



CALIL GIBRAN IRAIORE CARVALHO

**RESPOSTA MORFOFISIOLÓGICA DE *Setaria viridis* AO
ESTRESSE DE FRIO, E PROSPECÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO FRIO,
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM *Elaeis guineensis***

**LAVRAS - MG
2019**

CALIL GIBRAN IRAIORE CARVALHO

**RESPOSTA MORFOFISIOLÓGICA DE *Setaria viridis* AO ESTRESSE DE FRIO, E
PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO FRIO,
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM *Elaeis guineensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do Título de Mestre.

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
Orientador

Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Carvalho, Calil Gibran Iraiore.

Resposta morfofisiológica de *Setaria viridis* ao estresse de frio, e prospecção e caracterização de genes responsivos ao frio, diferencialmente expressos em *Elaeis guineensis* / Calil Gibran Iraiore Carvalho - 2018.

91 p. : il.

Orientador: Manoel Teixeira Souza Júnior

Coorientador: Carlos Antônio Ferreira de Sousa

Dissertação (Mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. *Setaria viridis*. 2. Planta modelo. 3. Tolerância a frio. 4. Fenômica. 5. Metabolômica. I. Souza Júnior, Manoel Teixeira. II. Sousa, Carlos Antônio Ferreira de. III. Título.

CALIL GIBRAN IRAIORE CARVALHO

**RESPOSTA MORFOFISIOLÓGICA DE *Setaria viridis* AO ESTRESSE DE FRIO, E
PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES RESPONSIVOS AO FRIO,
DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM *Elaeis guineensis***

***Setaria viridis* MORPHO-PHYSIOLOGICAL RESPONSE TO COLD STRESS, AND
PROSPECTION AND CHARACTERIZATION OF COLD RESPONSIVE GENES
DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN *Elaeis guineensis***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do Título de Mestre.

APROVADA em 23 de agosto de 2018.

Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa

Dr. Bruno Galvêas Laviola

EMBRAPA

EMBRAPA

Prof. Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior
Orientador

Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa
Coorientador

**LAVRAS - MG
2019**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e cuidado.

Aos meus pais, Flávia e João, que acreditaram comigo nesta realização.

Aos meus irmãos, Léo, Tata, Caco e Pepe, pelo apoio e incentivo.

Ao meu orientador, Dr. Manoel e Coorientador Dr. Carlos, pela paciência e dedicação.

Ao coordenador do programa, Dr. Luciano e à secretária Rossilvânia pelo esforço e compreensão.

Aos meus amigos de equipe de trabalho pela ajuda nos momentos difíceis, em especial, Letícia, Viviany e Amanda.

Aos analistas do Laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Agroenergia, em especial, André Leão, pelo apoio em momentos de dúvidas e nos procedimentos laboratoriais.

Aos meus amigos adventistas, que me auxiliaram nos momentos de solidão, representados por Bruno Pasold e Andressa Pasold.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade e assistência.

À Embrapa Agroenergia pela estrutura e apoio aos experimentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – pelo apoio financeiro.

Muito Obrigado!

RESUMO GERAL

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*) é uma cultura importante para a estratégia brasileira de diversificação de matérias-primas a serem utilizadas pela indústria de biodiesel. Nesse sentido, a expansão do cultivo, para além da Amazônia Legal, pode, de fato, consolidar sua participação na cadeia produtiva desse biocombustível. No entanto, ao ir para o Sul do Brasil, o dendê, sem dúvida, enfrentará novos desafios, como o estresse pelo frio. Aprender mais sobre as respostas morfofisiológicas, bioquímicas e genéticas a esse estresse abiótico é fundamental no processo de desenvolvimento de genótipos de dendê tolerantes ao frio. Este estudo teve dois objetivos principais: a) realizar uma identificação inicial e uma anotação preliminar dos genes de *E. guineensis* cuja expressão muda significativamente quando esta espécie de planta é submetida ao estresse pelo frio; e b) caracterizar a resposta de dois acessos de *Setaria viridis* (A.10 e AST) ao estresse pelo frio, a fim de verificar se esses acessos poderiam ser utilizados como planta modelo para estudos de validação de genes candidatos à tolerância ao frio. Plantas de setária, nas fases vegetativa e reprodutiva do desenvolvimento, foram submetidas ao estresse pelo frio, tanto de forma gradual (redução de temperatura de 5°C a cada 24h, com temperatura inicial de 25°C) quanto abrupta (redução instantânea de 25°C para 0°C) e mantidas a 0°C por períodos de 3, 5 e 10 dias. Para avaliar a resposta da setária ao estresse pelo frio, dados relacionados às trocas gasosas e à fluorescência da clorofila foram coletados. Também foram coletados dados relacionados à produção de biomassa no final do ciclo de desenvolvimento da planta. Tanto no regime abrupto como no gradual a fotossíntese atingiu zero somente quando a temperatura chegou a 0°C. Observou-se que quanto maior a duração do estresse, mais difícil é a recuperação, independente da forma pela qual a planta foi submetida ao frio. Quanto à produção de biomassa, observou-se que a planta tem melhor recuperação quando o estresse ocorre na fase vegetativa. Os resultados obtidos mostram que *S. viridis* é tolerante ao frio. Portanto os acessos A10.1 e AST desta espécie não se prestam ao uso como planta modelo para a validação de genes candidatos à tolerância ao frio. A plataforma pública baseada na web, para bioinformática Galaxy, foi utilizada para analisar a qualidade e a expressão diferencial de dados de RNA-Seq do óleo de palma submetido ao estresse pelo frio. Um total de 190 transcritos, cuja diferença entre o controle e o estressado é estatisticamente significativa (p -valor > 0,01) e apresenta diferença igual ou superior a oito vezes, foram identificados; 92 sendo com expressão aumentada, quando a planta é submetida ao frio e 98 com expressão reduzida. Os genes do genoma de *E. guineensis* (EG5), aos quais estes transcritos se alinhavam, foram identificados, e suas sequências (mRNA) foram alinhadas (BLASTx) contra o genoma de *S. viridis* disponível no NCBI.

Palavras-chave: Fenômica. Planta modelo. Tolerância a frio. Dendê.

GENERAL ABSTRACT

Palm oil trees (*Elaeis guineensis*) are important crops for the Brazilian strategy of diversification of raw materials to be used by the biodiesel industry. In this sense, the expansion of the cultivation area beyond the Amazon Region can consolidate its participation in the biodiesel production chain. However, as this crop goes South in Brazil, it will undoubtedly face new challenges such as cold stress. Learning more about the morphological, biochemical and genetic responses to this abiotic stress is fundamental in order to develop cold tolerant palm oil genotypes. This study had two main objectives: a) to carry out an initial identification and a preliminary annotation of the *E. guineensis* genes whose expression changes significantly when this species is subjected to cold stress; and b) to characterize the response of two accessions of *Setaria viridis* (A.10 and AST) to cold stress, in order to know if these accessions could be used as model plants for reverse genetics studies aiming the validation of cold tolerant candidate genes. *S. viridis* plants, both in the vegetative and reproductive stages of development, were subjected to cold stress in a gradual (temperature reduction of 5°C every 24h; starting at 25°C) or abrupt (instantaneous reduction from 25 to 0°C) manner, and maintained at 0°C for periods of 3, 5 and 10 days. To evaluate the response of *Setaria* plants to cold stress, data related to gas exchange and chlorophyll fluorescence were collected. Data related to biomass production were also collected at the end of the plant development cycle. In both abrupt and gradual regimes, photosynthesis reached zero only when the temperature reached 0°C. It was observed that the longer the duration of stress, the more difficult the recovery, regardless the way in which the plant was subjected to cold. As for biomass production, the plant had a better recovery when the stress occurred in the vegetative phase. The results showed that *S. viridis* is cold tolerant. Therefore, accessions A10.1 and AST of this species cannot be used as model plants for the validation of candidate genes for cold tolerance. The Galaxy web-based public platform for bioinformatics was used to analyze the quality and differential expression of RNA-Seq data from palm oil trees subjected to cold stress. A total of 190 transcripts, in which the difference in the level of expression between control and the stressed plants was statistically significant (p -value > 0.01), were identified; 92 transcripts were up regulated (eight or more times) when the plant is subjected to cold, and 98 were down regulated (eight or more times). The genes from the *E. guineensis* (EG5) genome to which these transcripts aligned were identified and their sequences (mRNA) were aligned (BLASTx) against the *S. viridis* genome available from the NCBI.

Keywords: Phenomics. Model plant. Cold tolerance. Palm Oil.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1 - Produção de fruto de dendê por país, dados correspondentes aos anos de 1994 a 2014..... 16
- Figura 2 - Norma climatológica do Brasil, média mensal de temperatura..... 16
- Figura 3 - Norma climatológica do Brasil, insolação total..... 17
- Figura 4 - Norma climatológica do Brasil, precipitação acumulada..... 18

CAPÍTULO 2

- Figura 1 - MD-Plot destacando os genes que são significativamente diferentes ($FDR < 0.01$) e que apresentam uma variação no logFC de pelo menos três. Círculos marrons, genes de maior expressão no estressado, em comparação com o controle; e círculos azuis, genes de menor expressão no estressado em comparação com o controle.....48

CAPÍTULO 3

- Figura 1 - Trocas gasosas em folhas de *Setaria viridis* submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual. Foi utilizado o acesso A10.1, na fase vegetativa, para a condição de controle, mantido a 25°C. Os acessos AST na fase reprodutiva (AST-R) e na fase vegetativa (AST-V), com o acesso A10.1.1 na fase vegetativa (A10.1.1-V), foram expostos ao frio gradual com diminuição de 5°C a cada 24h.....70
- Figura 2 - Rendimento quântico do fotossistema II em folhas de *Setaria viridis* submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual. Foi utilizado o acesso A10.1 na fase vegetativa, para a condição de controle, mantido a 25°C. Os acessos AST na fase reprodutiva (AST-R) e na fase vegetativa (AST-V), com o acesso A10.1 na fase vegetativa (A10.1.1-V) e fase reprodutiva (A10.1.1-R), foram expostos ao frio gradual com diminuição de 5°C a cada 24h, começando com 25°C até atingir 0°C.....71
- Figura 3 - Trocas gasosas em folhas de *Setaria viridis* em recuperação, após serem submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual. Os acessos AST na fase reprodutiva (AST-R) e na fase vegetativa (AST-V), com o acesso A10.1.1 na fase vegetativa (A10.1.1-V), foram expostos ao frio gradual com

diminuição de 5°C a cada 24h, começando em 25°C até atingir 0°C. Ao atingir 0°C, foram mantidos nesta temperatura por três dias, retornando a 25°C após este período. Dados coletados em três momentos distintos (0h, 24h e 48h) após o início da recuperação.....72

Figura 4 - Taxa de assimilação de CO₂ em folhas plantas de *Setaria viridis* em recuperação, após terem sido submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual ou abrupta. Foi utilizado o acesso A10.1 na fase reprodutiva para este experimento. O controle foi mantido a 25°C. As plantas foram expostas ao frio de maneira gradual com diminuição de 5°C a cada 24h, começando em 25°C até atingir 0°C. Ao atingir 0°C, foram mantidos nesta temperatura por cinco ou dez dias, retornando a 25°C após este período. Os dados foram coletados a 0h, 24h e 48h, durante a recuperação. As plantas também foram submetidas ao frio de maneira abrupta com exposição instantânea a 0°C, saindo de 25°C. Ao atingir 0°C, também, foram mantidos nesta temperatura, por cinco ou dez dias, retornando a 25°C após este período. Os dados, também, foram coletados em 0h, 24h e 48h, durante a recuperação.....73

Figura 5 - Variáveis derivadas da técnica de fluorescência da clorofila obtidas em folhas de plantas de *Setaria viridis* em recuperação, após terem sido submetidas a estresse de frio aplicado de forma gradual ou abrupta. Ao atingir 0°C, as plantas foram mantidas nesta temperatura por três, cinco ou dez dias, retornando em seguida a 25°C. Os dados de recuperação foram coletados a 0h, 24h e 48h durante a fase de recuperação.74

Figura 6 - Fase Reprodutiva - Estresse Abrupto – Dia 1 (A) e 10 (B e C) do estresse a 0°C. (D) Planta recuperada (no 52º dia do ciclo de desenvolvimento da planta).75

Figura 7 - Fase Reprodutiva - Estresse Gradual – Dia 1 (A) e 10 (B e C) do estresse a 0°C. (D) Planta recuperada (no 52º dia do ciclo de desenvolvimento da planta).76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1 - Localização preliminar dos genes responsivos ao frio nos cromossomos de *Elaeis guineensis*.49
- Tabela 2 - Descrição preliminar dos genes responsivos ao frio de *Elaeis guineensis*.50
- Tabela 3 - Resultado do *Blastx* entre genes diferencialmente expressos sob condição de frio de *Elaeis guineensis* contra banco de proteínas de *Setaria viridis*.50

CAPÍTULO 3

- Tabela 1 - Análise Estatística das Trocas Gasosas, utilizando medidor de trocas gasosas de gases infravermelhos, em material de *Setaria viridis* em estresse gradual de frio. Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.77
- Tabela 2 - Análise Estatística do resultado da fluorescência da clorofila, em folhas de *Setaria viridis*, submetidas a estresse de frio de forma gradual. Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.78
- Tabela 3 - Análise Estatística das Trocas Gasosas, na recuperação de estresse gradual de frio (três dias de estresse a 0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.79
- Tabela 4 - Análise de recuperação a 25°C utilizando medidor de trocas gasosas de gases infravermelhos em folhas de *Setaria viridis* acesso A10.1, na fase reprodutiva, quando submetido a 5 dias de estresse a 0°C. As plantas foram submetidas ao regime gradual em que passaram pela redução de 5°C a cada 24h, a partir de 25°C até atingir 0°C. E, no regime Abrupto, em que foram expostas instantaneamente a 0°C.80
- Tabela 5 - Análise Estatística de fluorescência da clorofila, na recuperação após 5 dias de estresse de frio (0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.181

Tabela 6 - Análise Estatística de Biomassa, na recuperação após 5 dias de estresse de frio (0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1.....	82
Tabela 7 - Análise Estatística de Biomassa, estresse gradual de frio (5 e 10 dias a 0°C) no acesso A10.1 na fase reprodutiva.	83

ANEXO A

Tabela 1 - ANOVA das variáveis que avaliam a fluorescência do fotossistema da planta em estresse de frio.	89
Tabela 2 - ANOVA das variáveis que avaliam a fluorescência do fotossistema da planta em recuperação, após estresse de frio.....	90

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL	13
1	A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO DENDÊ E O SEU POTENCIAL DE USO COMO FONTE DE ÓLEO VEGETAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL	13
1.1	Ecofisiologia do dendê.....	15
1.2	O estresse ao frio.....	18
1.3	Resposta fisiológica das plantas ao estresse de frio	21
1.4	Base genética da tolerância ao frio	22
1.5	Caracterização da resposta do dendê ao estresse de frio.....	24
1.6	Caracterização, validação e prospecção de genes candidatos	25
1.7	<i>Setaria viridis</i> como planta modelo para a validação de genes de tolerância ao frio.....	27
2	CONSIDERAÇÕES FINAIS	29
	REFERÊNCIAS	31
	CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE GENES DE <i>Elaeis guineensis</i> RESPONSIVOS AO ESTRESSE DE FRIO	40
1	INTRODUÇÃO	42
2	MATERIAIS E MÉTODOS	44
2.1	Identificação e seleção de genes diferencialmente expressos em dendê submetido a estresse de frio	44
2.2	Blast dos transcritos diferencialmente expressos contra o WGS de <i>Elaeis guineensis</i> e de <i>Setaria viridis</i> , e coleta de sequências (nucleotídeos e proteínas) dos genes e anotação preliminar de genes diferencialmente expressos em dendê submetido ao estresse de frio	45
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1	Análise de qualidade das sequências para estudo de expressão diferencial	46
3.2	Estudo da expressão diferencial	46
3.3	Anotação preliminar de genes diferencialmente expressos em dendê submetido a estresse de frio	48
4	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS	52
	CAPÍTULO 3 <i>Setaria viridis</i> COMO POTENCIAL PLANTA-MODELO PARA A VALIDAÇÃO DE GENES DE TOLERÂNCIA AO FRIO	55
1	INTRODUÇÃO	57
2	MATERIAIS E MÉTODOS	59
2.1	Material vegetal	59
2.2	Quebra de dormência e germinação das sementes.....	59
2.3	Capacidade de campo e teor de umidade do substrato.....	60
2.4	Aplicação do estresse de frio.....	60
2.5	Estresse gradual.....	60
2.6	Estresse abrupto	61
2.7	Duração do estresse	61
2.8	Recuperação.....	61
2.9	Biomassa.....	61
2.10	Luz	61
2.11	Caracterização da resposta das plantas ao estresse de frio	61
2.12	Análise estatística	62

2.12.1	Experimento 1	62
2.12.2	Experimento 2	63
2.12.3	Experimento 3	63
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1	Efeito do estresse de frio sobre os parâmetros de trocas gasosas	64
3.2	Efeito do estresse de frio sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila.....	66
3.3	Recuperação das plantas submetidas ao estresse de frio.....	67
3.4	Efeito do estresse de frio sobre a biomassa aérea e radicular das plantas de Setaria.....	68
4	CONCLUSÃO	84
	REFERÊNCIAS	85
	ANEXO A - Tabelas	89

CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO GERAL

1 A IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DO DENDÊ E O SEU POTENCIAL DE USO COMO FONTE DE ÓLEO VEGETAL PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL NO BRASIL

O dendê (*Elaeis guineensis*) é uma oleaginosa de origem africana. Junto com a espécie americana, *Elaeis oleifera*, compõe o rol de espécies deste gênero que pertence à tribo *Cocoseae*, da subfamília *Arecoideae*, que é uma das cinco subfamílias da família *Arecaceae* (HAI, 2016). No Brasil, *E. oleifera* é comumente conhecida como caiaué e sua distribuição se estende pela Floresta Amazônica e pela América Central.

O dendê tem sido explorado comercialmente no mundo como uma importante fonte de óleo vegetal. Na safra 2017/2018, o mundo consumiu 70,13 milhões de toneladas de óleo de dendê. Esse montante corresponde a 37% de todo o óleo vegetal consumido mundialmente. Esses números colocam a soja em segunda posição, na listagem mundial, com 56,0 milhões de toneladas de óleo (STATISTICS..., 2018).

No Brasil, a produção do fruto de dendê é incipiente, ocupando a 13ª posição no ranking mundial; no que se refere à produtividade (frutos de dendê por hectare) está classificado no 23º lugar. Ocupando o topo da lista estão a Indonésia, Malásia e Nigéria com as maiores áreas produtoras. O Brasil está listado na 15ª posição mundial com uma área colhida de 142.000 hectares (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT, 2017).

A cadeia produtiva do óleo de palma atende, principalmente, a indústria alimentícia. No entanto, nos últimos anos, aplicações alternativas têm sido desenvolvidas pelo setor farmacêutico e produção de biocombustíveis, principalmente, o biodiesel (GAMA; REYNOL, 2011; MATTEI, 2010; SANTANA et al., 2013).

A produtividade do dendê pode atingir até cinco toneladas de óleo de polpa por hectare/ano e até 0,4 toneladas de óleo de palmiste (KALTNER et al., 2004; MÜLLER; FURLAN JÚNIOR; CELESTINO FILHO, 2006). Quando comparada com outras oleaginosas, o dendê é a espécie mais produtiva, visto que excede, em dez vezes, a produtividade da soja, que atualmente consiste na principal fonte de óleo vegetal para a produção de biodiesel no Brasil (SOUZA JÚNIOR et al., 2017a).

Além de apresentar uma produtividade de óleo bastante superior ao da soja (MURPHY, 2003), o processo produtivo do óleo de dendê apresenta um balanço energético

positivo de, aproximadamente, 5,6 unidades, valor quatro vezes superior ao da soja (MACEDO; NOGUEIRA, 2005). Ademais as características observadas no biodiesel produzido se assemelham muito ao diesel convencional (FEROLDI; CREMONEZ; ESTEVAM, 2014). Deste modo, é eminente a potencialidade do dendezeiro em subsidiar matéria-prima para atender a demanda de óleo vegetal na produção de biodiesel em grande escala.

A fabricação de biodiesel consiste no processo químico de transesterificação etílica por meio de um catalisador alcalino (RAMOS et al., 2011). A matéria-prima mais utilizada no Brasil vem da cadeia produtiva da soja, que, no ano de 2017, respondeu por 71% do biodiesel produzido no Brasil, seguido da gordura animal com 16% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS - ABIOVE, 2017). Esses dados refletem a grande fragilidade deste setor no que tange a fontes de matéria-prima. Esta reduzida gama de fontes de matéria-prima também contribui para a não inclusão de algumas regiões do país da cadeia de produção deste biocombustível (MIRANDA; MOURA, 2003).

Mais de 90% da produção nacional de dendê vem do Estado do Pará (BENTES; HOMMA, 2016), evidenciando problemas adicionais para a inserção desta cultura no rol de matérias-primas, para o biodiesel no Brasil, haja vista que não existe nenhuma planta de produção de biodiesel autorizada para funcionar neste Estado (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP, 2017). Embora o zoneamento agroecológico da palma de óleo preconiza a utilização de áreas desmatadas da Amazônia e indica que 42% das terras com potencialidade de exploração desta cultura no Brasil se encontram no Estado do Pará (RAMALHO FILHO, 2010), vale salientar que ali também se concentram os maiores índices de conflito fatal na disputa por terra em todo o Brasil (ALMEIDA; VIEIRA, 2014; LOUREIRO; PINTO, 2005; OLIVEIRA, 2001), além de estar geograficamente distante dos principais centros de comercialização e refinaria (ANP, 2017).

Diante do exposto, a descentralização do cultivo de dendê, no Brasil, resultaria em grande benefício, no que se refere à logística, por aproximar o fornecedor desta matéria-prima da indústria de produção de biodiesel; à economia, pela redução nos gastos de transporte de matéria-prima; ao meio ambiente, pois haveria menor risco de expansão da lavoura sobre a área preservada da floresta amazônica. Como primeiras alternativas à Região Norte, para o cultivo do dendê, têm-se as Regiões Nordeste e Centro-Oeste. A Embrapa tem avaliado o desempenho agrônômico do dendê, em diferentes campos experimentais, localizados na

Região Centro-Oeste, no Bioma Cerrado, com resultados bastante positivos (GAMA; REYNOL, 2011).

Verifica-se que essa região possui solos planos e profundos, permitindo a mecanização agrícola e fertilização, fazendo dela uma região expressiva em produtividade agrícola, não raramente reconhecida como o celeiro do Brasil. No entanto importante salientar que alguns aspectos intrínsecos a essa região impõem obstáculos ao cultivo do dendê, entre eles, a ocorrência de temperaturas consideradas baixas para o pleno desenvolvimento desta espécie.

No processo de expansão agrícola do dendê, para além da Amazônia legal, a temperatura pode ser um dos principais fatores limitantes, uma vez que algumas regiões brasileiras podem atingir mínimas de 3 a 6°C (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET, 2017). As Regiões Centro-Oeste, Sudeste e Sul são teoricamente inadequadas, para o cultivo do dendê, por atingirem temperaturas suficientemente baixas, para interromper o crescimento e abortar flores (CARVALHO, 2000). Deste modo, com a finalidade de expandir as áreas de plantio de dendê para além da Região Norte, é necessário o desenvolvimento de genótipos tolerantes ao frio.

1.1 Ecofisiologia do dendê

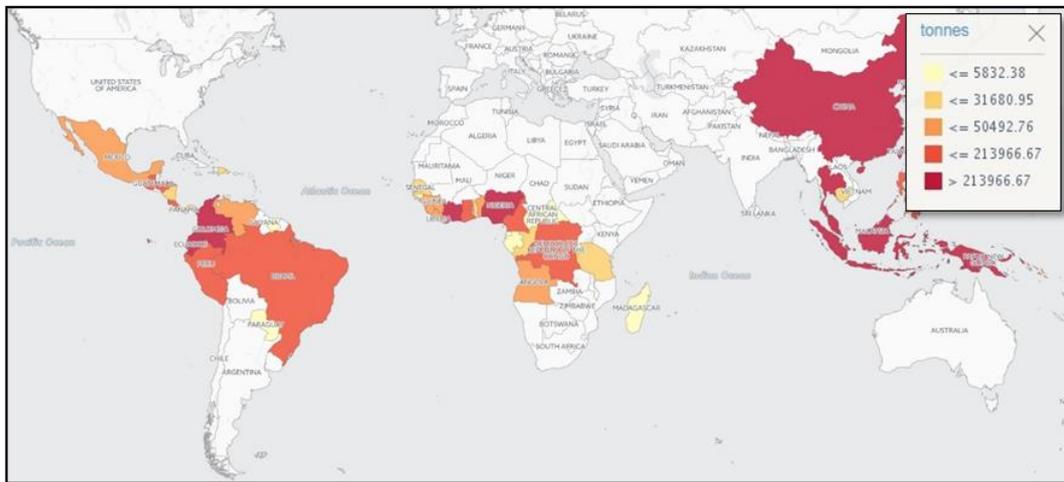
As condições ótimas de crescimento e desenvolvimento do dendê compreendem temperaturas médias que variam de 22°C de mínima a 33°C de máxima. Além disso, são necessárias 5 horas de insolação por dia, durante todo o ano e precipitação de 2000 mm, bem distribuídos anualmente e sem ocorrência de estação seca (CARVALHO, 2000).

Fatores que limitam as condições ditas ótimas, para o cultivo do dendê, não impedem sua exploração comercial; no entanto, em condições abaixo da ótima, observa-se queda de rendimento e elevação de custos (MÜLLER, 1980). O dendezeiro vem sendo cultivado na faixa intertropical do globo terrestre, em áreas que fornecem os recursos naturais que mais se aproximam às condições ótimas de cultivo. Encontram-se, nesta zona geográfica, os países que detêm maior produção de dendê, como Malásia, Indonésia, Nigéria e Tailândia, entre outros (FIGURA 1).

