



Universidade Federal do Ceará
Faculdade de Medicina De Sobral
Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia

Raulzito Fernandes Moreira

Alteração no perfil de expressão dos genes de folhas de Cajueiro CCP76
(*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino

Sobral
2014

Raulzito Fernandes Moreira

**Alteração no perfil de expressão dos genes de folhas de Cajueiro CCP76
(*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape
Silva da Cunha

**Sobral
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- M839a Moreira, Raulzito Fernandes.
 Alteração no perfil de expressão dos genes de folhas de cajueiro CCP76 (*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino. / Raulzito Fernandes Moreira. – 2014.
 60 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.
 Área de Concentração: Macromoléculas.
 Orientação: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha.
1. Cajueiro. 2. *Anacardium*. 3. I. Título

CDD 660.6

Raulzito Fernandes Moreira

**Alteração no perfil de expressão dos genes de folhas de Cajueiro CCP76
(*Anacardium occidentale* L.) em resposta ao estresse salino**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha

Aprovada em ___/___/_____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha (Orientador)

Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Prof. Dr. João Garcia Alves Filho

Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

Prof. Dr. Luiz Ferreira Aguiar Ponte

Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA

A meu avô Noberto Rodrigues Moreira (*in memoriam*),

dedico honrosamente.

Agradecimentos

À Deus pelo dom da vida, tão sábio que a fez com um alfabeto simples dividido por todos os seres. Por todos os aprendizados, momentos felizes e de arbítrio. Pela companhia nos bons momentos e de dificuldade.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, que transformou o conhecimento teórico em conhecimento palpável. Pela seleção “tortuosa” enfrentada para entrar no NUBIS. Pela confiança para realização da presente pesquisa.

Aos meus amigos João Garcia Alves Filho, Daniel Brito, Ricardo Basto Souza e Maria Auxiliadora Sousa Oliveira, pelo apoio durante os primeiros passos no plano científico. Pela ajuda na realização de forma direta e indireta da presente pesquisa. Momentos felizes, difíceis, divergência de opinião e “o sem medo de perder a piada”.

A minha “trupe” formada por Aurilene Gomes Cajado, Jedson Antonio de Sousa Aragão, Vitória Virginia Magalhães Soares, Áurea Morgana Silveira Vasconcelos e Nayanne Hardy Lima Pontes. Pela amizade, crescimento, momentos felizes e enfrentamento das primeiras dificuldades juntos.

A meu orientador do PROPAG, José Jackson do Nascimento Costa por todo apoio, paciência e amizade.

Aos integrantes e ex-integrantes do Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, pela colaboração. A saber: Antônio Francisco de Sousa, Bruno Bezerra Carneiro, Maria Amélia Araújo Soares, Monica Valeria, Cleane Gomes Moreira, Flávia Muniz de Mesquita, Crislays Maria Pereira Fontenele, Maria Gleiciane de Queiroz Martins e Mariana Silva.

As amigas Maria Nágila Carneiro Matos, e Tatiana Maria Farias Pinto, com as quais aprendi muito.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro essencial a realização desta conquista.

A mina namorada Renata Ferreira Nascimento pelo apoio, amizade e compreensão.

Aos meus pais, Maria Angelina e Francisco Antônio Moreira, pelo amor, apoio incondicional e herança de não desistir.

A Francisco Antonio Fernandes Moreira, Analberto Jardas Fernandes Moreira e Jaine Fernandes Moreira pelo apoio, amizade, conselhos e união.

“O conhecimento só é uma ferramenta de libertação da ignorância se for repassado”.

Raulzito Fernandes Moreira

Resumo

O estresse salino é apontado como tendo impactos negativos sobre a produção de cultivares de interesse comercial. Nos últimos anos os estudos têm focado na pesquisa e no entendimento dos mecanismos utilizados pelas plantas que toleram esse tipo de estresse naturalmente. Dentre as espécies que toleram ao estresse salino encontra-se *Anacardium occidentale* L. ou popularmente conhecida como Cajueiro. Trabalhos na literatura já descrevem mecanismos que esse cultivar pode utilizar para suportar a condição de estresse. Contudo, estudos adicionais que permitam obter uma visão global do processo são requeridos para um melhor entendimento das vias que estão envolvidas em resposta ao estresse salino no Cajueiro. O presente trabalho objetivou a avaliação da expressão global de genes em folhas de Cajueiro CCP76 com base no perfil transcriptômico em condições normais e de estresse. Para tanto, fez-se indução do estresse salino com 150 mM de NaCl e as coletas de folhas foram realizadas após 1, 3, 6 e 12 horas da adição do sal. O transcriptoma das folhas foi montado utilizando-se o programa *Velvet*. Por fim, os dados identificados pela ferramenta BLAST foram classificados com base no *Gene Ontology* (GO) e *KEGG Pathways*. Os dados obtidos foram utilizados na análise comparativa entre às plantas em estresse salino e o controle. Foram obtidos um total de 9.133.193 e 10.787.002 leituras para condição controle e estresse, respectivamente. Os resultados revelaram que os *contigs* com coberturas maiores que 50 vezes estavam relacionados as vias de produção de aminoácidos, metabólitos secundários e enzimas antioxidativas. Tais resultados mostram as mudanças metabólicas sofridas pela espécie em estudo para adequação às condições de estresse. Em suma, pôde-se observar de forma eficiente as mudanças globais no metabolismo do cajueiro para adaptação a condição de estresse. Os resultados aumentam as informações sobre as possíveis vias que *Anacardium occidentale* L. usa para tolerar a condição de estresse, além de apontarem para elucidação de novos mecanismos usada por tal organismo. Esse é o primeiro trabalho na literatura que analisou os impactos em transcritos nas primeiras horas de estresse salino em cajueiro.

