabela A. 6 - Número de mapas metabólicos da plataforma KEGG para os transcritos da Biblioteca de Raiz referenciados para estresse hídrico, sendo “S” a quantidade de sequências atribuídas a cada mapa, e “E” a quantidade de ECs localizados

(conclusão)

Nº	Nome		
		S	E
53	Caffeine metabolism	2	1
54	Fatty acid biosynthesis	2	1
55	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	2	1
56	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	2	2
57	alpha-Linolenic acid metabolism	2	1
58	Arachidonic acid metabolism	2	1
59	Carbon fixation in photosynthetic organisms	1	1
60	Glucosinolate biosynthesis	1	1
61	Retinol metabolism	1	1
62	Sphingolipid metabolism	1	1
63	Citrate cycle (TCA cycle)	1	1