Uma vez que a zona intertropical é cortada ao meio pela linha do equador e limitada pelos trópicos de Câncer, no hemisfério Norte e Capricórnio no hemisfério Sul, aproximadamente, 81,4% do território brasileiro encontram-se nesta região do globo, que é classificada como de clima tropical. Ficam de fora apenas os Estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e parte do Paraná (ALVARES et al., 2014).

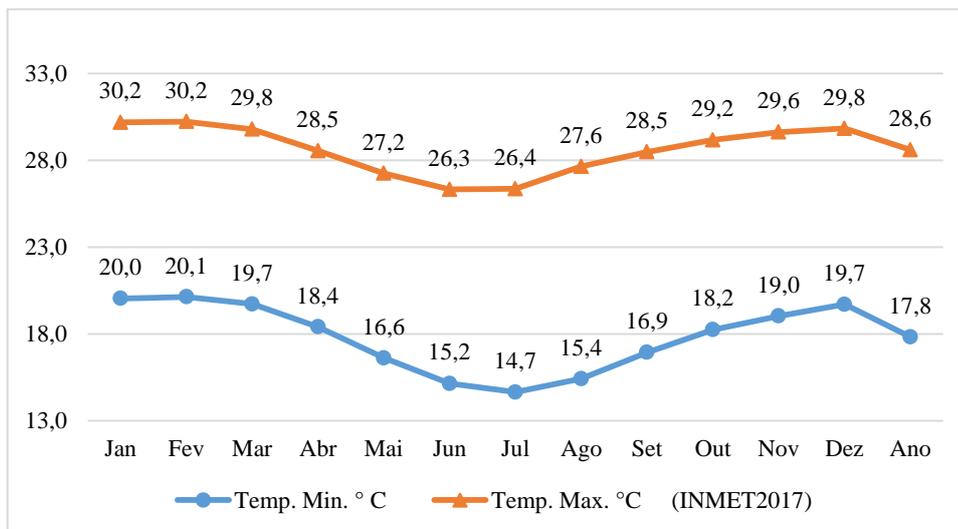
Segundo a normal climatológica do Brasil, as temperaturas médias nacionais mensais registradas são de 14,7°C, mínima e de 30,2°C, máxima (FIGURA 2). Considerando apenas estes dados e observando que a exposição prolongada abaixo de 17°C estaciona o crescimento vegetativo do dendê (CARVALHO, 2000), as condições brasileiras seriam, a priori, inadequadas para o seu cultivo, pois os meses de maio até setembro podem registrar mínimas fora do ideal, se forem consideradas as médias nacionais.

Figura 1 - Produção de fruto de dendê por país, dados correspondentes aos anos de 1994 a 2014.



Fonte: Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAOSTAT (2014).

Figura 2 - Norma climatológica do Brasil, média mensal de temperatura.



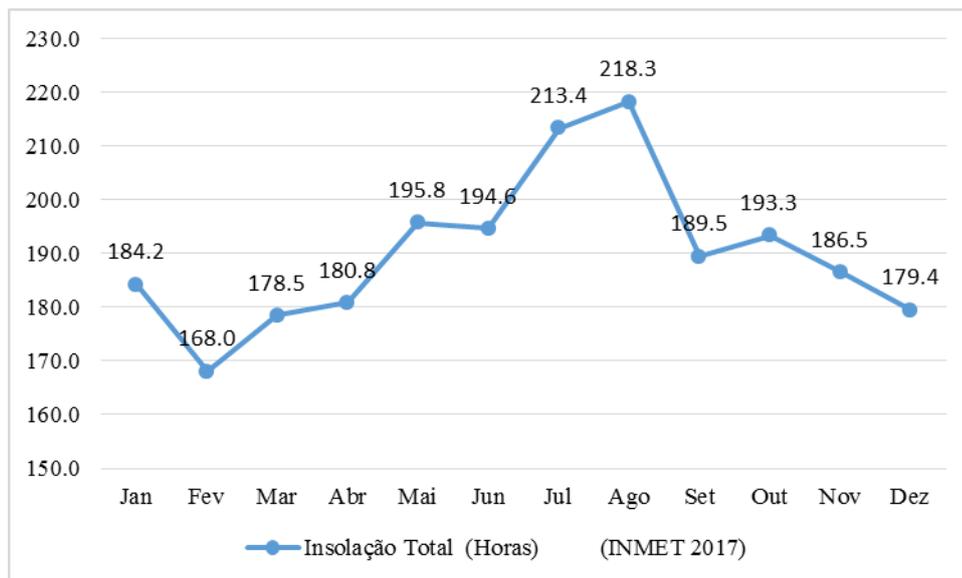
Fonte: INMET (2017).

Referindo-se à insolação, são necessárias, pelo menos, 150 horas/mês, ao longo do ano, como condição ideal (SOUZA, 2000). No Brasil, o mês com menor valor de insolação

total é fevereiro, que registra 168 horas (FIGURA 3), mais que o suficiente para o desenvolvimento do dendê. Com respeito à precipitação, a condição ideal seria a ausência de estação seca e o registro de, no máximo, três meses com níveis inferiores a 100 mm (CARVALHO, 2000). Por esta razão, o dendê pode encontrar dificuldades, nos meses de junho, julho, agosto e setembro, uma vez que o volume de chuva está abaixo do mínimo (FIGURA 4).

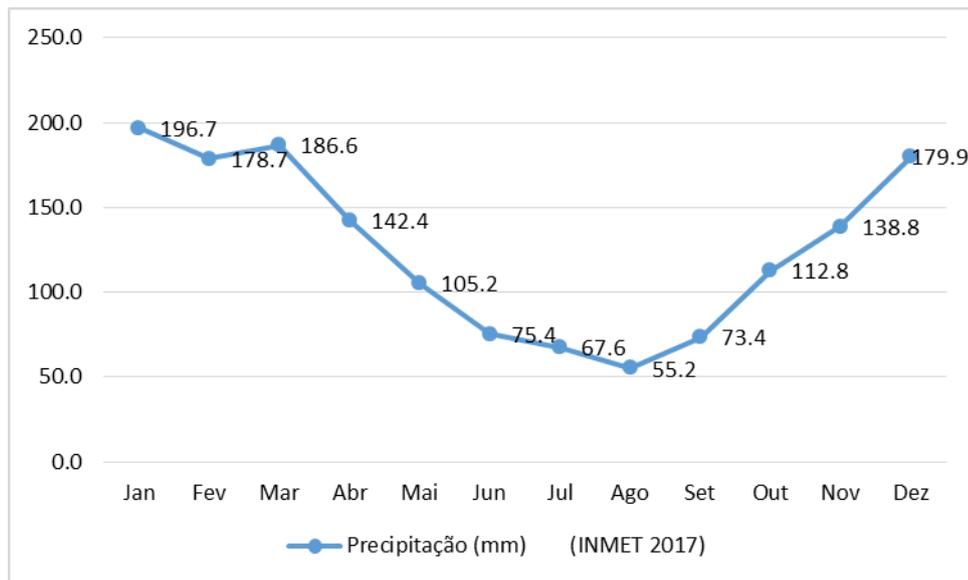
Importante salientar que as condições meteorológicas no Brasil são variadas por diferenças de relevo, massas de ar, fisionomia geográfica e extensão, podendo ser encontrado, pela classificação de Köppen, 12 subtipos de climas, que podem ser agrupados dentro de clima tropical, semiárido e subtropical (ALVARES et al., 2014). Deste modo, determinadas regiões seriam mais propícias ao cultivo do dendê, ao passo que, para outras, faz-se necessária a aplicação de tecnologia capaz de tornar o ambiente mais adequado.

Figura 3 - Norma climatológica do Brasil, insolação total.



Fonte: INMET (2017).

Figura 4 - Norma climatológica do Brasil, precipitação acumulada.



Fonte: INMET (2017).

1.2 O estresse ao frio

As plantas não dispõem sempre de condições ideais, para o seu desenvolvimento e crescimento, sendo expostas, durante o seu ciclo de vida, a alguns tipos de estresses abióticos, como seca, salinidade e temperatura. Sob a condição de estresse abiótico prolongado, a produção agrícola fica comprometida e, conseqüentemente, a segurança alimentar e, também, o fornecimento de matéria-prima para os diferentes processos industriais. Vale assinalar que os recursos disponíveis, para o uso da planta, são essenciais para a sua sobrevivência e, por essa razão, determinantes quanto à sua distribuição no globo terrestre (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011; ZHU, 2016).

Quando os recursos utilizados pelas plantas têm disponibilidade alterada, ocasionam o estresse abiótico, que se acentua com as mudanças climáticas que tomam proporções maiores, confirmando cada vez mais uma condição de clima extremo. Neste contexto, a temperatura tem sofrido muitas alterações e, por conseguinte, influência direta no desenvolvimento dos vegetais (FEDOROFF et al., 2010). A temperatura está diretamente ligada com as fases fenológicas dos vegetais, de modo que a superação dessas fases ocorre somente, em condição adequada de temperatura, que, por sua vez, é específica para cada planta (BERGAMASCHI, 2007).

Quanto à temperatura ideal para o desenvolvimento, estima-se que, ao longo do ciclo de vida vegetal, haja um acúmulo de energia fornecida, na forma de calor, que não se altera,

denominada soma térmica. E essa quantidade de calor diariamente acumulada é denominada graus dia. Assim, quando o vegetal não acumula calor suficiente, são observados sintomas do estresse (BERGAMASCHI, 2007; GADIOLI et al., 2000). Em baixa temperatura, a falta de calor atinge diretamente a taxa de crescimento, pois, nesta condição, são observados estímulos que desencadeiam diversos processos fisiológicos e bioquímicos, alterando o metabolismo vegetal, o que pode ocasionar perdas qualitativas e quantitativas (FRITSCHÉ-NETO; BORÉM, 2011).

O estresse de frio pode ser dividido de duas maneiras, estresse de resfriamento que corresponde a temperaturas abaixo de 20°C e estresse de congelamento com temperatura abaixo de 0°C (SANGHERA et al., 2011). De maneira semelhante às plantas, também, podem ser divididas em três grupos distintos quanto à resposta ao estresse de frio. Um grupo é formado por plantas que podem ter a tolerância induzida, pelo processo de aclimação, quando elas são expostas a temperaturas não congelantes (0-20°C). Esse grupo é composto por plantas de clima temperado e denominadas aclimatadas ao frio e são tolerantes a temperaturas de congelamento. O segundo grupo não tem tolerância induzida e, quando são expostas a temperaturas acima de 0°C, não sofrem danos e injúrias. Este grupo é formado por plantas denominadas tolerantes ao resfriamento. O terceiro e último grupo é formado por vegetais que apresentam injúrias, quando expostas a baixas temperaturas, são denominadas sensíveis ao resfriamento (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007; GUY, 1990; YADAV, 2010).

A depender do nível de tolerância da planta e da intensidade do estresse, sintomas variados podem ser observados e ocasionar até mesmo a morte (HUFFMAN, 2013). Inicialmente, quando submetida a baixas temperaturas, é observada uma redução no metabolismo da planta dificultando a absorção de água (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007). Nesta condição de estresse prolongado, observa-se uma redução na taxa de crescimento e injúrias nos tecidos à medida que se intensifica o frio.

Em plantas herbáceas, as folhas e o hipocótilo são os órgãos fortemente atingidos. Sintomas de murcha, encharcamento e necrose são os mais frequentes (BERGAMIN FILHO; KIMATI; AMORIN, 1995; LUKATKIN et al., 2012). Em plantas perenes, os sintomas mais comuns são a morte dos brotos, danos na raiz, rachaduras e queimadura na casca e no tronco, escurecimento interno dos frutos, morte das flores e botões florais. Plantas tropicais ou subtropicais são sensíveis e os danos podem levá-las à morte (HUFFMAN, 2013).

Algumas variedades de tomate adaptadas ao clima temperado sofrem estresse de resfriamento nas temperaturas de 0 a 10°C. Durante a floração, o estresse prejudica a polinização e provoca má formação dos frutos. Temperaturas baixas no solo prejudicam o

crescimento radicular e da planta. Nas folhas, os sintomas são de murcha, necrose, aumento da suscetibilidade a doenças. Para essas variedades, a temperatura ótima de crescimento varia de 18,5 a 26,5°C (LeBOEUF, 2004).

Muito embora o nível de tolerância seja importante, para a resposta da planta ao estresse de frio, outros fatores também influenciam. Plantas saudáveis possuem mais habilidade, para estabelecer um rearranjo fisiológico, quando submetidas ao estresse. Plantas que passaram por podas recente, estresse hídrico, excesso de adubação ou irrigação podem sofrer danos quando expostas a baixas temperaturas. A duração do frio, em que a fase fenológica da planta ocorreu, o quão rápido a temperatura caiu e/ou subiu, quão severo foi o frio, também, varia a tolerância das plantas ao estresse. Mesmo plantas de clima temperado podem sofrer estresse de resfriamento a depender das condições em que ele ocorreu (HUFFMAN, 2013).

O estresse de resfriamento provoca uma desorganização nas estruturas celulares (KRATSCH; WISE, 2000). O efeito no citoplasma mais severo do frio consiste no rompimento da membrana plasmática, ocasionando o extravasamento de eletrólitos, a recuperação, neste caso, é irreversível (CAMPOS et al., 2003; MINCHIN; SIMOM, 1973). O vazamento de eletrólitos aumenta, conforme se intensifica o frio, quanto mais rigoroso o estresse, mais intenso é esse sintoma (LIU et al., 2013). Neste sentido, a compartimentalização da célula também sofre danos irreversíveis, causados pela exposição prolongada ao estresse de resfriamento (GUTIERREZ et al., 1992).

São observadas alterações nas estruturas e metabolismo das organelas sob a condição de baixa temperatura. Após a exposição ao frio, causou, no retículo endoplasmático, a sua destruição (MARANGONI et al., 1990), alterações nas membranas do complexo de Golgi (YOSHIDA; MATSUURA; ETANI, 1989), alteração na composição das membranas e redução das cristas nas mitocôndrias como alteração em seu metabolismo (SANTIS; LANDI; GENCHI, 1999; YIN et al., 2009). Os cloroplastos são a organela com danos mais visíveis, os sintomas observados são o inchaço, distorção dos tilacoides, redução no tamanho e no número de grânulos de amido (KRATSCH; WISE, 2000). Além disso, é observada uma redução da taxa de divisão celular e conseqüente há redução na taxa de crescimento dos tecidos e órgãos (BEN-HAJ-SALAH; TARDIEU, 1995). O sistema radicular e as folhas são afetados, sendo observada uma diminuição das raízes em condição de temperatura baixa (BEN-HAJ-SALAH; TARDIEU, 1995; CUTFORTH; SHAYKEWICH; CHO, 1986).

1.3 Resposta fisiológica das plantas ao estresse de frio

O frio ocasiona alterações fisiológicas nos tecidos vegetais. A absorção de água pelas raízes é totalmente prejudicada. A depender da intensidade do estresse, a planta pode ser conduzida para um estado de murcha permanente. Neste sentido, dois aspectos são considerados para esta condição, a dificuldade em fechar os estômatos e uma redução na condutância hidráulica das raízes (BLOOM et al., 2004; BOLGER; UPCHURCH; McMICHAEL, 1992).

As baixas temperaturas limitam fortemente a absorção de potássio e de cálcio levemente (DREW; BIDDULPH, 1971). Também é observada a queda na absorção dos ânions sulfato e fosfato (HOLOBRAD; MISTRICK; KOLEK, 1981). A permeabilidade de outros íons ainda é reduzida, em parte, por redução do potencial de membrana e diminuindo a força motriz limitando a disponibilidade de ATP. Vale afirmar que, com a redução da temperatura, as proteínas têm sua estrutura alterada, reduzindo sua atividade, uma vez que o transporte ativo se dá por complexo enzimático e a translocação de íons sofre uma drástica queda (CLARKSON et al., 1988). Além disso, a fixação de nitrogênio oriunda das associações das plantas com rizobactérias, formando nódulos nas raízes, também é prejudicada (ZHANG et al., 1996).

A respiração celular entra em declínio com a diminuição da temperatura (LAWRENCE; HOLADAY, 2000). Juntamente com a queda na redução da respiração são observados queda no conteúdo de ubiquinona e quociente respiratório elevado (MUNRO et al., 2004). Um grupo de enzimas são inibidas, como o citocromo c oxidase, catalase e peroxidase e ATPase. Esta redução da atividade enzimática reduz também a formação de ATP e acúmulo de espécies reativas, causando danos oxidativos às mitocôndrias (PRASAD; ANDERSON; STEWART, 1994).

A queda na capacidade fotorredutora dos cloroplastos inibe o processo de fotossíntese em baixa temperatura (SMILLIE; NOTT, 1979). As temperaturas baixas ocasionam danos às membranas dos cloroplastos, sendo observado o desacoplamento dos tilacoides, afetando a estrutura do complexo de reação do fotossistema (STRAUSS et al., 2007; YORDANOV, 1992). A redução na taxa fotossintética está relacionada também com uma redução nas atividades das enzimas do ciclo de Calvin. Proteínas sensíveis à queda de temperatura têm sua funcionalidade perdida, comprometendo o processo bioquímico da fotossíntese (MARUYAMA; YATOMI; NAKAMURA, 1990). Além disso, são observados possíveis danos no fotossistema II, redução no conteúdo da clorofila, falha no deslocamento de água e

alteração na abertura estomacal, são outros fatores que contribuem para a redução da fotossíntese (BLOOM et al., 2004; BOLGER; UPCHURCH; McMICHAEL, 1992; McMAHON; PERTUIT JÚNIOR; ARNOLD, 1994).

O perfil da tradução de proteínas, em condição de frio, é alterado, com aumento em níveis de proteínas responsivas ao frio e degradação de outras. Proteínas envolvidas no processo fotossintético são fragmentadas, como, por exemplo, a Rubisco. E, em outros casos, há sua tradução reduzida (MERCADO et al., 1997; YAN et al., 2006), em contraponto verifica-se um aumento no nível de aminoácidos livres como a prolina. Este aminoácido está relacionado com a resposta fisiológica ao frio sendo observado em maior quantidade em espécies tolerantes. Sendo um aminoácido protetor, contribui para a redução das injúrias que são observadas após a exposição a baixas temperaturas (SIEBENEICHLER et al., 2000). Outro exemplo é a betaína, que confere tolerância ao frio até mesmo com tratamento exógeno (CHEN; LI; CHEN, 2000). *Arabidopsis* transformada com gene *codA*, ligado à síntese de betaína, resultou em mutantes com crescimento acelerado em condições de 10 e 15°C, além de sementes tolerantes a 0°C (ALIA et al., 1998).

1.4 Base genética da tolerância ao frio

Diversos estudos descritos na literatura científica têm buscado maior compreensão da base genética da tolerância ao frio, no entanto assevera-se que o conjunto de mudanças, em resposta ao frio que ocorre dentro da célula, é algo complexo. Embora a estratégia destes estudos foque, no entendimento do papel ou de um único gene ou de um grupo pequeno de genes, pontua-se que um elevado número de genes está, de fato, envolvido na tolerância ao frio (HANNAH; HEYER; HINCHA, 2005).

Os primeiros efeitos da exposição dos vegetais a baixas temperaturas resultam na alteração da fluidez da membrana e rearranjos do citoesqueleto (ALONSO; QUEIROZ; MAGALHÃES, 1997; ÖRVAR et al., 2000; SANGWAN et al., 2001). Tendo em vista que os vegetais não possuem uma estrutura ainda identificada capaz de sinalizar as baixas temperaturas, a mudança na rigidez da membrana consiste no mecanismo inicial de sinalização (MIURA; FURUMOTO, 2013). A composição da membrana plasmática influencia sua fluidez. Plantas sensíveis ao frio possuem ácidos graxos saturados compondo a membrana, assim, pequenas mudanças na temperatura são suficientes para mudar sua fluidez. Por outro lado, plantas de clima temperado possuem ácidos graxos insaturados em suas membranas, permitindo a fluidez, mesmo em temperaturas baixas não congelantes

(KODAMA et al., 1995). Vale salientar que a queda na temperatura pode alterar a composição da membrana pelo processo de aclimação nas plantas tolerantes (CRUZ et al., 2009).

Ressalta-se que a tolerância ao frio nas plantas está associada às alterações bioquímicas, de modo que são observados rearranjos do transcrito. A sinalização é uma dessas alterações, ela é capaz de estimular uma resposta à mudança de temperatura, portanto, quando detectado, o estresse é transduzido (MIURA; FURUMOTO, 2013). Outras interações bioquímicas, a fim de reajustar as mudanças do ambiente, consistem no acúmulo de açúcares solúvel e desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (EINSET; WINGE; BONES, 2007). Desta forma, mesmo sob baixas temperaturas, o vegetal consegue crescer e se desenvolver.

A capacidade de desenvolvimento e crescimento dos vegetais em baixas temperaturas está associada ao controle de múltiplos QTLs. COLD1, COLD2, COLD3, COLD4, COLD5 são exemplos de QTLs que interagem entre si e que podem contribuir, significativamente, para a tolerância ao frio. COLD1 sozinho pode contribuir com 7,23% para a tolerância ao frio. As proteínas codificadas por ele, em posição estratégica na membrana plasmática, estão associadas ao influxo de Ca^{2+} Intracelular, o qual é um importante sinalizador de resposta ao frio, capaz de provocar uma cascata de resposta bioquímica (KNIGHT et al., 1991; MA et al., 2015), incluindo a indução gênica de fatores de transcrição *C-repeat Binding Factor* CBF (SANGWAN et al., 2002).

Dentre as vias de sinalização para o frio, a via dependente de CBF/DREB1 é a mais conhecida, por ser a via principal em resposta a baixas temperaturas, conferindo tolerância ao frio nos vegetais (GILMOUR et al., 1998; MIURA; FURUMOTO, 2013). Estes fatores de transcrição podem se ligar a cis elementos de genes COR, responsáveis por conferir tolerância ao frio (MARUYAMA et al., 2004; SANGWAN et al., 2001). A família CBF/DREB e outros grupos de fatores de transcrição e genes COR são regulados por outro grupo de genes denominado *Induced of ICE1*. Este fato sugere que ICE1 seja considerado, de modo geral, o mais importante regulador de expressão gênica em célula vegetal sob condição de estresse de frio (CHINNUSAMY, et al., 2003; MIURA; FURUMOTO, 2013).

Uma via de sinalização alternativa pode ser estabelecida, tendo como ponto de partida espécies reativas de oxigênio e fosfato de inositol, estimulando o influxo de Ca^{2+} desencadeando uma cascata de sinalização até atingir a expressão de genes COR, como já mencionado (XIONG; SCHUMAKER; ZHU, 2002). Genes que conferem tolerância ao frio traduzem proteínas crioprotetoras, que podem também desencadear uma segunda via de sinalização, dessa vez, ativando a síntese de ácido abscísico (ABA), etileno e ácido salicílico

(SA), auxina, ácido giberélico (GA), deste modo, uma segunda rodada de sinalização é iniciada, retomando todo o processo supracitado (XIONG et al., 2001).

1.5 Caracterização da resposta do dendê ao estresse de frio

Programas de melhoramento genético têm dedicado esforço à adaptação do dendê em condição de temperatura baixa. Nessa ótica, genótipos de *Elaeis* têm alcançado resultados positivos em áreas mais altas e mais frias da África. Apesar disso, o dendê é uma espécie tropical e seu crescimento ótimo normalmente ocorre em ambientes quentes e húmidos, portanto considerado uma planta sensível ao frio (CHAPMAN; ESCOBAR; GRIFFEE, 2003; MURUGESAN et al., 2017). E os sintomas mais significativos em plantas adultas são os efeitos na emissão foliar e redução de cachos (BARCELOS et al., 1987).

Por ser classificada como uma planta sensível ao frio, visto que, quando submetida a baixas temperaturas, é observado um aumento na permeabilidade da membrana; a taxa de crescimento é reduzida e ocorre injúrias nas folhas (CAO et al., 2011). Por outro lado, é observado aumento nos níveis de açúcares solúveis, como a prolina e malondialdeído (MDA) e as enzimas superóxido dismutase SOD e peroxidase POD sob baixas temperaturas (10°C). Prolina e MDA são crioprotetoras e SOD e POD agem evitando danos oxidativos, desempenham importante papel em resposta ao estresse abiótico (ALIGHARS et al., 2008; MISRAA; GUPTA, 2006; SIEBENEICHLER et al., 2000). Os níveis de SOD e POD aumentam com a intensidade do frio, no entanto caem, à medida que o estresse se prolonga. Este comportamento sugere que mudas de dendê dispõem de mecanismos capazes de tolerar as temperaturas até certo ponto de intensidade de frio (7 dias a 10°C) e, posteriormente, são incapazes de evitar as progressivas lesões que se tornam irreversíveis (CAO et al., 2011).

No que se refere aos parâmetros fisiológicos do dendê, quando submetido ao frio, constata-se uma queda em quase todos os parâmetros. Quando mudas de dendê são submetidas a temperaturas não congelantes, a assimilação líquida de CO₂, condutância estomática, transpiração e concentração interna de CO₂ reduzem suas taxas significativamente. No entanto a eficiência no uso da água tem seus valores elevados, sob a mesma condição. No que se refere à avaliação do comportamento da clorofila por fluorescência em condição de frio, há uma redução na eficiência fotoquímica máxima e um aumento gradual da fluorescência inicial. A não dissipação de energia no fotossistema II evidencia danos severos aos aparatos fotossintéticos (HUAGENG; WEIFU, 2009).

O mesocarpo do fruto do dendê pode ter sua constituição lipídica alterada por ativação de algumas lipases. Quando expostos a 5°C, observa-se um aumento significativo no teor de ácidos graxos livres, ao passo que o óleo contido na castanha permanece inalterado (SAMBANTHAMURTHI et al., 1991). Essa característica está relacionada com o genótipo, *Elaeis oleifera*, apresenta menor atividade dessas enzimas, quando comparado ao *Elaeis guineensis* (SAMBANTHAMURTHI; RAJANAIDU; PARMAN, 2000).