Palavras-chave: Transcriptômica, Estresse Salino, Cajueiro, Folha.

Abstract

Salt stress is touted as having negative impacts on the production of commercial cultivars interest. In recent years studies have focused on the research and understanding of the mechanisms used by plants to tolerate this kind of stress naturally. Among the species that tolerate salt stress is *Anacardium occidentale* L. or popularly known as Cashew. Studies in the literature have described the mechanisms that this cultivar can use to support the stress condition. However, additional studies to obtain an overall view of the process are required for a better understanding of the pathways that are involved in response to salt stress in Cashew. This study aimed to evaluate the global gene expression in leaves Cashew CCP76 based on transcriptomic profile in normal and stress condition. As such, there is induction of salt stress with 150 mM NaCl and collections of leaves were performed after 1, 3, 6 and 12 hours of salt addition. The leaves transcriptome assembled using the Velvet program. Finally, the data identified by the BLAST tool and were classified based on Gene Ontology (GO) and KEGG Pathways. The data were used in the comparative analysis between the plants in salt stress and control. A total of 9,133,193 and 10,787,002 reads were obtained for the control condition and stress, respectively. The results showed that *contigs* with covers greater than 50 times were related pathways for the production of amino acids, secondary metabolites and antioxidative enzymes. These results show metabolic changes undergone by the species under for adaptation to stress conditions. In short, it can be observed efficiently global changes in the metabolism of cashew for adaptation to stress condition. The results augment the information about possible routes that *Anacardium occidentale* L. uses to tolerate the stress condition, and also point to elucidate new mechanisms used by this organism. This is the first work in the literature that examined the impacts on transcripts in the early hours of salt stress on cashew.

Keywords: Transcriptome, Salt Stress, Cashew, Leaf.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ArRBG2	Proteína rica em glicina ligante a RNA
BLAST	Ferramenta de pesquisa de alinhamento básico local
BLASTX	Ferramenta de pesquisa de alinhamento básico local (nucleotídeo-proteína)
BVOCs	Compostos orgânicos voláteis
cDNA	DNA complementar
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GO	<i>Gene Ontology</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes</i>
miRNA	Micro RNA
mRNA	RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	RNA não codificante
RBP	Proteínas ligantes a RNA
RNA	Ácido ribonucleico
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA
rRNA	RNA ribossômico
siRNA	RNA de interferência
RPKM	Número de leituras por kilobase por milhão de leituras mapeadas
Srp	Proteína ribossomal
UniProt	Pesquisa Universal de Proteínas

Sumário

1 Introdução.....	12
2 Revisão de Literatura.....	13
3 Objetivos.....	21
4 Material e Métodos.....	22
5 Resultados e Discussões	
5.1 Condições de coleta.....	25
5.2 Dados de montagem do transcriptoma <i>De novo</i>.....	25
5.3 Identificação das sequências com base no BLAST.....	27
5.4 Termos de GO e <i>KEGG pathways</i>.....	32
6 Conclusão.....	40
Referências Bibliográficas.....	41
Apêndices.....	48

1 Introdução

Um dos problemas enfrentados pela agricultura na atualidade é a salinização dos solos. A salinidade quebra com o ciclo de vida dos vegetais por meio do estresse salino, impactando no crescimento e produção do cultivar. Em culturas de interesse comercial afeta a lucratividade.

Diante deste cenário, pesquisas têm sido realizadas pela busca de meios para tolerar ao estresse salino e superar os impactos negativos na morfofisiologia da planta. Uma das vertentes é o entendimento dos mecanismos utilizados em espécies que são naturalmente tolerantes a esse tipo de situação. Os trabalhos têm focado no estudo de espécies de deserto e do semiárido. Em tais ambientes, os vegetais estão impostos a vários tipos de estresse abiótico.

Os resultados colhidos têm permitido aos pesquisadores elaborarem de melhor forma programas de melhoramento genético e transgênicos. Existem relatos na literatura de transgênicos com eficiência de crescimento aumentada em solos salinizados. Dessa forma, o entendimento das vias utilizadas pelos vegetais naturalmente resistentes é de extrema relevância.

Nesse contexto entra *Anacardium occidentale* L., espécie moderadamente adaptada às condições do semiárido nordestino. É sabido na literatura de algumas vias que o espécie utiliza para tolerar a salinidade. A mais conhecida é a via de acumulação de prolina e outros aminoácidos livres nas folhas e raízes. Contudo, estudos adicionais são requeridos para se ter um melhor entendimento do panorama das mudanças ocorridas no metabolismo do cajueiro diante à condição de estresse.

Recentemente, as atuais tecnologias de sequenciamento têm permitido a obtenção das mudanças globais ocorridas nos vegetais durante o estresse salino. Sendo aplicada com êxito em espécies que possuem poucas informações moleculares. Assim, a aplicação dessa metodologia em cajueiro pode fornecer dados relevantes sobre a resposta de tal espécie a salinidade.

2 Revisão de Literatura

2.1 *Anacardium occidentale* L.

