

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

**Análise de expressão dos genes *SbSRC2*, *SbCCA1* e *SbCBFs* em resposta ao
frio e fotoperíodo em cana-de-açúcar**

João Pedro Ramos da Silva

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

**Piracicaba
2023**

João Pedro Ramos da Silva
Engenheiro Agrônomo

**Análise de expressão dos genes *SbSRC2*, *SbCCA1* e *SbCBFs* em resposta ao frio e
fotoperíodo em cana-de-açúcar**

Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profª. Dra. **HELAINÉ CARRER**

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

Piracicaba
2023

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

Silva, João Pedro Ramos da

Análise de expressão dos genes *SbSRC2*, *SbCCA1* e *SbCBF3* em resposta ao frio e fotoperíodo em cana-de-açúcar / João Pedro Ramos da Silva. - - Versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011 - - Piracicaba, 2023.

70 p.

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

1 Estresse abiótico 2. Tolerância a frio 3. Cascata de sinalização 4. Expressão gênica
5. *Saccharum sp.* I. Título

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por não me deixar desistir diante das situações enfrentadas e por sempre colocar pessoas boas em minha vida.

Aos meus pais, para além da questão financeira, por todo amor, carinho e compreensão.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pelas oportunidades que tive na unidade, pelo ensino e por minha formação profissional.

À professora Helaine Carrer, minha orientadora, por ter me acolhido tão bem em seu laboratório; uma área até então nova e desafiadora pra mim. Saiba que sou muito grato por ter me auxiliado nessa etapa profissional e também no cenário geral.

Ao Dr. Pedro Boscariol, por ter gasto todas as horas possíveis na bancada (e fora dela), me auxiliando em todas as atividades pertinentes para a conclusão do meu projeto de Mestrado. Agradeço imensamente por todo apoio e parceria nestes meses compartilhados no laboratório.

Gostaria de agradecer a minha companheira e técnica do laboratório, Fátima, por todos os conselhos e sorrisos durante os meses que fiz parte do time CEBTEC. Agradeço também ao técnico Ênio pelo amparo durante meus experimentos no laboratório.

À minha amiga, Giovana Cunha, por todos os momentos divididos dentro e, principalmente, fora do laboratório. Sentirei saudades dos momentos de sorvete e conversas, pois esses momentos foram meu ponto de paz em Piracicaba - SP.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES).

“Mas, afinal, será que é covardia reconhecer o medo?”

Markus Zusak

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Cana-de-açúcar.....	13
2.2. Estresse abiótico em cana-de-açúcar.....	15
2.3. Vias de sinalização de estresses e respostas moleculares.....	16
2.4. Genes relacionados ao estresse a frio.....	18
3. OBJETIVO.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1. Material vegetal.....	25
4.2. Identificação de possíveis genes responsivos ao frio.....	25
4.3. Desenho de primers.....	30
4.4. Experimento de estresse de frio.....	31
4.4.1. Extração RNA.....	33
4.4.2. Síntese de cDNA.....	34
4.4.3. Experimento de RT-qPCR.....	34
4.5. Análise estatística.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Identificação de possíveis genes de resposta ao frio em cana-de-açúcar.....	37
5.2. Análise de expressão diferencial dos genes <i>SRC2</i> , <i>CCA1</i> , <i>CBF1</i> e <i>CBF3</i> em cana-de-açúcar frente a baixas temperaturas.....	38
5.2.1. <i>SRC2</i>	38
5.2.2. <i>CCA1</i>	40
5.2.3. <i>CBF3</i>	42
6. CONCLUSÃO.....	47
REFERÊNCIAS.....	49
APÊNDICE.....	61

RESUMO

Análise de expressão dos genes *SbSRC2*, *SbCCA1* e *SbCBFs* em resposta ao frio e fotoperíodo em cana-de-açúcar

O crescimento e produtividade de cultivos economicamente importantes pode ser reduzida devido a diversos fatores ambientais, como seca, salinidade, temperaturas altas e baixas, além de outros tipos de estresses. Entre esses fatores, a ocorrência de baixas temperaturas como congelamento e resfriamento, pode ser bastante prejudicial e afetar a distribuição geográfica das plantas, principalmente culturas de regiões tropicais, como o caso da cana-de-açúcar. Após o estresse por baixas temperaturas ser identificado pelas plantas, um dos mecanismos adotados é a transdução de sinal por uma cascata de sinalização que ativa vários genes capazes de responder ao estresse de forma eficiente. Neste trabalho, buscou-se avaliar a resposta de alguns dos genes envolvidos nessas vias em plantas de cana-de-açúcar. Para isso, a identificação de possíveis genes relacionados com resposta ao frio em plantas foi iniciada com uma revisão de literatura utilizando a palavra-chave “*cold stress genes*”. Assim, foram obtidos 21 genes candidatos nas espécies de plantas *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e arroz (*Oryza sativa*). Sequências ortólogas destes genes foram identificados em bancos de dados de cana-de-açúcar e seu potencial na resposta ao frio foi avaliado utilizando dados públicos de expressão em larga escala. Como resultado desta análise, foram selecionados os genes alvo *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3* para avaliar suas respostas frente ao estresse agudo de frio de 4°C em condição de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e, paralelamente, na condição de escuro total utilizando plantas com 35 dias após o plantio. Em todos os tratamentos amostras controle foram coletadas imediatamente no início dos tratamentos (tempo “zero”), seguido por coletas com 1, 2, 12 e 24 horas de estresse. Como resultado, foi observado que os genes *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3* apresentaram comportamentos distintos frente ao tempo de exposição ao frio e condição experimental, com presença ou ausência de fotoperíodo. A identificação e posterior manipulação da expressão de genes responsivos ao frio ou de seus elementos regulatórios apresenta um potencial relevante para o melhoramento genético. Assim, este trabalho contribui na caracterização da expressão de genes de cana-de-açúcar cuja manipulação pode auxiliar no aumento da tolerância ao frio.

Palavras-chave: Estresse abiótico, Tolerância a frio, Cascata de sinalização, Expressão gênica, *Saccharum* sp.

ABSTRACT

Expression analysis of *SbSRC2*, *SbCCA1* and *SbCBFs* genes in response to cold and photoperiod in sugarcane

The growth and productivity of economically important crops can be reduced due to several environmental factors such as drought, salinity, high and low temperatures, and other types of stresses. Among these factors, the occurrence of low temperatures causes freezing and cooling, which can be very harmful and affect the geographic distribution of plants. This is specially true for tropical crops such as sugarcane. After low temperature stress is detected by a plant, one of the response mechanisms involves signal transduction by a signaling cascade that activates several genes capable of responding to stress efficiently. In this work, we sought to evaluate the response of some of the genes involved in these pathways in sugarcane plants. For this, the identification of possible genes related to the response to cold in plants was started with a literature review using the keyword “*cold stress genes*”. This search yielded 21 candidate genes described in *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) and rice (*Oryza sativa*). Orthologous sequences of these genes were identified in sugarcane databases and their potential in response to cold was evaluated using public large-scale expression data. As a result of this analysis, the target genes *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* and *SbCBF3* were selected to evaluate their responses to acute cold stress at 4°C in a photoperiod of 16 hours of light and 8 hours of darkness and, in parallel, in total darkness using plants 35 days after planting. In all treatments, control samples were collected immediately at the beginning of the treatments (“zero” time), followed by collections with 1, 2, 12 and 24 hours of stress. As a result, the genes *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* and *SbCBF3* showed different behaviors in relation to the time of exposure to cold and the experimental condition, with the presence or absence of photoperiod. The identification and subsequent manipulation of the expression of cold-responsive genes or their regulatory elements presents a relevant potential for genetic improvement. Thus, this work contributes to the characterization of the expression of sugarcane genes whose manipulation can help increase cold tolerance.

Keywords: Abiotic stress, Cold tolerance, Signaling cascade, Gene expression, *Saccharum* sp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema de busca por ortólogos de genes de resposta ao estresse de frio em cana-de-açúcar. A) Identificação de genes candidatos; b) Obtenção de números de acesso de ortogrupos no banco de dados EggNOG v5.0; c) Identificação de possíveis ortólogos em bancos de dados de cana-de-açúcar; d) Identificação de domínios nas sequências de cana-de-açúcar e seleção baseada na completude do domínio; e) Seleção dos transcritos mais prováveis para análises de expressão por RNA-seq.....27
- Figura 2. Esquema representando o desenho experimental. A) Ilustração de um vaso contendo quatro plantas de cana-de-açúcar; b) Ilustração das quatro condições experimentais. Nas duas superiores existe a presença de fotoperíodo, enquanto nas duas inferiores escuro total. As temperaturas foram de 25°C na condição controle ou 4°C para o choque de frio.....32
- Figura 3. Ilustração de uma planta de cana-de-açúcar com sua numeração de acordo com a classificação de Kuijper. Entre parênteses está descrito a ordem das coletas realizadas (coleta 1 até coleta 5). Figura modificada de Dillewijn (1952).....33
- Figura 4. Análise por RT-qPCR da expressão do gene *SbSRC2* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do test “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).....39
- Figura 5. Análise por RT-qPCR da expressão do gene *SbCCA1* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do test “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).....41
- Figura 6. Análise por RT-qPCR da expressão do gene *SbCBF1* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do test “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).....43
- Figura 7. Análise por RT-qPCR da expressão do gene *SbCBF3* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do test “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).....44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes envolvidos na resposta ao estresse de frio, suas funções e fonte na literatura.....	26
Tabela 2. Putativos genes de resposta ao frio em painço (<i>S. italica</i>), sorgo (<i>S. bicolor</i>) e milho (<i>Z. mays</i>). Genes: gene ou família; N. acesso: identificadores dos transcritos no banco de dados Phytozome (phytozome-next.jgi.doe.gov/); Resposta: classificação de acordo com a expressão em resposta ao frio (1) rápida, (2) tardia, ou (3) sem resposta.....	28
Tabela 3. Primers desenhados para experimento de RT-qPCR e suas características.....	31

1. INTRODUÇÃO

As plantas são consideradas as principais responsáveis pelo bom funcionamento do ecossistema global, pois como produtoras primárias utilizam a energia solar e o gás carbônico, para produzir oxigênio e matéria orgânica (Pang et al., 2021). Além disso, são um dos pilares da economia mundial, fruto da relação intrínseca entre humanos e plantas. Nesse aspecto, os produtos de origem vegetal incluem alimentos, roupas, medicamentos, combustíveis como o biodiesel e o etanol, entre outros (Zuanazzi e Mayorga, 2010). O Brasil, por exemplo, além de ter seu nome derivado de uma planta tem como base econômica a agricultura com relevância para o cultivo de soja, milho, algodão, café, cana-de-açúcar, citros e eucaliptos, além de outras culturas (Duarte et al., 2021). A cultura da cana-de-açúcar, em particular, é de extrema importância socioeconômica para o Brasil, o qual é seu maior produtor mundial (May e Ramos, 2019).

A cana-de-açúcar é uma planta oriunda do território sul-asiático, pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae, gênero *Saccharum* L. (Rodrigues, 2022), e foi introduzida no Brasil durante a colonização portuguesa. É uma cultura de grande importância econômica, sendo responsável por produzir cerca de 80% do açúcar consumido no mundo (Sugiharto et al., 2023). O açúcar é uma das *commodities* agrícolas mais produzidas no mundo depois dos cereais (Katri e Pandit, 2022). Devido a este alto valor econômico, a planta é alvo recorrente de estudos para o seu melhoramento genético, tecnologia que já produziu diversas variedades desse cultivo (Moreira e Gonçalves, 2022). No entanto, assim como outras culturas, sua produção pode ser afetada por condições ambientais desfavoráveis (Shrestha et al., 2023), gerando um impacto direto em seu crescimento e desenvolvimento (Sugiharto et al., 2023).

Por serem sésseis, as plantas possuem diversas estratégias fisiológicas, morfológicas, celulares e moleculares para sobreviverem à exposição a diversos estresses ambientais (Cohen, 2019). Tais estresses podem ser de origem biótica ou abiótica e ameaçar o bem-estar das plantas. Esse tipo de ameaça pode gerar grandes prejuízos para as culturas como também desafiar a segurança alimentar global (Bailey-Serres et al., 2019).

O termo “estresse” pode ser definido como qualquer condição externa que cause alguma desvantagem e/ou prejuízo às plantas (Taiz e Zieger, 2016). Um ambiente externo está exposto a ocorrência de diversos estresses, a exemplo da salinidade, da alta intensidade de luz, do calor, da seca, do excesso ou falta de nutrientes, das tensões anaeróbicas (anóxia e hipóxia), do ozônio, do resfriamento, do congelamento, além das pragas e doenças. Esses estresses geralmente ocorrem em associação no campo, intensificando seus efeitos (Silva, 2019; Cheavegatti-Gianotto et al., 2019).

Para sobreviver aos estresses ambientais, as plantas precisam se adaptar à situação em tempo hábil e para isso desenvolveram vias regulatórias extremamente eficientes. Estas vias podem ser de resposta rápida, para lidar com o estresse agudo ou até mesmo uma resposta adaptativa para lidar com o estresse persistente (Rodrigues, 2018). As plantas podem passar pelo processo de adaptação ao ambiente através de mudanças genéticas, modificando de modo direto sua fisiologia ou morfologia e se habituando conforme sua plasticidade fenotípica (Taiz e Zieger, 2016).

O período de luz é responsável pelo sucesso do processo de fotossíntese e por potencializar o metabolismo de carboidratos nas plantas (Dodd e Webb, 2014). Os ritmos diários, oriundos da resposta do ciclo claro-escuro, são atores de extrema importância no controle da resposta aos estímulos ambientais, e são responsáveis pela sincronização dos ritmos circadianos endógenos com estímulos externos, como os fotoperíodos (Alves, 2019). A ausência total de luz resultará às plantas efeitos negativos diretos sobre seu crescimento e desenvolvimento. Problemas nos componentes do oscilador circadiano podem modificar o funcionamento livre ou até resultar em arritmia (Kim et al., 2007).

O estresse abiótico acarreta respostas multiníveis, que podem envolver desde a detecção do estresse, transdução de sinal, transcrição, processamento de transcrição, tradução e modificações de proteínas pós-traducionais (*Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC*, 2021). Temperaturas amenas (abaixo da média de temperatura), por exemplo, são capazes de induzir a expressão de genes regulados pelo frio (Yuan et al., 2018). Entretanto, alguns danos podem ser permanentes quando prejudiciais à fluidez da membrana e à estrutura de proteínas através do estresse causado pelo calor ou frio, consequentemente afetando reações químicas catalisadas por enzimas (Saleem et al., 2021).

Considerando que o estresse pelo frio é um fator relevante que afeta a produtividade em cana-de-açúcar, este trabalho de dissertação teve como objetivo avaliar nessa espécie, se existe alteração na expressão dos genes *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3* identificados por apresentarem potencial de resposta ao estresse de frio. A identificação e posterior manipulação da expressão de genes responsivos ao frio ou de seus elementos regulatórios é uma ferramenta importante para o melhoramento genético. A descoberta de genes envolvidos na tolerância ao frio, apresenta grande potencial em expandir o cultivo de cana-de-açúcar para ambientes menos propícios ao plantio e evitar o efeito negativo de ondas de frio inesperadas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma planta oriunda do território asiático e pertence à família Poaceae, tribo Andropogoneae, gênero *Saccharum* L. (Rodrigues, 2022). As variedades de cana-de-açúcar utilizadas na agricultura são comumente híbridos de duas espécies, *Saccharum spontaneum* e *Saccharum officinarum*, as quais possuem características desejáveis para a obtenção de alta produtividade. A primeira por apresentar alta produção de biomassa e tolerância a vários tipos de estresses ambientais e a segunda por apresentar alto acúmulo de sacarose (Anunanthini et., 2017).

Além dos principais produtos como o açúcar e o etanol, subprodutos da produção como as folhas, bagaço e melaço, também podem ser comercializados. A biomassa produzida pode ser fermentada para produzir bioetanol, cujo uso como biocombustível no Brasil é pioneiro, ou para a cogeração de bioeletricidade através de sua queima (Cândido Júnior, 2022). Além disso, produz a vinhaça, torta de filtro e fertilizantes. Por esses motivos, a cana-de-açúcar é considerada um exemplo de bio-recurso renovável (Katri e Pandit, 2022).

De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento do Brasil (CONAB), os efeitos climáticos adversos e as baixas temperaturas registradas no ano de 2021, fizeram com que a estimativa de colheita para a safra de 2021/22 fosse de 592 milhões de toneladas, redução de 9,5% em relação à safra anterior (Conab, 2021). Já a estimativa para a safra 2022/23 da cana-de-açúcar indica queda na produção, com 572,9 milhões de toneladas. Essa redução se deve a baixos índices pluviométricos e baixas temperaturas na região Centro-sul, a qual participa de cerca de 90% da produção total do país (Conab, 2022).

Dessa forma, a cultura da cana-de-açúcar necessita de condições agroclimáticas adequadas para seu pleno desenvolvimento e produção. Regiões de climas tropicais são ótimas aliadas dessa cultura, uma vez que possuem temperaturas variantes de 19 a 32°C e chuvas distribuídas ao longo do ano (Marin, 2022). É uma cultura que requer dias ensolarados, aliados a umidade elevada para atingir bons rendimentos na produção. A temperatura ideal de crescimento da cana é de 30 a 34°C, possuindo crescimento retardado quando a temperatura está abaixo de 20°C (Martins e Olivette, 2015).