Quanto à genética molecular, já foram identificados no dendê genes responsáveis por conferir tolerância ao frio. Utilizando técnica de sequenciamento pela plataforma *Illumina*, transcritos foram submetidos à análise diferencial de expressão e foram encontrados marcadores SSR polimórficos. Esta análise, somada à comparação de transcrito, permitiu identificar ortólogos de ICE1; cinco ortólogos putativos de CBF; e 19 fatores de transcrição *Recognition Sequence NAC* (XIAO et al., 2014).

Esta descoberta sugere que o dendê possui um mecanismo latente de tolerância ao frio. Ferramentas de bioinformática, para a montagem de um transcrito de referência, também, foram aplicadas em análise de RNAseq no dendê. Com base nessa análise, já foram descritos 51.452 transcritos dos quais 2665 estão exclusivamente relacionados ao estresse de frio. A anotação desses transcritos identificou 3934 (14,1%) *up-regulated* e 742 (2,6%) *down-regulated*. Foram identificados também diferentes grupos de fatores de transcrição dentre os quais o CBF foi o mais proeminente. Todavia mutações, nos promotores de gene COR, responsável pela produção de proteínas crioprotetoras, impedem sua regulação pelos fatores de transcrição CBF. Deste modo, a expressão desses genes que confere tolerância a frio não é expressa no dendê (LEI et al, 2014).

1.6 Caracterização, validação e prospecção de genes candidatos

Com o avanço das técnicas de sequenciamento, o volume de dados gerados estimulou as análises em biologia computacional. Graças a esse desenvolvimento tecnológico, informações biológicas relevantes são extraídas por meio de sofisticados algoritmos. Desenvolvidos nas diferentes linguagens de programação, os algoritmos são capazes de analisar *big data* tornando possível a montagem de genomas inteiros (OZSOLAK; MILOS, 2011).

Muitas das informações geradas por essas ferramentas de sequenciamento avançadas são originárias da técnica de RNASeq. Uma das vantagens, na adoção dessa estratégia, é que ela não requer conhecimento genômico prévio. Isto é possível por meio de análise

computacional manipulada pela técnica de montagem *de novo*. Os transcritos gerados são altamente informativos, tendo em vista que sua expressão está associada às condições ambientais (COSTA, 2011).

A expressão desses transcritos pode passar por uma avaliação quantitativa. Deste modo, são identificados os transcritos que foram mais expressos (*up-regulated*) em detrimento dos menos expressos (*down-regulated*). Esta avaliação é denominada análise diferencial de expressão gênica.

Esta avaliação pode ser sintetizada e proposta em uma “pipeline” dividida nas fases de: mapeamento, em que são posicionados os diferentes *reads*, em um genoma ou transcrito de referência (*software* Bowtie); sumarização, etapa em que são formados os transcritos, em que os *reads* são transformados em informações biológicas (*software* Tophat); normalização, momento em que é feita uma comparação de nível das amostras (*software* RPKM); e expressão diferencial, em que são reveladas as diferenças entre as expressões (*up-regulated e down-regulated*) levando em consideração a condição experimental (*software* DEseq) (OSHLACK; ROBINSON; YOUNG, 2010).

A expressão dos transcritos pode passar também por uma análise qualitativa. Nesta análise, a caracterização da funcionalidade de cada transcrito gerado revela sua importância biológica. A este procedimento denomina-se anotação. A comparação é uma maneira de anotar os transcritos, a qual é uma forma auxiliar na descoberta do papel que cada objeto envolvido no genoma desempenha. A comparação dos objetos elucida a semelhança entre elas e, por conseguinte, sua funcionalidade também (HUANG et al., 2007; VIANA, 2006).

No processo de comparar os genomas, pode-se obter o índice de similaridade que indica o quanto as amostras são semelhantes. Neste procedimento, uma amostra deve estar posicionada sobre a outra, perfazendo um alinhamento. A ferramenta comumente utilizada é o BLAST que consiste em um algoritmo de busca, em banco de dados, para a similaridade de sequência (ALTSCHUL et al., 1997). O alinhamento pode ser feito com múltiplas amostras (CHENNA et al., 2003).

Neste processo, há possibilidade de se conhecer genes que estão associados a uma condição ambiental, mas que nunca foram descritos. Deste modo, estabelece-se a prospecção de genes, que consiste em uma modalidade de extrair novas informações biológicas dentro das análises qualitativas e quantitativas de transcritos oriundos de RNAseq. A partir daí, há uma grande possibilidade de utilização de ferramentas biotecnológicas capazes de caracterizar esses genes prospectados, porém desconhecidos (LEI et al., 2014).

A aplicação de ferramentas ômicas (genômica, fenômica, metabolômica, dentre outras), na geração de conhecimento tecnológico e de produtos concernentes à cadeia produtiva do dendê, tem sido realidade na Embrapa Agroenergia desde 2010. Ferramentas ômicas são utilizadas dentro do “Programa de PD&I em Ômica de Palma de Óleo (*Elaeis* spp.), na Embrapa Agroenergia” (SOUZA JÚNIOR et al., 2017b), que é um dos “braços” de PD&I na Embrapa conectado com o Programa de Produção e Uso Sustentável da Palma de Óleo do Governo Federal.

As estratégias de pesquisa do programa de PD&I, em ômica de palma de óleo da Embrapa, focam em estresse abiótico e biótico que limitam, ou podem limitar, a produção de dendê no Brasil. Neste contexto, o projeto visa aplicar diferentes ferramentas de ômicas, com a finalidade de descoberta e validação de genes, promotores, marcadores moleculares e características de interesse para a dendeicultura brasileira.

Uma etapa relevante neste processo consiste na validação desses genes candidatos. Neste sentido, a tecnologia de DNA recombinante assume um importante papel na elucidação da função de genes não caracterizados. Para tal, a utilização de um organismo modelo é essencial, para realizar a prova de conceito, mediante a geração de plantas geneticamente modificadas, expressando o gene ou o promotor candidato, seguida da fenotipagem do indivíduo transformado para caracterizar a função atrelada ao gene candidato (LATA; PRASAD, 2012).

1.7 *Setaria viridis* como planta modelo para a validação de genes de tolerância ao frio

A *Setaria viridis* é uma planta que pertence à família *Poaceae* e subfamília *Panicoideae*. É uma planta monocotiledônea e tem sido utilizada como planta modelo para a validação de função de genes (LATA et al., 2011). O interesse na *Setaria viridis* advém da necessidade de se ter uma planta modelo que se aproxime fisiologicamente de espécies vegetais com metabolismo C4, utilizadas na produção de bioenergia, como, por exemplo, a cana de açúcar (*Saccharum officinale*), o milho (*Zea mays*) e o sorgo (*Sorghum vulgare*), tendo em vista que as plantas comumente utilizadas para esse fim como *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* são de metabolismo C3 (DIAO et al., 2014).

Como toda planta modelo, a *Setaria viridis* reúne características relevantes como tamanho pequeno, 10-15 cm, quando adulta; um ciclo de vida curto entre 6-9 semanas dependendo das condições de fotoperíodo; elevada produção de sementes, aproximadamente, 13.000 por planta; autopolinização; genoma pequeno. Além disso, pode ser transformada por

Agrobacterium (BRUTNELL et al., 2010). Ademais, a espécie tem o genoma sequenciado e anotado (LATA et al., 2013) com aplicação em estudos em genômica comparativa (BRUTNELL et al., 2010; DOUST et al., 2009).

A *Setaria viridis* também tem sido utilizada em pesquisa de estresse abiótico. Sua ampla ocorrência geográfica sugere que a espécie tenha alta variabilidade genética, estudos de tolerância ao estresse abiótico, como seca, sal e frio têm sido reportados na literatura (LI; BRUTNELL, 2011; MARTINS et al., 2016; SANTOS et al., 2017). Estudos recentes têm demonstrado resultados positivos na caracterização e validação de genes de referência para estresse abiótico em *Setaria viridis* (KUMAR; MUTHAMILARASAN; PRASAD, 2013; MARTINS et al., 2016). Em *Setaria italica*, a validação do gene ASM permite sua utilização em estudos, para tolerância ao estresse abiótico, levando em consideração a via metabólica que tenha a participação de DREB (LATA; PRASAD, 2012).

Nota-se que os fatores de transcrição desempenham importante papel na expressão de genes que conferem tolerância ao frio. Em setária, são relatados os genes SiASR4, SiARDP, SiAP2 / ERF-069, SiAP2 / ERF-103 e SiAP2 / ERF-120, envolvidos na via de expressão responsiva ao estresse abiótico (LATA et al., 2014; LI et al., 2014, 2017). Fatores de transcrição CBF/DREB e também ICE1 estão presentes no genoma de setária participando das vias de sinalização de estresse abiótico (LATA et al., 2011).

A *Setaria viridis* é uma planta com potencial uso para estudos em estresse abiótico, as compreensões das respostas fisiológicas ao frio podem ser caracterizadas e exploradas em estratégias de pesquisa diante dos desafios do estresse a baixas temperaturas. Para isso, impera a determinação da tolerância da planta a esse estresse. Somada às análises de expressão diferencial, fatores fisiológicos também são utilizados na caracterização da tolerância dos vegetais (LI; BRUTNELL, 2011).

Esforços têm sido dedicados, para a melhor compreensão às respostas fisiológicas, quando submetidas ao estresse abiótico. Deste modo, estratégias utilizando ferramentas biotecnológicas são mais bem traçadas para a prospecção e a validação de genes utilizando essa planta (MARTINS et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

2 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O dendê é uma importante cultura com diversas aplicações para a indústria alimentícia, sendo consumido em todo o mundo. Nos últimos anos, esta espécie tem chamado a atenção como planta com grande potencial para fornecer matéria-prima para a produção de biocombustíveis, em especial, o biodiesel. No Brasil, foi criado, em 2010, o Programa de Produção e Uso Sustentável da Palma de Óleo. Este programa visa tanto promover o desenvolvimento da dendeicultura brasileira, na Região Norte do Brasil, principal produtora de dendê no País, quanto fortalecer iniciativas visando expandir esta cadeia produtiva para outras regiões do país.

No processo visando expandir o cultivo do dendê, para além da Amazônia Legal, é necessário considerar o frio como fator limitante na produção em nível comercial desta espécie. As condições de clima ideal, para o cultivo do dendê, são encontradas na zona intertropical. Por essa razão, o seu crescimento é estagnado quando exposto a temperaturas abaixo de 18°C. A necessidade de um genótipo de dendê adaptado ao frio impera diante da necessidade de expandir as fronteiras agrícolas de seu cultivo para as regiões Centro-Oeste e Sudeste do Brasil.

A expansão agrícola do dendê torna possível a ampliação e diversificação da matriz energética de fonte renovável, com incremento na produção de óleo vegetal para que reflita na produção de biodiesel. Além disso, mitiga os efeitos nocivos ao meio ambiente e reduz a pressão do desmatamento sobre áreas de preservação.

Para tornar realidade essas possibilidades e vantagens proporcionadas pela expansão agrícola do dendê, é preciso promover a seleção e/ou desenvolvimento de genótipos tolerantes ao frio e de excelente desempenho agrônômico. O desenvolvimento de novos genótipos pode ocorrer, mediante emprego de estratégia de melhoramento dito “convencional”, ou por melhoramento dito “biotecnológico”. Neste sentido, um importante passo nesta estratégia visando ao desenvolvimento destes genótipos com a ajuda da biotecnologia é a prospecção e validação de genes responsivos ao frio, candidatos a conferir tolerância e este estresse abiótico.

Verifica-se que o dendê é uma planta tropical e sua exposição ao frio diminui sua produtividade. Plantas como o dendê, não tolerantes ao frio, sofrem injúrias em temperaturas não congelantes, assim chamadas de estresse de resfriamento. Este tipo de estresse compreende uma faixa de temperatura de 20°C até 0°C. Nesta faixa de temperatura,

alterações fisiológicas são observadas a depender do nível de tolerância de cada planta, podendo ser letal para espécies sensíveis.

A mudança fisiológica provocada pelo frio é influenciada por alterações nas expressões gênicas das células vegetais. O estresse causado pelas baixas temperaturas pode provocar injúrias e danos irreversíveis aos tecidos das plantas. Identificar, caracterizar e validar genes que conferem tolerância aos efeitos nocivos do frio é essencial para a compreensão do estresse e estabelecimento estratégico para o melhoramento genético.

Ferramentas de bioinformática são essenciais no processo de prospecção de genes *in silico*, principalmente, com o advento de novas técnicas de sequenciamento genético gerando grandes volumes de dados. A técnica de RNASeq reúne essas diferentes áreas de processamento, as técnicas de sequenciamento e as ferramentas de bioinformática para análises dos dados.

É importante dizer que a técnica de RNASeq torna a estratégia de prospectar genes mais assertiva e rápida, permitindo a possibilidade de caracterizar genes que foram expressos em determinada condição ambiental que ainda não foram estudados. Neste contexto, além das ferramentas de bioinformática para estudo *in silico* de genes desconhecidos à validação desses promotores, é outra etapa relevante.

Para a validação de genes, usualmente, as plantas-modelo assumem um papel importante, pois elas possuem características que possibilitam e facilitam o trabalho de validação. Neste sentido, a *Setaria viridis* é uma planta que contempla as principais características para uma planta-modelo. É uma planta monocotilédone tal qual o dendê, a cana de açúcar, o milho e o sorgo, de genoma conhecido, de elevada produção de sementes e de porte pequeno na fase reprodutiva. No entanto os estudos de tolerância ao frio que envolvem esta espécie são escassos na literatura, havendo necessidade de melhor compreensão das respostas morfofisiológicas em condição de temperaturas baixas.

Diante do exposto, o estudo relatado, nesta dissertação de Mestrado, objetivou: a) prospectar e caracterizar preliminarmente genes responsivos ao frio no genoma de *Elaeis guineensis*, mediante emprego de ferramentas de bioinformática, para analisar dados públicos de RNASeq, oriundos de estudo que buscou avaliar a resposta do dendê ao estresse de frio (Capítulo 2 desta dissertação); e b) caracterizar em detalhes as respostas morfofisiológicas de dois acessos de *Setaria viridis* (A10.1 e AST) ao estresse de frio, mediante emprego de ferramentas de fenômica (Capítulo 3 desta dissertação).

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>>. Acesso em: 2 nov. 2017.
- ALIA, A. et al. Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 21, n. 2, p. 232-239, Feb. 1998.
- ALIGHARS, M. et al. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 6, p. 588-599, Apr. 2008.
- ALMEIDA, A. S. de; VIEIRA, I. C. G. Conflitos no uso da terra em Áreas de Preservação Permanente em um polo de produção de biodiesel no Estado do Pará. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 9, n. 3, p. 476-487, jul./set. 2014.
- ALONSO, A.; QUEIROZ, C. S.; MAGALHÃES, A. C. Chilling stress leads to increased cell membrane rigidity in roots of coffee (*Coffea arabica* L.) seedlings. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1323, n. 1, p. 75-84, Jan. 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, Sept. 1997.
- ALVARES, C. A. et al. Köppen's climate classification map for Brazil. **Meteorologische Zeitschrift**, Berlin, v. 22, n. 6, p. 711-728, Dec. 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE ÓLEOS VEGETAIS - ABIOVE. **Conselho**. São Paulo: ABIOVE, 2017. Disponível em: <<http://www.abiove.org.br/site/index.php?page=conselho&area=My0xLTI=>>>. Acesso em: 18 set. 2017.
- BARCELOS, E. et al. **Dendê: informações básicas para o seu cultivo**. Brasília; Embrapa, 1987. 40 p.
- BEN-HAJ-SALAH, H.; TARDIEU, F. Temperature affects expansion rate of maize leaves without change in spatial distribution of cell length (Analysis of the coordination between cell division and cell expansion). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 109, n. 3, p. 861-870, Nov. 1995.
- BENTES, E. dos S.; HOMMA, A. K. O. **Importação e exportação de óleo e palmiste de dendezeiro no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 34 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 101).
- BERGAMASCHI, H. O clima como fator determinante da fenologia das plantas. In: REGO, C. M.; NEGRELLE, R. R. B.; MORELATTO, L. P. C. (Ed.). **Fenologia: ferramenta para conservação, melhoramento e manejo de recursos vegetais arbóreos**. São Paulo: Colombo, 2007. p. 291-310.

BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. (Ed.). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, 919 p.

BLOOM, A. J. et al. Water relations under root chilling in a sensitive and tolerant. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 27, n. 8, p. 971–979, Aug. 2004.

BOLGER, T. P.; UPCHURCH, D. R.; McMICHAEL, B. L. Temperature effects on cotton root hydraulic. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 32, n. 1, p. 49-54, Jan. 1992.

BRUTNELL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C4. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537–2544, Aug. 2010.

CAMPOS, P. S. et al. Electrolyte leakage and lipid degradation account for cold sensitivity in leaves of *Coffea* sp. plants. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 160, n. 3, p. 283-292, Mar. 2003.

CAO, H.-X. et al. Effects of low temperature and drought on the physiological and growth changes in oil palm seedlings. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 14, p. 2630-2637, Apr. 2011.

CARVALHO, C. J. R. de. Ecofisiologia do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: VIÉGAS, I. de J. M.; MÜLLER, A. A. (Ed.). **A cultura do dendezeiro na Amazônia brasileira**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. p. 89-124.

CHAPMAN, K. R.; ESCOBAR, R.; GRIFFEE, P. Cold tolerant or altitude adapted oil palm hybrid development initiatives in the Asia/Pacific Region. **Assumption University of Journal and Technology**, Sydney, v. 6, n. 3, p. 134-138, Jan. 2003.

CHENNA, R. et al. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research**, London, v. 31, n. 13, p. 3497-3500, July 2003.

CHEN, W. P.; LI, P. H.; CHEN, T. H. H. Glycinebetaine increases chilling tolerance and reduces chilling-induced lipid peroxidation in *Zea mays* L. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 23, n. 6, p. 609-618, June 2000.

CHINNUSAMY, V. et al. A regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. **Genes & Development**, New York, v. 17, n. 8, p. 1043-1054, Apr. 2003.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Cold stress regulation of gene. **Trends in Plant Science**, Kidlington, v. 12, n. 10, p. 444-451, Oct. 2007.

CLARKSON, D. T. et al. Temperature dependent factors influencing nutrient uptake: an analysis of responses at different levels of organization. **Symposium of Society for Experimental Biology**, Cambridge, v. 42, p. 281-309, 1988.

COSTA, A. M. Prospecção gênica e bioinformática. In: FALEIRO, G. F.; ANDRADE, S. R. M. de; REIS JÚNIOR, F. B. dos. **Bioteχνologia: estado da arte e aplicações na agropecuária**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2011. cap. 4, p. 121-142.

CRUZ, R. P. D. et al. Alterações na composição de ácidos graxos pela temperatura baixa na fase vegetativa em genótipos de arroz. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO, 6., 2009, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Sosbai, 2009. p. 1-4.

CUTFORTH, H. W.; SHAYKEWICH, C. F.; CHO, C. M. Effect of soil water and temperature on corn (*Zea mays* L.) root growth during emergence. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 66, n. 1, p. 51-58, 1986.

DIAO, X. et al. Initiation of *Setaria* as a model plant. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, Beijing, v. 1, n. 1, p. 16-20, 2014.

DOUST, A. N. et al. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. **Plant Physiology**, Lancaster, v 149, n. 1, p. 137–141, Jan. 2009.

DREW, M. C.; BIDDULPH, O. Effect of metabolic inhibitors and temperature on uptake and translocation of ⁴⁵Ca and ⁴²K by intact bean plants'. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 48, p. 426-432, 1971.

EINSET, J.; WINGE, P.; BONES, A. ROS signaling pathways in chilling stress. **Plant Signaling & Behavior**, Georgetown, v. 2, n. 5, p. 365–367, Sept./Oct. 2007.

FEDOROFF, N. V. et al. Radically rethinking agriculture for the 21st century. **Science**, New York, v. 327, n. 5967, p. 833-834, Feb. 2010.

FEROLDI, M.; CREMONEZ, P. A.; ESTEVAM, A. Dendê: do cultivo da palma à produção de biodiesel. **Revista Monografias Ambientais**, Santa Maria, v. 13, n. 5, p. 3800-3808, dez. 2014.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAOSTAT. **Countries by commodity**. Rome: FAOSTAT, 2014. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity>. Acesso em: 20 out. 2017.

FRITSCHÉ-NETO, R.; BORÉM, A. **Melhoramento de plantas para condições de estresse abiótico**. Viçosa: Ed. UFV, 2011. 250 p.

GADIOLI, J. L. et al. Temperatura do ar, rendimento de grãos de milho e caracterização fenológica associada à soma calórica. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 57, n. 3, p. 377-383, jul./set. 2000.

GAMA, L. C.; REYNOL, F. O dendê do cerrado. **Agroenergia em Revista**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 22-23, jul. 2011.

GILMOUR, S. J. et al. Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. **The Plant Journal**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 433-432, Nov. 1998.

GUTIERREZ, M. et al. Ultrastructural changes in cherimoya fruit injured by chilling. **Food Structure**, Chicago, v. 11, n. 4, p. 323-332, 1992.

GUY, C. L. Cold acclimation and freezing stress tolerance: role of protein metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 41, p. 187-223, June 1990.

HAI, H. D. Family arecaceae palm family. **The Worldwid Fruits**, Vietnam, Aug. 2016. Disponivel em: <<http://www.worldwidefruits.com/familyarecaceae.html>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

HANNAH, M. A.; HEYER, A. G.; HINCHA, D. K. A global survey of gene regulation during cold acclimation in arabidopsis thaliana. **Plos Genetics**, San Francisco, v. 1, n. 2, p. e26, Aug. 2005.

HOLOBRAD, M.; MISTRİK, I.; KOLEK, J. The effect of temperature on the uptake and loss of anions by seedling roots of *Zea mays* L. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 23, n. 4, p. 241-248, July 1981.

HUAGENG, Y.; WEIFU, L. The effect of low temperature stress on photosynthesis and chlorophyll fluorescence characteristics in oil palm seedlings. **Chinese Agricultural Science Bulletin**, Beijing, 2009.

HUANG, D. W. et al. Bioinformatics resources: expanded annotation database and novel algorithms to better extract biology from large gene lists. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 169-175, July 2007.

HUFFMAN, L. The effects of winter on tree fruit. **Omafra**, Guelph, Feb. 2013. Disponivel em: <http://www.omafra.gov.on.ca/english/crops/hort/news/tenderfr/tf1703_a2.htm>. Acesso em: 11 jul. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA - INMET. **Normas climatológicas do Brasil**. Brasília: INMET, 2017. Disponivel em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>>. Acesso em: 11 jul. 2018.

KALTNER, F. J. et al. **Viabilidade técnica e econômica de produção de ésteres de óleo de palma, para utilização como substituto de óleo diesel, na Amazônia**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. 54 p.

KNIGHT, M. R. et al. Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. **Nature**, London, v. 352, n. 6335, p. 524-526, Aug. 1991.

KODAMA, H. et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 107, n. 4, p. 1177-1185, Apr. 1995.

KRATSCH, H. A.; WISE, R. R. The ultrastructure of chilling stress. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 23, n. 4, p. 337-350, Apr. 2000.

- KUMAR, K.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 13–22, Oct. 2013.
- LATA, C. et al. Association of an SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stress tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 10, p. 3387-3401, June 2011.
- _____. Genome-wide investigation and expression profiling of AP2/ERF Transcription factor superfamily in foxtail millet (*Setaria italica* L.). **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-14, Nov. 2014.
- _____. *Setaria* genome sequencing: an overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 22, n. 3, p. 257–260, July 2013.
- LATA, C.; PRASAD, M. Validation of an allele-specific marker associated with dehydration stress tolerance in a core set of foxtail millet accessions. **Plant Breeding**, Berlin, v. 132, n. 5, p. 496-499, Oct. 2012.
- LAWRENCE, C.; HOLADAY, A. S. Effects of mild night chilling on respiration of expanding cotton leaves. **Plant Science**, Limerick, v. 157, n. 2, p. 233-244, Aug. 2000.
- LeBOEUF, J. The effect of extreme temperatures on the tomato and pepper crop. **Omafra**, Guelph, June 2004. Disponível em: <http://www.omafr.gov.on.ca/english/crops/facts/info_tomtemp.htm>. Acesso em: 11 Julho 2018.
- LEI, X. et al. RNA-seq analysis of oil palm under cold stress reveals a different C-repeat binding factor (CBF) mediated gene expression pattern in *elaeis guineensis* compared to other species. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. e114482, Dec. 2014.
- LI, C. et al. An ABA-responsive DRE-binding protein gene from *Setaria italica*, SiARDP, the target gene of SiAREB, plays a critical role under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 18, p. 5415-5427, Oct. 2014.
- LI, J. et al. SiASR4, the target gene of SiARDP from *Setaria italica*, improves abiotic stress adaption in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 2053, Jan. 2017.
- LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3031–3037, May 2011.
- LIU, W. et al. The low temperature induced physiological responses of *avena nuda* L., a Cold-Tolerant plant species. **The Scientific World Journal**, Boynton Beach, v. 2013, p. 1-7, June 2013.
- LOUREIRO, V. R.; PINTO, J. N. A. A questão fundiária na Amazônia. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 19, n. 54, p. 77-98, maio/ago. 2005.