O cajueiro, *Anacardium occidentale* L., é uma espécie encontrada em praticamente todos os estados brasileiros, porém melhor adaptada às condições climáticas do litoral nordestino, sendo sua distribuição normalmente confundida pela dispersão por cultivo (MITCHELL e MORI, 1987). A espécie é nativa da América tropical e o Brasil é considerado o provável centro de origem da espécie (HARLAN e WET, 1973). Pertencente à família Anacardiaceae, a qual possui 60 a 74 gêneros e 400 a 600 espécies de árvores, arbustos, subarbustos e trepadeiras ocorrendo principalmente em climas tropicais e subtropicais (PAIVA; CRISÓSTOMO; BARROS, 2003). O gênero *Anacardium* possui 21 espécies, mas *A. occidentale* a única espécie cultivada comercialmente.

Extensas populações nativas são encontradas ao longo do território nacional, apresentando uma grande diversidade morfológica. O seu centro principal de diversidade encontra-se na região Amazônica, existindo um centro secundário nos cerrados do planalto central brasileiro. No mundo, a árvore é pantropical, principalmente de regiões costeiras, possuindo uma distribuição que se estende desde o México, Índia, passando pelo Brasil e alcançando o Peru (JOHNSON, 1974).

Por ser uma espécie predominantemente de fecundação cruzada, o que tem colaborado para a alta heterogeneidade entre as plantas nos pomares, os programas de melhoramento genético do cajueiro vêm sendo direcionados para a obtenção de clones, que é facilitada pela possibilidade de multiplicação assexuada dos melhores indivíduos em qualquer etapa do programa.

Na natureza, existem basicamente dois tipos de cajueiro: o cajueiro comum e o cajueiro anão precoce. O cajueiro comum é o mais predominante no Nordeste ocorrendo de forma natural sem a necessidade de plantio. Ele apresenta porte elevado, com altura variando entre 8 e 15 m e extensão da copa podendo atingir até 20 m, dependendo das condições de clima, solo e sanidade (CRISÓSTOMO et al., 2001). O segundo tipo de cajueiro é conhecido como anão-precoce (cajueiro de 6 meses), e é caracterizado, principalmente pelo seu porte baixo, com altura entre 3 e 4 m e copa atingindo até 9 m (LIMA, 1988). O tipo anão-precoce também é caracterizado pela precocidade, iniciando

o florescimento entre 6 e 18 meses contra os cinco a sete meses do tipo comum (CAVALCANTI et al., 2009).

Apesar da sua relativa adaptação às condições do semiárido nordestino, o cajueiro sofre bastante com as condições adversas do ambiente regional, principalmente a baixa fertilidade e salinização dos solos, escassez de água e as elevadas taxas de luminosidade e temperatura.

2.2 *Anacardium occidentale* L. x Salinidade

A salinidade é apontada na literatura como limitante do crescimento e produção de cultivares de importância econômica. Esses efeitos têm impactos que atingem várias esferas de economia. Estima-se que 30% das áreas irrigadas no planeta já sofrem com o problema da salinidade (Unesco Water Portal, 2014). Nesse contexto, muitos trabalhos têm sido realizados para superar esse cenário. Uma das vertentes é o entendimento dos mecanismos que espécies resistentes a esse tipo de condição utilizam para superar o estresse salino. Tem-se conseguido com sucesso produzir transgênicos com base nas informações de mecanismos de tolerância e resistência a salinidade.

Nesse cenário entra o cajueiro, uma espécie de importância econômica para o semiárido nordestino e bem adaptada às condições dessa região. Nesse ambiente a espécie está exposta à seca, salinidade, altas temperaturas e alta radiação (CAVALCANTI et al, 2004; FERREIRA-SILVA et al, 2011). Contudo, segundo Ferreira-Silva e colaboradores (2008) apresenta bom crescimento nas condições citadas.

Muitos trabalhos de fisiologia e bioquímica têm sido realizados com o cajueiro no intuito de entender os mecanismos que a espécie usa para tolerar as condições de estresse. Silveira e colaboradores (2003) demonstraram acúmulo de prolina em folhas de *Anacardium occidentale* L. frente à condição de estresse salino. Tal via parece ser conservada para alguns vegetais, apresentando importância para a osmoproteção, reserva de carbono e nitrogênio, estabilização de proteínas e membranas (SILVEIRA et al, 2003; SZABADOS e SAVOURE, 2009).

Além disso, o aumento de vias antioxidativas enzimáticas e não enzimáticas vêm sendo descritas para a espécie em resposta a condição de estresse. Ferreira-Silva e colaboradores (2012) demonstraram aumento da atividade de Catalase atrelado ao aumento da concentração de NaCl. Contudo, doses altas de NaCl tendem a diminuir o

peso seco das folhas de cajueiro, deste modo a concentração de sal está ligada a severidade do estresse (FERREIRA-SILVA, 2011). Essa resistência à salinidade parece ser comum para espécies correlatas, *A. occidentale* e *A. microcarpum* (SILVEIRA et al, 2012).

Trabalhos na literatura sustentam a tolerância do cajueiro a salinidade. Contudo, estudos adicionais que permitam a visualização panorâmica das mudanças, podem estender o entendimento das vias utilizadas pela espécie diante ao estresse salino, principalmente das vias iniciais que permitem a ocorrência das mudanças subsequentes.