Além disso, é importante para um canavial haver condições climáticas bem definidas, pois a imprevisibilidade de baixas temperaturas em períodos atípicos afeta a fase de crescimento da cultura (Li e Yang, 2015). O crescimento vegetativo irá necessitar de umidade e calor, uma vez que a água possui papel essencial na turgescência celular e translocação de moléculas, enquanto a fase

de maturação é favorecida por baixas temperaturas e menor disponibilidade hídrica, auxiliando no acúmulo de açúcar (Fagundes, 2022).

O crescimento eficiente em altas temperaturas se deve ao mecanismo C4 de fixação de carbono da cana-de-açúcar e outras Poaceae. Existem diferenças no processo de fotossíntese das plantas C3 e plantas C4. No primeiro caso, o processo ocorre nas células do mesófilo, enquanto nas plantas C4 esse evento ocorre no mesófilo e na célula da bainha (Karki et al. 2013). O transporte de elétrons e a fotofosforilação é similar ao encontrado nas plantas C3. No entanto, a assimilação de carbono das plantas C4 ocorre através da enzima PEP carboxilase no mesófilo, e em seguida ocorre a transferência para a célula da bainha na forma de ácido aspártico ou ácido málico, ocorrendo o ciclo de Calvin para a formação do ácido fosfórico triose. Já nas plantas C3 a enzima que atua no sequestro de carbono para o ciclo de Calvin é a Rubisco (Bai et al., 2021).

Em temperatura e luminosidade elevadas, o mecanismo C4 confere maiores eficiências em comparação com o mecanismo C3 (Verma et al., 2019). Em contrapartida, o mecanismo C3, encontrado por exemplo em feijão, soja, café, algodão e trigo (Braga, 2020) é um mecanismo de menor gasto energético. Esta característica se reflete em sua maior eficiência em ambientes mais amenos em comparação com o mecanismo C4, devido à redução de perda de C na fotorrespiração (Gowik e Westhoff, 2011).

Nesse contexto, as mudanças climáticas são uma ameaça à cultura de cana-de-açúcar, visto que podem afetar o ambiente de modo prejudicial ao desenvolvimento das plantas. De acordo com Silva (2022), as mudanças climáticas são os efeitos da alteração das variáveis climáticas: precipitação, temperatura e vento, observadas ao longo das últimas décadas e também projeções para décadas futuras. Estas mudanças podem ser de origem antropogênica ou natural e ameaçam a produção agrícola, prejudicam as pessoas que dependem diretamente da agricultura para sua sobrevivência e afetam o mercado de alimentos, colocando em risco a segurança alimentar global (De' Donato e Michelozzi, 2014; Artaxo, 2020), visto que previsões apontam para uma população de 9 bilhões de habitantes no ano de 2050 (Rosenzweig et al., 2015).

O aumento na severidade dos extremos climáticos como seca, enchentes e geadas é uma realidade cada vez mais presente graças às mudanças climáticas que vem ocorrendo nos últimos anos em todo o planeta (Fao, 2021). Assim como outros estresses abióticos, baixas temperaturas e geadas podem afetar diretamente a produção e o desenvolvimento das culturas (WU et al., 2014), e possuem ocorrência geralmente durante o inverno (De Lucena et al., 2013).

Os danos causados por temperaturas baixas dependem da intensidade e duração do evento climático e podem resultar em aumento no preço dos alimentos, visto a ocorrência de prejuízos na escala de produção (Wrege et al., 2005). A ocorrência de baixas temperaturas no Brasil é observada com mais frequência em latitudes maiores de 20°S, envolvendo os Estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Bussoni et al., 2022) e podem afetar drasticamente culturas de clima tropical, como é o caso da cana-de-açúcar (Wrege et al., 2005).

2.2. Estresses abiótico em plantas

As plantas estão expostas a uma série de estresses ambientais que afetam e limitam a produtividade das culturas de interesse econômico. Há dois tipos principais de estresses para as plantas: o estresse biótico e o estresse abiótico (Zhang et al., 2019). O estresse biótico causa danos às culturas através do ataque de patógenos, como vírus, fungos, bactérias e nematóides. Em contrapartida, os efeitos causados pelo estresse abiótico também são muito severos e podem dizimar plantios. Exemplos de estresse abiótico são salinidade, radiação, temperaturas extremas, seca, excesso ou falta de nutrientes, tensões anaeróbicas (anóxia e hipóxia), ozônio, resfriamento e congelamento (Gaivota et al., 2019; Silva, 2019; Cheavegatti-Gianotto et al., 2019).

O termo “estresse” pode ser definido como qualquer fenômeno ambiental capaz de gerar uma tensão potencialmente prejudicial às plantas (Rodríguez et al., 2005). Os organismos vivos estão sujeitos a todo tipo de estresse e possuem uma série de vias para lidar com esse tipo de dano. No entanto, os animais podem se afastar de regiões estressantes, enquanto as plantas precisam sentir o ambiente externo e utilizar de mecanismos moleculares, bioquímicos e genéticos mais robustos para gerar respostas celulares adequadas, uma vez que não possuem mobilidade (Mittler, 2006). Estes mecanismos de respostas se dão através de vias de transdução de sinal, que servem como um elo entre a detecção do estresse e a resposta bioquímica apropriada, sendo muitas vezes reguladas por genes (Miryeganeh, 2021).

Apesar da falta de água ser o principal limitador da produção agrícola, podendo ocasionar uma perda de 70% da produção (Li et al., 2022), o estresse causado pelo frio pode acarretar, dentre os diversos prejuízos para as culturas, a limitação geográfica (Zhu, 2016). As perdas de rendimentos relacionados à seca e ao frio vêm aumentando nos últimos anos e ameaçam a produção agrícola em todo o mundo (Pourkheirandish et al., 2020).

As baixas temperaturas são um dos fatores que mais limitam o crescimento, desenvolvimento e produção de culturas de regiões tropicais (Gao et al., 2019), como é o caso da mandioca (Malik et al., 2020), cultura sensível ao frio e oriunda do Brasil (país tropical), como também outras culturas de interesse agrônômico como arroz, milho, algodão, tomate (Thiebaut et al., 2012) e a cana-de-açúcar (May e Ramos, 2019).

No entanto, as plantas podem utilizar do mecanismo de aclimação para minimizar o estresse causado pelo frio (Walter et al., 2015). Essa capacidade de se adaptar ao estresse é variável entre espécies e até mesmo entre diferentes variedades da mesma cultura (Kalisz et al., 2014). No caso da cana-de-açúcar, apesar de ser considerada uma planta sensível a baixas temperaturas, o grau de susceptibilidade ao frio está atrelado à variedade da cana estudada (Thiebaut et al., 2012).

Este tipo de estresse pode resultar em diferentes respostas a depender do genótipo da cana, sendo que plantas com melhor tolerância ao frio têm maior atividade enzimática antioxidante e melhor capacidade de eliminação de oxigênio ativo sob condições de frio (Su et al., 2020). Em situações estressantes, pode ocorrer alteração dos níveis de açúcar solúvel, malondialdeído (MDA), proteína solúvel e prolina, como também alterar o desempenho de enzimas como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e peroxidase (POD), que são fundamentais na manutenção da integridade das membranas celulares e regulação da homeostase das espécies reativas de oxigênio (ROS) quando em situação de estresse (Li et al., 2015; Sun et al., 2017). A atividade de SOD, CAT e POD, como também os níveis de MDA podem ser indicadores da grande quantidade de ROS nas células (Li, 2009).

Além das alterações apresentadas, o estresse por frio pode levar a mudanças em características morfológicas e fotossintéticas da planta, alterações nos complexos de pigmentos, clorofila, transporte de elétrons, atividade de enzimas, permeabilidade da membrana plasmática, ajuste osmótico e expressão gênica (Zhang et al., 2015; Li et al., 2018).

2.3. Vias de sinalização de estresses e respostas moleculares

Para sobreviver aos estresses ambientais, as plantas podem alterar diversos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. A percepção de estresses bióticos e abióticos dá início a inúmeras vias de sinalização celulares (Kudla et al., 2010; Petrov et al., 2015). Alguns dos eventos de sinalização incluem o aumento da concentração intracelular de Ca^{2+} , Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e ativação de cascatas de quinases (Seifikalhor et al., 2019; Zhao, 2021). Em específico, a quantidade intracelular de Ca^{2+} pode permitir a detecção de estresse de osmolaridade,

sal e temperatura em algumas situações, visto que a sinalização mediada por este nutriente é uma das formas mais comuns de transdução de sinais de estresse (Zang, 2022).

O aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular é detectado por proteínas quinases de ligação de cálcio (CDPKs ou CPKs), que podem identificar tanto aumento como diminuição dos níveis de cálcio (como um sensor), além de terem participação na adaptação das plantas a ambientes secos, salinos e estresses por calor e frio (Thor, 2019). As CPKs são de extrema importância na tolerância ao estresse abiótico e participam da ativação e regulação de vários genes, fatores de transcrição, enzimas e canais iônicos (Atif et al., 2019). Ademais, alguns genes podem ainda ser ativados ou suprimidos através da ligação dos sensores de Ca^{2+} a *cis*-elementos dos promotores dos genes envolvidos na resposta ao estresse (Zhao et al., 2021).

As ROS por sua vez podem atuar como sinalizadoras de condições de estresse biótico e/ou abiótico e favorecem respostas de defesa. Embora, a partir do momento que são produzidas excessivamente podem intensificar os danos chegando a causar eventos oxidativos deletérios (Carvalho, 2008). O mesmo ocorre com as RNS (espécies reativas de nitrogênio), as quais mesmo sendo moléculas chaves no crescimento, desenvolvimento e metabolismo das plantas podem ser tóxicas e danosas às células quando estão em excesso (Arnao e Hernández-Ruiz, 2019).

Embora o aparato de resposta através do Ca^{2+} e da ROS sejam mecanismos eficientes, o estresse nas plantas engloba vias bastante complexas em resposta a esses eventos (Fichman et al., 2022). Uma das vias importantes nas respostas aos estresses são os diferentes grupos de hormônios vegetais, que são fatores endógenos essenciais para as plantas (Alcantara-Cortes et al., 2019). Os hormônios vegetais, também chamados de fitormônios, possuem relação direta com a capacidade das plantas se aclimatar aos ambientes, exercendo papel importante no crescimento, desenvolvimento e alocação dos nutrientes (Fahad et al., 2015). Os hormônios atuam em concentrações geralmente baixas e desempenham funções essenciais em diferentes estágios, tecidos e condições ambientais (Yang et al., 2019; Arnao e Hernández-Ruiz, 2021).

Os principais fito hormônios produzidos pelas plantas são as auxinas, giberelinas (GA), citocininas (CK), brassinosteróides (BR), ácido abscísico (ABA), etileno (ET), ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e estrigolactonas. Destes, ABA, ET, SA e JA são responsáveis por desempenhar papel importante na resposta de defesa da planta contra patógenos e estresses abióticos, enquanto os outros hormônios estão atrelados ao crescimento e desenvolvimento vegetal (Yu et al., 2020). Entretanto, a combinação dos hormônios de importância na resposta ao estresse junto aos de desenvolvimento potencializam a resposta final da planta (Yang et al., 2019).

Está bem documentado que o JA aumenta em níveis notáveis em condições de frio e funciona como um dos principais componentes da via ICE-CBF/DREB1 para regular positivamente efeitos de congelamento em algumas espécies, como por exemplo *Arabidopsis* (Hu et al., 2013; Yang et al., 2019). Após a efetiva transdução dos sinais de estresse, as plantas utilizam de artifícios bem elaborados para se recuperarem dos danos (Mahmood et al., 2019).

Além disso, a tolerância que as plantas apresentam aos estresses também é regulada por uma rede complexa de genes (Tripathi et al., 2022), como também proteínas que auxiliam nas transduções de sinais e na expressão desses genes, como por exemplo os fatores de transcrição (TFs), proteínas de remodelação/modificação da cromatina (Wang e Komatsu, 2018) e as quinases que são capazes de fazer fosforilações e são muito importantes nas vias de sinalização (Miotto, 2020).

Um dos principais mecanismos inclui uma série de fatores de resposta ao etileno (ERFs), que são as Proteínas de Ligação ao Elemento Responsivo à Desidratação/Fatores de Ligação de Repetição C (DREBs/CBFs) as quais podem desencadear uma resposta transcricional complexa e eficiente a qualquer sinal de baixas temperaturas (An et al., 2012).

Alguns genes induzidos pelo frio também podem ter relação com o estresse causado pela seca, e em vários casos esses genes são regulados por ABA (Nogueira et al., 2003). Após o estresse por baixas temperaturas ser identificado pelas plantas, um sinal é transmitido por uma cascata de sinalização e ativa vários genes capazes de responder ao estresse de forma eficiente (Barah et al., 2013). Entretanto, muitos estudos ainda estão limitados a plantas modelo como *Arabidopsis* (Barrero-Sicilia et al., 2017) que, além de possuir ciclo de vida curto, é uma planta que possui alta capacidade de aclimação ao frio (Carvalho et al., 2011).

2.4. Genes relacionados ao estresse a frio

As plantas possuem diferentes estratégias para lidar com os mais variados tipos de estresses, a depender da espécie e da intensidade do dano (Júnior, 2018). O estresse causado pelo frio está relacionado à diminuição da eficiência fotossintética, à alteração dos lipídios da membrana e, conseqüentemente, ao desenvolvimento das culturas (Kong et al., 2018). Apesar disto, a primeira resposta ao estímulo de estresse é molecular, e se reflete na alterada expressão de genes de resposta ao estresse.

Neste contexto, estes genes podem ser agrupados conforme sua função e posição na cascata de sinalização de resposta ao frio. Os genes reguladores são responsáveis por executar um papel

importante na regulação da expressão gênica e na transdução de sinal, como os fatores de transcrição (TFs) e as proteínas quinases. Os TFs são proteínas com domínios de ligação ao DNA capazes de reconhecer sequências específicas, e regulam a expressão gênica, consequentemente regulando a maioria dos processos essenciais para a vida dos organismos (Shen et al., 2023). Entre estes processos estão a percepção de mudanças ambientais e hormonais, a diferenciação celular e o desenvolvimento de órgãos (Nath et al., 2019). Após se ligar na região promotora de um gene, os TFs são capazes de promover a ativação ou repressão de sua expressão (Cai et al., 2017). Além disso, podem se ligar a outras proteínas, como outros TFs ou moléculas sinalizadoras, desencadeando respostas a uma grande quantidade de estímulos endógenos ou do ambiente (Baillio et al., 2019).

Os três principais atores no combate ao estresse de frio em plantas são os TFs *Inducer of CBF Expression* (ICE), os CBFs, e os *Cold-Regulated genes* (CORs). Esta via, chamada ICE-CBF-COR, é uma via universal relacionada à tolerância ao estresse causado por baixas temperaturas em uma ampla variedade de espécies de plantas (Jin et al., 2018), como trigo (Guo et al., 2019), pepino (Qi et al., 2022), arroz (Guo et al., 2019), cana-de-açúcar (Moreira, 2021), e outras.

Na via ICE-CBF-COR, moléculas de Ca^{2+} e proteínas quinases possuem papel primário e fundamental na sinalização induzida pelo frio (Chen et al., 2021). Após a percepção do estresse, a quantidade intracelular de Ca^{2+} é elevada, e ICE1 é fosforilado e estabilizado pela quinase OST1 (Ding et al., 2015). Depois de fosforilado, o ICE1 pode ligar-se aos promotores de genes *CBFs* a jusante, induzindo sua expressão (Song et al., 2021). Finalmente, os TFs CBFs se ligam a promotores de genes *COR*, os quais efetivamente modulam a resposta fisiológica ao frio (Krishnaswamy et al., 2012).

Os TFs ICE são parte da família MYC, uma subfamília dos TFs *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH). Uma das características estruturais mais notáveis e importantes do ICE é que ele partilha regiões bastante conservadas no domínio bHLH e suas regiões C-terminais (Chinnusamy et al., 2003; Badawi et al., 2008; Peng et al., 2014; Lee et al., 2015; Lu et al., 2017; Guo et al., 2019). Na via ICE-CBF-COR, o papel mais conhecido dos TFs ICE é na regulação positiva da expressão de *CBFs* (Yu et al., 2023).

Com destaque na regulação das plantas como fator de transcrição, os CBFs são caracterizados como uma rede regulatória complexa responsável por desempenhar papel crucial no crescimento e desenvolvimento vegetal, através da sua participação ativa em situações de estresses abióticos (Dou et al., 2015). Os TFs CBF/DREB fazem parte da família multigênica *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (AP2/ERF). As proteínas CBF possuem um

motivo que as diferencia de outras proteínas AP2/ERF. Suas sequências se encontram a montante e a jusante do domínio de ligação AP2/ERF e são, respectivamente, PKKP/RAGR_xKF_xETRHP (PKKPAGR) e DSAWR (Skinner et al., 2005; Canella et al., 2010; Park et al., 2015; Jia et al., 2016; Guo et al., 2019). Além disso, os CBF/DREB podem se ligar a elementos DRE/CRT (*Dehydration Responsive Element/C-repeat Factor*) dos promotores de genes a jusante. A sequência destes elementos tem o consenso CCGAC e está presente em todos os promotores de genes de resposta à falta de água, salinidade ou frio (Yang et al., 2020).

Os TFs DREB/CBF ativam uma cascata de sinalização que envolve diversos genes a jusante coletivamente chamados de genes *COR*. Estes genes possuem diversas funções, e sua ação pode resultar, por exemplo, na estabilização de moléculas (como os fosfolípidos e proteínas de membrana celular e proteínas citoplasmáticas), na manutenção de ligações hidrofóbicas, na homeostase iônica e na reciclagem de ROS (Hwarari et al., 2022). Exemplos destes genes incluem *RD29A*, *RD17*, *ERD10*, *KIN1*, *KIN2* e *COR15a*, os quais, quando expressos, potencializam a resistência das plantas ao frio (Krishnaswamy et al., 2012).