- LUKATKIN, A. S. et al. Chilling injury in chilling-sensitive plants: a review. **Zemdirbyste Agriculture**, Akademija, v. 99, n. 2, p. 111-124, 2012.
- MA, Y. et al. COLD1 confers chilling tolerance in rice. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 6, p. 1209-1221, Mar. 2015.
- MACEDO, I. C.; NOGUEIRA, L. A. H. **Biocombustíveis**. Brasília: Núcleo de Assuntos Estratégicos da Presidência da República, 2005. v. 1, 233 p.
- MARANGONI, A. G. et al. Physical and biochemical changes in the microsomal membranes of tomato fruit associated with acclimation to chilling. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 135, n. 6, p. 653-661, Feb. 1990.
- MARTINS, P. K. et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-10, June 2016.
- MARUYAMA, K. et al. Identification of cold-inducible downstream genes of the Arabidopsis DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. **The Plant Journal**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 982-993, June 2004.
- MARUYAMA, S.; YATOMI, M.; NAKAMURA, Y. Response of rice leaves to low temperature I. Changes in basic biochemical parameters. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 31, n. 3, p. 303-309, Jan. 1990.
- MATTEI, L. Programa Nacional para Produção e uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 41, n. 4, p. 731-740, out./dez. 2010.
- McMAHON, M. J.; PERTUIT JÚNIOR, A. J.; ARNOLD, J. E. Effects of chilling on episcia and dieffenbachia dieffenbachia. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Alexandria, v. 119, n. 1, p. 80-83, 1994.
- MERCADO, J. A. et al. Metabolic changes and susceptibility to chilling stress in capsicum annum plants grown at suboptimal temperature. **Australian Journal of Plant Physiology**, Victoria, v. 24, p. 759-767, Jan. 1997.
- MINCHIN, A.; SIMOM, E. W. Chilling injury in cucumber leaves in relation to temperature. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 1231-1235, Dec. 1973.
- MIRANDA, R. de M.; MOURA, R. D. Óleo de dendê, alternativa ao óleo diesel como combustível para geradores de energia em comunidades da Amazônia. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 3., 2003, Campinas. **Anais...** Campinas: Unicamp, 2003.
- MISRAA, N.; GUPTA, A. K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 1, p. 11-18, Jan. 2006.
- MIURA, K.; FURUMOTO, T. Cold signaling and cold response in plants. **International Journal of Molecular Science**, Basel, v. 14, n. 3, p. 5312-5337, Mar. 2013.

- MÜLLER, A. A. **A cultura do dendê**. Belém: Embrapa, 1980. 24 p.
- MÜLLER, A. A.; FURLAN JÚNIOR, J.; CELESTINO FILHO, P. **A Embrapa Amazônia Oriental e o agronegócio do dendê no Pará**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 67 p.
- MUNRO, K. D. et al. Low temperature effects on ubiquinone content, respiration rates and lipid peroxidation levels of etiolated seedlings of two differentially chilling-sensitive species. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 121, n. 3, p. 488-497, July 2004.
- MURPHY, D. J. Working to improve the oil palm crop. **Inform**, Silver Spring, v. 14, n. 11, p. 670-671, Nov. 2003.
- MURUGESAN, P. et al. Oil palm (*Elaeis guineensis*) genetic resources for abiotic stress tolerance: a review. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, New Delhi, v. 171, n. 875, p. 12-17, Apr. 2017.
- OLIVEIRA, A. U. D. A longa marcha do campesinato brasileiro: movimentos sociais, conflitos e Reforma Agrária. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 15, n. 43, p. 185-206, set./dez. 2001.
- ÖRVAR, B. L. et al. Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin. **The Plant Journal**, Oxford, v. 23, n. 6, p. 785-794, Sept. 2000.
- OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, London, v. 11, n. 12, p. 220, 2010.
- OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews. Genetics**, London, v. 12, n. 2, p. 87-98, Feb. 2011.
- PRASAD, T. K.; ANDERSON, M. D.; STEWART, C. R. Acclimation, hydrogen peroxide, and abscisic acid protect mitochondria against irreversible chilling injury in maize seedlings. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 105, n. 2, p. 619-627, June 1994.
- RAMALHO FILHO, A. **Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.
- RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de produção de biodiesel. **Revista Virtual Química**, Niterói, v. 3, n. 5, p. 385-405, out. 2011.
- SAMBANTHAMURTHI, R. et al. Chilling-induced lipid hydrolysis in the oil palm (*Elaeis guineensis*) mesocarp. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 42, n. 9, p. 1199-1205, Sept. 1991.
- SAMBANTHAMURTHI, R.; RAJANAIDU, N.; PARMAN, S. H. Screening for lipase activity in the oil palm. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 28, n. 6, p. 769-770, Dec. 2000.
- SANGHERA, G. S. et al. Engineering cold stress tolerance in crop plants. **Current Genomics**, Hilversum, v. 12, n. 1, p. 30-43, 2011.

SANGWAN, V. et al. Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. **The Plant Journal**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 1-12, July 2001.

_____. Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. **The Plant Journal**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 629-638, Sept. 2002.

SANTANA, M. C. C. B. de et al. Dendê e seu potencial de uso: uma prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 6, n. 4, p. 516-525, 2013.

SANTIS, A. de; LANDI, P.; GENCHI, G. Changes of mitochondrial properties in maize seedlings associated with selection for germination at low temperature. Fatty acid composition, cytochrome c oxidase, and adenine nucleotide translocase activities. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 119, n. 2, p. 743-754, Feb. 1999.

SANTOS, M. L. et al. CAN *Setaria viridis* (A 10.1) be used as model plant for validation of genes for salinity tolerance? In: SÍMPOSIO BRASILEIRO DE SALINIDADE, 3., 2017, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Inovagri, 2017. p. 1-8.

SIEBENEICHLER, S. C. et al. Efeitos da baixa temperatura no crescimento e nos teores de açúcares solúveis e de prolina em dois cultivares de feijão. **Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 273, p. 495-509, 2000.

SMILLIE, R. M.; NOTT, R. Assay of chilling injury in wild and domestic tomatoes based on photosystem activity of the chilled leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 63, n. 5, p. 796-801, May 1979.

SOUZA, J. de. Dendê. **Ceplac Notícias**, Brasília, out. 2000. Disponível em: <<http://www.ceplac.gov.br/radar/dende.htm>>. Acesso em: 14 mar. 2018.

SOUZA JÚNIOR, M. T. et al. **Biodiesel e bioquerosene: o papel da Embrapa Agroenergia**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2017a. 34 p. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 21).

_____. **O Programa de PD&I em Ômica de Palma de Óleo (*Elaeis spp.*) na Embrapa Agroenergia**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2017b. 41 p.

STATISTICS and studies from more than 22,500 sources. **The Statistics Portal**, [S.l.], 2018. Disponível em: <<https://www.statista.com/chartoftheday/>>. Acesso em: 14 Agosto 2018.

STRAUSS, A. J. et al. The role of low soil temperature in the inhibit ion of growth and PSII function during dark chilling in soybean genotypes of contrasting tolerance. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 131, n. 1, p. 89-105, Sept. 2007.

VIANA, C. J. M. **Aspectos de genômica comparativa**. 2006. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Computacional) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2006.

- XIAO, Y. et al. Exploiting transcriptome data for the development and characterization of gene-based SSR markers related to cold tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis*). **BMC Plant Biology**, London, v. 14, p. 384, Dec. 2014.
- XIONG, L. et al. The arabidopsis LOS5/ABA3 locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. **The Plant Cell**, Rockville, v. 13, n. 9, p. 2063-2083, Sept. 2001.
- XIONG, L.; SCHUMAKER, K. S.; ZHU, J.-K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, p. 165-183, 2002. Supplement.
- YADAV, S. K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, Paris, v. 30, n. 3, p. 516-527, Sept. 2010.
- YAN, S. P. et al. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. **Molecular & Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 5, n. 3, p. 484-496, Mar. 2006.
- YIN, G. et al. Mitochondrial damage in the soybean seed axis during imbibition at chilling temperatures. **Plant and Cell Physiology**, Kyoto, v. 50, n. 7, p. 1305-1318, July 2009.
- YORDANOV, I. Response of photosynthetic apparatus to temperature stress and molecular mechanisms of its adaptations. **Photosynthetica**, Prague, v. 26, p. 517-531, Jan. 1992.
- YOSHIDA, S.; MATSUURA, C.; ETANI, S. Impairment of tonoplast H⁺-ATPase as an initial physiological response of cells to chilling in mung bean (*Vigna radiata* [L.] Wilczek). **Plant Physiology**, Lancaster, v. 89, n. 2, p. 634-642, Feb. 1989.
- ZHANG, F. et al. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] Nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperatures. **Annals of Botany**, London, v. 77, n. 5, p. 453-460, May 1996.
- ZHU, J. K. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, Cambridge, v. 167, n. 2, p. 313-324, Oct. 2016.

CAPÍTULO 2 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO PRELIMINAR DE GENES DE *Elaeis guineensis* RESPONSIVOS AO ESTRESSE DE FRIO

RESUMO

A palma de óleo (*Elaeis guineensis*) é uma cultura importante para a estratégia brasileira de diversificação de matérias-primas a serem utilizadas pela indústria de biodiesel. Nesse sentido, a expansão do cultivo para além da Amazônia Legal pode contribuir para, de fato, consolidar sua participação na cadeia produtiva desse biocombustível. No entanto, ao ir para o Sul do Brasil, o dendê sem dúvida enfrentará novos desafios, como o estresse pelo frio. Aprender mais sobre as respostas morfofisiológicas, bioquímicas e genéticas a esse estresse abiótico é fundamental ao processo de desenvolvimento de genótipos de dendê tolerantes ao frio, seja por melhoramento convencional ou por melhoramento baseado no desenvolvimento de plantas geneticamente modificadas. Este estudo teve o objetivo de identificar e anotar, preliminarmente, genes de *Elaeis guineensis* cuja expressão aumenta ou diminui significativamente, quando esta espécie vegetal é submetida ao estresse de frio. A web-based plataforma pública de bioinformática Galaxy foi utilizada para a análise de dados de RNASeq de dendê. A análise de expressão diferencial de genes, comparando plantas mantidas em temperatura ambiente com plantas submetidas ao estresse de frio, revelou um total de 190 transcritos cuja diferença de expressão é estatisticamente significativa (p-Value > 0.01). Destes, 92 aumentaram e 98 reduziram em oito ou mais vezes a expressão, quando a planta foi submetida ao frio. Os genes do genoma de *E. guineensis* (EG5), aos quais estes transcritos se alinhavam, foram identificados e suas sequências (mRNA) foram alinhadas (BLASTx) contra o genoma de *S. viridis* disponível no NCBI. Doze dos genes com expressão reduzida estão no cromossomo cinco, enquanto nenhum dos genes encontrados está no cromossomo 15. Para genes com expressão aumentada, o cromossomo três é o que possui o maior número de *loci* e os cromossomos 16 e 11 não apresentaram nenhum. O restante dos cromossomos apresenta um *locus* de genes responsivo ao frio. Dos 190 transcritos selecionados, 37 são de genes encontrados em “scaffolds” que ainda não foram ligados a nenhum dos 16 cromossomos do genoma de *E. guineensis* e um total de 15 transcritos que não tiveram alinhamento com o genoma de *E. guineensis*.

Palavras-chave: RNASeq. Expressão diferencial. Dendê. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Oil palm (*Elaeis guineensis*) is an important crop for the Brazilian strategy of diversification of raw materials to be used by the biodiesel industry. In this sense, the expansion of cultivation beyond the Amazon region can in fact contribute to consolidate its participation in the biodiesel production chain. However, when going to the south of Brazil palm oil will undoubtedly face new challenges, such as cold stress. Learn more about the morphological, biochemical and genetic responses of oil palm to this abiotic stress is fundamental to help on the development of cold tolerant oil palm genotypes, either by conventional breeding or breeding based on the development of genetically modified plants. The objective of this study was to identify and to annotate *E. guineensis* genes whose expression increases or decreases significantly when this plant species is subjected to cold stress. The Galaxy web-based public platform for bioinformatics was used for analysis of oil palm RNASeq data. Differential gene expression analysis, comparing plants maintained at room temperature with cold stressed plants, revealed a total of 190 transcripts whose expression difference was statistically significant (p-Value > 0.01). Of these, 92 increased and 98 reduced the expression eight or more times when the plant was submitted to cold. The genes of the *E. guineensis* (EG5) genome, to which these transcripts were aligned, were identified, and their sequences (mRNA) were aligned (BLASTx) against the *S. viridis* genome available from the NCBI. Twelve of the genes with reduced expression are located on chromosome 5, while none of the genes found are on chromosome 15. For genes with increased expression, chromosome 3 is the one with the highest number of loci, and chromosomes 16 and 11 have none. The rest of the chromosomes present at least one cold-responsive gene locus. Out of the 190 selected transcripts, 37 are from genes found in scaffolds that have not yet been linked to any of the 16 chromosomes in the genome of *E. guineensis*. A total of 15 transcripts that had no alignment with the genome of *E. guineensis*.

Keywords: RNASeq. Diferential expresion. Oil palm. Abiotic stress.

1 INTRODUÇÃO

O dendê (*Elaeis guineensis*) é uma cultura oleaginosa originária do Continente Africano. Junto com a espécie americana, *Elaeis oleifera*, compõe o rol de espécies deste gênero que pertence à tribo Cocoseae, da subfamília Arecoideae, que é uma das cinco subfamílias da família Arecaceae (HAI, 2016). No Brasil, *E. oleifera* é comumente conhecida como caiaué e sua distribuição se estende pela Floresta Amazônica e pela América Central.

O dendê tem sido explorado comercialmente no mundo como uma importante fonte de óleo vegetal. Na safra 2017/2018, o mundo consumiu 70,13 milhões de toneladas de óleo de dendê. Esse montante corresponde a 37% de todo o óleo vegetal consumido mundialmente. Nos últimos anos, aplicações alternativas no uso do óleo de palma têm sido estimuladas, com destaque para a produção de biocombustíveis, principalmente, o biodiesel (GAMA; REYNOL, 2011; MATTEI, 2010; SANTANA et al., 2013). Embora o dendê possa produzir até dez vezes mais óleo que a soja por hectare, atualmente, esta última é a principal fonte de óleo vegetal para a produção de biodiesel no Brasil (SOUZA JÚNIOR et al., 2017).

Mais de 90% da produção nacional de dendê vêm do Estado do Pará (BENTES; HOMMA, 2016). O zoneamento agroecológico da palma de óleo, que preconiza a utilização de áreas já desmatadas da Amazônia, indica que 42% das terras com potencialidade de exploração desta cultura no Brasil se encontra no Estado do Pará (RAMALHO FILHO, 2010). No entanto nenhuma planta de produção de biodiesel está autorizada, para funcionar neste Estado, evidenciando o distanciamento geográfico das refinarias e centros de comercialização (AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP, 2017), além de ser um Estado com intenso conflito agrário recorrente (ALMEIDA; VIEIRA, 2014; LOUREIRO; PINTO, 2005; OLIVEIRA, 2001).

Diante do exposto, a aplicação de uma estratégia de descentralização do cultivo de dendê no Brasil poderia em grande benefício, no que se refere à logística, por aproximar o fornecedor desta matéria-prima da indústria de produção de biodiesel; à economia, pela redução nos gastos de transporte de matéria-prima; ao meio ambiente, pois haveria menor risco de expansão da lavoura sobre a área preservada da floresta amazônica. Como primeiras alternativas à Região Norte, para o cultivo do dendê, temos as Regiões Nordeste e Centro-Oeste.

A temperatura pode ser um fator limitante, para a expansão agrícola do dendê, tendo em vista a sua sensibilidade a baixas temperaturas. Os sintomas mais significativos em plantas adultas são o efeitos na emissão foliar e redução de cachos (BARCELOS et al., 1987). Além

disso, podem ocorrer aumento na permeabilidade da membrana e redução na taxa de crescimento, seguidas de injúrias nas folhas (CAO et al., 2011).

São observados, também, aumento nos níveis de açúcares solúveis como a prolina e malondialdeído (MDA) e as enzimas superóxido dismutase (SOD) e peroxidase (POD) sob baixas temperaturas (10°C). Prolina e MDA são moléculas crioprotetoras, enquanto SOD e POD agem evitando danos oxidativos, desempenhando importante papel em resposta ao estresse abiótico (ALIGHARS, et al., 2008; MISRAA; GUPTA, 2006; SIEBENEICHLER et al., 2000). Os níveis de SOD e POD aumentam com a intensidade do frio, todavia estes níveis caem, à medida que o estresse se prolonga, sendo assim, incapazes de evitar as progressivas lesões que se tornam irreversíveis em prolongadas exposições ao frio (CAO et al., 2011).

Nos que se refere à genética molecular, já foram identificados no dendê genes responsáveis por conferir tolerância ao frio. Utilizando técnica de sequenciamento pela plataforma *Illumina*, transcritos foram submetidos à análise diferencial de expressão e foram encontrados marcadores SSR polimórficos. Esta análise, somada à caracterização do transcrito, permitiu identificar ortólogos do gene, fatores de transcrição *Induced of CBF* (ICE1); cinco ortólogos putativos de *C-repeat Binding Factor* (CBF); e 19 fatores de transcrição do tipo *Recognition Sequence* (NAC), que são genes relacionados à tolerância ao frio (XIAO et al., 2014). Esta descoberta sugere que o dendê possui um mecanismo latente de tolerância ao frio.

Lei et al. (2014) estudaram a resposta do dendê ao frio utilizando estratégia de RNAseq. Neste estudo, foram descritos 51.452 transcritos, dos quais 2.665 estão relacionados ao estresse de frio. A anotação desses transcritos revelou que 3.934 (14,1%) eram *up-regulated* e 742 (2,6%) eram *down-regulated*, em relação ao tratamento controle. Além disso, também foram identificados diferentes e caracterizados grupos de fatores de transcrição, dos quais o grupo CBF foi o mais proeminente. Mutações, nos promotores de gene COR responsável pela produção de proteínas crioprotetoras, impedem sua regulação pelos fatores de transcrição CBF, conseqüentemente, estes genes que conferem tolerância ao frio estão presentes, mas não são expressos no dendê (LEI et al., 2014). Este trabalho foi utilizado como fonte de dados para o estudo neste capítulo.

Este estudo teve por objetivo a identificação e a anotação funcional preliminar de genes de *Elaeis guineensis* cuja expressão aumenta ou diminui, significativamente, quando esta espécie vegetal é submetida ao estresse de frio.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Identificação e seleção de genes diferencialmente expressos em dendê submetido a estresse de frio

Os dados de RNASeq gerados por (Lei, Xiao, Xia, Mason, Yang, & Ma, 2014) e disponibilizados, no Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI), foram utilizados para a análise de expressão diferencial de genes. O arquivo SRR1612397 (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2018a) foi obtido com base no banco de dados de SRA disponível no NCBI (SRA Sample SRS721650, SRA Study SRP048913).

O genoma completo de *E. guineensis* (SINGH et al., 2013) foi utilizado como referência. Os arquivos EG5/GCF_000442705.1_EG5_genomic.fna.gz (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/442/705/GCF_000442705.1_EG5/GCF_000442705.1_EG5_genomic.fna.gz) e EG5/GCF_000442705.1_EG5_genomic.gff.gz (ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/442/705/GCF_000442705.1_EG5/GCF_000442705.1_EG5_genomic.gff.gz) foram obtidos, a partir do diretório FTP disponibilizado pelo NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION – NCBI, 2018b). Estes arquivos correspondem à mais recente RefSeq montagem do genoma completo de *Elaeis guineensis* (EG5, WGS Project ASJS01, BioProject PRJNA192219).

Softwares disponibilizados, para uso na Web-Based Platform Galaxy (GALAXY, 2018), foram utilizados para a análise da expressão diferencial dos dados de RNASeq oriundos do estudo desenvolvido por (LEI et al., 2014). Toda a análise foi realizada, usando a opção “Galaxy on the cloud” (AFGAN et al., 2011). O software NormalizeFasta, Galaxy Version 2.7.1.0, foi aplicado para normalizar o arquivo GCF_000442705.1_EG5_genomic.fna.

Os seguintes softwares foram utilizados, de forma sequencial, para realizar a análise de expressão diferencial: a) FastQC, Galaxy version 0.72 (ANDREWS, 2010); b) FastQ Groomer, Galaxy Version 1.1.1 (BLANKENBERG et al., 2010); c) Trim Galore, Galaxy Version 0.4.3.1 (BABRAHAM BIOINFORMATICS, 2018); d) HISAT2, Galaxy Version 2.1.0 (KIM; LANGMEAD; SALZBERG, 2015); e) StringTie transcript assembly and quantification, Galaxy Version 1.3.3.2 (PERTEA et al., 2015); f) StringTie merge transcripts, Galaxy Version 1.3.3 (PERTEA et al., 2015); g) featureCounts, Galaxy Version 1.6.0.6 (LIAO; SMYTH; SHI, 2013); e h) edgeR, Galaxy version 3.20.7.2 (LIU et al., 2015);

ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2009). Esta análise se constituiu das seguintes etapas: controle de qualidade, mapeamento, nova reconstrução de transcritos, montagem de transcrito, contagem do número de sequências por gene e análise de expressão diferencial de genes.

2.2 Blast dos transcritos diferencialmente expressos contra o WGS de *Elaeis guineensis* e de *Setaria viridis*, e coleta de sequências (nucleotídeos e proteínas) dos genes e anotação preliminar de genes diferencialmente expressos em dendê submetido ao estresse de frio

A análise de expressão diferencial forneceu o parâmetro *Gene Symbol* como parte dos resultados. Com base nessa informação, foi possível localizar, por meio da ferramenta de busca no site do NCBI, as sequências correspondentes. *Downloads* em formato FASTA das sequências de genes encontradas foram realizados. Além disso, foram coletadas também informações como *Gene symbol*, *Gene type* e o *chromosome* relacionado ao gene.

Os arquivos em formato FASTA, adquiridos na anotação preliminar dos genes responsivos ao frio de *E. guineensis*, foram agrupados para a análise dentro de um banco de dados de proteína de *S. viridis*. Para esse procedimento, foi utilizada a ferramenta *Blastx*, disponível no site do NCBI.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Análise de qualidade das sequências para estudo de expressão diferencial

O arquivo SRR1612397 foi decomposto em quatro arquivos, denominados Controle_1, Controle_2, Frio_1 e Frio_2. Estes arquivos foram então submetidos à análise de qualidade utilizando o software FastQC. Os arquivos Controle_1 e Controle_2 tinham, cada um, 19.340.381 sequências de 90 nucleotídeos, enquanto os arquivos Frio_1 e Frio_2 tinham, cada um, 19.281.316 sequências de 90 nucleotídeos.

Após a análise inicial da qualidade das sequências, os quatro arquivos foram processados com o software FASTQ Groomer, e os arquivos resultantes foram submetidos à limpeza, utilizando o software Trim Galore; em ambos os casos foram empregadas as condições “defaults”.

Após o processamento com FASTQ Groomer e com Trim Galore, os arquivos gerados foram então submetidos novamente à análise de qualidade utilizando o software FastQC. Os arquivos Trimmed_Control_1 e Trimmed_Control_2 tinham, cada um, 19.335.586 sequências, variando de 18 a 90 nucleotídeos, enquanto os arquivos Trimmed_Frio_1 e Trimmed_Frio_2 tinham, cada um, 19.277.426 sequências variando de 18 a 90 nucleotídeos.

3.2 Estudo da expressão diferencial

O primeiro passo do “pipeline” utilizado, para a análise da expressão diferencial, foi alinhar as sequências ao genoma de dendê (arquivo GCF_000442705.1_EG5_genomic.fna. normalizado) utilizando o software HISAT2. No caso do tratamento Controle, de um total de 19.335.190 pares de sequências, 2.820.645 pares não alinharam, 14.483.194 alinharam uma vez, 1.774.282 alinharam mais de uma vez e 257.069 alinharam de forma discordante uma vez. Quanto às sequências individuais (sem par), de um total de 5.641.290, 2.139.676 não alinharam, 3.225.202 alinharam uma vez e 276.412 alinharam mais de uma vez. A taxa total de alinhamento das sequências do tratamento Controle foi de 94.47%.

No caso do tratamento Frio, de um total de 19.277.102 pares de sequências, 2.073.522 pares não alinharam, 15.437.774 alinharam uma vez, 1.565.501 alinharam mais de uma vez e 200.305 alinharam de forma discordante uma vez. Quanto às sequências individuais (sem par), de um total de 4.147.0440, 1.830.042 não alinharam, 2.148.282 alinharam uma vez e

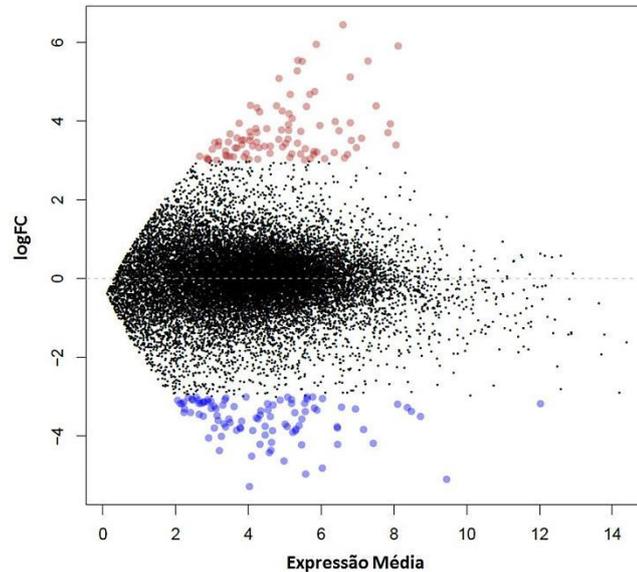
168.720 alinharam mais de uma vez. A taxa total de alinhamento das sequências do tratamento Frio foi de 95.25%.

Após o alinhamento das sequências ao genoma de dendê utilizando HISAT2, foi realizada a montagem e quantificação de transcritos, utilizando o software String Tie, separadamente para cada tratamento. Depois foi realizada a junção dos respectivos arquivos de transcritos, utilizando o software String Tie Merge, tendo o arquivo GCF_000442705.1_EG5_genomic.gff como referência de anotação. Por fim, antes da análise da expressão diferencial de genes do tratamento Frio, em relação ao Controle, os arquivos BAM gerados pelo HISAT2 foram submetidos à análise pelo software featureCounts, tendo o arquivo gtf resultante do software String Tie Merge como arquivo de anotação de genes.