2.3 Respostas dos vegetais a salinidade

O estresse salino quebra o ciclo normal de vida das plantas, pois afeta o crescimento celular e fotossíntese primordialmente (MUNNS et al, 2006). Com relação a fotossíntese, limita a difusão de gases e leva ao estresse oxidativo. Além disso, a salinidade prolongada pode causar dois impactos principais: hiper estresse iônico e hiper estresse osmótico (CHAVES et al, 2009). Outros efeitos são: dificuldade na absorção de água, diminuição da absorção de nutrientes, atividade enzimática e efeitos negativos no metabolismo de modo geral (HAJLAOUI et al, 2006).

A complexidade dos efeitos negativos reflete na complexidade de respostas. Além disso, a resposta ao estresse salino pode ser espécie-específica. Adicionalmente, a resposta a esse estresse abiótico envolve várias vias celulares, tendo impactos sobre a expressão global de genes, mudanças pós-traducionais e utilização das moléculas já disponíveis na célula para modular essas mudanças. Essas características dificultam o estudo e o entendimento desse tipo de estresse sobre os vegetais (ZIEMANN et al, 2013).

Contudo, segundo Chaves e colaboradores (2009) há duas vertentes principais de respostas ao estresse salino: resposta ao estresse osmótico e iônico. Segundo Xiong e Zhu (2002) a resposta dos vegetais diante ao estresse abiótico pode ser categorizada em três tipos: manutenção da homeostase, desintoxicação e recuperação do crescimento.

São várias as descrições de vias relacionadas a respostas a salinidade. A mais citada é o ajuste osmótico com base na prolina e outros aminoácidos livres. Carboidratos e metabólitos secundários também são exemplos de controladores da pressão osmótica.

As mudanças também incluem regulação epigenética e síntese de RNAs não codificantes (ncRNA) (URANO, 2010). Regulação positiva da expressão de proteínas ligantes de RNA (RBPs) tem sido relacionada a um aumento da tolerância ao estresse osmótico e de temperatura (AMBROSONE, 2012). Tais proteínas participam do metabolismo do RNA: processamento, transporte, estabilidade e tradução. Além disso, parecem funcionar como chaperonas de mRNA, assim, permitindo uma maior expressão da molécula ou produção micro RNAs (miRNA) ou RNAs de interferência (siRNA) (JACOBSEN et al, 2010).

Outra via utilizada pelos vegetais para tolerar o estresse é a ativação da degradação de proteínas via ubiquitina (CUI et al, 2013). Os vegetais também usam como estratégia o transporte de íons através de proteínas transportadoras (HILL et al, 2013). Vias de fosforilação estão envolvidas no processo de defesa da planta diante ao estresse salino, a guisa de exemplo, calmodulina e 14-3-3. As mesmas medeiam as mudanças iniciais que permitem a aquisição da tolerância e resistência.

As vias antioxidativas enzimáticas e não enzimáticas têm importância na resposta à salinidade. Nos últimos anos aumento da produção de metabólitos secundários têm sido relatados como antioxidantes primários e indicadores de resposta ao estresse salino.

2.3.1 Vias celulares de proteção ao estresse oxidativo

2.3.1.1 Vias enzimáticas e da Glutathione

O estresse oxidativo é um dos efeitos da salinidade sobre as plantas. Os radicais livres causam danos ao material genético, lipídeos e proteínas, podendo levar a morte celular via apoptose (KOHEN e NYSKA, 2002). Contudo, as células possuem vias de proteção contra essas moléculas. Tais vias podem ser enzimáticas e não enzimáticas. Na primeira, ocorre ação de enzimas antioxidativas como a catalase (CAT), superóxido desmutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx). Já no segundo caso, moléculas como a vitamina E, vitamina C, bilirrubina e Glutathione reagem diretamente com espécies reativas de oxigênio (EROs) (GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Todas essas proteínas com atividade antioxidativa possuem a regulação dos seus genes via fator nuclear eritroide-2 (Nrf-2) através da ligação a segmentos específicos da molécula de DNA, denominados elementos de resposta antioxidante (do inglês “*antioxidant response element*” ou ARE) (LEE e JOHNSON, 2004; GONZÁLEZ-

BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). A ação das enzimas antioxidativas é específica para a espécie reativa de oxigênio. Por exemplo, a CAT converte o peróxido de hidrogênio em água, enquanto a SOD produz oxigênio e peróxido de hidrogênio via dismutação do superóxido (MATES, 2000; VALKO et al, 2006). Já a GPx utiliza a glutationa como substrato para reação de redução dos hidroperóxidos (ARTHUR, 2000).

Dentre os compostos não enzimáticos responsáveis pela desintoxicação das células, a Glutathione é o que apresenta maior concentração em todos os organismos, atuando na proteção de vias com funções vitais (GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012). Sua ação se dá pela presença de três aminoácidos que tornam possível a permuta de formas da proteína, a forma reduzida da glutathione (GSH) e a oxidada (GSSG). Esses aminoácidos são: cisteína, glicina e glutamato. Em sua forma ativa (GSH) a glutathione doa prótons via cisteína (OWEN et al, 2010). Em condições fisiológicas normais a forma GSH predomina sobre GSSG. Essa proteína pode reagir diretamente com os EROs ou servir como coenzimas (AOYAMA et al, 2008). Entretanto, em quantidades excessivas de espécies reativas de oxigênio as vias endógenas são saturadas, dando origem ao estresse oxidativo. Ainda, dentro da via não enzimática os metabólitos secundários vêm ganhando espaço na resposta a salinidade como moléculas antioxidantes primárias.