Outro fator que influencia na resposta das plantas ao frio é o ciclo circadiano, visto que estão intrinsecamente relacionados (Ibañez et al., 2008). Os TFs *CCA1* (*Circadian Clock-Associated 1*) e *LHY* (*Late Elongated Hypocotyl*) pertencem à família MYB e são os componentes centrais do relógio circadiano em *Arabidopsis thaliana*. Entre suas funções, *CCA1* e *LHY* afetam positivamente a expressão dos genes da via CBF de resposta ao frio (McClung, 2011). De acordo com Park et al. (2012), pode ocorrer *splicing* alternativo nos transcritos de *CCA1* o que dá origem a duas isoformas: *CCA1a*, a variante canônica, e *CCA1β*, a qual retém o quarto íntron e elimina o domínio N-terminal de ligação ao DNA. A presença da isoforma *CCA1β* em heterodímeros produz unidades não funcionais (Kim et al., 2016). Conforme Seo et al. (2012), em condições de frio, o *splicing* alternativo de *CCA1* é suprimido, o que resulta em maior produção, e consequente atividade, da variante *CCA1a*. Dessa forma, o *CCA1a* ultrapassa os efeitos do *CCA1β*, o que resulta em aumento da tolerância ao congelamento. Estudos realizados por Dong et al. (2011) demonstraram que mutantes sem *LHY* e *CCA1* exibiram baixa indução dos genes CBFs, demonstrando assim a importância desses dois agentes no sucesso de sua regulação em situações de estresse por frio em plantas de *Arabidopsis thaliana*. Interessantemente, a atuação de *CCA1/LHY* foi pouco observada no gene *CBF2*, levando a constatar que este provavelmente é funcionalmente diferente dos demais (Dong et al., 2011).

Alguns genes, apesar de também estarem relacionados ao estresse por frio ainda são poucos explorados nas pesquisas atuais quando comparados aos CBFs. Alguns exemplos desses genes são *ADA2*, *BES1*, *CAMTA3*, *CESTA*, *CRLK1*, *CRLK2*, *DDF3*, *ERD6*, *HOS1*, *MYB15*, *PHYB*, *PIF7*, *RCI3*, *SEX1*, *SIZ1*, *SRC2*, entre outros (MIZOI et al., 2012; SHI et al., 2018). O *SRC2*, por exemplo, foi um gene descoberto em soja (*Glycine max*) e é uma proteína transmembrana, induzida por frio, capaz de regular a produção de ROS mediada por Ca^{2+} (Takahashi e Shimosaka, 1997). Neste caso, a baixa temperatura pode afetar a fluidez da membrana plasmática e ativar os canais iônicos de cálcio. É provável que o *SRC2* esteja envolvido nessa ativação, que por fim ocasiona em uma cascata de processos intracelulares que resulta na aclimatação das plantas ao frio (Takahashi e Shimosaka, 1997). O homólogo de *SRC2* em Arabidopsis, *AtSRC2*, também tem resposta ao frio, e regula a produção de ROS através de sua interação com a NADPH oxidase *AtROBHF* (Kawarazaki et al., 2013).

Anteriormente, Moreira (2021) identificou e caracterizou genes CBFs na cana-de-açúcar (cultivar SP80-3280) por meio de seleção e sequenciamento, como também análise de expressão frente ao resfriamento (8°C) e congelamento (-2°C). Como resultado, encontrou quatro genes do tipo CBF, que foram denominados como *SoCBF1-4*, os quais apresentaram expressão induzida tanto ao frio quanto ao congelamento, com padrões distintos frente ao tempo de exposição. Este foi um trabalho importante para a cultura da cana na perspectiva molecular, como também para projetos futuros. Essas análises foram realizadas na ausência de luz, e devido à potencial regulação de CBFs pelo ciclo circadiano, estudos que consideram a presença de luz são necessários para melhor caracterizar estes genes (Nóren et al., 2016).

3. OBJETIVO

Neste trabalho, buscou-se avaliar a variação da expressão dos genes *ShSRC2*, *ShCCA1*, *ShCBF1* e *ShCBF3* em cana-de-açúcar (*Saccharum* sp.) variedade SP80-3280 sob condições de baixas temperaturas e na presença ou ausência de fotoperíodo. Para isso foram seguidos os objetivos específicos:

1. Verificar se os genes possuem comportamento distinto em condições de temperatura ambiente e baixa temperatura (4°C);
2. Verificar se os genes apresentam respostas distintas à presença e a ausência de fotoperíodo;
3. Identificar qual dos genes tem potencial para auxiliar na tolerância ao frio, independente de fotoperíodo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

Neste trabalho, todos os procedimentos foram realizados com plantas de cana-de-açúcar *Saccharum* sp. variedade SP80-3280. O plantio foi feito a partir de gemas meristemáticas de plantas adultas presentes na estufa da área experimental do laboratório de Genômica e Biologia Molecular de Plantas, situado no CEBTEC, Departamento de Ciências Biológicas, Esalq/Universidade de São Paulo. Foram colocadas quatro gemas por vaso contendo solo orgânico, e estes foram irrigados por gotejamento três vezes ao dia durante 10 minutos até atingir a capacidade de campo. No período de plantio (setembro, 2022), a duração do dia foi de 12 h \pm 20 min (cptec.inpe.br). Plantas com 35 dias após o plantio foram utilizadas para os experimentos de resposta ao frio. Foram escolhidos os vasos com uniformidade fenotípica entre eles e entre as plantas por vaso. Antes da realização do experimento, os vasos foram mantidos na condição de controle em temperatura ambiente e fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro por cinco dias.

4.2. Identificação de possíveis genes responsivos ao frio

A identificação de possíveis genes relacionados com resposta ao frio em plantas foi iniciada com uma revisão de literatura utilizando a palavra-chave “*cold stress genes*”. Assim, foram obtidos 21 genes candidatos nas espécies de plantas *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*) e arroz (*Oryza sativa*) (Tabela 1, Figura 1A).

Tabela 1. Genes envolvidos na resposta ao estresse de frio, suas funções e fonte na literatura.

Gene	Função	Literatura
<i>ADA2</i>	Co-ativador transcricional	Mao et al., 2006
<i>BES1</i>	Proteína de sinalização de brassinosteróides	Li et al., 2017
<i>CAMTA3</i>	Fator de transcrição, resposta a Calmodulina (sinalização por Ca ²⁺)	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>CBFs/DREBs</i>	Fator de transcrição, resposta ao frio e congelamento	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>CCA1/LHY</i>	Fator de transcrição, determinação do ciclo circadiano	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>CESTA</i>	Fator de transcrição, resposta a brassinosteróides	Shi et al., 2018
<i>COLD1</i>	Proteína transmembrana, regula a transdução de sinal de frio mediada por Ca ²⁺	Shi et al., 2018
<i>CRLK1</i>	Quinase de membrana, transdução de sinal de frio	Shi et al., 2018
<i>CRLK2</i>	Quinase de membrana, transdução de sinal de frio	Shi et al., 2018
<i>DDFs</i>	Fator de transcrição, mesma família que CBFs, resposta a seca e calor	Mizoi et al., 2012
<i>ERD6</i>	Transportador de açúcar, gene <i>COR</i>	Shi et al., 2018
<i>HOS1</i>	E3 ligase, regula negativamente a expressão de ICE	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>ICE</i>	Fator de transcrição, ativa a expressão de CBFs	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>MYB15</i>	Fator de transcrição, interage com ICEs, regula a expressão de CBFs	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>OST1</i>	Quinase ativada por frio, regulam a estabilidade de ICEs	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>PHYB</i>	Fotorreceptor, afeta negativamente a expressão de CBFs de acordo com a luz ou ciclo circadiano	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>PIF7</i>	Fator de interação com fitocromos, regula negativamente a expressão de CBFs em resposta à luz/ciclo circadiano	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>RCI3</i>	Peroxidase, induzida por frio, confere tolerância a diferentes estresses	Llorente et al., 2002
<i>SEX1</i>	Diquinase, envolvida na fosforilação de amido	Yano et al., 2005
<i>SIZ1</i>	SUMO E3 ligase, inibe a degradação de ICE	Mizoi et al., 2012; Shi et al., 2018
<i>SRC2</i>	Proteína transmembrana, induzida por frio, regula a produção de ROS mediada por Ca ²⁺	Takahashi & Shimosaka, 1997

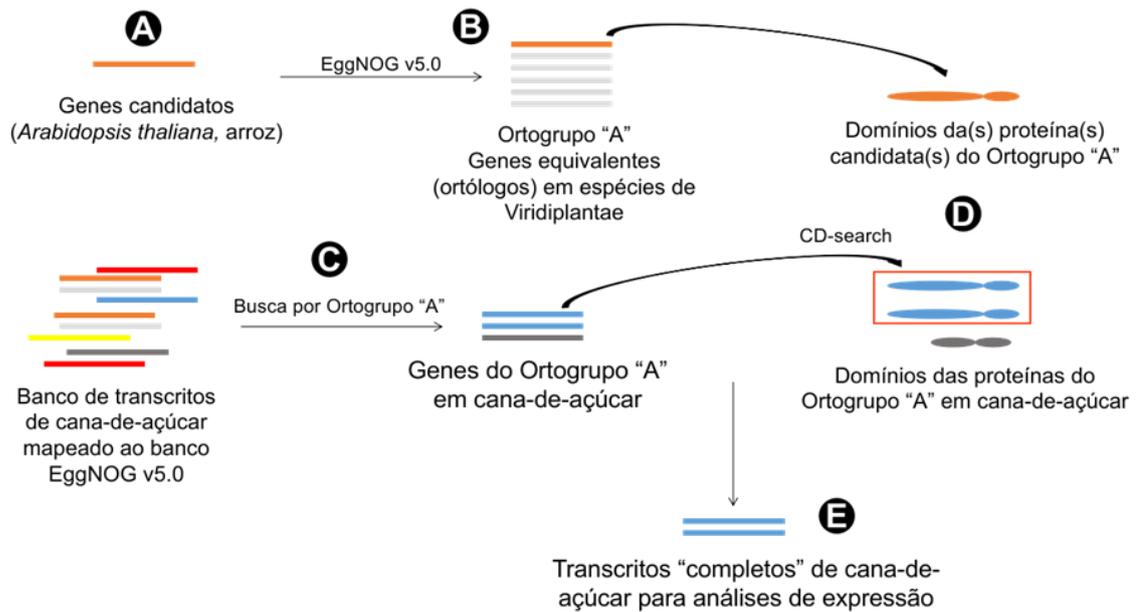


Figura 1. Esquema de busca por ortólogos de genes de resposta ao estresse de frio em cana-de-açúcar. A) Identificação de genes candidatos; B) Obtenção de números de acesso de ortogrupos no banco de dados EggNOG v5.0; C) Identificação de possíveis ortólogos em bancos de dados de cana-de-açúcar; D) Identificação de domínios nas sequências de cana-de-açúcar e seleção baseada na completude do domínio; E) Seleção dos transcritos mais prováveis para análises de expressão por RNA-seq.

As sequências de aminoácidos dos 21 genes encontrados (disponível em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877) foram utilizadas para buscar seus grupos ortólogos no banco de dados EggNOG v5.0 (eggnog5.embl.de) (Figura 1B, disponível em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877). Em seguida, os números de acesso dos ortogrupos identificados foram utilizados para identificar sequências ortólogas em um banco exaustivo e não-redundante de transcritos de cana-de-açúcar (Figura 1C), obtido por comunicação direta com os autores do artigo Oliveira et al. (2022). As sequências de aminoácidos codificadas pelos transcritos identificados nos bancos (disponível em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877) foram avaliadas com o programa *CD-search* (Marchler-Bauer e Bryant, 2004), para confirmar a presença dos domínios conservados (Figura 1D). Foram mantidas para as análises seguintes apenas os transcritos que apresentavam síntese predita de proteínas com domínios completos e equivalentes àqueles presentes nas proteínas do mesmo ortogrupo aos quais elas pertencem (Figura 1E).

Os 233 transcritos "completos" de cana-de-açúcar identificados (Figura 1E) foram avaliados quanto ao potencial de resposta ao frio utilizando uma análise de dados públicos de RNA-seq. Para isso, bibliotecas de RNA-seq de cana-de-açúcar dos cultivares ROC22 e GT08-1108 submetidos a 36 h de estresse a 4°C (Tang et al., 2018) foram utilizadas para quantificar os transcritos selecionados (Figura 1E) com o programa Salmon v2.0 (Patro et al., 2017). Após a quantificação, foi avaliado se os transcritos selecionados possuíam expressão diferencial entre o tratamento e o controle para ambos os cultivares.

Para isso, as tabelas de quantificação (disponível em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877) foram utilizadas como *input* para o programa *bestDEG* (Sanket et al., 2022), o qual integra diferentes análises de expressão diferencial. Após esse passo, foram identificados 99 dos 233 transcritos originais que seguiram para as análises seguintes.

Para aumentar a confiança na escolha dos genes a serem analisados e sua potencial universalidade na resposta ao frio, foram analisados dados adicionais de RNA-seq de experimentos de estresse de frio nas espécies *Setaria italica* (painço), *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Zea mays* (milho) (arquivos de quantificação e resultados disponível em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877).

Utilizando-se dos mesmos ortogrupos EggNOG definidos previamente, genes ortólogos foram identificados nessas espécies (painço, sorgo e milho) e seu padrão de expressão foi observado durante o choque de frio. Na Tabela 2 estão os genes que possuem transcritos com respostas similares em cana-de-açúcar e estes estão classificados de acordo com sua expressão nessas três espécies de Poaceae, em (1) resposta rápida ao frio, (2) resposta tardia ao frio ou (3) sem resposta (Zhang et al., 2017, dados brutos também disponíveis em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877).

Tabela 2. Genes putativos de resposta ao frio em painço (*S. italica*), sorgo (*S. bicolor*) e milho (*Z. mays*). Genes: Gene ou família; N. acesso: identificadores dos transcritos no banco de dados Phytozome (phytozome-next.jgi.doe.gov/); Resposta: classificação de acordo com a expressão em resposta ao frio (1) rápida, (2) tardia, ou (3) sem resposta

Genes	<i>Setaria italica</i>		<i>Sorghum bicolor</i>		<i>Zea mays</i>	
	N. acesso	Resposta	N. acesso	Resposta	N. acesso	Resposta
CBF	Seita.1G271000	1	Sobic.004G283201	1	Zm00001d002618	1
	Seita.7G205200	1	Sobic.006G184800	1	Zm00001d017592	2
CCA1	Seita.6G055700	2	Sobic.007G047400	2	Zm00001d024547	2
CRLK 2	Seita.4G124400	3	Sobic.010G118100	3	Zm00001d045756	3
DDF	Seita.1G259000	3	Sobic.001G298100	3	Zm00001d000179	3
	Seita.1G259100	3	Sobic.004G295500	3	Zm00001d002744	3
	Seita.1G259200	3	Sobic.004G295600	3	Zm00001d002747	3

	Seita.3G355000	3	Sobic.004G295700	3	Zm00001d017477	3	
	Seita.7G188500	3			Zm00001d017478	3	
	Seita.7G188600	3	Sobic.006G169900	3	Zm00001d017480	3	
					Zm00001d026182	3	
	Seita.7G188700	3	Sobic.006G170000	3	Zm00001d026184	3	
					Zm00001d029884	3	
	Seita.9G323300	3	Sobic.006G170100	3	Zm00001d051350	3	
					Zm00001d051355	3	
	MYB1 5	Seita.1G239400	2	Sobic.001G219200	2	Zm00001d003064	3
						Zm00001d014029	2
Seita.7G167300		2	Sobic.004G219800	2	Zm00001d017268	2	
					Zm00001d025864	3	
Seita.9G222100		1	Sobic.006G148000	2	Zm00001d032694	2	
	Zm00001d051149				2		
RCI3	Seita.1G079000	3	Sobic.004G049800	3	Zm00001d014467	3	
	Seita.3G190300	3	Sobic.009G186600	3	Zm00001d014467	2	
	Seita.4G259700	3	Sobic.010G232500	3	Zm00001d038599	3	
SEX1	Seita.4G151100	2	Sobic.010G143500	2	Zm00001d037059	3	
SRC2	Seita.5G442200	1	Sobic.003G416500	2	Zm00001d011919	2	

					Zm00001d042214	2
--	--	--	--	--	----------------	---

Como resultado da busca, foi observado que os ortogrupos de CBFs, CCA1, SRC2 e MYB15 apresentaram resposta ao frio com padrões similares entre as três espécies analisadas e poderiam ser ótimos candidatos para a cultura da cana-de-açúcar. Após esta análise, dos 21 genes iniciais (Tabela 1) foram definidos quatro genes (*SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3*) para avaliar sua expressão no experimento de choque de frio em cana-de-açúcar. Todas as análises descritas nesta seção foram feitas com o auxílio do Dr. Pedro Boscarior Ferreira, e os dados detalhados estão presentes no Apêndice e no repositório Zenodo sob número de acesso doi.org/10.5281/zenodo.7786877.

4.3. Desenho de primers

Os transcritos dos genes selecionados (Apêndice) foram alinhados com o programa MAFFT v7.505 (Katoh e Standley, 2013) e *primers* foram desenhados em regiões conservadas entre os transcritos com o auxílio dos programas PrimerQuest (idtdna.com/PrimerQuest) e OligoAnalyzer (idtdna.com/OligoAnalyzer).