Finalmente, os arquivos resultantes da análise pelo software featureCounts, para ambos os tratamentos, foram submetidos à análise da expressão diferencial, utilizando o software edgeR, com a combinação Frio-Controle como o contraste de interesse. Para esta análise, foi utilizado o filtro, para genes de baixa expressão, eliminando aquele com menos de um “count-per-million” (COM) em todas as amostras normalizadas. O “Log2 Fold Change” utilizado foi 3, com “threshold” de valor de p ajustado para 0.01 (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

Dos 32.937 genes, 13.281 foram descartados por baixo nível de expressão em todas as amostras (< 1 CPM). Dos 19.466 genes restantes, a análise de expressão diferencial mostrou que 92 eram *up-regulated* e 98 eram *down-regulated*, quando a planta foi submetida ao estresse de frio, com diferença de oito ou mais vezes (FIGURA 1).

Figura 1 - MD-Plot destacando os genes que são significativamente diferentes ($FDR < 0.01$) e que apresentam uma variação no logFC de pelo menos três. Círculos marrons, genes de maior expressão no estressado, em comparação com o controle; e círculos azuis, genes de menor expressão no estressado em comparação com o controle.



Fonte: Dados do autor (2018).

3.3 Anotação preliminar de genes diferencialmente expressos em dendê submetido a estresse de frio

Os genes no genoma de *E. guineensis* responsivos ao frio, identificados a partir dos 190 transcritos diferencialmente expressos, selecionados no estudo de expressão diferenciada, foram agrupados, segundo sua localização nos cromossomos (TABELA 1). O cromossomo cinco apresentou o maior número de genes responsivos ao frio cuja expressão foi reduzida, em relação ao tratamento controle, ao passo que o cromossomo 15 não apresentou nenhum gene envolvido na resposta ao estresse de resfriamento. O cromossomo três apresentou maior número de genes cuja expressão foi aumentada, em relação ao tratamento controle, por outro lado, os cromossomos 11 e 16 não possuem genes responsivos ao frio.

Quinze dos 190 transcritos não se alinharam aos genes do genoma de referência (*no hit*), sendo oito cuja expressão foi aumentada e sete cuja expressão foi diminuída. Dentre os genes caracterizados, encontra-se um grupo de genes caracterizados como *unplaced*, isto é, genes presentes em “*contigs*” or “*scaffolds*” não ligados a nenhum dos 16 cromossomos de dendê. Este grupo é composto de 19 genes de expressão aumentada e 18 de expressão reduzida (TABELA 1).

Dentre os genes *down-regulated*, ~92% são do tipo codificante proteína (*Protein coding*) e nove deles ainda não têm sua descrição definida, classificados como

uncharacterized (TABELA 2). Para genes *up-regulated*, ~80% dos genes codificam alguma proteína e 11 deles estão classificados como *uncharacterized*. Além disso, do total de 92 genes, 14 não apresentaram alinhamento contra genoma de referência e três foram identificados como *pseudogenes* e 1 RNA não codificante (ncRNA). Este tipo de RNA está envolvido na regulação gênica. Estudos demonstram que ncRNA participa de vias responsivas ao estresse abiótico (CONTRERAS-CUBA et al., 2012). Neste sentido, a identificação desse gene, compondo um grupo de genes responsivos ao frio diferencialmente expressos, sugere a possibilidade da participação de ncRNA na regulação gênica em resposta ao frio de *E. guineensis*.

Quando os genes *up-regulated* responsivos ao frio em *E. guineensis* são analisados contra uma base de dados de proteínas de *S. viridis*, são verificados alguns alinhamentos (TABELA 3). De um total de 92 genes *up-regulated*, 15 reportaram algum nível de identidade com, pelo menos, uma proteína; dentre estes 15 genes, três deles classificados como *uncharacterized* apresentaram, pelo menos, uma proteína correspondente. Além disso, 16 genes *down-regulated* de 98 retornaram, pelo menos, um alinhamento com proteínas de *S. viridis* e um gene *uncharacterized* reportou haver, pelo menos, uma proteína correspondente em *S. viridis* (TABELA 3).

Tabela 1 - Localização preliminar dos genes responsivos ao frio nos cromossomos de *Elaeis guineensis*.

CROMOSSOMO	# GENES “DOWN REGULATED”	# GENES “UP REGULATED”
1	10	8
2	4	6
3	5	9
4	9	2
5	12	7
6	5	2
7	2	2
8	1	5
9	5	2
10	2	3
11	4	0
12	2	4
13	4	4
14	6	3
15	0	2
16	2	0
<i>Unplaced</i>	18	19
<i>No hit</i>	7	14
Total	98	92

Fonte: Dados do autor (2018).

Tabela 2 - Descrição preliminar dos genes responsivos ao frio de *Elaeis guineensis*.

Tipo de gene	# GENES “DOWN REGULATED”	# GENES “UP REGULATED”
<i>No hit</i>	7	8
<i>Protein coding</i>	91	80
<i>Pseudo genes</i>	0	3
<i>ncRNA</i>	0	1
<i>Protein coding - uncharacterized</i>	10	11

Fonte: Dados do autor (2018).

Tabela 3 - Resultado do *Blastx* entre genes diferencialmente expressos sob condição de frio de *Elaeis guineensis* contra banco de proteínas de *Setaria viridis*.

	# GENES “DOWN REGULATED”	# GENES “UP REGULATED”
<i>Número total de genes</i>	92	98
<i>Número de genes de E. guineensis que alinham com proteínas de S. viridis</i>	15	16
<i>Número de genes não caracterizados de E. guineensis que alinham com proteínas de S. viridis</i>	3	1

Fonte: Dados do autor (2018).

4 CONCLUSÃO

Por meio da análise de qualidade, foi possível detectar e conferir a integridade das sequências disponibilizadas pelo banco de dados público NCBI. A qualidade das sequências garantiu excelentes resultados na etapa de mapeamento, montagem e detecção da expressão diferencial entre o controle e tratamento (frio).

Foi possível identificar genes responsivos ao frio que apresentaram sua expressão aumentada e, também, genes que tiveram sua expressão reduzida. Esta identificação foi possível graças à disponibilidade de inserir o genoma anotado na análise de montagem. Como resultado, dispôs-se o parâmetro *gene symbol* o qual possibilitou realizar buscas no genoma de *E. guineensis*.

A anotação preliminar permitiu a identificação de genes que não estão caracterizados, apontando uma potencial linha de pesquisa em validação de genes e promotores responsivos ao frio. Possibilitou, também, a identificação de ncRNA, aprovando uma outra linha de pesquisa no que tange à regulação dos genes responsivos ao frio.

A “pipeline” proposta foi capaz de prospectar genes com potencial uso, em programas de melhoramento genético, que aplicam ferramentas de biotecnologia para a espécie geneticamente modificada. Diante disso, fica evidente a potencialidade desta ferramenta, para a prospecção de genes responsivos ao frio, que se tornam futuros candidatos a conferir tolerância ao frio. Permite, ainda, vislumbrar, no futuro, genótipos de dendê tolerantes ao frio que ora são determinados sensíveis.

REFERÊNCIAS

- AFGAN, E. et al. Harnessing cloud computing with Galaxy Cloud. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 11, p. 972-974, Nov. 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCMBUSTÍVEIS - ANP. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/dados-estatisticos>>. Acesso em: 2 nov. 2017.
- ALIGHARS, M. et al. Comparative salt tolerance analysis between *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*, with special emphasis on K⁺/Na⁺ selectivity and proline accumulation. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 165, n. 6, p. 588-599, Apr. 2008.
- ALMEIDA, A. S. de; VIEIRA, I. C. G. Conflitos no uso da terra em Áreas de Preservação Permanente em um polo de produção de biodiesel no Estado do Pará. **Revista Ambiente e Água**, Taubaté, v. 9, n. 3, p. 476-487, jul./set. 2014.
- ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. **Babraham Bioinformatics**, Cambridge, 2010. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 15 mar. 2018.
- BARCELOS, E. et al. **Dendê: informações básicas para o seu cultivo**. Brasília; Embrapa, 1987. 40 p.
- BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B. Methodological**, London, v. 57, n. 1, p. 289-300, 1995.
- BENTES, E. dos S.; HOMMA, A. K. O. **Importação e exportação de óleo e palmiste de dendezeiro no Brasil**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2016. 34 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 101).
- BLANKENBERG, D. et al. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 14, p. 1783-1785, July 2010.
- BABRAHAM BIOINFORMATICS. **Trim galore**. Cambridge: Babraham Institute, 2018. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore/>. Acesso em: 13 mar. 2018.
- CAO, H.-X. et al. Effects of low temperature and drought on the physiological and growth changes in oil palm seedlings. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 14, p. 2630-2637, Apr. 2011.
- CONTRERAS-CUBA, C. et al. Non-coding RNAs in the plant response to abiotic stress. **Planta**, Berlin, v. 236, n. 4, p. 943-958, Oct. 2012.
- GALAXY. Disponível em: <<https://usegalaxy.org/>>. Acesso em: 13 mar. 2018.

- GAMA, L. C.; REYNOL, F. O dendê do cerrado. **Agroenergia em Revista**, Brasília, v. 2, n. 2, p. 22-23, jul. 2011.
- HAI, H. D. Family arecaceae palm family. **The Worldwid Fruits**, Vietnam, Aug. 2016. Disponível em: <<http://www.worldwidefruits.com/familyarecaceae.html>>. Acesso em: 15 mar. 2017.
- KIM, D.; LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. **Nature Methods**, New York, v. 12, n. 4, p. 357-360, Apr. 2015.
- LEI, X. et al. RNA-seq analysis of oil palm under cold stress reveals a different C-repeat binding factor (CBF) mediated gene expression pattern in *Elaeis guineensis* compared to other species. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 12, p. e114482, Dec. 2014.
- LIAO, Y.; SMYTH, G. K.; SHI, W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 7, p. 923-930, Apr. 2013.
- LIU, R. et al. Why weight? Modelling sample and observational level variability improves power in RNA-seq analyses. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, n. 15, p. e97, Apr. 2015.
- LOUREIRO, V. R.; PINTO, J. N. A. A questão fundiária na Amazônia. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 19, n. 54, p. 77-98, maio/ago. 2005.
- MATTEI, L. Programa Nacional para Produção e uso do Biodiesel no Brasil (PNPB): trajetória, situação atual e desafios. **Revista Econômica do Nordeste**, Fortaleza, v. 41, n. 4, p. 731-740, out./dez. 2010.
- MISRAA, N.; GUPTA, A. K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 163, n. 1, p. 11-18, Jan. 2006.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. **Diretório FTP**. Bethesda: NCBI, 2018b. Disponível em: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/all/GCF/000/442/705/GCF_000442705.1_EG5>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- _____. **The transcriptome of *Elaeis guineensis* under cold stress(SRR1612397)**. Bethesda: NCBI, 2018a. Disponível em: <<https://trace.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/?run=SRR1612397>>. Acesso em: 15 ago. 2018.
- OLIVEIRA, A. U. D. A longa marcha do campesinato brasileiro: movimentos sociais, conflitos e Reforma Agrária. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 15, n. 43, p. 185-206, set./dez. 2001.
- PERTEA, M. et al. StringTie enables improved reconstruction of a transcriptome from RNA-seq reads. **Nature Biotechnology**, New York, v. 33, n. 3, p. 290-295, Mar. 2015.
- RAMALHO FILHO, A. **Zoneamento agroecológico, produção e manejo para a cultura da palma de óleo na Amazônia**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2010. 216 p.

- ROBINSON, M. D.; McCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 139-140, Jan. 2009.
- SANTANA, M. C. C. B. de et al. Dendê e seu potencial de uso: uma prospecção tecnológica. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 6, n. 4, p. 516-525, 2013.
- SIEBENEICHLER, S. C. et al. Efeitos da baixa temperatura no crescimento e nos teores de açúcares solúveis e de prolina em dois cultivares de feijão. **Ceres**, Viçosa, v. 47, n. 273, p. 495-509, 2000.
- SINGH, R. et al. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature**, London, v. 500, n. 7462, p. 335-339, Aug. 2013.
- SOUZA JÚNIOR, M. T. et al. **Biodiesel e bioquerosene: o papel da Embrapa Agroenergia**. Brasília: Embrapa Agroenergia, 2017. 34 p. (Embrapa Agroenergia. Documentos, 21).
- XIAO, Y. et al. Exploiting transcriptome data for the development and characterization of gene-based SSR markers related to cold tolerance in oil palm (*Elaeis guineensis*). **BMC Plant Biology**, London, v. 14, p. 384, Dec. 2014.

CAPÍTULO 3 *Setaria viridis* COMO POTENCIAL PLANTA-MODELO PARA A VALIDAÇÃO DE GENES DE TOLERÂNCIA AO FRIO

RESUMO

A *Setaria viridis* é uma espécie da família *Poaceae*, que possui metabolismo C_4 e tem sido utilizada como planta-modelo para estudos de validação da função de genes em estratégias de genética reversa. Apesar disso, não se encontrou, na literatura, qualquer referência a respeito da utilização desta planta, para a validação de genes de tolerância ao frio. Para preencher esta lacuna, este estudo teve por objetivo caracterizar as respostas morfofisiológicas de dois acessos de *Setaria viridis* ao frio, visando à utilização da espécie como planta-modelo na validação de genes candidatos àquele tipo de estresse. Assim, plantas de *S. viridis* dos acessos A10.1 e AST foram cultivadas a 25°C e, nas fases vegetativa ou reprodutiva, foram submetidas ao frio pela redução da temperatura na câmara de crescimento, de forma gradual ou abrupta. No primeiro caso, as plantas foram submetidas à redução da temperatura do ar, em passos de 5°C a cada 24h até atingir 0°C . No segundo caso, as plantas foram transferidas instantaneamente de uma câmara de crescimento a 25°C para outra câmara a 0°C . Desta forma, foram mantidas a 0°C , durante 3, 5 e 10 dias no estresse gradual e por 5 e 10 dias no estresse abrupto. Imediatamente após o estresse de frio, a temperatura da câmara de cultivo foi aumentada para 25°C . Um grupo de plantas-controle foi mantido sob cultivo a 25°C durante todo o período. Foram avaliados parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila, ao longo do período de estresse e até 48 h após, além de biomassa fresca e seca, ao final do ciclo da planta. No estresse gradual, as taxas de trocas gasosas caíram gradativamente, ao longo de seis dias, até atingir valores próximos a zero, enquanto os valores de concentração interna de CO_2 aumentaram. Resultados similares de trocas gasosas ocorreram, também, nas primeiras 24h, sob estresse abrupto. Em ambas as formas de estresse, houve redução acentuada em F_m e, conseqüentemente, em F_v/F_m . Todas as plantas submetidas ao estresse de frio, independentemente da fase do ciclo, mantiveram-se vivas. Os efeitos do frio sobre a morfologia da planta foram mais pronunciados quando aplicado na fase vegetativa. Pelos resultados obtidos, concluiu-se que os acessos de *Setaria viridis* avaliados são tolerantes ao frio.

Palavras-chave: Genética reversa. Genômica funcional. Estresse abiótico.

ABSTRACT

Setaria viridis is a plant in the Poaceae family of C4 metabolism that has been used as a model plant for validation studies of gene function in reverse genetics strategies. However, there are no references to the use of this plant for the validation of cold tolerance genes. This study aimed to characterize the morphophysiological response of two accessions of *S. viridis* (A.10 and AST) to cold stress, with the purpose of legitimizing its use as a model plant in the validation of candidate cold tolerance genes. Plants of the A10.1 and AST accessions, in vegetative and reproductive phases of development, were submitted to cold stress, both in a gradual (reduction of temperature by 5°C every 24 hours with an initial temperature of 25°C) and abrupt (instantaneous reduction from 25°C to 0°C) manner, and maintained at 0°C for periods of 3, 5 and 10 days. An IRGA gas exchange analyzer and a Mini-PAM-WALTZ portable fluorometer were used to measure gas exchange and chlorophyll fluorescence, respectively. In both stress induction regimes, photosynthesis reached zero at the 0°C. At 52 days after inoculation in culture medium, for seed germination, control and stressed plants had their fresh and dry weight obtained. All plants submitted to cold stress recovered. Plants submitted to cold stress during the vegetative phase recovered faster than during the reproductive phase. The morphological effects are more pronounced when applied in the vegetative phase. The results obtained show that *S. viridis* is tolerant to cold; therefore, this is not an ideal model plant for the validation of candidate genes for cold tolerance.

Keywords: Reverse genetics. Functional genomics. Abiotic stress.

1 INTRODUÇÃO

Setaria viridis e *Setaria italica* são espécies que pertencem à família *Poaceae* e subfamília *Panicoideae*. Estas monocotiledôneas têm sido utilizadas como plantas-modelo em estudos de genética reversa para a validação da função de genes candidatos (LATA et al., 2011). No caso específico da *S. viridis*, ela reúne características relevantes, como tamanho pequeno, 10-15 cm, quando adulta; ciclo de vida curto, entre 6-9 semanas, dependendo das condições de fotoperíodo; elevada produção de sementes, aproximadamente, 13.000 sementes por planta; autopolinização; e genoma pequeno. Além disso, a sua transformação genética mediada por biobalística ou por *Agrobacterium* já é dominada (BRUTNELL et al., 2010).

Ademais, esta espécie tem o genoma sequenciado e anotado (LATA; PRASAD, 2013), com aplicação em estudos em genômica comparativa (BRUTNELL et al., 2010; DOUST et al., 2009). Sua ampla ocorrência geográfica sugere que tenha alta variabilidade genética, e estudos de seu uso, em estudos de genética reversa, para validar genes candidatos de tolerância ao estresse abiótico, têm sido reportados na literatura (LI; BRUTNELL, 2011; MARTINS et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Em diferentes acessos de *S. italica*, são relatados genes envolvidos em vias que conferem tolerância ao estresse abiótico (LATA et al., 2014; LI et al., 2014, 2017), como, por exemplo, fatores de transcrição CBF/DREB e também ICE1 que estão presentes em seu genoma, participando das vias de sinalização responsivos ao estresse abiótico (LATA et al., 2011). No entanto é relatado para *S. italica* acessos com diferentes níveis de tolerância: muito tolerante; tolerante e sensível ao estresse abiótico. Para essa classificação, o parâmetro utilizado foi o efeito oxidativo da membrana plasmática, quando submetido à condição de estresse (LATA et al., 2011). Essas descobertas sugerem que a *S. italica* tenha níveis diversificados de tolerância ao estresse abiótico, incluindo o frio. Quanto à *S. viridis* (A10.1) não há relatos quanto ao seu nível de tolerância ao frio.

Estudos recentes têm demonstrado resultados positivos na caracterização e validação de genes de referência para estresse abiótico em *S. viridis* (KUMAR; MUTHAMILARASAN; PRASAD, 2013; MARTINS et al., 2016). Em *S. italica*, a validação do gene ASM já permite sua utilização, em estudos de tolerância ao estresse abiótico, levando em consideração a via metabólica que tenha a participação de DREB (LATA; PRASAD, 2012). Estudos de tolerância e respostas fisiológicas ao estresse de frio, em *S. viridis* (A10.1), não foram encontrados até o momento.

Vale afirmar que grande parte dos trabalhos realizados com setária adotam como estratégia a combinação de diferentes estresses abióticos. Deste modo, não fica claro o real nível de tolerância observado, no respectivo acesso estudado, quando submetido exclusivamente ao estresse de frio. Por um lado, observa-se que os diferentes tipos de estresse abiótico compartilham as mesmas vias metabólicas em resposta às alterações ambientais. No entanto, também, verifica-se que existem vias alternativas que são específicas de cada planta em que se manifesta alterações no genoma. Portanto é possível ressaltar diferentes níveis de tolerância entre acessos de setária como supracitado.

Este estudo teve por objetivo caracterizar a resposta de dois acessos de *S. viridis* (A.10 e AST) ao estresse de frio, mediante emprego de técnicas de fenômica, buscando subsidiar estudos relativos à utilização dessa espécie vegetal como potencial planta-modelo para validação de genes de tolerância ao frio. Para tanto, foram caracterizadas as respostas morfofisiológicas e de produção de biomassa destes dois acessos, quando submetidos a dois regimes distintos de imposição de estresse de frio (abrupto e gradual), em três tempos de duração do estresse (três, cinco e dez dias), em dois estágios de desenvolvimento da planta.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado foram dois acessos de *Setaria viridis* (A10.1 e AST).

2.2 Quebra de dormência e germinação das sementes

As plantas foram germinadas em meio de cultivo MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962). Para um volume final de 1L, o meio de cultivo foi preparado utilizando as seguintes quantidades: Meio MS 2,15g, Vitaminas 1 ml, Sacarose 20g, Fitagel 20g. O pH foi ajustado para 5,8. O meio foi autoclavado por vinte minutos à pressão de trabalho de 1atm e 120°C. Foi vertido um volume de 25 ml, em placas de petri estéreis, com dimensões de 90 x 15mm, em fluxo laminar.

As sementes passaram por escarificação química em ácido sulfúrico puro. Foi utilizada uma proporção de 200 sementes para 1000 µL de ácido em um Becker de 50 ml. A escarificação se deu por quinze minutos com agitação de cinco em cinco minutos. Após esse período, as sementes foram separadas do ácido em excesso e lavadas por três vezes e água deionizada.

Em fluxo laminar, as sementes passaram por um processo de desinfestação em 1000 µL de hipoclorito de sódio 2% e duas gotas de Tween20[®] 0.1%, durante cinco minutos, sob agitação. Passado esse tempo, as sementes foram separadas do excesso de hipoclorito e Tween20[®] e lavadas com água deionizada autoclavada até que não se observou espuma e nem cheiro de hipoclorito.

Após a desinfestação, as sementes foram colocadas em papel filtro autoclavado para secagem. Uma vez secas, foram transferidas com auxílio de pinça para placas de petri contendo meio de cultura MS sólido. Foram alocadas, aproximadamente, 40 sementes por placa, espalhadas o mais equidistante possível. As placas de petri, contendo o meio de cultivo e as sementes, foram acondicionadas em câmara de crescimento por sete dias, mantidas sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Após sete dias, as plântulas foram transplantadas para substrato autoclavado composto por solo, vermiculita e bioplant, na proporção de 2:1:1.

2.3 Capacidade de campo e teor de umidade do substrato

Durante o preparo do substrato, foi estimada a capacidade de campo, utilizando 10 vasos plásticos de 200 ml, que receberam 120g de substrato. Os vasos foram pesados com e sem substrato, em seguida, receberam água até que foi observado o vazamento de água pelos orifícios na parte inferior dos vasos. Após *overnight*, os copos saturados foram pesados, e a diferença entre o peso do substrato fresco e saturado resultou na capacidade que o solo tem de reter a água, como descrito a seguir:

$$PS_{\text{peso saturado}} - PF_{\text{peso fresco}} = \text{Capacidade de campo}$$

Para a determinação do teor de umidade do substrato, foram utilizadas 10 placas de petri contendo 100g de substrato cada. As placas, contendo o substrato, foram acondicionadas em estufa a 105°C/72h. Após esse período, as placas contendo o substrato seco foram pesadas novamente. A diferença entre o peso fresco e seco resultou no teor da umidade do substrato, como descrito a seguir:

$$PS_{\text{peso seco}} - PF_{\text{peso fresco}} = \text{Teor de umidade}$$

2.4 Aplicação do estresse de frio

Tratamento de frio foi realizado em câmara de crescimento conviron programada para um ciclo de 8 horas no escuro e 16 de luz, umidade relativa de 65%, zero ppm de CO₂ (utilizando, assim, o CO₂ atmosférico) e luz entre 400 e 470 μmol. A exposição das plantas ao frio foi realizada de duas maneiras e em diferente duração.

2.5 Estresse gradual

A temperatura inicial foi ajustada para 25°C. A partir desta temperatura, houve um decréscimo de 5°C a cada 24 horas. A redução da temperatura se deu até o instante em que a taxa de assimilação líquida de CO₂ atingiu zero.

2.6 Estresse abrupto

A partir de uma temperatura inicial de 25°C, as plantas foram expostas instantaneamente à temperatura em que a taxa de assimilação líquida de CO₂ atingiu zero (averiguado no estresse gradual).

2.7 Duração do estresse

Na temperatura em que a taxa de assimilação líquida de CO₂ atingiu zero, as plantas foram mantidas por três, cinco e dez dias.

2.8 Recuperação

Ao final de cada ciclo de estresse, a temperatura foi reajustada instantaneamente para 25°C e a recuperação avaliada em 24 e 48h.

2.9 Biomassa

Aos 52 dias após a germinação, as plantas foram pesadas em balança de precisão para determinar o peso fresco e, para determinar o peso seco, as plantas foram mantidas em estufa de circulação e renovação de ar por três dias a 70 +/- 1°C, quando então foi determinado o peso seco.

2.10 Luz

A configuração da câmara foi ajustada para que a intensidade luminosa se mantivesse constante ao longo do experimento. No momento em que se esgotou o recurso do equipamento para controle da luminosidade, o painel de lâmpadas foi rebaixado para mais próximo das plantas.

2.11 Caracterização da resposta das plantas ao estresse de frio

As plantas foram submetidas à avaliação com medidor de trocas gasosas de gases infravermelhos LI-COR 6400XT (LI-COR, Lincoln, NE, EUA), dotados iluminação artificial

LED modelo 6400-02B. O equipamento foi configurado, para as avaliações, da seguinte maneira: umidade relativa da câmara entre 50 e 60% com temperatura ajustada para $\pm 5^{\circ}\text{C}$ da temperatura do interior da câmara de crescimento, intensidade de luz em $1500\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, fluxo a $400\mu\text{mol s}^{-1}$ e concentração de CO_2 em 400 ppm. Os dados fornecidos pelo software OPEN versão 6.3 foram: A = taxa de assimilação líquida de CO_2 ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), gs = condutância estomática a vapor de água ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$), E = taxa de transpiração ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e C_i = concentração de CO_2 intercelular ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ ar molar}^{-1}$). Estas análises foram feitas, em todas as plantas, na primeira folha, completamente expandida.