2.3.1.2 Metabólitos secundários: Terpenos e Flavonóides.

Terpenos são uma classe variada de moléculas naturais biosintetizadas a partir de isoprenos. Esses compostos estão presentes em bactérias, fungos, algas, plantas e alguns animais (BOER e LEEUWEN, 2012) apresentam mais de 30.000 metabólitos secundários que demonstram variadas atividades endógenas, como a proteção de plantas contra vírus e bactérias, bem como participação na geração de alguns fitohormônios (PETERS, 2010). Em vegetais essas moléculas são abundantes nos óleos essenciais e látex. Terpenos podem ocorrer naturalmente na forma de hemiterpenos (uma unidade de isopreno, C₅), monoterpenos (duas unidades de isopreno, C₁₀), sesquiterpenos (três unidades de isopreno, C₁₅), diterpenos (quatro unidades de isopreno, C₂₀), triterpenos (seis unidades de isopreno, C₃₀), tetraterpenos (oito unidades de isopreno, C₄₀) e politerpenos (oito unidades de isopreno < n > 30,000; C_{5n}) (RUZLICKA, 1953; GONZÁLEZ-BURGOS e GÓMEZ-SERRANILLOS, 2012).

Flavonóides são encontrados principalmente em frutas, verduras e seus derivados. Várias espécies de plantas tropicais apresentam em suas partes fontes valiosas de

polifenóis. De modo geral os flavonóides apresentam em sua constituição dois anéis aromáticos (A e B). Dependendo de sua origem os flavonóides podem ser divididos em sete classes: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavonóides, antocianinas e isoflavonas (VAUZOUR et al, 2008). Essas substâncias participam de pelos menos três vias metabólicas: metabolismo oxidativo, P450 e conjugação com grupos tiol (principalmente GSH) (SPENCER et al, 2003).

Ambas as moléculas são descritas como potentes antioxidantes, tanto que são objetos de estudo pela busca de novas drogas. Nos últimos anos têm ganhado destaque por sua produção ser aumentadas em condições de estresse salino. Essa característica vem sendo explorada pelos pesquisadores que trabalham com o isolamento de tais moléculas. Além do efeito antioxidante dos metabólitos secundários, a comunicação mediada por tais moléculas têm ganhado importância como mecanismo de resposta à condição de estresse abiótico.

2.3.2 Metabólitos secundários como indicadores da resposta a salinidade.

Os compostos orgânicos voláteis (BVOCs) desempenham importantes funções nos vegetais no que diz respeito à comunicação entre os tecidos, plantas e outros organismos (LORETO e SCHNNITZLER, 2010). Nos últimos anos tais compostos vêm sendo apontados como tendo relação com a resposta da planta ao estresse biótico e abiótico. Em trabalho de revisão Loreto e Schnitzler (2010) relataram que o aumento na emissão de BVOCs culmina em mudanças de comunicação com outros organismos, além disso, influencia no ciclo fotoquímico.

Há pelo menos três vias para produção dos compostos orgânicos voláteis, são elas, via dos terpenos, oxilipídios e Chiquimato (Flavonóides) (FEUSSNER et al, 2002; LORETO e SCHNNITZLER, 2010). Além desses BVOCs, tem-se a produção de álcoois e metano. Ambas as moléculas parecem ser importantes para comunicação planta-planta (LORETO e SCHNNITZLER, 2010). Metano, Metanol e compostos derivados da via dos oxilipídeos estão envolvidos em reportar o estado em que planta se encontra (LORETO e SCHNNITZLER, 2010).

Dados na literatura apontam que em condições de estresse, os BVOCs podem ser sintetizados a partir de fontes de carbono fixado em eventos passados (SCHNITZLER et al, 2010). O aumento da expressão dessas vias pode ter relação com a resposta frente

ao estresse oxidativo, salino e térmico, ou ainda, proteção contra herbivoria (COSTA et al, 2013). Das vias citadas, parece haver uma preferência pelos vegetais da utilização da via dos terpenos, isso devido à limitação de sua produção por períodos específicos depois do estresse (GUENTHER et al, 1995; LORETO e SCHNNITZLER, 2010).

Embora haja muita especulação sobre os efeitos positivos do estresse abiótico na produção de terpenóides, ainda não há um consenso para explicar esse fato (LORETO e SCHNNITZLER, 2010). Uma das hipóteses levantadas reza que os terpenos funcionam como antioxidantes primários frente à condição de estresse enquanto outras vias são ativadas pela célula vegetal (LORETO et al, 2001; AFFEK e YAKIR, 2002; VICKERS, 2009).

A emissão de BVOCs é limitada em condições de seca, estresse salino e temperatura (TEUBER et al, 2008; LORETO e SCHNNITZLER, 2010). Esse estado é provocado devido aos efeitos das condições ambientais citadas sobre a fotossíntese e estômatos. Contudo, a produção de terpenos parece não cessar, visto que ao conseguir retorno a um status fisiológico normal ocorre uma repentina emissão de BVOCs (LORETO e DELFINE, 2000; LORETO et al, 2004). No que diz respeito ao Cajueiro, parece não haver trabalhos na literatura que discutam sobre um possível aumento da via de produção de terpenos ou outros compostos que possam dar origem a BVOCs diante as condições de estresse citadas.

2.4 Análises transcriptômicas x Estresse salino.

As atuais tecnologias de sequenciamento têm permitido a obtenção de genomas inteiros em pouco tempo, bem como a de transcriptomas em diferentes organismos (WANG et al, 2010). Assim, muitos trabalhos vêm usando essas plataformas para a obtenção de dados moleculares inéditos para várias espécies. Algumas destas tecnologias permitem a construção de transcriptomas de organismos que ainda não possuem genoma de referencia ou que apresentam poucos dados moleculares conhecidos, *Ipomoea batatas* (WANG et al, 2010), *Cicer arietinum* L. (GARG et al, 2011).