Brevemente, diferentes pares de *primers* nas regiões selecionadas foram gerados pelo programa PrimerQuest, sendo que todos seguiram os seguintes requisitos: (1) ter entre 18 e 22 pares de bases, (2) possuir cerca de 50% de GC, (3) possuir temperatura de anelamento entre 60 e 65°C, e (4) produzir um amplicon entre 80 e 200 pares de bases (pb). Estes pares de *primers* foram analisados no programa OligoAnalyzer para confirmar estas características e também verificar as probabilidades de formação de dímeros e grampos, que dificultam as reações de RT-qPCR. Uma tabela de curva de melting dos *primers* está presente no repositório Zenodo sob número de acesso doi.org/10.5281/zenodo.7786877.

Com base nesses dados, foram desenhados *primers* para os genes *SbCCA1* e *SbSRC2*, e reavaliados os *primers* desenhados previamente para os genes *SbCBF1* e *SbCBF3* (Moreira, 2021). Os *primers* estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Primers desenhados para experimento de RT-qPCR e suas características.

Gene	Nome	Sequência 5'-3'	nº bases	GC (%)	Tm (°C)	Amplicon
<i>SbSRC2</i>	ShSRC2_Fw	AAGAAGAACAACCTTCGGGATGG	22	45,5	62,6	93 pb
	ShSRC2_Rv	TGACGCGTCCGAGATCAT	18	55,6	62,9	
<i>SbCCA1</i>	ShCCA1_Fw	CTGTGGAAGCGAAGGAGAATAG	22	50	62,2	109 pb
	ShCCA1_Rv	ACCGGTGACCATGTAGAGAT	20	50	62,4	
<i>SbCBF1</i>	SoCBF2_Fw	ACCAAGTTC AAGGAGACGCG	20	55	64,4	119 pb
	SoCBF2_Rv	GAAGGTCCCCAGCCATATCC	20	60	63,7	
<i>SbCBF3</i>	SoCBF3_Fw	CGCTTCCTTGAAGGGGAGAG	20	60	63,9	56 pb
	SoCBF3_Rv	TTGCACAAACATCCTCCCGT	20	50	64,5	
<i>SbGAPDH</i>	GAPDH_Fw	CACGGCCACTGGAAGCA	17	64,7	64,5	100 pb
	GAPDH_Rv	TCCTCAGGGTTCCTGATGCC	20	60	65,5	

Para *SbCCA1*, o par de *primers* desenhado amplifica um fragmento de 109 pb comum a todos os transcritos identificados. No caso de *SbSRC2*, o par de *primers* amplifica uma região de 93 pb comum aos transcritos identificados. O par de *primers* para detectar a expressão de *SbCBF1* alinham apenas com o transcrito *evm.model.SCSP803280_000116105.2*, e produzem um amplicon predito de 119 pb.

Os *primers* para o gene *SbCBF3* não possuem similaridade com sequências identificadas como CBFs pelo método aqui descrito. Apesar disso, eles são específicos para a sequência SCACLR1129E10.g identificada por Moreira (2021) no banco de dados SUCEST (sucest-fun.org) como uma região codificadora de um fator de transcrição CBF/DREB. A presença de um domínio AP2 completo nesta sequência corrobora a conclusão de Moreira (2021) de que se trata de um gene da família CBF/DREB. Por este motivo, e por *SbCBF3* ter apresentado alterações em sua expressão no trabalho de Moreira (2021), foi decidido testar sua expressão em um novo experimento de estresse de frio. Os *primers* para este gene permitem amplificar uma região de 56 pb.

4.4. Experimento de estresse de frio

O experimento de estresse ao frio foi realizado para avaliar a resposta dos genes alvo (*SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3*) frente ao estresse agudo de frio de 4°C em condição de fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro e na condição de escuro total em períodos de 1, 2, 12 e 24 horas (Figura 2).

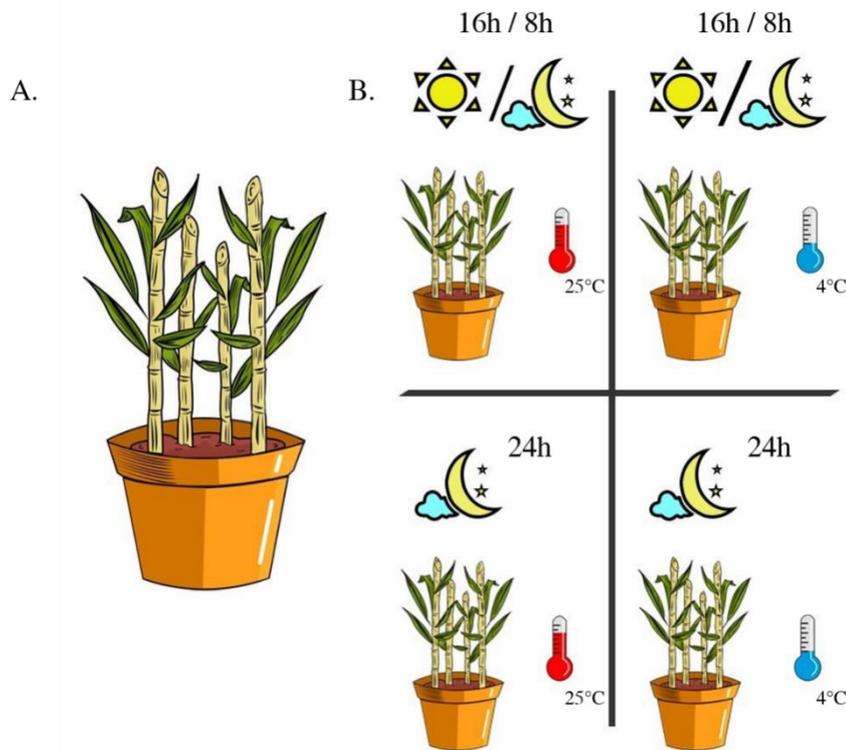


Figura 2. Esquema representando o desenho experimental. A) Ilustração de um vaso contendo quatro plantas de cana-de-açúcar; B) Ilustração das quatro condições experimentais. Nas duas superiores existe a presença de fotoperíodo, enquanto nas duas inferiores escuro total. As temperaturas foram de 25°C na condição controle ou 4°C para o choque de frio.

Para ambas as condições, plantas fenotipicamente similares em temperatura ambiente foram utilizadas como controles. Dessa forma, quatro combinações experimentais foram testadas com coletas de amostras nos tempos 1, 2, 12 e 24 horas:

- (1) Estresse de frio de 4°C em fotoperíodo 16/8;
- (2) Temperatura ambiente em fotoperíodo 16/8;
- (3) Estresse de frio de 4°C em escuro completo;
- (4) Temperatura ambiente em escuro completo.

Em todos os tratamentos, amostras controle foram coletadas imediatamente no início dos tratamentos (tempo “zero”, às 9 horas da manhã), e coletas durante o tratamento ocorreram com 1 (10 horas da manhã); 2 (11 horas da manhã); 12 (21 horas da noite) e 24 horas (9 horas da manhã do outro dia). As plantas em situação de frio foram armazenadas em uma BOD a 4°C até o final do experimento. As coletas foram feitas recortando o ápice (1/5 da extremidade apical) de folhas em posições equivalentes nas quatro plantas de cada tratamento, com uma tesoura desinfetada com etanol 70%. A primeira coleta foi feita recortando a Folha -1, a segunda coleta a Folha 0, e assim por diante até coletar a Folha +3 (Figura 3). As amostras foram imediatamente embrulhadas

em envelopes de papel alumínio e congeladas em nitrogênio líquido. No total fez-se a coleta de 8 réplicas biológicas para cada tratamento. Todo o material coletado (160 amostras) foi mantido a -80°C até a extração dos RNAs.

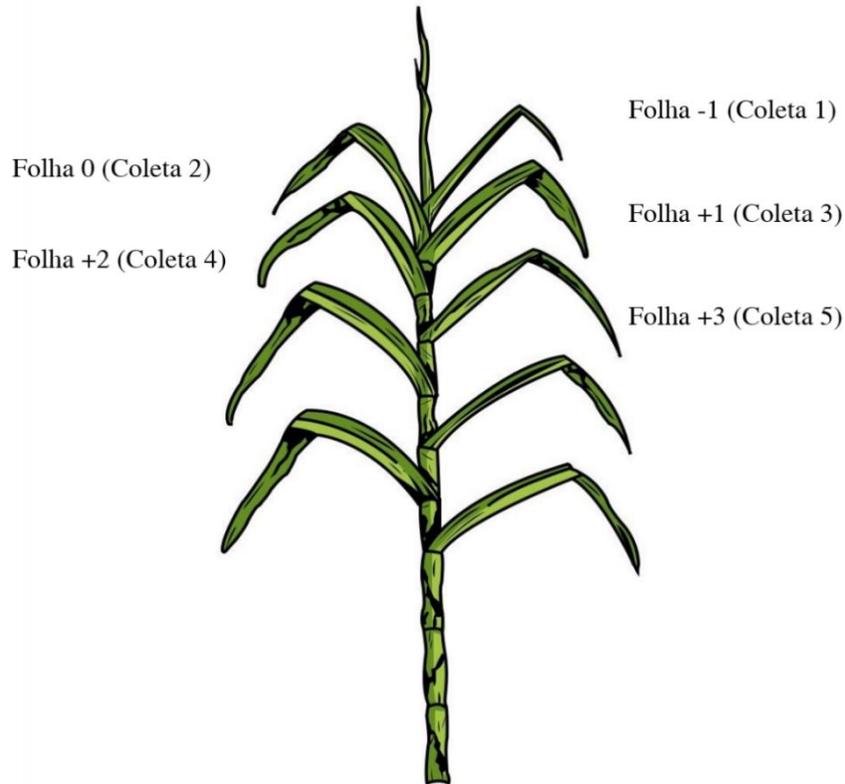


Figura 3: Ilustração de uma planta de cana-de-açúcar com sua numeração de acordo com a classificação de Kuijper. Entre parênteses está descrito a ordem das coletas realizadas (coleta 1 até coleta 5). Figura modificada de Dillewijn (1952).

4.4.1. Extração RNA

A extração de RNA do material vegetal foi realizada pelo método do TRIzol (Thermo Fisher Scientific), seguindo um protocolo modificado. Todos os passos foram realizados com luvas e máscaras para evitar contaminações com RNase. Os tecidos congelados foram triturados com o auxílio do disruptor de tecidos Mini-BeadBeater 24 (BioSpec, Bartlesville, USA), em tubos alumínio de 2,0 mL com três esferas de ferro de 3 mm de diâmetro adicionadas a seu interior, previamente imersos em N₂ líquido. Foram utilizados em cada tubo aproximadamente 100 mg de tecido vegetal, aos quais 1 mL de TRIzol foi acrescido. As misturas foram homogeneizadas em vórtex rapidamente, e incubadas a temperatura ambiente (T.A) por 5 minutos. Em seguida foi adicionado 0,2 volume de clorofórmio 100% gelado, os tubos foram misturados delicadamente e incubados por 5 min em T.A. Logo depois, as amostras foram centrifugadas (12000 x g por 15 min a 4°C) e a

fase aquosa foi transferida para um novo tubo. Os RNAs foram precipitados com 1 mL de isopropanol 100% por 20 min a T.A e, em seguida, centrifugados a 12000 x g por 15 min a 4°C. O isopropanol foi removido cuidadosamente e o precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 70% e homogeneizado no vórtex. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 7500 x g por 5 min a 4°C, o etanol descartado, e os RNAs secos ao ar livre. As amostras foram ressuspensas em 20 µL de água ultrapura tratada com Dietil Pirocarbonato (DEPC) 0,1% e incubadas por 10 min a 60°C. Os RNAs ressuspensos foram armazenados a -80°C.

4.4.2. Síntese de cDNA

Previamente à síntese, as amostras de RNA foram quantificadas no espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific, EUA) e foram utilizados os parâmetros (260/280) e (260/230) para avaliação da qualidade e pureza dos produtos obtidos na extração. Depois, 2 µg de cada RNA foram tratados com *RQ1 DNase* (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Ao final do processo, as amostras foram novamente quantificadas em *NanoDrop* para realizar a síntese de cDNA.

Para a síntese de DNA complementar (cDNA), foi feita a transcrição reversa de 1 µg de cada RNA com o *kit SuperScript™ III – First Strand* (Invitrogen™), seguindo as instruções do fabricante. As amostras de cDNA foram diluídas para aproximadamente 50 ng/µL e foram usadas para os PCRs em tempo real (RT-qPCR). Os *primers* utilizados foram OligoDT.

4.4.3. Experimento de RT-qPCR

Para cada gene escolhido, foram montadas reações de RT-qPCR contendo 0,2 µM dos *primers* do gene alvo em *SYBR™ Green PCR Master Mix* (Thermo Fisher, 4309155). As reações controles das amostras de cDNA foram feitas com *primers* do gene de referência *GLICERALDEÍDO 3-FOSFATO DESIDROGENASE* (GAPDH). O GAPDH é um dos genes de referência mais utilizado em estudos de estresse em cana de açúcar (Iskandar et al., 2004; Ling et al., 2014). Também foram feitas reações controle dos *primers* substituindo cDNA por água ultrapura. Tanto as reações controles, como as dos genes alvos foram analisadas no aparelho *StepOnePlus™ System* (Applied Biosystems, EUA). Para cada gene alvo e controle foram preparadas reações de três repetições biológicas e duas técnicas em cada tratamento analisado. Todas as reações foram montadas em placas ópticas *Micro.Amp Fast* de 96 poços de 0,1 mL (Applied Biosystems, EUA). As reações foram submetidas ao programa: 2 minutos a 50°C, 2 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C. Foi adicionada uma etapa de curva de dissociação, de 95°C por 15 s, 60°C por 1 min, 95°C por 15 s e 60°C por 15 s.

4.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student a 95% de significância, levando em consideração as médias de ΔC_t (C_t do gene alvo – C_t do gene de referência) dos tratamentos e sua diferença com as médias de ΔC_t dos controles (ΔC_t tratamento - ΔC_t controle = $\Delta\Delta C_t$). O valor de expressão relativa foi obtido através da fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação de possíveis genes de resposta ao frio em cana-de-açúcar

Foram identificados 21 possíveis genes de resposta ao frio em *Arabidopsis* e arroz através de análise da literatura (Tabela 1). A lista dos genes presentes na Tabela 1 inclui genes de resposta ao frio, inclusive aqueles cuja participação nas vias metabólicas de resposta a esse estresse ainda não tenha sido totalmente elucidada. Os possíveis homólogos destes genes foram identificados em cana-de-açúcar por análise de ortologia (Apêndice, disponível em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877) e dados públicos de RNA-seq foram empregados para estimar seu potencial de resposta ao frio.

Nessa análise foram reavaliados experimentos de estresse ao frio em cana-de-açúcar dos cultivares ROC22 e GT08-1108 (Tang et al., 2018). Para isso, foi realizada a quantificação da expressão dos transcritos de cana-de-açúcar correspondentes aos ortogrupos identificados. Este experimento revelou que 42,3% dos 233 transcritos selecionados apresentaram expressão diferencial nas amostras com 36 h de exposição ao frio em pelo menos um dos cultivares (Apêndice). Desses genes, 79 (79,8%) foram diferencialmente expressos em ambos os cultivares analisados (em negrito no Apêndice). Para alguns genes, como os *CBFs*, *CCA1/LHY*, *CRLK2*, *DDF5*, *MYB15*, *RCI3*, *SEX1* e *SRC2*, todos os seus transcritos apresentaram respostas (aumento ou diminuição da expressão). Para os outros genes, não houve expressão diferencial ou os seus transcritos apresentaram respostas antagônicas, como é o caso de *ERD6*, *ICE1/2*, *OST1* e *PIF7*.

Utilizando-se dos mesmos ortogrupos, genes ortólogos foram identificados nas espécies *Setaria italica* (painço), *Sorghum bicolor* (sorgo) e *Zea mays* (milho) e seus padrões de expressão durante o choque de frio foram observados, a fim de aumentar a confiança na escolha dos genes a serem analisados e sua potencial universalidade na resposta ao frio (Zhang et al., 2017, dados brutos também disponíveis em: doi.org/10.5281/zenodo.7786877). Os ortogrupos de *CBFs*, *CCA1*, *SRC2* e *MYB15* apresentaram respostas ao frio com padrões similares nas três espécies analisadas e desses foram escolhidos os genes *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3* para ter sua expressão avaliada por RT-qPCR em cana-de-açúcar. Em resumo, estes genes foram selecionados porque todos os seus transcritos demonstraram resposta no mesmo sentido (aumento ou diminuição de expressão) na análise de cana-de-açúcar e com respostas similares em outras espécies de Poaceae.

5.2. Análise de expressão diferencial dos genes SRC2, CCA1, CBF1 e CBF3 em cana-de-açúcar frente a baixas temperaturas

A expressão dos genes *SbSRC2*, *SbCCA1*, *SbCBF1* e *SbCBF3* em plantas de cana submetidas ao estresse por frio (4°C) e em situação de fotoperíodo e frio (4°C), foi avaliada através de PCR em tempo real (RT-qPCR). Abaixo, os resultados para cada gene estão apresentados e discutidos separadamente. A expressão relativa é apresentada nos gráficos a seguir através do número de vezes, de acordo com a indução ou repressão dos genes avaliados em relação ao controle.

5.2.1. SRC2

O gene *SbSRC2* apresentou indução/aumento de expressão após 2 e 12 horas de exposição ao frio de 4°C, com valor de expressão relativa média de 3,26 e 3,10, respectivamente (Figura 4). Enquanto isso, os tratamentos de tempo 1 e 24 horas apresentaram valor de expressão relativa de 1,05 e 0,8, respectivamente, e não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (zero hora). Na segunda condição (fotoperíodo e temperatura ambiente), não houve diferença estatística da expressão de *SbSRC2* (Figura 4). Apesar disso, uma tendência de aumento é detectada em 24 horas, com valor de expressão relativa de 2,25. No entanto, a alta variabilidade das amostras não permite afirmar a alteração observada.