Todas as plantas foram avaliadas pela técnica de fluorescência da clorofila, que foi medida pelo equipamento fluorímetro portátil de luz modulada (MINI-PAM - WALZ). A primeira folha completamente expandida recebeu um pulso de luz saturante, após ser mantida no escuro, por 30 minutos com o auxílio de um clipe foliar. Para esta avaliação, foram obtidos os parâmetros: Fluorescência (F) medida, imediatamente, antes do último pulso de saturação, Fluorescência máxima (FM) medida, durante o último pulso de luz saturante e YIELD (YII), que corresponde ao máximo rendimento de conversão de energia fotoquímica ($\text{YIELD} = Y/1000 = (M-F)/M = \Delta F/F_m'$ -Parâmetro de Genty).

2.12 Análise estatística

O experimento foi instalado em blocos inteiramente casualizados, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o software SISVAR 5.6. A análise estatística foi aplicada, considerado as diferentes maneiras de caracterização às respostas morfofisiológicas ao estresse de frio como descrito a seguir.

2.12.1 Experimento 1

Neste experimento, o estresse foi aplicado de forma gradual. Foram utilizadas dez repetições. As plantas foram submetidas à avaliação com medidor de trocas gasosas e pela técnica de fluorescência da clorofila. O material utilizado foram os acessos A10.1, na fase vegetativa (A10.1-V) e AST, nas fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V).

2.12.2 Experimento 2

Neste experimento, avaliou-se a recuperação das plantas. A avaliação foi feita com medidor de trocas gasosas e pela técnica de fluorescência da clorofila. Os acessos utilizados foram A10.1-V, AST-V, AST-R. A duração do estresse foi de 5 e 10 dias a zero grau. Foram utilizadas cinco repetições.

2.12.3 Experimento 3

Resultado de recuperação da biomassa, após 5 e 10 dias de estresse a zero grau, aos 52 dias. Material utilizado foi o acesso A10.1 fase reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1). Para as avaliações, considerando as fases vegetativas e reprodutivas, foram utilizadas 10 repetições. Para a avaliação, considerando o modo de aplicação, se abrupto ou gradual e a duração, de 5 ou 10 dias, foram utilizados cinco repetições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeito do estresse de frio sobre os parâmetros de trocas gasosas

Sob estresse gradual, em ambos os acessos de *Setária* avaliados, as taxas de trocas gasosas foram reduzidas, gradativamente, com a redução da temperatura do ar no interior da câmara de crescimento até atingir valores insignificantes, quando a temperatura alcançou 0°C (FIGURA 1, TABELA 1). Por outro lado, os valores de concentração interna de carbono (C_i) aumentaram, enquanto os de eficiência no uso de água diminuíram, mas somente, quando a temperatura foi reduzida para 5 °C, no acesso AST, na fase reprodutiva e a 0 °C, em ambos os acessos, na fase vegetativa. A eficiência instantânea de carboxilação (ACE) e a eficiência intrínseca no uso de água (IWUE) mantiveram-se inalteradas com a queda na temperatura até 15°C e 10°C, respectivamente. Tais resultados sugerem que, nestas temperaturas, ainda, ocorre o funcionamento normal do complexo enzimático ligado à assimilação de carbono, além de um eficiente controle estomático para manter o balanço de trocas gasosas. O controle, mantido a 25 °C, não apresentou alterações em nenhuma dessas variáveis durante o período.

As taxas fotossintéticas das plantas estão associadas à transpiração estomática. Esta é regulada pelos estômatos, que funcionam como uma barreira à perda d'água pelas plantas. O fechamento dos estômatos limita, também, a entrada de CO₂, reduzindo a atividade do Ciclo de Calvin. Assim, uma redução na condutância estomática provoca queda nas taxas de transpiração e fotossíntese. A capacidade da planta, em fechar os estômatos em baixas temperaturas, está relacionada com a tolerância ao frio. Plantas sensíveis têm dificuldades no controle da abertura estomática e, conseqüente, na regulação das taxas de transpiração. Por outro lado, ocorre, também, uma redução na absorção de água, culminando com a murcha, quando expostas a baixas temperaturas (citação). Em gramíneas C4 tolerantes ao frio, o comportamento é diferente. As plantas fecham os estômatos, em resposta à queda na temperatura, reduzindo a transpiração e, conseqüentemente, a perda de água (McWILLIAM; KRAMER; MUSSER, 1982; NAIDU; LONG, 2004).

A redução nas taxas de trocas gasosas nas plantas de *Setaria viridis* com a redução na temperatura no interior da câmara parece estar associada à redução na abertura estomática, uma vez que condutância estomática foi reduzida na mesma proporção. O aumento na concentração interna de CO₂, nas temperaturas mais baixas, indica que houve algum problema, também, de assimilação de CO₂. O baixo rendimento quântico e a limitação da atividade da Rubisco, nos tecidos foliares, impõem baixas taxas fotossintéticas às gramíneas

C₄, quando submetidas ao estresse de frio (PITTERMANN; SAGE, 2000). Além disso, a Rubisco reduz o ponto de saturação de CO₂ em baixas temperaturas. Isso implica que é necessária uma pequena quantidade de CO₂, para a atividade da Rubisco, tornando o processo fotossintético mais lento (BERRY; RAISON, 1981).

Gramíneas de clima tropical têm a atividade ótima da Rubisco em torno de 30°C, ao passo que gramíneas de clima temperado têm a atividade ótima desta enzima em torno de 20°C. Portanto espera-se que gramíneas C₄ de clima temperado, como a *Setaria viridis*, tenham redução na assimilação de carbono em temperaturas abaixo de 20°C. A redução da atividade no Ciclo de Calvin, seguido de um declínio na fotossíntese, é esperado à medida que a temperatura é reduzida (TREHARNE; COOPER, 1969).

Estudos têm demonstrado que o rendimento quântico é uma forma de verificar a eficiência na assimilação de CO₂. Esta maneira de associação é obtida pela razão entre o rendimento quântico do fotossistema II e Photo (OBERHUBER; EDWARDS, 1993). Neste sentido, as relações entre o rendimento quântico e Photo permitiram identificar, na gramínea C₄ *Muhlenbergia glomerata*, em condição de exposição prolongada a baixas temperaturas (10°C), o extravasamento de CO₂ das células da bainha do feixe. Somado ao baixo rendimento da Rubisco, este aspecto torna ainda mais compreensiva a fotoinibição em gramíneas C₄ durante estresse de resfriamento (KUBIEN; SAGE, 2004).

Estudos têm demonstrado que espécies tolerantes ao frio são capazes de manter as trocas gasosas sob tal condição, com um rígido controle sobre a abertura estomática, de tal maneira que as torna capazes da fixação de CO₂ em temperaturas sub ótimas (NAIDU; LONG, 2004). Em *Miscanthus x giganteus*, uma espécie tolerante ao frio, Naidu e Long (2004) relataram uma redução de 40% na condutância estomática, 31% na taxa de assimilação líquida de CO₂, 19% na eficiência instantânea de carboxilação (ACE) e alteração de apenas 1% na concentração interna de CO₂, quando cultivadas a 14°C/10°C (dia/noite). Nesta mesma condição de cultivo, no milho (*Zea mays*), uma espécie sensível ao frio, aqueles autores observaram reduções de 81%, 79% e 54%, para as taxas de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática e eficiência instantânea de carboxilação, respectivamente.

Neste trabalho, quando a *Setaria viridis* foi submetida a 15°C, foram observadas reduções de 14% na taxa de condutância estomática, 22% na taxa de assimilação líquida de CO₂ e 32% na eficiência instantânea de carboxilação, sem variação significativa na concentração interna de CO₂. Sob 10°C, as quedas observadas aumentaram para 67%, 52% e 87% nas taxas de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática e eficiência instantânea de carboxilação. Embora exista uma diferença na forma como Naidu e Long (2004)

submeteram as plantas de *Miscanthus x giganteus* e *Zea mays* ao estresse por frio, em relação ao que foi realizado neste trabalho com *Setaria viridis*, as plantas desta última mantiveram valores de trocas gasosas semelhantes à *Miscanthus* e muito superiores ao milho, quando submetidas a 15°C. As variáveis de trocas gasosas foram muito reduzidas somente a 10°C. Vale salientar que a redução nas taxas de fotossíntese líquida, em temperaturas baixas, não significa necessariamente intolerância ao frio. Por exemplo, a gramínea C4 *Bouteloua gracilis*, que apresenta severa redução da fotossíntese, em baixas temperaturas, não sofre danos nos fotossistemas sob tal condição, mantendo a integridade das estruturas celulares (PITTERMANN; SAGE, 2000).

3.2 Efeito do estresse de frio sobre os parâmetros de fluorescência da clorofila

Com a diminuição gradual da temperatura de 25°C para 0°C, houve um pequeno incremento na fluorescência inicial no escuro (F_0) e uma redução considerável na fluorescência máxima (F_m) e, conseqüentemente, no máximo rendimento quântico do fotossistema II (F_v/F_m) (FIGURA 2; TABELA 2). O aumento em F_0 , porém ocorreu de forma similar nas plantas estressadas pelo frio e nas plantas-controle.

A medida de F_0 se correlaciona com a estrutura e funcionamento das membranas dos cloroplastos (BERTAMINI, 2007; CAMPOSTRINI, 1997) e, conseqüentemente, possibilita a avaliação da integridade dos centros de reação do fotossistema II (PSII) (POSPÍSIL; SKOTNICA; NAUS, 1998). O Aumento de F_0 , portanto pode sinalizar alterações causadas nas membranas por baixas temperaturas (citação). Em condições normais, a medida de F_0 não se altera nas folhas das plantas. Porém o estresse de frio pode alterar a estrutura das membranas, nas quais os pigmentos fotossintéticos estão inseridos, alterando, também, a sua funcionalidade (citação). Por isso, a técnica de fluorescência da clorofila tem sido bastante utilizada para a caracterização de espécies quanto à tolerância ao frio (ADAMS; PERKINS, 1993). No caso das plantas de Setária, o aumento em F_0 pode estar associado à idade das folhas e não ao estresse por frio, uma vez que as plantas-controle, também, apresentaram aumento.

A queda em F_m , nas folhas das plantas de Setária com a redução da temperatura, muito provavelmente, está associada à degradação de clorofila, um resultado comumente observado em plantas submetidas ao frio (POSPÍSIL; SKOTNICA; NAUS, 1998). Uma vez que ocorre aumento em F_0 , ou queda em F_m , a consequência é uma queda em F_v/F_m . Isto

significa que a capacidade de absorção de luz e transferência de elétron foi prejudicada (PERBONI et al., 2015; RIZZA et al., 2001).

A técnica de fluorescência da clorofila foi utilizada para avaliar a tolerância ao frio das gramíneas C_4 , *Miscanthus x giganteus* e *Zea mays* (NAIDU; LONG, 2004). Segundo estes autores, os baixos valores, para o efetivo rendimento quântico do fotossistema II, podem sinalizar a fotoinibição. Porém as espécies tolerantes são capazes de evitá-la em condições de estresse por frio. Assim, valores elevados de Y(II) sob tais condições indicam que a planta possui mecanismos, para dar vazão ao fluxo de elétrons da fotoquímica, evitando a sobrecarga dos centros de reação do PSII.

3.3 Recuperação das plantas submetidas ao estresse de frio

As taxas de trocas gasosas foliares se recuperaram, a partir de 48 h, após a mudança da temperatura para 25°C tanto no estresse gradual quanto no abrupto, mas somente quando as plantas foram mantidas a 0°C por três ou cinco dias. Quando as plantas foram mantidas a 0°C por dez dias, não houve recuperação (FIGURA 3; FIGURA 4; TABELA 3; TABELA 4).

Considerando as variáveis de fluorescência da clorofila, todas se recuperaram, após três dias, quando as plantas foram submetidas ao estresse de frio a 0 °C, aplicado de forma gradual. Após cinco dias, apenas F_o se recuperou, independentemente do estresse ter sido aplicado de forma gradual ou abrupta. E, após dez dias, nenhuma das variáveis retornou aos níveis do controle, em qualquer das duas formas de aplicação do estresse (FIGURA 5; TABELA 5).

A resposta ao estresse de frio, considerando variáveis de fluorescência da clorofila, foi estudo em canola (PERBONI et al., 2015). Estes autores relatam que, após um período de recuperação, as plantas que sofreram estresse de frio apresentaram o mesmo nível de rendimento quântico do controle.

Plantas de aveia foram estudadas considerando os parâmetros de F_v/F_m sob estresse de frio (RIZZA et al., 2001). Os autores identificaram diferenças entre cultivares tolerantes e sensíveis a baixas temperaturas. As cultivares tolerantes apresentaram menor queda dos valores de F_v/F_m e melhor recuperação após o estresse. O nível de intensidade da temperatura está relacionada com a recuperação, estresse mais severo prejudica a recuperação das variáveis de fluorescência da clorofila.

3.4 Efeito do estresse de frio sobre a biomassa aérea e radicular das plantas de *Setaria*

As respostas da biomassa das plantas de *Setária* ao estresse de frio a 0 °C, durante cinco dias, dependeram do estágio de desenvolvimento. Houve um aumento no número de inflorescências, mas somente quando o estresse foi aplicado na fase vegetativa. Por outro lado, houve redução, no tamanho da haste principal, peso seco e fresco da inflorescência, em ambas as fases, tamanho médio da inflorescência, na fase vegetativa e peso seco total, apenas na fase reprodutiva. Não houve alterações, para o número de inflorescência, na fase reprodutiva. De forma similar, não houve mudanças no peso fresco e peso seco das raízes, da parte aérea, além do peso fresco total, em ambas as fases e, no peso seco total, na fase vegetativa (TABELA 6).

Plantas mantidas sob estresse de baixas temperaturas apresentam redução no crescimento. O frio reduz a atividade metabólica prejudicando a divisão e o alongamento celular. Como resultado, a planta acumula menos biomassa, reduzindo o tamanho (AGHAEI et al., 2011; MERTZ et al., 2008).

Os autores Aghaei et al. (2011) submetem cultivares tolerante e sensível de arroz a baixas temperaturas. As plantas foram mantidas por duas semanas a uma temperatura de 15/10°C (dia/noite). Ao final do experimento, a cultivar tolerante perdeu em biomassa 46,71% de parte aérea e 36,74% de raiz e apresentou uma relação parte aérea/raiz de 3,47. A cultivar sensível reduziu em biomassa 72,58% e 78,01% da parte aérea e raiz, respectivamente, e uma relação de 7,48 parte aérea/raiz. Plantas tolerantes apresentam um balanço parte aérea/raiz melhor que as intolerantes, sugerindo haver um mecanismo que confere melhor ajuste do crescimento sob estresse.

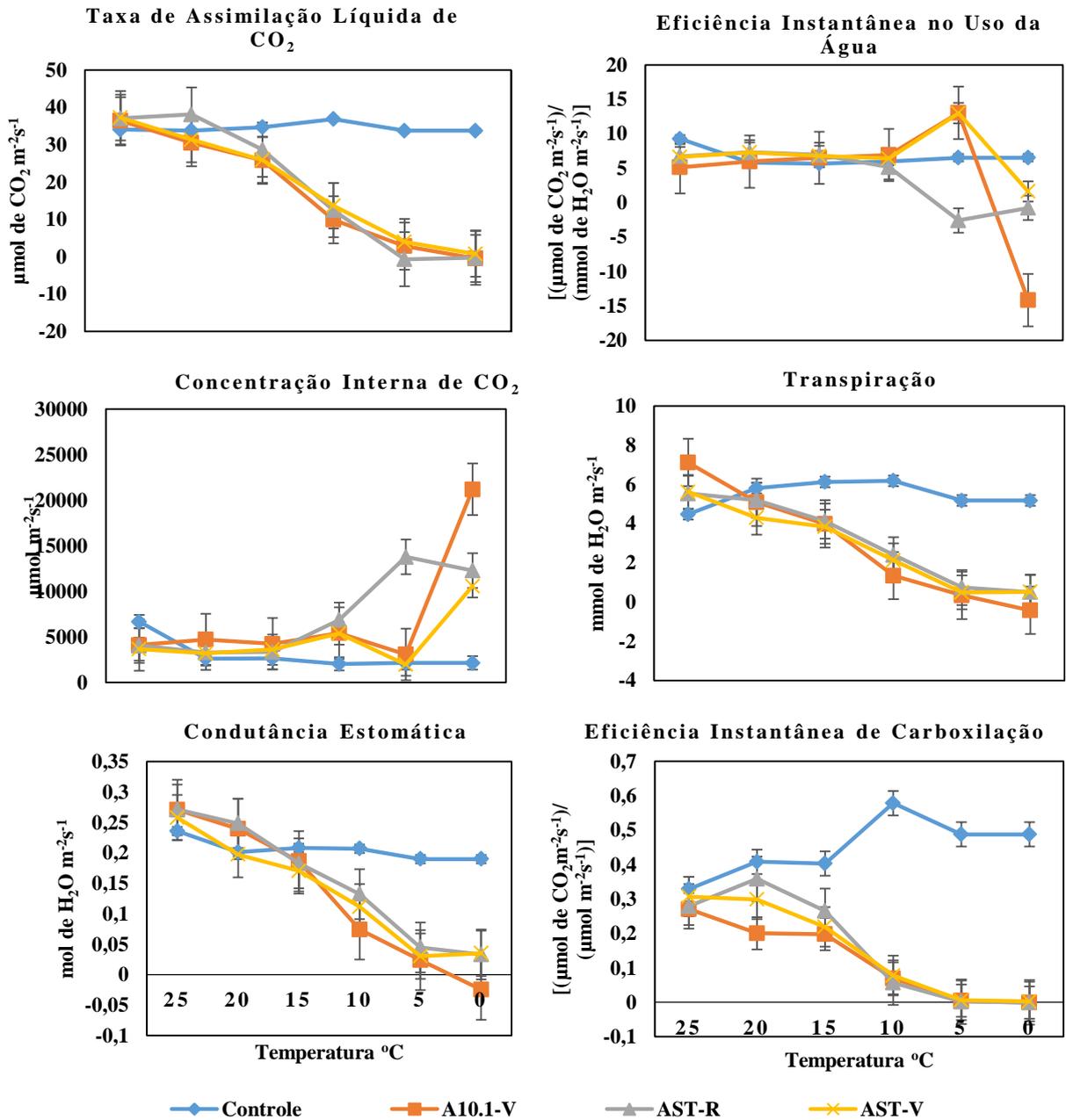
Neste trabalho, a *Setária* não apresentou perdas significativas da parte aérea nas fases vegetativas e reprodutivas. A maior influência em nenhuma redução de biomassa estatisticamente significativa na fase vegetativa. E uma redução de 25% de biomassa na fase reprodutiva. Além disso, apresentou 1,19 de relação parte aérea/raiz para a fase vegetativa e 1,75 na fase reprodutiva. Vale dizer que os dados foram coletados, aos 52 dias da germinação, evidenciando uma excelente recuperação da planta.

Comparando-se as duas formas de aplicação do estresse, ou seja, gradual ou abrupta, praticamente, não houve diferenças entre elas em relação às variáveis relacionadas à biomassa da parte aérea ou raízes das plantas de *Setária* (TABELA 7). O tempo de duração do estresse, por sua vez, exerceu grande influência sobre tais variáveis. Houve redução no tamanho da haste principal, no tamanho médio da inflorescência, no peso seco da inflorescência e no peso

seco total das plantas, quando as plantas foram mantidas a 5 ou 10 dias sob frio de 0°C. O número de inflorescências, peso fresco da parte aérea e peso fresco total sofreram redução no valor apenas quando as plantas foram mantidas a 0°C por 10 dias.

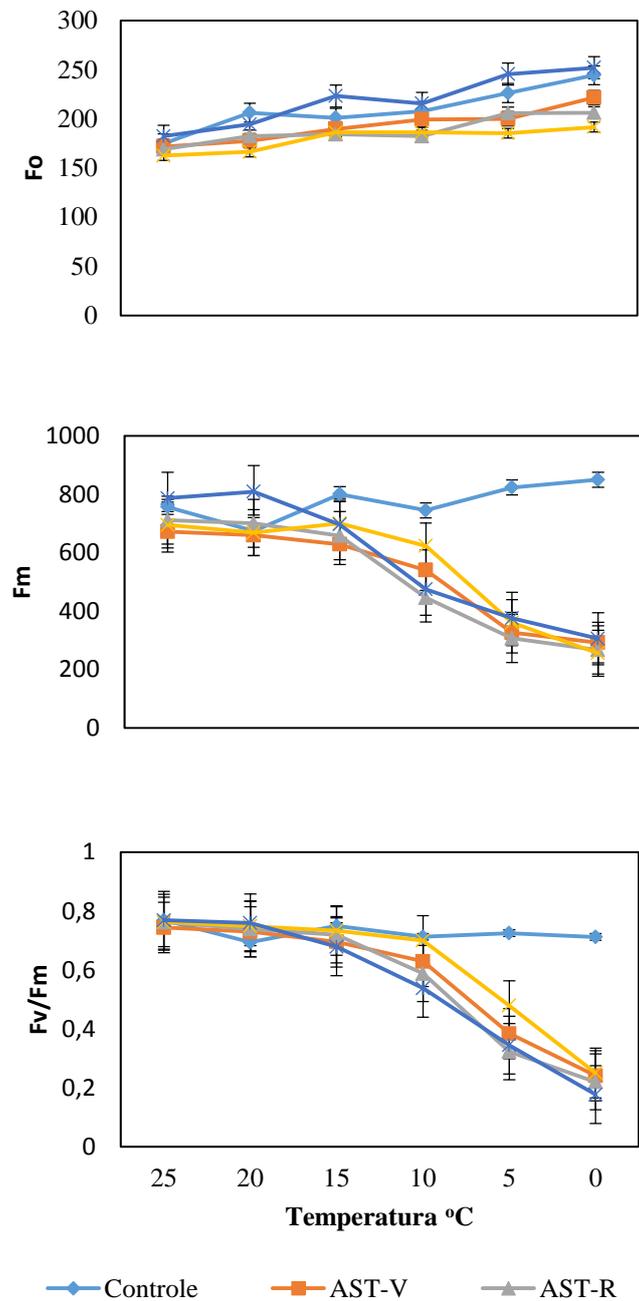
O peso fresco da inflorescência foi reduzido, quando as plantas foram submetidas ao frio gradual por 5 e 10 dias, ou 10 dias de frio abrupto. O peso fresco das raízes foi reduzido apenas, quando as plantas foram mantidas por 10 dias a 0°C, por submissão abrupta de frio, enquanto o peso seco foi reduzido, quando as plantas foram mantidas por 5 e 10 dias sob frio gradual e 10 dias sob frio abrupto.

Figura 1 - Trocas gasosas em folhas de *Setaria viridis* submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual. Foi utilizado o acesso A10.1, na fase vegetativa, para a condição de controle, mantido a 25°C. Os acessos AST na fase reprodutiva (AST-R) e na fase vegetativa (AST-V), com o acesso A10.1 na fase vegetativa (A10.1-V), foram expostos ao frio gradual com diminuição de 5°C a cada 24h.



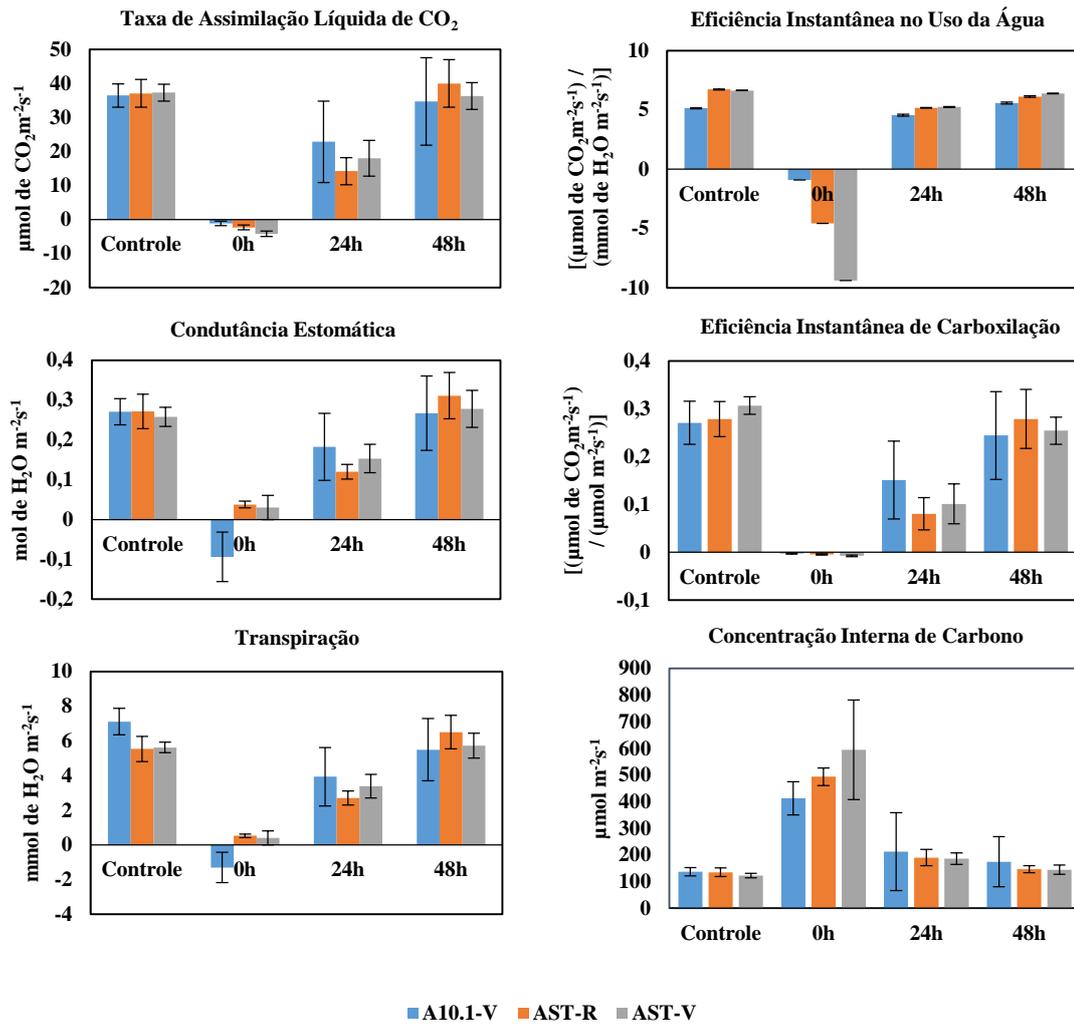
Fonte: Dados do autor (2018).