O sequenciamento de RNA (RNA-Seq) vem sendo utilizado com sucesso em trabalhos que visam entender os mecanismos que as plantas utilizam para superar a condição de estresse salino. Geralmente a metodologia é aplicada em espécies expostas a habitats extremos, tais como semiárido e desertos (XU et al, 2013; DANG et al, 2013).

As análises baseiam-se na diferença da expressão global de genes. O resultado é o panorama das vias utilizadas pelas espécies que toleram a resistem a salinidade.

Alves Filho (2013) relatou a utilização de RNA-Seq para a montagem do primeiro esboço de transcriptoma de sementes de cajueiro. Nesse contexto, a utilização de tal metodologia em cajueiro pode expandir os conhecimentos sobre os mecanismos utilizados pela espécie frente à condição de estresse salino. Ainda, a obtenção de sequências para espécie é uma consequência e aumenta as informações moleculares disponíveis para estudos futuros.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho objetivou avaliar as alterações no perfil de transcritos de folhas de cajueiro CCP76 (*Anacardium occidentale* L.) visando à identificação das vias relacionadas à tolerância da espécie ao estresse salino.

3.2 Objetivos específicos

- Cultivar e induzir o estresse salino em plântulas de cajueiro CCP76;
- Isolar RNA total de folhas de cajueiro CCP76 com qualidade suficiente para montagem das bibliotecas de cDNA;
- Realizar sequenciamento das bibliotecas de cDNA e montar o transcriptoma *de novo*;
- Identificar os transcritos com base na ferramenta BLAST;
- Classificar e mapear os transcritos com base nos termos de *Gene ontology* e *KEGG pathways*;
- Analisar as mudanças no perfil de expressão de alguns genes.

4 Material e Métodos

4.1 Cultivo e indução do estresse salino

4.1.1 Material Vegetal

Castanhas (sementes) de cajueiro do tipo anão precoce dos genótipos CCP76 utilizadas nos experimentos, foram fornecidas pela EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agroindústria Tropical (CNPAT). Todo esse material foi originado de matrizes do experimento de competição de clones, do campo da Estação Experimental de Pacajus, CE. Os experimentos foram realizados com sementes do mesmo lote.

4.1.2 Obtenção das plantas

4.1.2.1 Plântulas

As castanhas foram superficialmente esterilizadas com hipoclorito de sódio em formulação comercial a 10% (V/V) durante 10 minutos e, em seguida, foram lavadas várias vezes com água destilada para remoção de resíduos do hipoclorito. Após lavagem, as castanhas permaneceram por 24 horas mergulhadas em água destilada sob aeração, visando um aumento na velocidade e uniformidade da germinação. A germinação foi realizada em vasos contendo vermiculita, e permaneceram em câmara de crescimento, nas seguintes condições controladas: temperaturas médias de 28°C, P.A.R. média de 700 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ na altura das plantas, fotoperíodo de 12 h e UR média de 70%. Após a germinação, as plântulas permaneceram sob essas condições de cultivo por mais 30 dias, sendo irrigadas a cada três dias com água destilada de forma a manter o nível de umidade do substrato próximo da capacidade máxima de saturação.

4.1.2.2 Efeito isolado do NaCl

Plântulas do genótipo CCP76 foram cultivadas em solução nutritiva, nas condições especificadas acima, submetidas a uma dose fixa de adição NaCl na solução nutritiva para concentração final de 75 mM e, após 48 horas, adição sal para concentração final de 150 mM, em câmara de crescimento. As folhas necessárias ao estudo foram obtidas 1h, 3h, 6h e 12h após adição final de 150 mM de NaCl. Para cada condição foi realizado com 3 repetições e foi seguido o modelo Inteiramente Casualizado. As folhas foram coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido até a etapa de extração do RNA.

4.2 Transcriptômica

4.2.2 Isolamento de RNA total

O RNA total foi obtido pelo *Plant RNA Reagent (Invitrogen™)*. As amostras foram maceradas e incubadas com 1 mL de tampão de extração. Os tubos foram levemente invertidos e incubados a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, a solução foi centrifugada por 2 minutos a 12.000 x g a temperatura ambiente e o sobrenadante, transferido para um novo tubo. Os tubos foram misturados por inversão após adição de 0,1 mL de NaCl 5 M e 0,3 mL de clorofórmio. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos a 4 °C para separar as fases. A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo livre de RNase seguido pela adição de um volume igual de isopropanol. As amostras foram misturadas por inversão e deixadas à temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado foi adicionado 1 ml de etanol 75%. Os tubos foram centrifugados a temperatura ambiente por 1 minuto a 12.000 x g. O líquido foi descartado e ao precipitado foi adicionado 30 µL de água livre de RNase misturando levemente com pipeta e deixando em repouso até o precipitado se dissolver por completo. As amostras foram armazenadas em freezer -80 °C para uso posterior.

4.2.3 RNA-Seq utilizando a plataforma *Illumina Hi-Seq2000*

Após a extração de RNA, foi feito um *pool* de amostra para o cajueiro CCP 76. Cerca de 10 µg de RNA total extraído foi levado ao Laboratório de Biotecnologia Animal (ESALQ-USP) para a construção das bibliotecas de cDNA do tipo *Paired End*. Foi utilizado a plataforma de sequenciamento *Illumina HiSeq2000*.