O gene *SbSRC2* também apresentou aumento na sua expressão logo no início da exposição à condição de frio (4°C) na ausência de luz, com valor de expressão relativa de 1,61, 1,33, 3,49 e 2,67 durante 1, 2, 12 e 24 horas de experimento. Entretanto, só foi observada diferença estatística a partir da segunda hora de análise, comportamento similar ao que foi encontrado durante a condição de frio (4°C) com fotoperíodo, indicando que este gene é induzido por temperaturas baixas. Neste caso, a maior expressão relativa foi detectada 12 horas após o início do estresse. Na condição de temperatura ambiente e escuro, pode-se observar diminuição da expressão do gene logo nas primeiras horas, assim como na condição de temperatura ambiente com fotoperíodo. O valor de expressão das amostras foram 0,35, 0,81, 0,36 e 0,60, correspondendo, respectivamente, a 1, 2, 12 e 24 horas de experimento. Todas as amostras apresentaram valor de expressão inferior ao controle (zero hora), sendo os menores valores apresentados às 1 e 12 horas.

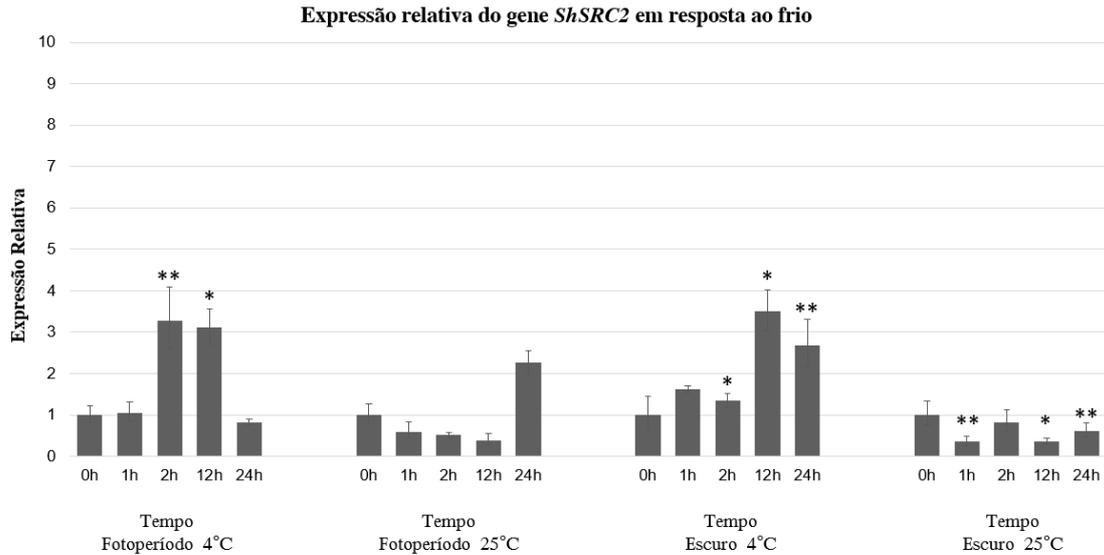


Figura 4: Análise por RT-qPCR da expressão do gene *ShSRC2* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).

Em resumo, o gene *ShSRC2* apresentou aumento da expressão frente ao estresse de frio, independente das condições de luminosidade. Takahashi & Shimosaka (1997) observaram que após a exposição a 5°C, o nível de transcrição de *SRC2* continuou a aumentar até 48 horas em uma cultivar de soja (*Glycine max*) mais tolerante ao frio, entretanto atingiu o máximo às 12 horas em uma cultivar sensível, assim como ocorreu na condição de fotoperíodo e frio (4°C) em cana-de-açúcar. Também foi possível observar algo similar sobre a indução/aumento da expressão de *AtSRC2* no tecido foliar de *Arabidopsis* no tratamento de frio (4°C) após 2 horas (Robinson e Parkin, 2008). Em condições de frio (4°C), plantas de *Arabidopsis* induziram a expressão do gene *AtSRC2* nas raízes em 5 horas e aumentaram a produção de cálcio, melhorando seu aparato de defesa (Kawarazaki et al., 2013). De acordo com Rativa et al. (2020), resultados semelhantes foram observados em plantas de arroz (*Oryza sativa*) sensíveis ao frio. Neste último caso, observou-se acúmulo de ROS e aumento da produção da proteína *SRC2* neste tipo de genótipo sob condição de frio (10°C).

Kim et al. (2008) demonstraram que o estresse de frio (4°C) em plantas de pimenta induziu a expressão de *CaSRC2-1* dentro de 3 horas de tratamento e um máximo de transcrição às 24 horas. Além do estresse de frio, foi observado também aumento de expressão do gene *CaSRC2-1* a outros tipos de estresses, como seca, estresse salino e ataque de patógenos. Neste trabalho também foi

notado que, embora a maior parte dos tratamentos de estresse abiótico tenha induzido a expressão de *CaSRC2-1*, sua transcrição foi independente de ABA.

Visto que Takahashi & Shimosaka (1997) demonstraram que plantas de soja tolerantes ao frio possuem expressão mais prolongada de *SRC2* do que em plantas sensíveis, e que maiores níveis de *SRC2* estão correlacionados a maior tolerância ao frio, é possível propor que a indução da expressão de *SbSRC2* em cana-de-açúcar possa conferir maior tolerância a este estresse. Além disso, a possibilidade deste gene agir em uma via independente do hormônio ABA (Kim et al., 2008), diferente de genes clássicos de resposta como os CBFs, fornece uma alternativa a programas de melhoramento à resposta ao frio.

Dessa maneira, mais estudos são necessários utilizando o gene *SRC2* na cultura da cana-de-açúcar, e em diferentes variedades. Até o momento, existem poucas pesquisas na literatura que exploram os mecanismos moleculares desse gene, embora ele apresente potencial na mitigação dos efeitos causados por baixas temperaturas em uma ampla diversidade de espécies, e também apresentar resposta a outros tipos de estresses.

5.2.2. CCA1

Em diversas espécies o gene *CCA1* está envolvido na regulação do ciclo circadiano. Neste trabalho o gene *SbCCA1* demonstra um decréscimo em expressão relativa na condição de fotoperíodo e frio (4°C) nas primeiras 12 horas, com valores de 0,42, 0,79 e 0,30, correspondendo à 1, 2 e 12 horas, respectivamente (Figura 5). O menor valor de expressão ocorreu 12 horas após o início do experimento, enquanto o maior valor ocorreu em 24 horas, com 2,19.

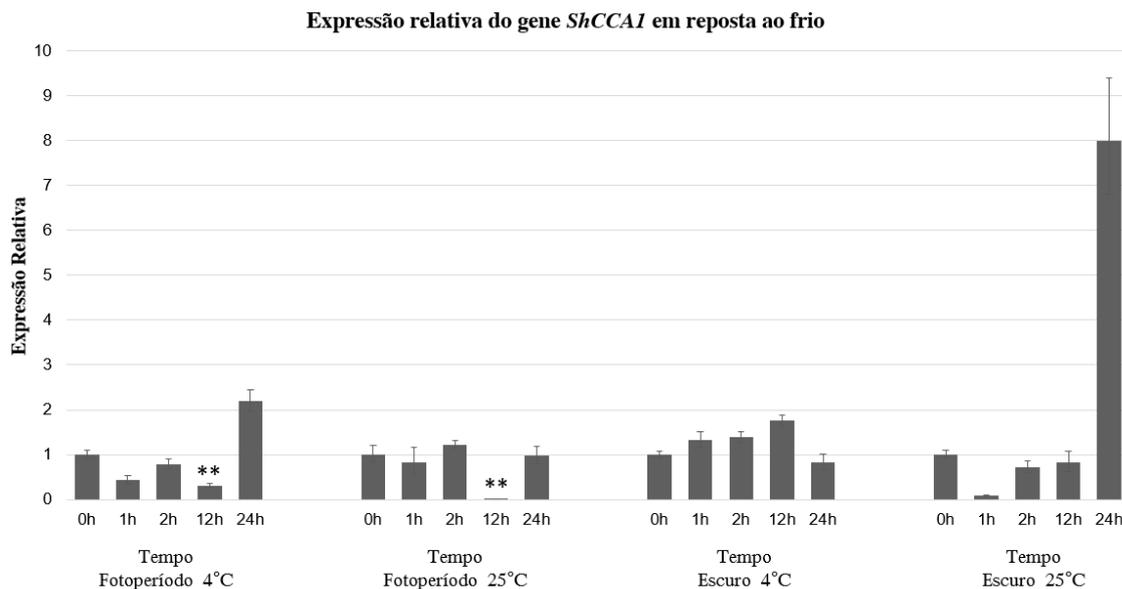


Figura 5: Análise por RT-qPCR da expressão do gene *SbCCA1* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).

Na condição de fotoperíodo em temperatura ambiente o gene *SbCCA1* apresentou comportamento estável até a ocorrência de uma diminuição da expressão relativa no período de 12 horas, com cerca de 0,007 de valor de expressão. O maior valor de expressão foi encontrado após 2 horas, com 1,21.

Não foi possível observar diferença estatística entre as amostras na condição de frio (4°C) em escuro completo. Nesta condição, *SbCCA1* apresentou comportamento pouco variável durante todo o período de experimentação. O maior valor de expressão detectado foi 1,75 após 12 horas e o menor após 24 horas, com 0,82. A condição de escuro e temperatura ambiente é marcada por uma queda na expressão relativa de 0,09 após 1 hora e um aumento às 24 horas, com 7,99. No entanto, embora essa diferença seja grande, as amostras apresentaram um alto grau de variabilidade entre si, de modo que não atendem ao intervalo estatístico aplicado.

As plantas possuem um aparato interno de manutenção do tempo, denominado relógio circadiano, que é capaz de antecipar sinais ambientais externos (Huang e Nusinow, 2016). Esse mecanismo interno é regulado pela luz ambiente e variação de temperatura e atuam nos níveis transcricional e pós-traducional (Hsu e Harmer, 2014). Segundo Rubin et al. (2017), o relógio circadiano é essencial para o tamanho da planta, ramificação, tempo de floração e aptidão em

plantas de *Arabidopsis*. Além disso, também é importante para o ritmo da quebra de amido durante o período da noite (Webb et al., 2019).

Além do mais, o relógio circadiano e a aclimação ao frio são fatores que estão intrinsecamente relacionados nas plantas (Ibañez et al., 2008). A expressão diminuída em 12 h durante o fotoperíodo (coleta realizada às 21 h da noite) é esperada, visto que *CCA1/LHY* são genes expressos durante o dia e começam a diminuir a expressão perto da noite (Wang et al., 2021). De acordo com Harmer et al. (2000), a expressão dos genes *DREB1/CBF*, que são responsáveis por codificar fatores de transcrição de extrema importância para respostas ao estresse ao frio, é regulada circadianamente. A indução desses genes é máxima pela manhã e mínima à noite, sendo afetados em mutantes do gene *CCA1/LHY* (Fowler et al., 2005; Kidokoro et al., 2017). Em plantas de *Arabidopsis* 41% dos genes regulados pelo frio foram expressos ritmicamente em luz constante (Covington et al., 2008).

No experimento realizado no escuro, não foi possível detectar esta diminuição, de modo que o ciclo circadiano possa ter sido alterado. A essência de um sistema circadiano é a sincronização com o ambiente local (Dodd et al., 2014). De acordo com Kim et al. (2007), problemas nos componentes do oscilador circadiano podem modificar o funcionamento livre ou até resultar em arritmia. Assim, espera-se que a regulação de genes alvo de *CCA1/LHY*, como os CBFs, também sejam afetadas pela ausência de luz.

5.2.3. CBFs

O gene *SbCBF1* é bastante responsivo ao frio (Krishnaswamy et al., 2012). Na condição de fotoperíodo e frio (4°C), é possível observar aumento na expressão relativa a partir de 1 hora, com cerca de 3,17 (Figura 6). O maior valor de expressão relativa ocorre às 2 horas, com 15,83. Após isso, é observada uma queda às 12 e 24 horas, com valores de 1,25 e 0,17, respectivamente. Na condição de controle de fotoperíodo (temperatura ambiente) o *SbCBF1* apresentou uma queda com o passar das horas, com valores de 0,09, 0,011 e 0,23, durante o período de 2, 12 e 24 horas, respectivamente.

SbCBF1 apresentou tendência de aumento de expressão durante todo o período experimental no escuro e frio (4°C), com o maior valor de expressão às 24 horas, com cerca de 3,09. Não foi possível observar diferença estatística nos outros horários avaliados. Também não foi possível identificar diferença entre os tratamentos da condição experimental de escuro e temperatura ambiente. Há ocorrência de indução de expressão a partir de 1 hora de exposição, com

1,42 de valor de expressão relativa. O maior valor é encontrado após 12 horas, com 5,30. Após isso nota-se uma queda para 2,56 após 24 horas. O *SbCBF1* parece ser afetado por fotoperíodo, e isso pode estar relacionado à sua regulação pelo ciclo circadiano, que já foi relatado em outras espécies (Dong et al., 2011).

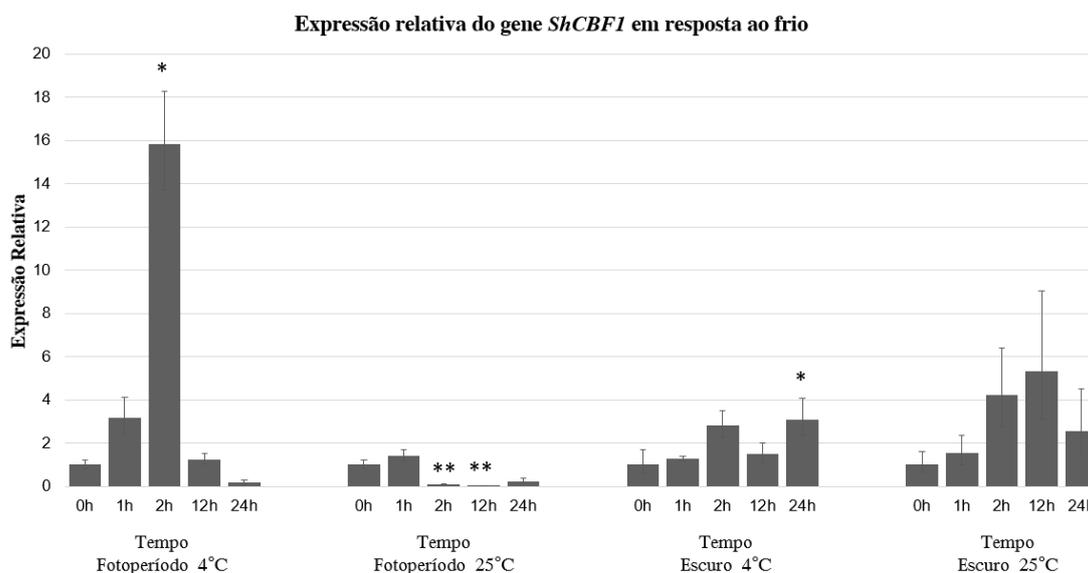


Figura 6: Análise por RT-qPCR da expressão do gene *SbCBF1* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do test “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p-valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p-valor < 0,01).

O gene *SbCBF3* apresenta comportamento semelhante ao *SbCBF1* na condição experimental de fotoperíodo e frio (4°C), com sua expressão aumentada gradualmente ao longo do tempo com 2,72 de expressão relativa após 1 hora e um aumento para 21,13 após 2 horas, seguida de uma redução da expressão relativa para 8,08 e 0,86 após 12 e 24 horas, respectivamente (Figura 7).

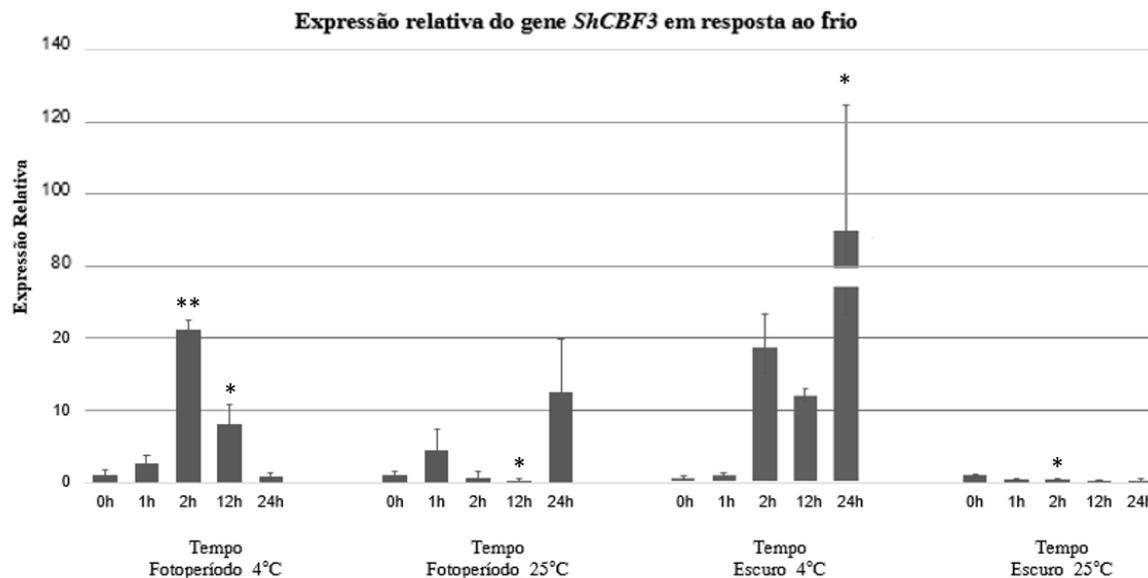


Figura 7: Análise por RT-qPCR da expressão do gene *ShCBF3* em plantas de cana-de-açúcar expostas a condições de fotoperíodo e escuro, como também a temperatura ambiente (25°C) e ao frio (4°C). A análise estatística foi realizada através do teste “t” de Student comparando as médias de cada condição experimental individualmente com seu controle (zero hora). *Diferença estatística a 95% de significância (p -valor < 0,05). **Diferença estatística a 99% de significância (p -valor < 0,01).