Figura 2 - Rendimento quântico do fotossistema II em folhas de *Setaria viridis* submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual. Foi utilizado o acesso A10.1 na fase vegetativa, para a condição de controle, mantido a 25°C. Os acessos AST na fase reprodutiva (AST-R) e na fase vegetativa (AST-V), com o acesso A10.1 na fase vegetativa (A10.1.1-V) e fase reprodutiva (A10.1-R), foram expostos ao frio gradual com diminuição de 5°C a cada 24h, começando com 25°C até atingir 0°C.



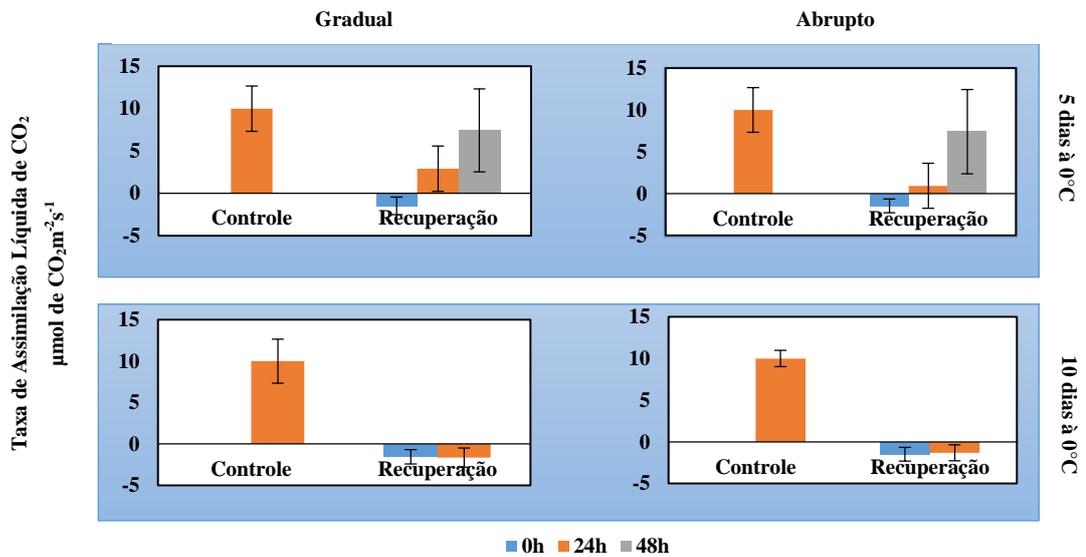
Fonte: Dados do autor (2018)

Figura 3 - Trocas gasosas em folhas de *Setaria viridis* em recuperação, após serem submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual. Os acessos AST na fase reprodutiva (AST-R) e na fase vegetativa (AST-V), com o acesso A10.1.1 na fase vegetativa (A10.1.1-V), foram expostos ao frio gradual com diminuição de 5°C a cada 24h, começando em 25°C até atingir 0°C. Ao atingir 0°C, foram mantidos nesta temperatura por três dias, retornando a 25°C após este período. Dados coletados em três momentos distintos (0h, 24h e 48h) após o início da recuperação.



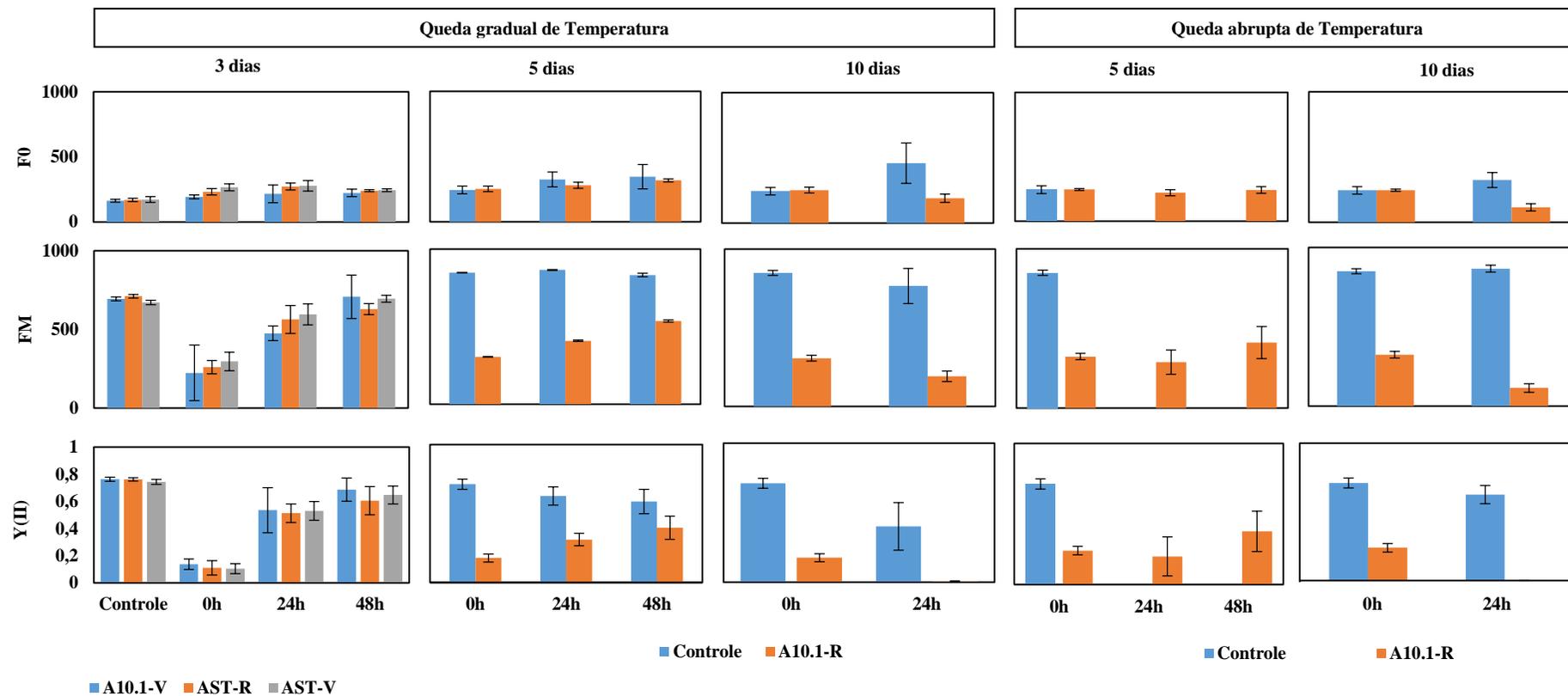
Fonte: Dados do autor (2018).

Figura 4 - Taxa de assimilação de CO₂ em folhas plantas de *Setaria viridis* em recuperação, após terem sido submetidas ao estresse de frio aplicado de forma gradual ou abrupta. Foi utilizado o acesso A10.1 na fase reprodutiva para este experimento. O controle foi mantido a 25°C. As plantas foram expostas ao frio de maneira gradual com diminuição de 5°C a cada 24h, começando em 25°C até atingir 0°C. Ao atingir 0°C, foram mantidos nesta temperatura por cinco ou dez dias, retornando a 25°C após este período. Os dados foram coletados a 0h, 24h e 48h, durante a recuperação. As plantas também foram submetidas ao frio de maneira abrupta com exposição instantânea a 0°C, saindo de 25°C. Ao atingir 0°C, também, foram mantidos nesta temperatura, por cinco ou dez dias, retornando a 25°C após este período. Os dados, também, foram coletados em 0h, 24h e 48h, durante a recuperação.



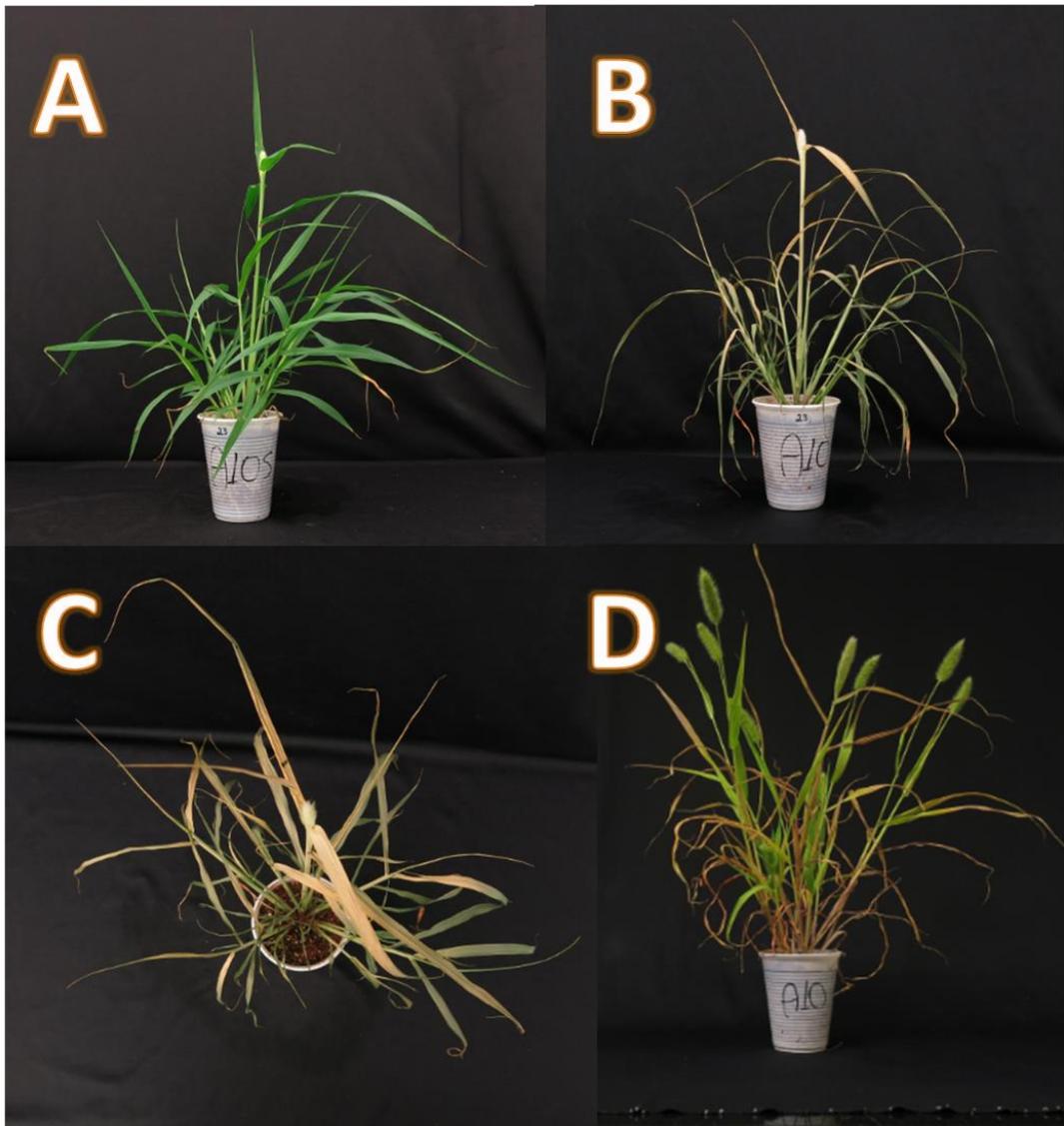
Fonte: Dados do autor (2018).

Figura 5 - Variáveis derivadas da técnica de fluorescência da clorofila obtidas em folhas de plantas de *Setaria viridis* em recuperação, após terem sido submetidas a estresse de frio aplicado de forma gradual ou abrupta. Ao atingir 0°C, as plantas foram mantidas nesta temperatura por três, cinco ou dez dias, retornando em seguida a 25°C. Os dados de recuperação foram coletados a 0h, 24h e 48h durante a fase de recuperação.



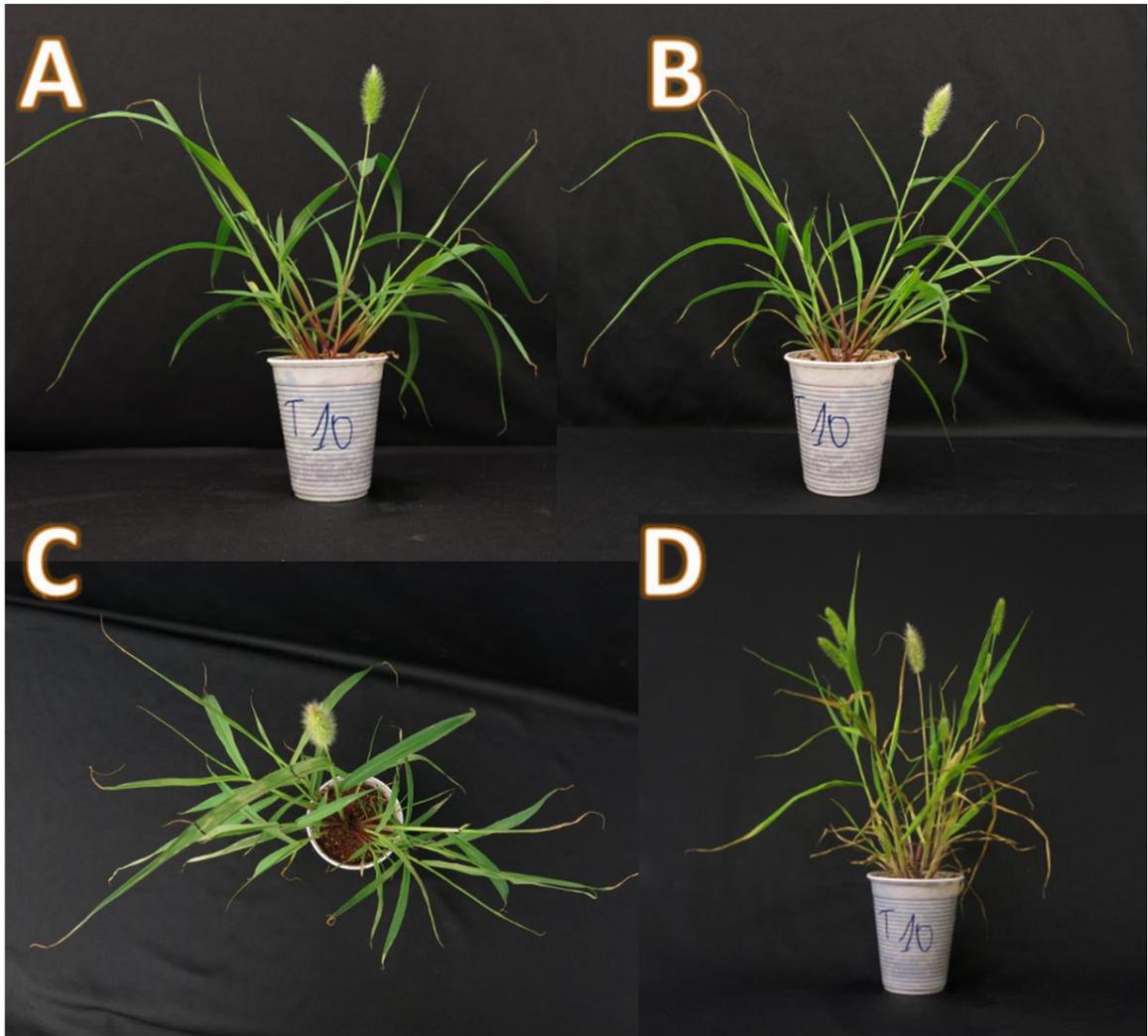
Fonte: Dados do autor (2018).

Figura 6 - Fase Reprodutiva - Estresse Abrupto – Dia 1 (A) e 10 (B e C) do estresse a 0°C. (D) Planta recuperada (no 52º dia do ciclo de desenvolvimento da planta).



Fonte: Dados do autor (2018).

Figura 7 - Fase Reprodutiva - Estresse Gradual – Dia 1 (A) e 10 (B e C) do estresse a 0°C. (D) Planta recuperada (no 52º dia do ciclo de desenvolvimento da planta).



Fonte: Dados do autor (2018).

Tabela 1 - Análise Estatística das Trocas Gasosas, utilizando medidor de trocas gasosas de gases infravermelhos, em material de *Setaria viridis* em estresse gradual de frio. Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.

Acesso_Fase	Temperatura					
	25°C	20°C	15°C	10°C	5°C	0°C
Taxa de Assimilação Líquida de CO₂ (μmol de CO₂m⁻²s⁻¹)						
AST-R	37,07Aa	38,12Aa	28,69Bb	12,48Bc	-0,68Cd	-0,27Bd
AST-V	37,28Aa	31,37Cb	25,92Cc	13,64Bd	3,97Be	0,75Bf
A10.1-V	36,44Aa	30,54Cb	25,85Cc	9,90Cd	2,82Be	-0,47Bf
Controle	35,17Ab	33,79Bb	34,70Ab	36,87Aa	33,77Ab	33,77Ab
Concentração Interna de Carbono (μmol m⁻²s⁻¹)						
AST-R	134,48Ab	109,46Ab	111,34Ab	228,79Ab	458,74Aa	409,34Ba
AST-V	121,77Ab	106,01Ab	120,41Ab	179,56Ab	65,61Bb	352,41Ba
A10.1-V	136,76Ab	156,90Ab	140,67Ab	180,43Ab	102,19Bb	706,13Aa
Controle	94,49Aa	86,85Aa	88,16Aa	67,67Aa	71,08Ba	71,08Ca
Transpiração (mmol de H₂O m⁻²s⁻¹)						
AST-R	5,53Ca	5,19Bb	4,12Bc	2,40Bd	0,74Be	0,50Be
AST-V	5,62Ca	4,30Cb	3,84Bc	2,12Bd	0,49Ce	0,52Be
A10.1-V	7,11Aa	5,09Bb	3,98Bc	1,34Cd	0,34Ce	-0,43Cf
Controle	6,43Ba	5,80Ab	6,12Aa	6,18Aa	5,17Ac	5,17Ac
Condutância Estomática (mol de H₂O m⁻²s⁻¹)						
AST-R	0,27Aa	0,25Ab	0,18Bc	0,13Bd	0,05Be	0,03Be
AST-V	0,26Aa	0,20Bb	0,17Bc	0,11Cd	0,03Be	0,04Be
A10.1-V	0,27Aa	0,24Ab	0,19Bc	0,07Dd	0,02Be	-0,02Cf
Controle	0,22Ba	0,20Ba	0,21Aa	0,21Aa	0,19Ab	0,19Ab
Eficiência do Uso de Água [(μmol de CO₂m⁻²s⁻¹) / (mmol de H₂O m⁻²s⁻¹)]						
AST-R	6,73Aa	7,32Aa	6,95Aa	5,16Aa	-2,58Bb	-0,77Ab
AST-V	6,64Aa	7,30Aa	6,79Aa	6,43Aa	13,02Aa	1,64Aa
A10.1-V	5,14Aa	5,97Aa	6,51Aa	6,94Aa	13,06Aa	-14,16Bb
Controle	5,47Aa	5,82Aa	5,68Aa	5,97Aa	6,53Aa	6,53Aa
Eficiência Instantânea de Carboxilação [(μmol de CO₂m⁻²s⁻¹) / (μmol m⁻²s⁻¹)]						
AST-R	0,28Cb	0,36Ba	0,27Bb	0,06Bc	0,00Bd	-0,00Bd
AST-V	0,31Ba	0,30Ca	0,22Cb	0,08Bc	0,01Bd	0,00Bd
A10.1-V	0,27Ca	0,20Db	0,20Cb	0,07Bc	0,00Bd	-0,00Bd
Controle	0,38Ac	0,41Ac	0,40Ac	0,58Aa	0,49Ab	0,49Ab

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre as temperaturas (25, 20, 15, 10, 5 e 0°C), fixados os níveis do fator Acesso_fase (AST-R, AST-V, A10.1-V, Controle) empregaram-se letras minúsculas e, para a comparação entre os Acessos_Fase, fixados os níveis do fator temperatura, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 2 - Análise Estatística do resultado da fluorescência da clorofila, em folhas de *Setaria viridis*, submetidas a estresse de frio de forma gradual. Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.

Acesso_Fase	Temperatura					
	25°C	20°C	15°C	10°C	5°C	0°C
F0						
A10.1-R	182,50Ac	194,50Ac	223,40Ab	215,80Ab	245,60Aa	252,20Aa
A10.1-V	162,70Ab	166,50Bb	186,40Ba	186,40Ba	185,50Ca	191,80Ca
AST-R	169,20Ab	182,60Bb	184,40Bb	182,50Bb	206,00Ca	206,40Ca
AST-V	172,00Ac	177,70Bc	189,80Bc	199,60Ab	200,20Cb	221,70Ba
Controle	175,10Ac	206,40Ab	201,10Bb	207,90Ab	226,40Ba	244,50Aa
FM						
A10.1-R	786,20Aa	808,80Aa	696,30Bb	474,40Dc	376,00Bd	305,80Be
A10.1-V	694,50Ba	668,50Ba	700,20Ba	623,00Bb	360,70Bc	256,00Bd
AST-R	711,10Ba	700,40Ba	658,20Ca	445,60Db	306,80Cc	267,00Bc
AST-V	671,70Ba	659,60Ba	628,50Ca	540,20Cb	326,50Cc	292,10Bc
Controle	756,50Ab	673,80Bc	800,00Aa	744,80Ab	822,80Aa	849,50Aa
YII						
A10.1-R	0,77Aa	0,76Aa	0,68Bb	0,54Dc	0,34Dd	0,18Ce
A10.1-V	0,76Aa	0,75Aa	0,73Aa	0,70Ab	0,48Bc	0,25Bd
AST-R	0,76Aa	0,74Aa	0,72Aa	0,59Cb	0,32Dc	0,22Bd
AST-V	0,74Aa	0,73Aa	0,70Bb	0,63Bc	0,38Cd	0,24Be
Controle	0,77Aa	0,69Bb	0,75Aa	0,71Ab	0,72Ab	0,71Ab

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre as temperaturas (25, 20, 15, 10, 5 e 0°C), fixados os níveis do fator Acessos_Fase (A10.1-R, A10.1-V, AST-R, AST-V, Controle), empregaram-se letras minúsculas e, para a comparação entre os Acessos_Fase, fixados os níveis do fator temperatura, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 3 - Análise Estatística das Trocas Gasosas, na recuperação de estresse gradual de frio (três dias de estresse a 0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.

(Continua)

Acesso_Fase	Tempo		
	Zero hora	24 horas	48 horas
Taxa de Assimilação Líquida de CO₂ (μmol de CO₂m⁻²s⁻¹)			
A10.1-V	-1,08Bc	22,86Bb	34,68Ba
Controle A10.1-V	36,44Aa	36,44Aa	36,44Ba
AST-V	-4,18Bc	17,99Cb	36,32Ba
Controle AST-V	37,28Aa	37,28Aa	37,28Ba
AST_R	-2,32Bc	14,21Db	39,99Aa
Controle AST-R	37,07Aa	37,07Aa	37,07Ba
Condutância Estomática (mol de H₂O m⁻²s⁻¹)			
A10.1-V	-0,09Cc	0,18Bb	0,27Ba
Controle A10.1-V	0,27Aa	0,27Aa	0,27Ba
AST-V	0,03Bc	0,15Cb	0,28Ba
Controle AST-V	0,26Aa	0,26Aa	0,26Ba
AST_R	0,03Bc	0,12Db	0,31Aa
Controle AST-R	0,27Aa	0,27Aa	0,27Ba
Transpiração (mmol de H₂O m⁻²s⁻¹)			
A10.1-V	-1,31Dc	3,92Cb	5,49Ca
Controle A10.1-V	7,11Aa	7,11Aa	7,11Aa
AST-V	0,40Cc	3,37Db	5,71Ca
Controle AST-V	5,62Ba	5,62Ba	5,62Ca
AST_R	0,52Cc	2,70Eb	6,50Ba
Controle AST-R	5,53Ba	5,53Ba	5,53Ca
Concentração Interna de Carbono (μmol m⁻²s⁻¹)			
A10.1-V	411,95Ca	212,04Ab	174,14Ac
Controle A10.1-V	136,76Da	136,76Ba	136,76Aa
AST-V	593,65Aa	185,89Ab	143,94Ac
Controle AST-V	121,77Da	121,77Ba	121,77Aa
AST_R	493,26Ba	189,19Ab	145,87Ac
Controle AST-R	134,48Da	134,48Ba	134,48Aa
Eficiência do Uso de Água [(μmol de CO₂m⁻²s⁻¹) / (mmol de H₂O m⁻²s⁻¹)]			
A10.1-V	-0,91Cb	4,55Ba	5,58Aa
Controle A10.1-V	5,14Ba	5,14Ba	5,14Aa
AST-V	-9,37Eb	5,25Ba	6,37Aa
Controle AST-V	6,63Aa	6,63Aa	6,63Aa
AST_R	-4,56Db	5,17Ba	6,12Aa
Controle AST-R	6,73Aa	6,73Aa	6,73Aa

Tabela 3 - Análise Estatística das Trocas Gasosas, na recuperação de estresse gradual de frio (três dias de estresse a 0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1 e as fases reprodutiva (AST-R) e vegetativa (AST-V) do acesso AST.