4.2.4 Montagem do transcriptoma e diferenças de expressão

O processamento dos dados foram realizados em um computador *HP Proliant* com 8 núcleos de processamento e 16,7 Gb de memória RAM. Os dados brutos filtrados (arquivos no formato *fastq*) contendo dados de sequência e qualidade de base em *Phred* foram avaliados pelo programa *FastQC* (ERWING e GREEN, 1998; ANDREWS, 2013). As leituras de baixa qualidade foram removidos utilizando a ferramenta *FastX Toolkit* (HANNON LAB, 2013). A montagem *De novo* foi feita utilizando o programa *Velvet* (ZERBINO e BIRNEY, 2008). O programa *VelvetOptimiser* foi utilizado para escolher os melhores parâmetros do *Velvet* para cada biblioteca (VICTORIAN BIOINFORMATICS CONSORTIUM, 2013). A diferença de expressão dos transcritos discutidos foi validada

pelo método de RPKM (MORTAZAVI et al, 2008) e método desenvolvido no laboratório de Genética molecular do NUBIS.

4.2.5 Blast2GO

Para a detecção de genes baseados em sequências ortólogas, foi utilizado o programa BLAST. O banco de dados do NCBI e do *SwissProt* foram baixados pelo site FTP do NCBI e *Uniprot*, respectivamente. Os parâmetros do BLAST incluem um BLASTX, um *cutoff* de *E-value* para 1×10^{-6} (ALTSCHUL et al, 1997). Também, o programa classificou os dados nos termos de GO: função molecular, processo biológico e componente celular. Por fim, permitiu a identificação de enzimas em mapas de vias metabólicas com base no *KEGG pathways* (KANEHISA e GOTO, 2000; CONESA et al, 2005).

5 Resultados e Discussões

5.1 Condições de coleta

O percentual de plantas germinadas foi de 85%. Foram obtidas 24 plantas e as mais vigorosas, uniformes e contendo 8-10 folhas foram escolhidas para a transferência para o sistema hidropônico (Figura 1). As plantas tiveram crescimento regular e algumas apresentaram estiolamento. As plantas apresentaram as características típicas de estresse salino, após a adição de 150 mM de NaCl. As folhas inferiores, mais sintomáticas, foram utilizadas para extração de RNA.

Figura 1. Mudas de cajueiro CCP76 germinadas em vermiculita



Fonte: Moreira, 2014.

5.2 Dados de montagem do transcriptoma *De novo*

As bibliotecas de cDNA geraram 16.570.701 e 21.653.443 leituras para a condição controle e de estresse salino, respectivamente (Tabela 1). Após a retirada das leituras de baixa qualidade observou-se uma redução de 44,8% para controle e 50,5% para a condição de estresse salino (ver dados de qualidade nos Apêndices A e B). Além disso, foram obtidos mais 58.000 *contigs* para ambas as condições. Ainda, os resultados revelaram que menos de 13,5% dos *contigs* tiveram coberturas iguais ou acima de 50. Desses, 782 e 1088 *contigs* foram acima de 100 bp respectivamente para controle e tratado

(ver Apêndice C). Vale ressaltar que mais da metade das leituras foram usadas para a montagem dos *contigs* com valores de 50 vezes de cobertura, tal fato aumenta a confiabilidade das sequências obtidas.

Tabela 1. Dados de montagem do transcriptoma *de novo* de folhas de CCP76 em condições normais e de estresse salino.

	Controle			Estresse salino		
	Optimiser	Cov 10	Cov 50	Optimiser	Cov 10	Cov 50
Leituras brutas	16.570.701	-	-	21.653.443	-	-
Leituras filtradas	9.133.193	-	-	10.787.002	-	-
Conteúdo de GC (%)	45			45		
Leituras usadas	7.027.939	5.872.198	3.854.970	8.565.926	7.914.325	6.039.292
N50	197	507	470	187	506	472
Nº <i>Contigs</i>	58.943	7547	1181	72.628	9.769	1.592

Cov: cobertura da montagem; Optimiser: programa que indica as dadas ideias para montagem do transcriptoma no *Velvet*.

Fonte: Moreira, 2014

Muitos trabalhos têm obtido dados moleculares com sucesso para espécies que toleram a salinidade utilizando as atuais tecnologias de sequenciamento. Xu e colaboradores (2013) descreveram a montagem de transcriptoma *de novo* para *Gossypium aridum* afim da obtenção da expressão global de genes em diferentes estágios de resposta ao estresse salino. Estudos semelhantes foram descritos para *Reaumuria trigyna* (DANG et al, 2013), *Eutrema salsugineum* (CHAMPIGNY et al, 2013) e *Hordeum vulgare* L. (ZIEMANN et al, 2013).

Esse é o primeiro relato na literatura da utilização de RNA-seq para análises das mudanças sofridas na expressão global de genes em folhas *Anacardium occidentale* L. em condições de estresse salino. É de interesse o entendimento dos mecanismos que tal espécie utiliza para tolerar a condição de estresse abiótico. Contudo, são poucas as

informações moleculares acerca da mesma. Por conta dessa característica analisou-se os *contigs* com 50 vezes ou mais de cobertura.