Em situação de fotoperíodo e temperatura ambiente, o *ShCBF3* tem aumento de sua expressão com 4,48 após 1 hora e uma queda repentina para 0,68 e 0,13 durante 2 e 12 horas, respectivamente. Em seguida, é notado um aumento no valor de expressão para 12,57 após 24 horas, no entanto esse valor não é significativo estatisticamente pois os valores de expressão das amostras diferiram muito entre si. Na condição de frio (4°C) e escuro, o *ShCBF3* apresentou aumento na expressão ao longo do tempo com 1,15 de expressão relativa após 1 hora, aumento para 18,02 após 2 horas, seguida de diminuição para 13,45 após 12 horas. O maior valor de expressão é apresentado após 24 horas, com 88,97. Este tratamento apresentou alta variabilidade entre as repetições biológicas nos tratamentos de 2 e 12 horas.

O *ShCBF3* teve sua expressão diminuída com o passar do tempo na condição escuro e temperatura ambiente, com 0,40 após 1 hora, 0,34 após 2 horas, 0,23 após 12 horas e 0,13 após 24 horas. Todos os valores de expressão foram inferiores ao controle (zero hora). Aparentemente, esse tipo de condição diminui a expressão do *ShCBF3* com o aumento do período de exposição.

A regulação de CBFs possui um importante papel na tolerância a baixas temperaturas. Em experimentos anteriores também com cana-de-açúcar, Moreira (2021) observou o comportamento de *SoCBF1* em condição de escuro e frio (8°C). Neste caso, foi possível constatar um aumento da expressão relativa após 2 horas de exposição ao frio, e os valores de expressão diminuíram após 24 horas. Esse padrão foi ligeiramente distinto do que foi encontrado no presente trabalho. No

entanto, em ambos os experimentos foi notada indução da expressão do gene *CBF1* no frio em condição de escuro total. Quando se considera o fotoperíodo, foi possível detectar uma resposta maior ao frio.

A superexpressão de *CBF1* em plantas cultivadas tende a aumentar sua tolerância aos diversos estresses abióticos, como congelamento, frio, seca e até ao estresse salino (PINO et al., 2007). Nos últimos anos, diversos estudos demonstraram que os CBFs podem aumentar a tolerância de plantas transgênicas ao frio. Com o intuito de verificar o comportamento do *CBF1* de *Solanum tuberosum* em plantas de *Arabidopsis*, Song et al. (2021) produziram plantas transgênicas. A expressão de *StCBF1* em *Arabidopsis* aumentou a resistência em condições de frio (4°C) e congelamento (- 6°C e - 10°C) em relação às plantas controle. Além disso, a superexpressão de *StCBFs* (*StCBF1* e *StCBF4*) coincidiu com um aumento na expressão dos genes regulados pelo frio *AtCOR15a*, *AtCOR47*, *AtKIN1* e *AtRD29A*. O mesmo foi constatado por Kidokoro et al. (2015), onde observaram que plantas de *Arabidopsis* transformadas com *GmDREB1*, de soja, também apresentaram maior resistência ao frio.

Além disso, a via ICE-CBF também pode ser regulada pelas respostas hormonais de jasmonatos (JA), etileno, brassinosteróides (BR), gibberelina (GA), auxina e ácido salicílico (SA) (Eremina et al., 2016; We e Lee, 2022). Em experimentos realizados com aplicação exógena de JA e posterior choque de frio (4°C) em plantas de pepino (*Cucumis sativus*), Qi et al. (2022) observaram que os níveis de expressão relativa dos genes da via de sinalização ICE-CBF-COR, como *CsICE1*, *CsCBF1*, *CsCBF2* e *CsCOR1* foram significativamente maiores nos eventos de superexpressão de *CsHSA1d* - um ativador de biossíntese do jasmonato - do que nas plantas controle e eventos *knockdown*.

É importante destacar que nem sempre a superexpressão de um gene resulta em aumento de tolerância ao estresse. Zhang et al. (2004) observaram que a superexpressão constitutiva de *LcCBF1* (gene de tomate responsivo ao frio) e *AtCBF3* (gene de *Arabidopsis* responsivo ao frio) em tomateiros transgênicos não aumentou a tolerância ao congelamento. O mesmo ocorreu com plantas de arroz transgênicos expressando *AtCBF1* de *Arabidopsis* (Lee et al., 2004). Em contraste, a superexpressão do gene de cevada *HvCBF4*, que também é uma monocotiledônea, apresentou aumento na tolerância ao frio quando expresso em plantas de arroz (Oh et al., 2007). Estudos também comprovaram que os CBFs foram responsáveis por aumentar a tolerância ao frio de algumas plantas, como cevada (Francia et al., 2007) e trigo (Knox et al., 2008). Também foi observado por Guo et al. (2019) a indução dos genes *TaCBF1b*, *TaCBF4a*, *TaCOR3b* em plantas de trigo submetidas ao estresse de frio (4°C).

De modo geral, os CBFs pertencem à classe mais estudada de genes de resposta ao frio. Neste trabalho, foi possível demonstrar que os genes *SbCBF1* e *SbCBF3* respondem ao estresse agudo de frio em cana-de-açúcar. Ademais, os experimentos realizados na ausência de luz permitiram determinar que a resposta de CBFs ao frio é dependente do fotoperíodo. Assim, este trabalho contribui para o crescente corpo de informações a respeito da via ICE-CBF1, e determina mais genes candidatos a programas de melhoramento de cana-de-açúcar.

6. CONCLUSÃO

O estudo de genes envolvidos na tolerância ao frio apresenta grande potencial em expandir o cultivo de cana-de-açúcar para ambientes menos propícios ao plantio e, principalmente, mitigar o efeito negativo de ondas de frio inesperadas. Dessa forma, com esse trabalho foi possível concluir que:

1. Os genes *SbSRC2*, *SbCBF1* e *SbCBF3* apresentaram expressão induzida ao frio, com padrões distintos frente ao tempo de exposição e condição de fotoperíodo luz/escuro;
2. O gene *SbSRC2* apresentou aumento da expressão frente ao estresse de frio, independente das condições de luminosidade.
3. O gene *SbCCA1* tem seu comportamento afetado pelo escuro, visto que reduz em 50% o padrão de expressão que possui durante o fotoperíodo;
4. Ambos os genes *SbCBF1* e *SbCBF3* são responsivos ao frio, e suas respostas são moduladas dependendo da condição de luminosidade.

REFERÊNCIAS

- ALCANTARA-CORTES, J. S. *et al.* Principales reguladores hormonales y sus interacciones en el crecimiento vegetal. *Nova*, v. 17, n. 32, p. 109-129, 2019.
- ALVES, L. C. *et al.* Diel oscillations in cell wall components and soluble sugars as a response to short-day in sugarcane (*Saccharum* sp.). *BMC plant biology*, v. 19, n. 1, p. 1-14, 2019.
- AN, D.; YANG, J.; ZHANG, P. Transcriptome profiling of low temperature-treated cassava apical shoots showed dynamic responses of tropical plant to cold stress. *BMC genomics*, v. 13, p. 1-25, 2012.
- ANUNANTHINI, P.; KUMAR, S. R.; SATHISHKUMAR, R. Factors affecting genetic transformation efficiency in sugarcane. *In: Sugarcane biotechnology: challenges and prospects*. Springer, Cham, 2017. p. 61-73.
- ARNAO, M. B.; HERNÁNDEZ- RUIZ, J. Melatonina como centro regulador dos níveis de hormônios vegetais e ação em situações de estresse. *Biologia Vegetal*, v. 23, p. 7-19, 2021.
- ARNAO, M.B., HERNÁNDEZ-RUIZ, J. Melatonin and reactive oxygen and nitrogen species: a model for the plant redox network. *Melatonin Res.*, 2 (2019), pp. 152-168
- ARTAXO, P. As três emergências que nossa sociedade enfrenta: saúde, biodiversidade e mudanças climáticas. *Estudos Avançados*, v. 34, p. 53-66, 2020.
- ATIF, R. M. *et al.* Insights on calcium-dependent protein kinases (CPKs) signaling for abiotic stress tolerance in plants. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 21, p. 5298, 2019.
- BADAWI M. *et al.* 2008. Structure and functional analysis of wheat ICE (inducer of CBF expression) genes. *Plant Cell Physiology* 49(8):1237-1249.
- BAI, T. *et al.* Different physiological responses of C3 and C4 plants to nanomaterials. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, p. 25542-25551, 2021.
- BAILEY-SERRES, J., PARKER, J. E., AINSWORTH, E. A., OLDROYD, G. E. D. & SCHROEDER, J. I. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature* 575, 109–118 (2019).
- BAILLO, E. H. *et al.* Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. *Genes*, v. 10, n. 10, p. 771, 2019.
- BARAH, P. *et al.* Genome-scale cold stress response regulatory networks in ten *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *BMC genomics*, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2013.
- BARRERO-SICILIA, C. *et al.* Lipid remodelling: Unravelling the response to cold stress in *Arabidopsis* and its extremophile relative *Eutrema salsugineum*. *Plant Science*, v. 263, p. 194-200, 2017.
- BRAGA, F. M. *et al.* Crescimento de plantas C3 e C4 em resposta a diferentes concentrações de CO₂ e arranjos competitivos. 2020.

BUSSONI, C. V. A.; MOREIRA, D. S.; MACHADO, J. P. Avaliação do Modelo WRF para Aplicação de um índice de Previsão de Geadas na Região Sul do Brasil. *Revista Brasileira de Meteorologia*, v. 37, p. 279-287, 2022.

CAI, R. *et al.* The maize WRKY transcription factor ZmWRKY17 negatively regulates salt stress tolerance in transgenic Arabidopsis plants. *Planta*, v. 246, n. 6, p. 1215-1231, 2017.

CÂNDIDO JÚNIOR, C. S. Capacidade para produção de etanol de segunda geração e cogeração de energia elétrica a partir do bagaço da cana-de-açúcar no estado de São Paulo. 2022.

CANELLA D.; GILMOUR S. J.; KUHN L. A. Thomashow MF. 2010. DNA binding by the Arabidopsis CBF1 transcription factor requires the PKKP/RAGR_xKFxETRHP signature sequence. *Biochimica et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms* 1799(5–6):454-462.

CARVALHO, M. H. C. Drought stress and reactive oxygen species: production, scavenging and signaling. *Plant signaling & behavior*, v. 3, n. 3, p. 156-165, 2008.

CARVALLO, M. A. *et al.* A comparison of the low temperature transcriptomes and CBF regulons of three plant species that differ in freezing tolerance: *Solanum commersonii*, *Solanum tuberosum*, and *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany*, v. 62, n. 11, p. 3807-3819, 2011.

CHEAVEGATTI-GIANOTTO, A. *et al.* 2019. Development of CTC20BT, the first genetically modified sugarcane commercially available in the world. *Proceedings International Society of Sugar Cane Technologists Congress* 30: 1272–1279.

CHEN, X. *et al.* Proteína quinases em respostas de plantas à seca, sal e estresse por frio. *Jornal de biologia vegetal integrativa*, v. 63, n. 1, pág. 53-78, 2021.

CHINNUSAMY V.; OHTA M.; KANRAR S.; LEE B. H.; HONG X.; AGARWAL M.; ZHU G. K. 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Gene Development* 17(8):1043-1054.

COHEN, S. P.; LEACH, J. E. Abiotic and biotic stresses induce a core transcriptome response in rice. *Scientific reports*, v. 9, n. 1, p. 6273, 2019.

CONAB - *Companhia Nacional de Abastecimento*. 2021. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2021/22, segundo levantamento. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em 9 de setembro de 2022.

CONAB - *Companhia Nacional de Abastecimento*. 2022. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, safra 2022/23, segundo levantamento. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>. Acesso em 10 de setembro de 2022.

COVINGTON, M. F.; MALOOF, J. N.; STRAUME, M.; KAY, S. A.; HARMER, S. L. (2008). Global transcriptome analysis reveals circadian regulation of key pathways in plant growth and development. *Genome Biol.* 9, R130. doi: 10.1186/gb-2008-9-8-r130

DE ANDRADE, O. Pau Brasil. *Globo Livros*, 2003.

DE LUCENA, J. A. *et al.* Produção agropecuária e correlação com a dinâmica climática em Caicó-RN. 2013.

- DE' DONATO, F.; MICHELOZZI, P. Climate change, extreme weather events and health effects. *The Mediterranean Sea: Its history and present challenges*, p. 617-624, 2014.
- DILLEWIJN, C. Van Botany of sugarcane. *Waltham: Chronica Botanica*, 1952. 371p.
- DING, Y. *et al.* OST1 kinase modulates freezing tolerance by enhancing ICE1 stability in Arabidopsis. *Developmental cell*, v. 32, n. 3, p. 278-289, 2015.
- DODD, A. N. *et al.* The circadian clock has transient plasticity of period and is required for timing of nocturnal processes in Arabidopsis. *New Phytol.* 201, 168–179 (2014).
- DODD, A. N.; WEBB, A. A. In a plant's own sweet time: Sugar and circadian rhythms. *The Biochemist*, v. 36, n. 2, p. 8-11, 2014.
- DONG M. A.; FARRE E. M.; THOMASHOW M. F. 2011. 1 associado ao relógio circadiano e hipocótilo alongado tardio regulam a expressão da via do fator de ligação de repetição C (CBF) em Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, EUA 108: 7241 – 7246.
- DOU, H. *et al.* Potato plants ectopically expressing Arabidopsis thaliana CBF 3 exhibit enhanced tolerance to high- temperature stress. *Plant, Cell & Environment*, v. 38, n. 1, p. 61-72, 2015.
- DUARTE, N. L. *et al.* Cultura do sorgo (*Sorghum bicolor* [L.] Moench): uma revisão sobre sua versatilidade tecnológica, processamento e pós-colheita. 2021.
- EREMINA, M.; Unterholzner, S. J.; Rathnayake, A. I. Brassinosteroids participate in the control of basal and acquired freezing tolerance of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, e5982–e5991.
- FAGUNDES, F. N. Elementos territoriais estratégicos à aquisição de cana-de-açúcar por usinas sucroalcooleiras do estado de São Paulo. 2022.
- FAHAD, S. *et al.* Crop plant hormones and environmental stress. *Sustainable Agriculture Reviews*, v. 15, p. 371-400, 2015.
- FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. 2020. *Base de dados Faostat — Agriculture*.
- FAO. The State of Food Security and Nutrition in the World 2021. FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO; 2021
- FENG, T. *et al.* Coronatine alleviates cold stress by improving growth and modulating antioxidative defense system in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, p. 1-9, 2022.
- FICHMAN, Y. *et al.* HPCA1 is required for systemic reactive oxygen species and calcium cell-to-cell signaling and plant acclimation to stress. *The Plant Cell*, v. 34, n. 11, p. 4453-4471, 2022.
- FOWLER, S. G.; COOK, D.; THOMASHOW, M. F. Low temperature induction of Arabidopsis CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiol.* 2005, 137, 961–968.
- FRANCIA, E.; BARABASCHI, D.; TONDELLI, A.; LAIDO, G.; RIZZA, F.; STANCA, A. M.; BUSCONI, M.; FOGHER, C.; STOCKINGER, E. J.; PECCHIONI, N. Fine mapping of a

HvCBF gene cluster at the frost resistance locus Fr-H2 in barley. *Theor. Appl. Genet* 2007, 115, 1083–1091.

GAIVOTA, A.; LONE, A. A.; WANI, N. U. I. Estresses bióticos e abióticos em plantas. *Estresse abiótico e biótico em plantas*, p. 1 a 19 de 2019.

GAO, F. *et al.* Quantitative proteomic analysis of the response to cold stress in jojoba, a tropical woody crop. *International journal of molecular sciences*, v. 20, n. 2, p. 243, 2019.

GONZALEZ, D. H. Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects. *Plant Transcription Factors: Evolutionary, Structural and Functional Aspects*; Elsevier: London, UK, 2015.

GOWIK, U.; WESTHOFF, P. The path from C3 to C4 photosynthesis. *Plant Physiology*, v. 155, n. 1, p. 56-63, 2011.

GUO, J. *et al.* Characterization and expression profiling of the ICE-CBF-COR genes in wheat. *PeerJ*, v. 7, p. e8190, 2019.

HAO, X. *et al.* Comprehensive transcriptome analysis reveals common and specific genes and pathways involved in cold acclimation and cold stress in tea plant leaves. *Scientia Horticulturae*, v. 240, p. 354-368, 2018.

HARMER, S. L.; HOGENESCH, J. B.; STRAUME, M.; CHANG, H. S.; HAN, B.; ZHU, T.; WANG, X.; KREPS, J. A.; KAY, S. A. Orchestrated transcription of key pathways in Arabidopsis by the circadian clock. *Science* 2000, 290, 2110–2113.

HSU, P. Y.; HARMER, S. L. Wheels within wheels: the plant circadian system. *Trends in plant science*, v. 19, n. 4, p. 240-249, 2014.