(Conclusão)

Acesso_Fase	Tempo		
	Zero hora	24 horas	48 horas
Eficiência de Assimilação de Carbono [($\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)]			
A10.1-V	-0.00Cc	0.15Cb	0.24Ca
Controle A10.1-V	0.27Ba	0.27Ba	0.27Ba
AST-V	-0.00Cc	0.10Cb	0.25Ca
Controle AST-V	0.30Aa	0.30Aa	0.30Aa
AST_R	-0.00Cc	0.08Cb	0.27Ba
Controle AST-R	0.27Ba	0.27Ba	0.27Ba

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre os diferentes tempos (0, 24, 48h), fixados os níveis do fator Acessos_Fase (A10.1-V, Controle A10.1-V, AST-V, Controle AST-V, AST_R, Controle AST-R), empregaram-se letras minúsculas e, para a comparação entre os Acessos_Fase, fixados os níveis do fator tempo, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 4 - Análise de recuperação a 25°C utilizando medidor de trocas gasosas de gases infravermelhos em folhas de *Setaria viridis* acesso A10.1, na fase reprodutiva, quando submetido a 5 dias de estresse a 0°C. As plantas foram submetidas ao regime gradual em que passaram pela redução de 5°C a cada 24h, a partir de 25°C até atingir 0°C. E, no regime Abrupto, em que foram expostas instantaneamente a 0°C.

(Continua)

Tratamento	Tempo		
	Zero hora	24 horas	48 horas
Concentração de carbono interno ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			
Estresse Abrupto	693.40Ab	1001.13Aa	258.13Ac
Estresse Gradual	602.73Aa	391.86Bb	303.53Ab
Controle	106.46Ba	106.46Ca	106.46Aa
Transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			
Estresse Abrupto	-0.00Bc	0.61Bb	1.78Aa
Estresse Gradual	0.07Bc	0.59Bb	1.42Ba
Controle	1.21Aa	1.21Aa	1.21Ba
Condutância estomática ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			
Estresse Abrupto	0.01Cc	0.03Bb	0.09Aa
Estresse Gradual	0.02Bb	0.02Bb	0.07Ba
Controle	0.06Aa	0.06Aa	0.06Ca
Taxa de Assimilação Líquida de CO₂ ($\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$)			
Estresse Abrupto	-1.48Bc	0.93Cb	7.38Ba
Estresse Gradual	-1.49Bc	2.92Bb	7.44Ba
Controle	9.98Aa	9.98Aa	9.98Aa

Tabela 4 - Análise de recuperação a 25°C utilizando medidor de trocas gasosas de gases infravermelhos em folhas de *Setaria viridis* acesso A10.1, na fase reprodutiva, quando submetido a 5 dias de estresse a 0°C. As plantas foram submetidas ao regime gradual em que passaram pela redução de 5°C a cada 24h, a partir de 25°C até atingir 0°C. E, no regime Abrupto, em que foram expostas instantaneamente a 0°C.

(Conclusão)

Tratamento	Tempo		
	Zero hora	24 horas	48 horas
Eficiência do uso da água [($\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / (mmol de $\text{H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)]			
Estresse Abrupto	-11.33Ba	-1.96Aa	3.92Aa
Estresse Gradual	-13.40B	0.31A	2.59A
Controle	8.26Aa	8.26aA	8.26Aa
Eficiência da assimilação do carbono [($\mu\text{mol de CO}_2\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) / ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)]			
Estresse Abrupto	-0.00Ba	0.00Ba	0.03Ba
Estresse Gradual	-0.00Ba	0.01Ba	0.03Ba
Controle	0.13Aa	0.13Aa	0.13Aa

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de significância. Para a comparação entre os diferentes tempos (0, 24, 48h), fixados os níveis de tratamento (Gradual, Abrupto, Controle), empregaram-se letras minúsculas, e, para a comparação entre os tratamentos fixados, os níveis de tempo utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 5 - Análise Estatística de fluorescência da clorofila, na recuperação após 5 dias de estresse de frio (0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1

Tratamento	Tempo		
	Zero hora	24 horas	48 horas
F			
Estresse Abrupto	244.50Aa	220.90Ca	243.10Ba
Controle Abrupto	244.50Aa	244.50Ca	244.50Ba
Estresse Gradual	244.50Ab	280.40Bb	317.60Aa
Controle Gradual	244.50Ab	324.10Aa	345.60Aa
Fm			
Estresse Abrupto	323.80Bb	288.60Cb	411.20Ca
Controle Abrupto	849.50Bb	849.50Ab	849.50Ab
Estresse Gradual	305.80Ac	409.40Bb	536.80Ba
Controle Gradual	849.50Aa	866.20Aa	833.50Aa
YII			
Estresse Abrupto	0.23Bb	0.19Db	0.37Ca
Controle Abrupto	0.71Aa	0.71Aa	0.71Aa
Estresse Gradual	0.17Bc	0.31Cb	0.39Ca
Controle Gradual	0.71Aa	0.62Bb	0.58Bb

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre os diferentes tempos (0, 24, 48h), fixados os níveis de tratamento (Gradual, Abrupto, Controle), empregaram-se letras minúsculas, e, para a comparação entre os tratamentos fixados, os níveis de tempo utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 6 - Análise Estatística de Biomassa, na recuperação após 5 dias de estresse de frio (0°C). Comparação das médias entre as fases reprodutiva (A10.1-R) e vegetativa (A10.1-V) do acesso A10.1.

Acesso_Fase	Controle	Estressado
Número de Inflorescências (unidade)		
A10.1-V	14.70Ab	19.90Aa
A10.1-R	14.70Aa	13.60Ba
Tamanho da haste principal (cm)		
A10.1-V	59.13Aa	45.60Ab
A10.1-R	38.13Ba	22.14Bb
Tamanho médio da inflorescência (cm)		
A10.1-V	3.86Aa	3.36Ab
A10.1-R	3.58Ba	4.00Ba
Peso fresco da parte aérea (g)		
A10.1-V	10.04Aa	10.88Aa
A10.1-R	8.97Aa	8.24Ba
Peso fresco da inflorescência (g)		
A10.1-V	5.73Aa	4.93Ab
A10.1-R	3.81Ba	2.74Bb
Peso fresco da raiz (g)		
A10.1-V	12.31Aa	12.63Aa
A10.1-R	10.30Ba	10.90Aa
Peso fresco total (g)		
A10.1-V	28.08Aa	28.45Aa
A10.1-R	23.09Ba	21.88Ba
Peso seco da inflorescência (g)		
A10.1-V	3.31Aa	2.48Ab
A10.1-R	1.88Ba	1.08Bb
Peso seco da parte aérea (g)		
A10.1-V	3.02Aa	3.10Aa
A10.1-R	3.02Aa	2.48Ba
Peso seco da raiz (g)		
A10.1-V	1.71Aa	1.56Aa
A10.1-R	1.76Aa	1.41Aa
Peso seco total (g)		
A10.1-V	8.05Aa	7.15Aa
A10.1-R	6.67Ba	4.98Bb

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre o tratamento (Controle, estressado), fixados os níveis do fator Acessos_Fase (A10.1-V, A10.1-R), empregaram-se letras minúsculas e, para a comparação entre os Acessos_Fase, fixados os níveis do fator tratamento, utilizaram-se letras maiúsculas.

Tabela 7 - Análise Estatística de Biomassa, estresse gradual de frio (5 e 10 dias a 0°C) no acesso A10.1 na fase reprodutiva.

Acesso_Fase	Tratamentos		
	Controle	Estresse 5 dias	Estresse 10 dias
Número de Inflorescências (unidade)			
Estresse Abrupto	10.90Aa	12.20Aa	8.70Ab
Estresse Gradual	14.80Aa	13.60Aa	8.80Ab
Tamanho da haste principal (cm)			
Estresse Abrupto	51.19Aa	24.50Ab	18.55Ac
Estresse Gradual	38.13Ba	22.14Ab	19.84Ab
Tamanho médio da inflorescência (cm)			
Estresse Abrupto	4.56Aa	3.58Ab	3.49Ac
Estresse Gradual	3.58Ba	4.00Ab	3.37Ab
Peso fresco da parte aérea (g)			
Estresse Abrupto	10.54Aa	9.20Aa	6.24Ab
Estresse Gradual	8.97Ba	8.24Aa	6.65Ab
Peso fresco da inflorescência (g)			
Estresse Abrupto	3.87Aa	3.74Aa	1.36Ab
Estresse Gradual	3.81Aa	2.74Bb	1.44Ac
Peso fresco da raiz (g)			
Estresse Abrupto	11.07Aa	10.43Aa	8.63Ab
Estresse Gradual	10.30Aa	10.90Aa	10.26Aa
Peso fresco total (g)			
Estresse Abrupto	25.49Aa	23.38Aa	16.24Ab
Estresse Gradual	23.09Aa	21.88Aa	18.36Ab
Peso seco da inflorescência (g)			
Estresse Abrupto	1.98Aa	1.69Ab	0.44Ac
Estresse Gradual	1.88Aa	1.08Bb	0.45Ac
Peso seco da parte aérea (g)			
Estresse Abrupto	3.70Aa	2.97Ab	2.45Ac
Estresse Gradual	3.02Ba	2.48Ab	2.01Ab
Peso seco da raiz (g)			
Estresse Abrupto	1.70Aa	1.56Aa	1.03Ab
Estresse Gradual	1.76Aa	1.41Ab	0.96Ac
Peso seco total (g)			
Estresse Abrupto	7.39Aa	6.23Ab	3.93Ac
Estresse Gradual	6.67Aa	4.98Bb	3.42Ac

Fonte: Dados do autor (2018).

Nota: Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Scott-Knott, no nível de 5% de significância. Para a comparação entre os dias de estresse (0, 5, 10 dias), fixados os níveis do fator tratamento (Estresse Abrupto, Estresse Gradual), empregaram-se letras minúsculas e, para a comparação entre os tratamentos, fixados os níveis do fator dias de estresse, utilizaram-se letras maiúsculas.

4 CONCLUSÃO

A taxa líquida de assimilação de CO₂ atinge valor zero somente quando a temperatura atinge 0°C. A condutância estomática e a transpiração se adequam com a redução da temperatura, mantendo o CO₂ interno e a eficiência do uso da água em níveis constantes de concentração. As primeiras alterações fisiológicas de trocas gasosas, em resposta às mudanças de temperatura, ocorrem a 20°C. Comportamento observado independentemente da idade ou do acesso, tanto para regime abrupto ou gradual.

A recuperação da planta é mais lenta à medida que o estresse se intensifica. Dez dias de estresse a 0°C não ocorre recuperação da terço superior da planta. Comportamento observado independentemente da idade ou do acesso, tanto para regime abrupto ou gradual.

Os níveis das variáveis de fluorescência da clorofila se recuperam apenas com três de estresse a 0°C. O rendimento quântico é positivo em baixas temperaturas, atingindo menor valor a 0°C. Os primeiros efeitos na redução do rendimento quântico ocorrem a 15°C. Comportamento observado independentemente da idade ou do acesso, tanto para regime abrupto ou gradual.

A intensidade do estresse, no que se refere a três, cinco e dez dias a 0°C, tem mais impacto na recuperação da planta em detrimento do modo de aplicação, neste caso, gradual ou abrupto. 48h de recuperação às plantas submetidas ao estresse gradual e abrupto estão no mesmo nível de taxas de assimilação líquida de CO₂ e rendimento quântico.

Os efeitos morfológicos são maiores quando o estresse é aplicado na fase vegetativa. Fase esta em que se observa melhor recuperação e maior acúmulo de biomassa. Não existem diferenças no que se refere à produção de biomassa para estresse de até cinco dias a 0°C. Os regimes de estresse abrupto e gradual não exercem influência sobre a produção de biomassa.

Diante disso, os acessos A10.1 e AST de *Setaria viridis* são tolerantes ao frio e, por isso, não se prestam para uso como planta-modelo em estudos de validação da função de genes para tolerância a este estresse abiótico.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G. T.; PERKINS, T. D. Assessing cold tolerance in *Picea* using chlorophyll fluorescence. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 33, n. 3, p. 377-382, July 1993.
- AGHAEI, A. et al. Physiological responses of two rice (*Oryza sativa* L.). **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 39, p. 7617-7621, July 2011.
- BADGER, M. R.; BJÖRKMAN, O.; ARMOND, P. A. An analysis of photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants: temperature acclimation in the desert evergreen *Nerium oleander* L. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 5, n. 1, p. 85-99, Feb. 1982.
- BEALE, C. V.; LONG, S. P. Can perennial C4 grasses attain high efficiencies of radiant energy conversion in cool climates? **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 18, n. 6, p. 641-650, June 1995.
- BERRY, J.; RAISON, J. K. Responses of macrophytes to temperature. In: LANGE, O. L. et al. (Ed.). **Encyclopedia of plant physiology, new series, Physiological plant ecology I**. Berlin: Springer-Verlage, 1981. v. 12, p. 278-338.
- BERTAMINI, M. et al. Low night temperature effects on photosynthetic performance on two grapevine genotypes. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 51, n. 2, p. 381-385, June 2007.
- BEVILACQUA, C. B. et al. Acúmulo de fitomassa e teor de clorofila em plântulas de cultivares de arroz sob estresse por frio. **Scientia Agraria Paranaensis**, Paraná, v. 14, n. 4, p. 229-233, out./dez. 2015.
- BRUTNELL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C4. **The Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 8, p. 2537-2544, Aug. 2010.
- CAMPOSTRINI, E. **Fluorescência da clorofila A**: considerações teóricas e aplicações práticas. Rio de Janeiro: Universidade Estadual Norte Fluminense, 1997. 34 p. Disponível em: <http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2018.
- CAO, H.-X. et al. Effects of low temperature and drought on the physiological and growth changes in oil palm seedlings. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 14, p. 2630-2637, Apr. 2011.
- COTTEE, N. S. et al. Simple electrolyte leakage protocols to detect cold tolerance in cotton genotypes. In: WORLD COTTON RESEARCH CONFERENCE, 4., 2007, Lubbock. **Proceedings...** Lubbock: [s.n.], 2007. p. 1-9.
- DOUST, A. N. et al. Foxtail millet: a sequence-driven grass model system. **Plant Physiology**, Lancaster, v 149, n. 1, p. 137-141, Jan. 2009.

EAGLES, C. F. The effect of temperature on vegetative growth in climatic races of *dactylis glomerata* in controlled environments. **Annals of Botany**, London, v. 31, n. 121, p. 31-39, Jan. 1967.

HOLADAY, A. S. et al. Changes in activities of enzymes of carbon metabolism in leaves during exposure of plants to low temperature. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 98, n. 3, p. 1105–1114, Mar. 1992.

KROL, M.; HUNER, N. P. A. Growth and development at cold-hardening temperatures. Pigment and benzoquinone accumulation in winter rye. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 63, n. 4, p. 716-721, 1985.

KUBIEN, D. S.; SAGE, R. F. Low-temperature photosynthetic performance of a C4 grass and a co-occurring C3 grass native to high latitudes. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 27, n. 7, p. 907-916, July 2004.

KUMAR, K.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Reference genes for quantitative real-time PCR analysis in the model plant foxtail millet (*Setaria italica* L.) subjected to abiotic stress conditions. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v. 115, n. 1, p. 13–22, Oct. 2013.

LATA, C. et al. Association of an SNP in a novel DREB2-like gene SiDREB2 with stress tolerance in foxtail millet [*Setaria italica* (L.)]. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 10, p. 3387-3401, June 2011.

_____. Genome-wide investigation and expression profiling of AP2/ERF Transcription factor superfamily in foxtail millet (*Setaria italica* L.). **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 11, p. 1-14, Nov. 2014.

LATA, C.; PRASAD, M. *Setaria* genome sequencing: an overview. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, Berlin, v. 22, n. 3, p. 257–260, July 2013.

_____. Validation of an allele specific marker associated with dehydration stress tolerance in a core set of foxtail millet accessions. **Plant Breeding**, Berlin, v. 132, n. 5, p. 496-499, Oct. 2012.

LI, C. et al. An ABA-responsive DRE-binding protein gene from *Setaria italica*, SiARDP, the target gene of SiAREB, plays a critical role under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 65, n. 18, p. 5415-5427, Oct. 2014.

LI, J. et al. SiASR4, the target gene of SiARDP from *Setaria italica*, improves abiotic stress adaption in plants. **Frontiers in Plant Science**, Lausanne, v. 7, p. 2053, Jan. 2017.

LI, P.; BRUTNELL, T. P. *Setaria viridis* and *Setaria italica*, model genetic systems for the Panicoid grasses. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 9, p. 3031–3037, May 2011.

MARTINS, P. K. et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. **Scientific Reports**, London, v. 6, p. 1-10, June 2016.

MARUYAMA, S.; YATOMI, M.; NAKAMURA, Y. Response of rice leaves to low temperature I. Changes in basic biochemical parameters. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 31, n. 3, p. 303–309, Jan. 1990.

McWILLIAM, J. R.; KRAMER, P. J.; MUSSER, R. L. Temperature-induced water stress in chilling-sensitive plants. **Australian Journal of Plant Physiology**, Collingwood, v. 9, n. 3, p. 343-352, 1982.

MERTZ, L. M. et al. Alterações fisiológicas em sementes de arroz expostas ao frio na fase de germinação. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 254-262, 2009.

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

NAIDU, S. L.; LONG, P. S. Potential mechanisms of low-temperature tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus giganteus*: an in vivo analysis. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 1, p. 145-155, Nov. 2004.

OBERHUBER, W.; EDWARDS, E. G. Temperature dependence of the linkage of quantum yield of photosystem II to CO₂ fixation in C₄ and C₃ plants. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, p. 507-512, Feb. 1993.

PEARCY, R. W. Acclimation of photosynthetic and respiratory carbon dioxide exchange to growth temperature in atriplex lentiformis (Torr.) wats. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 59, n. 5, p. 795-799, May 1977.

PERBONI, A. T. et al. Baixas temperaturas sobre a fl uorescência da clorofi la a em plantas de diferentes híbridos de canola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 2, p. 215-222, fev. 2015.

PITTERMANN, J.; SAGE, R. F. Photosynthetic performance at low temperature of *Bouteloua gracilis* Lag., a high-altitude C₄ from the Rocky Mountains, USA. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 23, n. 8, p. 811-823, Aug. 2000.

POLLOCK, C. J.; LLOYD, J. The effect of low temperature upon starch, sucrose and fructan synthesis in leaves. **Annals of Botany**, London, v. 60, n. 2, p. 231–235, Aug. 1987.

POSPÍSIL, P.; SKOTNICA, J.; NAUS, J. Low and high temperature dependence of minimum F and maximum 0 F chlorophyll fluorescence in vivo. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 12, n. 1363, p. 95-99, Feb. 1998.

RIZZA, F. et al. Use of chlorophyll fuorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. **Plant Breeding**, Berlin, v. 120, n. 5, p. 389-396, Oct. 2001.

RÜTTEN, D.; SANTARIUS, K. A. Age-related differences in frost sensitivity of the photosynthetic apparatus of two *Plagiomnium* species. **Planta**, Berlin, v. 187, n. 2, p. 224-229, May 1992.

SAGE, R.; KUBIEN, D. S. The temperature response of C3 and C4 photosynthesis. **Plant, Cell and Environment**, Hoboken, v. 30, n. 1, p. 1086-1106, Sept. 2007.

SANTOS, M. L. et al. CAN *Setaria viridis* (A 10.1) be used as model plant for validation of genes for salinity tolerance? In: SÍMPOSIO BRASILEIRO DE SALINIDADE, 3., 2017, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Inovagri, 2017. p. 1-8.

SMILLIE, R. M.; NOTT, R. Assay of chilling injury in wild and domestic tomatoes based on photosystem activity of the chilled leaves. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 63, n. 5, p. 796–801, May 1979.

TREHARNE, K. J.; COOPER, J. P. Effect of temperature on the activity of carboxylases in tropical and temperate gramineae. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 170–175, Feb. 1969.

TREHARNE, K. J.; EAGLES, C. F. Effect of temperature on photosynthetic activity of climatic races of *Dactylis glomerata* L. **Photosynthetica**, Prague, v. 4, p. 107-117, 1970.

YORDANOV, I. Response of photosynthetic apparatus to temperature stress and molecular mechanisms of its adaptations. **Photosynthetica**, Prague, v. 26, p. 517-531, Jan. 1992.

ANEXO A - Tabelas

Tabela 1 - ANOVA das variáveis que avaliam a fluorescência do fotossistema da planta em estresse de frio. (Continua)

F					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Temperatura	5	83747,87	16749,57	39,47	<2E-16***
Acesso	4	61727,69	15431,92	36,37	<2E-16***
Temperatura*Acesso	20	15931,43	796,57	1,88	0.0142*
Resíduo	270	114577,60	424,36		
Total	299	275984,59			
Fm					
Temperatura	5	5188798,15	1037759,63	277,68	<2E-16***
Acesso	4	2783683,57	695920,89	186,21	<2E-16***
Temperatura*Acesso	20	2693897,83	134694,89	36,04	<2E-16***
Resíduo	270	1009072,70	3737,31		
Total	299	11675452,25			
Y					
Temperatura	5	7,94	1,59	853,25	<2E-16***
Acesso	4	1,31	0,33	176,52	<2E-16***
Temperatura*Acesso	20	2,00	0,10	53,69	<2E-16***
Resíduo	270	0,50	0,00		
Total	299	11,76			
Taxa de Assimilação Líquida de CO₂					
Temperatura	5	87368,76	17473,75	1361,56	<2E-16***
Acesso	3	35537,45	11845,82	923,03	<2E-16***
Temperatura*Acesso	15	29971,18	1998,08	155,69	<2E-16***
Resíduo	696	8932,18	12,83		
Total	719	161809,57			
Condutância estomática					
Temperatura	5	3,85	0,77	606,91	<2E-16***
Acesso	3	0,61	0,20	160,91	<2E-16***
Temperatura*Acesso	15	1,13	0,08	59,61	<2E-16***
Resíduo	696	0,88	0,00		
Total	719	6,47			
Concentração Interna de Carbono					
Temperatura	5	6483854,79	1296770,96	11,72	<2E-16***
Acesso	3	3174723,63	1058241,21	9,56	<2E-16***
Temperatura*Acesso	15	6758274,88	450551,66	4,07	<2E-16***
Resíduo	696	77030926,34	110676,62		
Total	719	93447779,63			
Transpiração					
Temperatura	5	2201,89	440,38	1157,43	<2E-16***
Acesso	3	1128,26	376,09	988,46	<2E-16***
Temperatura*Acesso	15	545,36	36,36	95,56	<2E-16***
Resíduo	696	264,81	0,38		
Total	719	4140,33			

Tabela 1 - ANOVA das variáveis que avaliam a fluorescência do fotossistema da planta em estresse de frio.

(Conclusão)

Eficiência do Uso de Água					
Temperatura	5	6946,73	1389,35	6,23	<2E-16***
Acesso	3	1327,18	442,39	1,98	<2E-16***
Temperatura*Acesso	15	10830,66	722,04	3,24	<2E-16***
Resíduo	696	155176,95	222,96		
Total	719	174281,53			
Eficiência do Assimilação de Carbono					
Temperatura	5	4,68	0,94	248,38	<2E-16***
Acesso	3	13,32	4,44	1177,94	<2E-16***
Temperatura*Acesso	15	4,87	0,32	86,08	<2E-16***
Resíduo	696	2,62	0,00		
Total	719	25,48			

Fonte: Dados do autor (2018).

***, ** e *: Diferença estatisticamente significativa a 0,1; 1 e 5%, respectivamente.

Tabela 2 - ANOVA das variáveis que avaliam a fluorescência do fotossistema da planta em recuperação, após estresse de frio.

(Continua)

Taxa de Assimilação Líquida de CO₂					
FV	Gl	SQ	QM	F	Pr(>F)
Tempo	2	35183,03	17591,51	588,216	<2E-16***
Acesso	5	50639,9	10127,98	338,654	<2E-16***
Tempo*Acesso	10	36688,52	3668,852	122,677	<2E-16***
Resíduo	522	15611,22	29,90655		
Total	539	138122,7			
Condutância Estomática					
Tempo	2	1,95	0,98	442,00	<2E-16***
Acesso	5	2,16	0,43	195,49	<2E-16***
Tempo*Acesso	10	2,29	0,23	103,73	<2E-16***
Resíduo	522	1,15	0,00		
Total	539	7,56			
Concentração Interna de Carbono					
Tempo	2	3195905,09	1597952,55	377,98	<2E-16***
Acesso	5	3229469,94	645893,99	152,78	<2E-16***
Tempo*Acesso	10	3636664,13	363666,41	86,02	<2E-16***
Resíduo	522	2206803,70	4227,59		
Total	539	12268842,86			
Transpiração					
Tempo	2	824,25	412,12	561,63	<2E-16***
Acesso	5	1414,23	282,85	385,45	<2E-16***
Tempo*Acesso	10	911,15	91,11	124,17	<2E-16***
Resíduo	522	383,04	0,73		
Total	539	3532,66			

Tabela 2 - ANOVA das variáveis que avaliam a fluorescência do fotossistema da planta em recuperação, após estresse de frio.

(Conclusão)

Eficiência do Uso de Água					
Tempo	2	3308,27	1654,14	261,39	<2E-16***
Acesso	5	2713,66	542,73	85,76	<2E-16***
Tempo*Acesso	10	4158,71	415,87	65,72	<2E-16***
Resíduo	522	3303,35	6,33		
Total	539	13483,994			
Eficiência da Assimilação de Carbono					
Tempo	2	3,308	1,654	261,3	0,0000
Acesso	5	2,71	542,73	85,76	0,0000
Tempo*Acesso	10	4,15	415,87	65,71	0,0000
Resíduo	522	3,30	6,32		
Total	539	13,468			

Fonte: Dados do autor (2018).

***; ** e *: Diferença estatisticamente significativa a 0,1; 1 e 5%, respectivamente