HU, Y. *et al.* Jasmonate regulates the inducer of CBF expression—c-repeat binding factor/DRE binding factor1 cascade and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*, v. 25, n. 8, p. 2907-2924, 2013.

HUANG H.; NUSINOW D. A. Into the evening: Complex interactions in the Arabidopsis circadian clock. *Trends in Genetics*. 2016 Oct 1;32(10):674-86.

HWARARI, D. *et al.* ICE-CBF-COR Signaling Cascade and Its Regulation in Plants Responding to Cold Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 3, p. 1549, jan. 2022.

IBAÑEZ, Cristian *et al.* Alteração geral da expressão do gene do relógio circadiano na resposta ao frio da castanha. *PLoS On*, v. 3, n. 10, pág. e3567, 2008.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. *Climate Change 2021: the physical science basis* (IPCC, 2021).

INUKAI, S.; Kock, K. H.; Bulyk, M. L. Transcription factor-DNA binding: Beyond binding site motifs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2017, 34, 110–119.

- ISKANDAR, H. M. et al. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 22, p. 325-337, 2004.
- JIA Y.; DING Y.; SHI Y.; ZHANG X.; GONG Z.; YANG S. 2016. The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in Arabidopsis. *New Phytologist* 212(2):345-353.
- JIN Y.; ZHAI S.; WANG W.; DING X.; GUO Z.; BAI L.; WANG S. 2018. Identification of genes from the ICE-CBF-COR pathway under cold stress in Aegilops-Triticum composite group and the evolution analysis with those from Triticeae. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 24(2):211-229.
- JÚNIOR, G. N. A. et al. Estresse hídrico em plantas forrageiras: Uma revisão. *Pubvet*, v. 13, p. 148, 2018.
- KALISZ, A. et al. Effect of chilling stress before transplanting on morphological parameters of broccoli heads. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, v. 13, n. 1, p. 129-139, 2014.
- KARKI et al. Improvement of photosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by inserting the C4 pathway. *Rice*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2013.
- KATOH K.; Standley D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability, *Molecular Biology and Evolution*, Volume 30, Issue 4, April 2013, Pages 772–780.
- KAWARAZAKI T.; KIMURA S.; IIZUKA A.; HANAMATA S.; NIBORI H.; MICHIKAWA M.; IMAI A.; ABE M.; KAYA H.; KUCHITSU K. (2013) A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 2775-2780.
- KHATRI, P.; PANDIT, A. B. Systematic review of life cycle assessments applied to sugarcane bagasse utilization alternatives. *Biomass and Bioenergy*, v. 158, p. 106365, 2022.
- KIDOKORO, S. et al. Soybean DREB 1/CBF- type transcription factors function in heat and drought as well as cold stress- responsive gene expression. *The Plant Journal*, v. 81, n. 3, p. 505-518, 2015.
- KIDOKORO, S.; YONEDA, K.; TAKASAKI, H.; TAKAHASHI, F.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Different Cold-Signaling Pathways Function in the Responses to Rapid and Gradual Decreases in Temperature. *Plant Cell* 2017, 29, 760–774.
- KIM, J. Y., et al. "High temperature attenuates the gravitropism of inflorescence stems by inducing SHOOT GRAVITROPISM 5 alternative splicing in Arabidopsis." *New Phytologist*. 209.1 (2016): 265-279.
- KIM, W. Y. et al. ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449, 356–360 (2007).
- KIM, Y. C. et al. Molecular characterization of a pepper C2 domain-containing SRC2 protein implicated in resistance against host and non-host pathogens and abiotic stresses. *Planta*, v. 227, p. 1169-1179, 2008.

KNOX, A. K.; LI, C.; VAGUJFALVI, A.; GALIBA, G.; STOCKINGER, E.J.; DUBCOVSKY, J. Identification of candidate CBF genes for the frost tolerance locus Fr-Am2 in *Triticum monococcum*. *Plant Mol. Biol* 2008, 67, 257–270.

KONG, X. *et al.* Changes in membrane lipid composition and function accompanying chilling injury in bell peppers. *Plant and Cell Physiology*, v. 59, n. 1, p. 167-178, 2018.

KRISHNASWAMY, S. *et al.* Família de Genes APETALA2: Potencial para Melhoramento de Culturas em Condições Adversas. In: *Aclimação das Plantas ao Estresse Ambiental*. Nova York, NY: *Springer Nova York*, 2012. p. 177-195.

KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *The Plant Cell*, v. 22, n. 3, p. 541-563, 2010.

LEE B. H.; HENDERSON D. A.; ZHU J. K. 2015. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell* 17(11):3155-3175.

LI H.; YE K.; SHI Y.; CHENG J.; ZHANG X.; YANG S. BZR1 Positively Regulates Freezing Tolerance via CBF-Dependent and CBF-Independent Pathways in Arabidopsis. *Molecular Plant*, Volume 10, Issue 4, 2017, Pages 545-559.

LI, H. *et al.* Transcriptome and Expression Analysis of Genes Related to Regulatory Mechanisms in Holly (*Ilex dabieshanensis*) under Cold Stress. *Forests*, v. 13, n. 12, p. 2150, 2022.

LI, S. *et al.* "Cell signaling during drought and/or cold stress in cassava." *Tropical Plants* 1, no. 1 (2022): 1-7.

LI, S. L. *et al.* Differential effects of cold stress on chloroplasts structures and photosynthetic characteristics in cold-sensitive and cold-tolerant cultivars of sugarcane. *Sugar Tech*, v. 20, p. 11-20, 2018.

LI, Y. *et al.* Respostas fisiológicas de mudas de tomateiro (*Lycopersicon esculentum*) ao estresse salino. *Appl moderno. Sci*, v. 3, n. 3, pág. 171-176, 2009.

LI, Y. R. *et al.* Damage in sugarcane production caused by long duration of chilling and frost in Guangxi, China. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, v. 3, n. 4, p. 1139-1144, 2015.

LI, Y. R.; YANG, L. T. Sugarcane agriculture and sugar industry in China. *Sugar Tech*, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2015.

LIN, L. *et al.* Plant mitogen-activated protein kinase cascades in environmental stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 4, p. 1543, 2021.

LING, H. *et al.* Comprehensive selection of reference genes for gene expression normalization in sugarcane by real time quantitative RT-PCR. *Plos one*, v. 9, n. 5, p. e97469, 2014.

LLORENTE F.; LÓPEZ-COBOLLO R. M.; CATALÁ R.; MARTÍNEZ-ZAPATER J. M.; SALINAS J. (2002), A novel cold-inducible gene from Arabidopsis, RCI3, encodes a peroxidase that constitutes a component for stress tolerance. *The Plant Journal*, 32: 13-24.

- LU, X. *et al.* 2007. Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnology Journal* 5(5):646-656.
- MAHMOOD, T. *et al.* Insights into drought stress signaling in plants and the molecular genetic basis of cotton drought tolerance. *Cells*, v. 9, n. 1, p. 105, 2019.
- MALIK, A. L. *et al.* "Cassava breeding and agronomy in Asia: 50 years of history and future directions." *Breeding Science* 70, no. 2 (2020): 145-166.
- MAO Y.; KANCHAN A. P.; MICHAEL F. T.; STEVEN J. T. Physical and functional interactions of Arabidopsis ADA2 transcriptional coactivator proteins with the acetyltransferase GCN5 and with the cold-induced transcription factor CBF1. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, Volume 1759, *Issues* 1–2, 2006, Pages 69-79.
- MARCHLER-BAUER A.; BRYANT S. H. (2004), "CD-Search: protein domain annotations on the fly" *Nucleic Acids Res.* 32(W) 327-331.
- MARIN, F. R. Características da cana-de-açúcar. *Embrapa*, 2022. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/cana/pre-producao/caracteristicas>. Acesso em: 12/09/22.
- MARTINS, V. A.; OLIVETTE, M. P. D. A. Cana-de-açúcar—safra 2013/14—e fatores climáticos: panorama dos impactos na produtividade nos Escritórios de Desenvolvimento Rural (EDRs) no Estado de São Paulo. *Análise e Indicadores do Agronegócio*, v. 10, n. 3, p. 1-10, 2015.
- MAY, A.; RAMOS, N. P. Uso de gemas individualizadas de cana-de-açúcar para a produção de mudas. *Jaguariúna: Embrapa*, 2019.
- MCCLUNG, C. R. The genetics of plant clocks. *Advances in genetics*, v. 74, p. 105-139, 2011.
- MIOOTTO, Y. E. Efeitos da sinalização dependente de luz no desenvolvimento de raízes em *Arabidopsis thaliana*. 2020.
- MIRYEGANEH, M. Mecanismos epigenéticos das plantas e estresse abiótico. *Genes*, v. 12, n. 8, pág. 1106, 2021.
- MITTLER, R. Estresse abiótico, ambiente de campo e combinação de estresse. *Tendências em ciência vegetal*, v. 11, n. 1, pág. 15-19, 2006.
- MIZOI J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. *Biochimica Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Volume 1819, *Issue* 2, 2012, Pages 86-96.
- MOREIRA, D. A. C.; GONÇALVES, D. A. R. Influência da fosfatagem e tamanho do tolete no desenvolvimento da cana de açúcar (*Saccharum officinarum*). *Pesquisa Agropecuária Pernambucana*, v. 27, n. 2, 2022.
- MOREIRA, G. L. L. S.; Identificação e caracterização de genes referentes a fatores de transcrição CBFs envolvidos na resposta ao frio em cana-de-açúcar. 2021. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo.

NATH, V. S.; MISHRA, A. K.; KUMAR, A.; MATOUSEK, J.; JAKSE, J. Revisiting the role of transcription factor in coordinating the defense response against Citrus Bark Cracking Viroid infection in commercial hop (*Humulus lupulus* L.). *Viruses J.* 2019, 11, 419.

NOGUEIRA, F. T. S.; VICENTE E.; ROSA J. R.; MARCELO M.; EUGÊNIO C. U.; PAULO A. "RNA expression profiles and data mining of sugarcane response to low temperature." *Plant Physiology* 132, no. 4 (2003): 1811-1824.

NORÉN, L. *et al.* Circadian and plastid signaling pathways are integrated to ensure correct expression of the CBF and COR genes during photoperiodic growth. *Plant physiology*, v. 171, n. 2, p. 1392-1406, 2016.

OH, S. J.; KWON, C. W.; CHOI, D. W.; SONG, S. I.; KIM, J. K. EXPRESSION of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol. J* 2007, 5, 646–656.

OLIVEIRA, L.; NAVARRO, B.; DE JESUS PEREIRA, J. *et al.* Bioinformatic analyses to uncover genes involved in trehalose metabolism in the polyploid sugarcane. *Sci Rep* 12, 7516 (2022).

PANG, Z. *et al.* Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: a review. *Frontiers in Plant Science*, v. 12, p. 621276, 2021.

PARK S.; LEE C. M.; DOHERTY C. J.; GILMOUR S. J.; KIM Y.; THOMASHOW M. F. 2015. Regulation of the Arabidopsis CBF regulon by a complex low-temperature regulatory network. *Plant Journal* 82(2):193-207

PARK, M. J.; SEO, P. J.; PARK, C. M. CCA1 alternative splicing as a way of linking the circadian clock to temperature response in Arabidopsis. *Plant signaling & behavior*, v. 7, n. 9, p. 1194-1196, 2012.

PATRO R.; Duggal G.; Love M. *et al.* Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. *Nat Methods* 14, 417–419 (2017).

PENG P. H.; LIN C. H.; TSAI H. W.; LIN T. Y. 2014. Cold response in *Phalaenopsis Aphrodite* and characterization of PaCBF1 and PaICE1. *Plant and Cell Physiology* 55(9):1623-1635.

PETROV, V. *et al.* ROS-mediated abiotic stress-induced programmed cell death in plants. *Frontiers in plant science*, v. 6, p. 69, 2015.

PINO, M. T. *et al.* Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal*, v.5, n. 5, p. 591-604, 2007.

POURKHEIRANDISH, M.; AGNIESZKA A.; GOLICZ, P. L.; BHALLA, M. B. Singh. "Global role of crop genomics in the face of climate change." *Frontiers in Plant Science* 11 (2020): 922.

QI, C. *et al.* Heat shock- induced cold acclimation in cucumber through CsHSFA1d- activated JA biosynthesis and signaling. *The Plant Journal*, v. 111, n. 1, p. 85-102, 2022.

RATIVA, A. G. S. *et al.* Cold tolerance in rice plants is partially controlled by root responses. *BioRxiv*, p. 2020.01. 25.919464, 2020.

ROBINSON, S. J.; PARKIN, I. A. P. Differential SAGE analysis in *Arabidopsis* uncovers increased transcriptome complexity in response to low temperature. *BMC genomics*, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2008.

RODRIGUES, M. T. G. Efeitos de bioestimulantes no crescimento e desenvolvimento da cana-de-açúcar. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2022. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/236051>>.

RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E.; BORRÁS-HIDALGO, O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Bioteconología Aplicada*, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2005.

ROSENZWEIG, C. *et al.* The Agricultural Model Intercomparison and Improvement Project: Phase I activities by a global community of science. Handbook of Climate Change and Agroecosystems: The Agricultural Model Intercomparison and Improvement Project (Agmip) Integrated Crop and Economic Assessments—Joint Publication with Asa, Cssa, *And Sssa (In 2 Parts)*, v. 3, p. 1, 2015.

Rubin, M. J.; Brock, M. T.; Davis, A. M.; German, Z. M.; Knapp, M.; Welch, S. M.; HARMER, S. L.; Maloof, J. N.; Davis, S. J.; Weinig, C. Circadian rhythms vary over the growing season and correlate with fitness components. *Mol. Ecol.* 2017, 26, 5528–5540.

SALEEM, M.; FARIDUDDIN, Q.; JANDA, T. Multifaceted role of salicylic acid in combating cold stress in plants: A review. *Journal of Plant Growth Regulation*, v. 40, p. 464-485, 2021.

SANGKET U.; YODSAWAT P.; NUANPIROM J.; SATHAPONDECHA P. 2022. bestDEG: a web-based application automatically combines various tools to precisely predict differentially expressed genes (DEGs) from RNA-Seq data. *PeerJ* 10:e14344.

SCHAAL, B. Plants and people: Our shared history and future. *Plants, People, Planet*, v. 1, n. 1, p. 14–19, 2019

SEIFIKALHOR, M. *et al.* A sinalização de cálcio e a tolerância ao sal estão diversamente entrelaçadas nas plantas. *Sinalização e comportamento vegetal*, v. 14, n. 11, pág. 1665455, 2019.

SEO, P. J. *et al.* "Targeted inactivation of transcription factors by overexpression of their truncated forms in plants." *The Plant Journal* 72.1 (2012): 162-172.

SHEN, W. K. *et al.* Animal TFDB 4.0: a comprehensive animal transcription factor database updated with variation and expression annotations. *Nucleic Acids Research*, v. 51, n. D1, p. D39-D45, 2023.

SHI, Y.; DING, Y.; YANG, S. Regulação molecular da sinalização CBF na aclimação ao frio. *Tendências em ciência vegetal*, v. 23, n. 7, pág. 623-637, 2018.

SHRESTHA, A.; THAPA, B.; DULAL, G. Sugarcane Response and Its Related Gene Expression under Water Stress Condition. *Sugarcane-Its Products and Sustainability*, 2023.

SILVA, J. P. R. Instrumentação utilizada em fisiologia vegetal – ESALQ | USP. 2019. *Trabalho de Conclusão de Curso*. Brasil.

SILVA, M. L. Avaliação do impacto das mudanças climáticas na América do Sul *Tropical usando downscaling dinâmico: histórico e futuro*. 2022.

SKINNER S.; VON ZITZEWITZ J.; SZUCS P.; MARQUEZ-CEDILLO L.; FILICHKIN T.; AMUNDSEN K.; STOCKINGER E. J.; THOMASHOW M. F.; CHEN T. H. H.; HAYES P. M. 2005. Structural, functional, and phylogenetic characterization of a large CBF gene family in barley. *Plant Molecular Biology* 59(4):533-551.

SONESON C.; LOVE M. I.; ROBINSON M. D. (2015). “Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences.” *F1000Research*, 4.

SONG, Q. *et al.* CBF1 and CBF4 in *Solanum tuberosum* L. differ in their effect on low-temperature tolerance and development. *Environmental and Experimental Botany*, v. 185, p. 104416, 2021.

SU, W. *et al.* A família de genes da álcool desidrogenase na cana-de-açúcar e seu envolvimento na regulação do estresse pelo frio. *BMC genomics*, v. 21, n. 1, pág. 1-17, 2020.

SUGIHARTO, B.; HARMOKO, R.; SAWITRI, W. D. Biotechnological Approaches to Improve Sugarcane Quality and Quantum Under Environmental Stresses. In: *Agro-industrial Perspectives on Sugarcane Production under Environmental Stress*. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. p. 267-300.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia vegetal*. 6. ed., Artmed, 2016. 888 p.

TAKAHASHI R.; SHIMOSAKA E. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes in soybean. *Plant Science*, Volume 123, Issues 1–2, 1997, Pages 93-104.

TAKAHASHI, R.; SHIMOSAKA, E. cDNA sequence analysis and expression of two cold-regulated genes in soybean. *Plant Science*, v. 123, n. 1-2, p. 93-104, 1997.

TANG S.; YANG L.; LI Y. Comparative Analysis on Transcriptome Among Different Sugarcane Cultivars Under Low Temperature Stress. *Biotechnology Bulletin*, 2018, 34(12): 116-124.

THIEBAUT, F. *et al.* Regulation of miR319 during cold stress in sugarcane. *Plant, cell & environment*, v. 35, n. 3, p. 502-512, 2012.

THOR, K. Cálcio – nutriente e mensageiro. *Fronteiras na ciência vegetal*, v. 10, p. 440, 2019.

TRIPATHI, P.; CHANDRA, A.; PRAKASH, J. Changes in physio-biochemical attributes and dry matter accumulation vis a vis analysis of genes during drought and stress recovery at tillering stage of sugarcane. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 44, p. 1-10, 2022.

VERMA, R. R.; SRIVASTAVA, T. K.; SINGH, P. Climate change impacts on rainfall and temperature in sugarcane growing Upper Gangetic Plains of India. *Theoretical and Applied Climatology*, v. 135, p. 279-292, 2019.

WALTER, L. C.; ROSA, H. T.; STRECK, N. A. Mecanismos de aclimação das plantas à elevada concentração de CO₂. *Ciência Rural*, v. 45, p. 1564-1571, 2015.

WANG, K. *et al.* Two homologous LHY pairs negatively control soybean drought tolerance by repressing the abscisic acid responses. *New Phytologist*, v. 229, n. 5, p. 2660–2675, 2021.

- WEBB, A. A. R. et al. Continuous dynamic adjustment of the plant circadian oscillator. *Nature communications*, v. 10, n. 1, p. 550, 2019.
- WEI, X. et al. Convergence and divergence: Signal perception and transduction mechanisms of cold stress in Arabidopsis and Rice. *Plants*, v. 10, n. 9, p. 1864, 2021.
- WI, S. D.; LEE, E. S. Redox-mediated structural and functional switching of C-repeat binding factors enhances plant cold tolerance. *New Phytol.* 2022, 233, 1067–1073.
- WREGGE, M. S. et al. Regiões potenciais para cultivo da cana-de-açúcar no Paraná, com base na análise do risco de geadas. *Revista brasileira de agrometeorologia*, v. 13, n. 1, p. 113-122, 2005.
- WU, Y. F. et al. Frost affects grain yield components in winter wheat. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, v. 42, n. 3, p. 194-204, 2014.
- YANG, G. et al. SnRK2s at the crossroads of growth and stress responses. *Trends in plant science*, v. 24, n. 8, p. 672-676, 2019.
- YANG, J. et al. The crosstalks between jasmonic acid and other plant hormone signaling highlight the involvement of jasmonic acid as a core component in plant response to biotic and abiotic stresses. *Frontiers in plant science*, v. 10, p. 1349, 2019.
- YANG, Y. et al. DREB/CBF expression in wheat and barley using the stress- inducible promoters of HD- Zip I genes: impact on plant development, stress tolerance and yield. *Plant biotechnology journal*, v. 18, n. 3, p. 829-844, 2020.
- YANO R.; NAKAMURA M.; YONEYAMA T.; NISHIDA I. Starch-Related α -Glucan/Water Dikinase Is Involved in the Cold-Induced Development of Freezing Tolerance in Arabidopsis, *Plant Physiology*, Volume 138, Issue 2, June 2005, Pages 837–846.
- YIN, J. et al. Post-translational modifications of proteins have versatile roles in regulating plant immune responses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 11, p. 2807, 2019.
- YU, M. M. et al. JA-induced TaMPK6 enhanced the freeze tolerance of Arabidopsis thaliana through regulation of ICE-CBF-COR module and antioxidant enzyme system. *Plant Science*, v. 329, p. 111621, 2023.
- YU, Z. et al. How plant hormones mediate salt stress responses. *Trends in plant science*, v. 25, n. 11, p. 1117-1130, 2020.
- YUAN, P.; YANG, T.; POOVAIAH, B. W. Resposta de plantas mediadas por sinalização de cálcio ao estresse por frio. *Revista Internacional de Ciências Moleculares*. v. 19, n. 12, pág. 3896, 2018.
- ZHANG, B. Q.; YANG, L. T.; LI, Y. R. Physiological and biochemical characteristics related to cold resistance in sugarcane. *Sugar Tech*, v. 17, p. 49-58, 2015.
- ZHANG, H. et al. Abiotic stress responses in plants. *Nature Reviews Genetics*, v. 23, n. 2, p. 104-119, 2022.

ZHANG, X.; Fowler, S. G.; Cheng, H.; Lou, Y.; Rhee, S. Y.; Stockinger, E.J.; Thomashow, M.F. Freezing-sensitive tomato has a functional CBF cold response pathway, but a CBF regulon that differs from that of freezing-tolerant Arabidopsis. *Plant J* 2004, 39, 905–919.

ZHANG, Y. *et al.* Differentially regulated orthologs in sorghum and the subgenomes of maize. *The Plant Cell*, v. 29, n. 8, p. 1938-1951, 2017.

ZHANG, Y. *et al.* Interações entre endófitos e plantas: efeito benéfico dos endófitos para melhorar estresses bióticos e abióticos nas plantas. *Jornal de biologia vegetal*, v. 62, p. 1-13, 2019.

ZHAO, D. *et al.* Phyto melatonin: an emerging regulator of plant biotic stress resistance. *Trends in plant science*, v. 26, n. 1, p. 70-82, 2021.

ZHAO, Y. *et al.* The calcium- dependent protein kinase ZmCDPK7 functions in heat - stress tolerance in maize. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 63, n. 3, p. 510-527, 2021.

ZHU, J. K. "Abiotic stress signaling and responses in plants." *Cell* 167, no. 2 (2016): 313-324.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. *Química nova*, v. 33, p. 1421-1428, 2010.

APÊNDICE

Putativos genes de resposta ao frio em cana-de-açúcar. Gene: Gene ou família; ID EggNOG: identificadores dos ortogrupos no banco de ortólogos EggNOGG; ID TAIR: número de acesso do(s) gene(s) em *Arabidopsis thaliana* (arabidopsis.org); Ortólogos em cana-de-açúcar: sequências em cana-de-açúcar pertencentes ao ortogrupo indicado e com todos os domínios completos segundo análise no programa *CD-search*. Origem: Banco de dados ao qual a sequência pertence, nomenclatura de Oliveira et al. (2022).

G en e	ID EggNOG	ID TAIR	Ortólogos em cana-de-açúcar	Origem
B ES 1	ENOG5037JAA	AT1G1935 0	c63645f2p01289	SCA2_ 2
			SP803280_c113795_g2_i4	SCA3
A D A2	ENOG5037J8Z	AT3G0774 0	SCCCRZ1C01B03.g	SCA5
			SP803280_c114308_g1_i1	SCA3
			c92442f2p12285	SCA2_ 2
			Sh01_t006480	SCA1_ 1
C A M T A3	ENOG5037PJU	AT2G2230 0	evm.model.SCSP803280_000011436.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000012466.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000033936.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000097298.1	SCA4
			SP803280_c113061_g2_i1	SCA3
			SP803280_c109974_g2_i1	SCA3
			SP803280_c113061_g2_i2	SCA3
			SUGdenovo-0749474	SCA2_ 1
			c83056f1p13324	SCA2_ 2
			c88112f1p23481	SCA2_ 2
			c97737f1p03525	SCA2_ 2
			Sh_218K06_t000010	SCA1_ 1
Sh_018J09_t000010	SCA1_ 1			
Sh_211A11_t000020	SCA1_ 1			
C BF s/ D	ENOG5037S89	AT4G2549 0	SCBGLR1099G02.g	SCA5
		AT4G2547 0	SCJLLR2013H07.g	SCA5
			evm.model.SCSP803280_000116105. 2	SCA4

R E Bs		AT4G2548 0	c52435flp11016	SCA2_ 2
		AT5G5199 0	c57280flp01071	SCA2_ 2
C C A1 /L H Y	ENOG5037STC	AT1G0106 0 AT2G4683 0	SCCCLR1048E10.g	SCA5
			SUGdenovo-0635905	SCA2_ 1
			SUGdenovo-0743719	SCA2_ 1
			c88386flp03115	SCA2_ 2
			c54095flp02484	SCA2_ 2
			c94234flp03242	SCA2_ 2
			c95532flp13188	SCA2_ 2
			c81300flp13172	SCA2_ 2
C E S T A	ENOG5037U25	AT1G2533 0	Sh_225M13_t000120	SCA1_ 1
			Sh_243P07_t000120	SCA1_ 1
			Sh_254A12_t000060	SCA1_ 1
			SCMCCL6050E05.g	SCA5
			SP803280_c104111_g1_i1	SCA3
			SP803280_c109837_g2_i1	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000006234.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000022790.4	SCA4
			SUGdenovo-0524143	SCA2_ 1
			SUGdenovo-0524149	SCA2_ 1
			SUGdenovo-0524152	SCA2_ 1
			SUGdenovo-0524153	SCA2_ 1
			SUGdenovo-0524157	SCA2_ 1
SUGdenovo-0557530	SCA2_ 1			

C O L L D 1	ENOG5037IKZ	AT1G6499	c48658f1p02010	SCA2_2	
		0	evm.model.SCSP803280_000030374.2	SCA4	
		AT4G2763	evm.model.SCSP803280_000030997.1	SCA4	
C R L K 1	ENOG5037IRE	AT5G5459	c19440f1p01570	SCA2_2	
			0	c19880f1p01749	SCA2_2
			c63772f1p01559	SCA2_2	
			evm.model.SCSP803280_000049806.2	SCA4	
C R L K 2	ENOG5037IK1	AT5G1573	Sh_213D24_t000030	SCA1_1	
			0	c87460f1p11292	SCA2_2
			SP803280_c107073_g1_i2	SCA3	
D D F s	ENOG5037U6 Z	AT1G1261	Sh04_t021840	SCA1_2	
			0	Sh04_t021850	SCA1_2
			AT1G6303	Sh_159H10_t000050	SCA1_1
			0	Sh_243F10_t000050	SCA1_1
			SP803280_c68214_g1_i1	SCA3	
			SP803280_c76490_g1_i1	SCA3	
			evm.model.SCSP803280_000004513.1	SCA4	
			SCR FAM1027C11.g	SCA5	
E R D 6	ENOG5037ZDJ	AT1G0893	Sh01_t024750	SCA1_2	
			0	Sh02_t025930	SCA1_2
			Sh02_t025960	SCA1_2	
			Sh06_t013630	SCA1_2	
			Sh06_t019650	SCA1_2	
			Sh_237L23_t000030	SCA1_1	
			Sh_244I23_t000060	SCA1_1	

			c72098f1p01588	SCA2_2
			c54288f1p01852	SCA2_2
			c85730f1p05071	SCA2_2
			c96343f1p04410	SCA2_2
			c57636f1p12053	SCA2_2
			c59844f8p51961	SCA2_2
			c73563f1p11836	SCA2_2
			c78460f1p12018	SCA2_2
			c91143f2p02095	SCA2_2
			SP803280_c111555_g1_i1	SCA3
			SP803280_c74146_g1_i1	SCA3
			SP803280_c114730_g2_i6	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000004767.5	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000006257.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000006526.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000021798.2	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000038271.2	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000039458.4	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000045364.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000051825.2	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000061284.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000061993.2	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000078534.5	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000117235.2	SCA4
	ENOG5037SN G	AT2G3981 0	Sh01_t007570	SCA1_2

H O S1			Sh_265O22_t000090	SCA1_1
			SUGdenovo-0089928	SCA2_1
			SUGdenovo-0473546	SCA2_1
			SUGdenovo-0473547	SCA2_1
			SUGdenovo-0640961	SCA2_1
			c92583f1p03095	SCA2_2
			c97145f1p03225	SCA2_2
			evm.model.SCSP803280_000023251.1	SCA4
IC E	ENOG5037RT U	AT1G1286 0 AT3G2674 4	Sh_224I16_t000120	SCA1_1
			Sh_233J21_t000020	SCA1_1
			c12175f1p01482	SCA2_2
			c77671f1p01433	SCA2_2
			c33021f1p1601	SCA2_2
			SP803280_c96864_g1_i1	SCA3
			SP803280_c102702_g3_i1	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000011168.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000020010.3	SCA4
			SCRFLR1012A11.g	SCA5
SCVPRT2074E11.g	SCA5			
M Y B1 5	ENOG5037JGS	AT3G2325 0	Sh01_t017490	SCA1_2
			Sh_209F19_contig-1_t000010	SCA1_1
			Sh_225H09_t000010	SCA1_1
			Sh_234J04_t000070	SCA1_1
			SUGdenovo-0793007	SCA2_1
			c74140f1p11193	SCA2_2

			c45886f1p01076	SCA2_2
			c714f4p01089	SCA2_2
			c9151f11p11216	SCA2_2
			c99173f1p01120	SCA2_2
			c24555f4p01215	SCA2_2
			c42476f2p01207	SCA2_2
			c67085f2p01201	SCA2_2
			c71466f2p11244	SCA2_2
			c59022f3p01166	SCA2_2
			c61391f1p01043	SCA2_2
			c101236f3p41312	SCA2_2
			c77982f1p01180	SCA2_2
			c115923f3p11253	SCA2_2
			SP803280_c100856_g1_i1	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000033970.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000039883.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000066260.2	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000121645.2	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000143970.1	SCA4
O ST 1	ENOG5037HY W	AT4G3395 0	Sh_218K06_t000170	SCA1_1
			Sh_230I04_t000100	SCA1_1
			SCQGHR1011E10.g	SCA5
			SCRFLR1034G06.g	SCA5
			SCRFLR2034A09.g	SCA5
			SCEZRZ1013F09.g	SCA5
			SCCCLB1003E11.g	SCA5
			SP803280_c93698_g1_i1	SCA3

		evm.model.SCSP803280_000027273	SCA4
		.1	
		evm.model.SCSP803280_000033439	SCA4
		.1	
		SUGdenovo-0513550	SCA2_ 1
		SUGdenovo-0513551	SCA2_ 1
		SUGdenovo-0572446	SCA2_ 1
		SUGdenovo-0681184	SCA2_ 1
		SUGdenovo-0724576	SCA2_ 1
		c48347f1p01277	SCA2_ 2
		c53547f1p01264	SCA2_ 2
		c13686f4p21343	SCA2_ 2
		c20659f1p01279	SCA2_ 2
		c89357f1p01349	SCA2_ 2
		c40211f1p31347	SCA2_ 2
		c55106f1p11363	SCA2_ 2
		c56897f3p11648	SCA2_ 2
		c62356f1p11421	SCA2_ 2
		c61465f1p31807	SCA2_ 2
		c60073f5p01359	SCA2_ 2
		c72522f1p11354	SCA2_ 2
		c76092f1p41456	SCA2_ 2
		c80170f3p21565	SCA2_ 2
		c89361f2p01226	SCA2_ 2

			c82424f1p01348	SCA2_2
			c116879f10p21322	SCA2_2
P H Y B	ENOG50388R9	AT2G18790	Sh_220N09_contig-1_t000050	SCA1_1
			c86916f1p03618	SCA2_2
			c21525f1p0935	SCA2_2
			SP803280_c116871_g1_i3	SCA3
PI F7	ENOG5037NBF	AT5G61270	Sh_230A12_t000040	SCA1_1
			SUGdenovo-0661292	SCA2_1
			SUGdenovo-0661293	SCA2_1
			SUGdenovo-0699525	SCA2_1
			SUGdenovo-0699529	SCA2_1
			SUGdenovo-0699530	SCA2_1
			SUGdenovo-0699532	SCA2_1
			c51163f1p02421	SCA2_2
			c76356f1p02294	SCA2_2
			c19241f1p22170	SCA2_2
			c95334f1p22417	SCA2_2
			c91558f1p22142	SCA2_2
			c36078f1p01472	SCA2_2
			c43568f1p21877	SCA2_2
			c64258f3p21516	SCA2_2
			SP803280_c116009_g3_i1	SCA3
			SP803280_c104881_g1_i3	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000056052.1	SCA4
evm.model.SCSP803280_000065648.1	SCA4			

			evm.model.SCSP803280_000114914.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000122738.1	SCA4
			CA149640.1	SCA5
			CA083411.1	SCA5
R CI 3	ENOG5037JN5	AT1G0526 0	Sh04_t003410	SCA1_ 2
			Sh_025L09_t000100	SCA1_ 1
			c67167f1p11343	SCA2_ 2
			evm.model.SCSP803280_000021024 .4	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000065074.1	SCA4
			CA110999.1	SCA5
SE X1	ENOG5037KS G	AT1G1076 0	Sh_249C19_t000040	SCA1_ 1
			c110542f1p04716	SCA2_ 2
			c112330f1p04658	SCA2_ 2
			c103673f2p04847	SCA2_ 2
			c107799f1p04503	SCA2_ 2
			c103886f1p04415	SCA2_ 2
			c113298f1p04358	SCA2_ 2
			c110222f1p04511	SCA2_ 2
			c108485f1p04740	SCA2_ 2
			c108572f1p04536	SCA2_ 2
SI Z1	ENOG5037MJS	AT5G6041 0	Sh_213F10_t000080	SCA1_ 1
			SUGdenovo-0592363	SCA2_ 1
			SUGdenovo-0666432	SCA2_ 1
			c83961f2p13370	SCA2_ 2
			SP803280_c117872_g1_i1	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000022866.1	SCA4

SR C2	ENOG5037I48	AT1G0907 0	Sh02_t030650	SCA1_ 1
			Sh_207J24_t000060	SCA1_ 1
			Sh_231M02_t000030	SCA1_ 1
			Sh_246H20_t000040	SCA1_ 1
			c63796f1p01311	SCA2_ 2
			c82996f1p01377	SCA2_ 2
			SP803280_c105462_g1_i1	SCA3
			evm.model.SCSP803280_000032093.1	SCA4
			evm.model.SCSP803280_000156369.2	SCA4
			CA069254.1	SCA5
			SCJLST1024C09.g	SCA5