5.3 Identificação das sequências com base no BLAST

Os resultados de BLAST para os *contigs* com ou acima de 50 vezes de cobertura, permitiram a identificação 1181 sequências relacionadas entre controle e tratado. A fim de analisar as mudanças metabólicas sofridas por *Anacardium occidentale* L. diante à condição de estresse, realizou-se BLAST. Os resultados demonstraram que 504 e 822 sequências foram identificadas para condição controle e estresse, respectivamente (Tabela 2, Apêndice D). Ainda, dentre as sequências identificadas mais de 4% para ambas as condições foram proteínas hipotéticas, não caracterizadas ou preditas. Os resultados indicam envolvimento desses transcritos na resposta da espécie frente a estresse. Adicionalmente, 38,1% e 41,52% das sequências não foram identificadas para controle e tratado, respectivamente. Tais transcritos podem ter funções chave no processo de resposta do cajueiro a salinidade. Além disso, os resultados relacionam esses transcritos às vias de respostas ao estresse salino, assim, fornecendo informações que podem ajudar a elucidar suas identidades.

Tabela 2. Total de sequências identificadas e não identificadas pelo BLAST com base no NCBI.

	Controle	E. salino
Identificadas	731	931
Não identificadas	450	661
Total	1181	1592

Valor de E: 1×10^{-6} (ver Apêndice D)

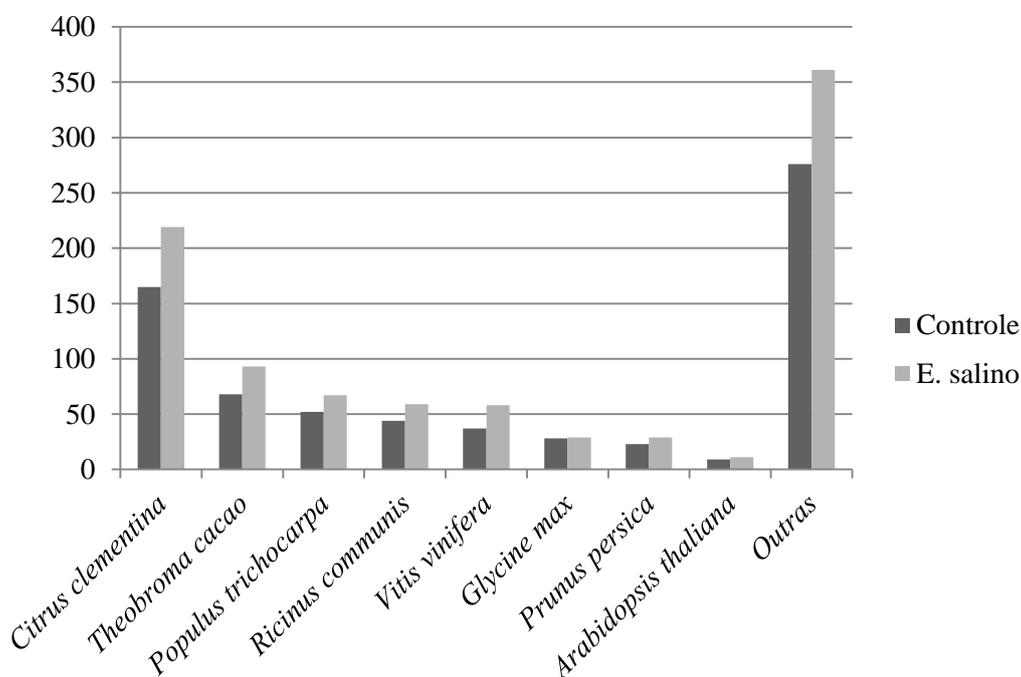
Fonte: Moreira, 2014

O baixo número de identificações pode ser devido à reduzida quantidade de informações moleculares disponíveis para os táxons de ordem e da espécie em estudo. Buscas no NCBI confirmaram a escassez de dados moleculares para os grupos taxonômicas citadas (NCBI, 2014). Para a ordem Sapindales foram verificadas 14 entradas, sendo que apenas quatro delas apresentaram dados de cromossomos, as espécies são, *Citrus clementina*, *Citrus maxima*, *Citrus trifoliata* e *Citrus sinensis* (ver Apêndice E). Quando o filtro de busca foi gênero *Anacardium*, as informações se resumiram a algumas sequências nucleotídicas (ver Apêndice F). Limitações de

identificação semelhantes foram reportados por Alves Filho (2013) para dados transcriptômicos de semente de cajueiro.

Ainda, os resultados de BLAST permitiram listar as espécies que tiveram os seus dados moleculares utilizadas para o alinhamento (Figura 2). Mais de 160 *contigs* foram identificados com base nas informações moleculares de *Citrus clementina*. Tais resultados aumentam a confiança das informações colhidas, tendo em vista que a espécie citada pertence à mesma ordem de *Anacardium occidentale* L. Logo em seguida vem *Theobroma cacao*, *Populus trichocarpa*, *Ricinus communis* e *Vitis vinifera* como espécies utilizadas pelo BLAST. Tal fato se deve em parte a riqueza de informações moleculares disponíveis das espécies citadas. Contudo, vale chamar atenção para o fato de que foram poucos os *contigs* identificados com base *Arabidopsis thaliana*. Deste modo, tais resultados fornecem uma lista de espécies que podem ser utilizadas para alinhamento de sequências do cajueiro, assim podendo aumentar as possibilidades de identificação.

Figura 2. Espécies utilizadas pela ferramenta BLAST para identificação dos transcritos na condição de controle e estresse salino.

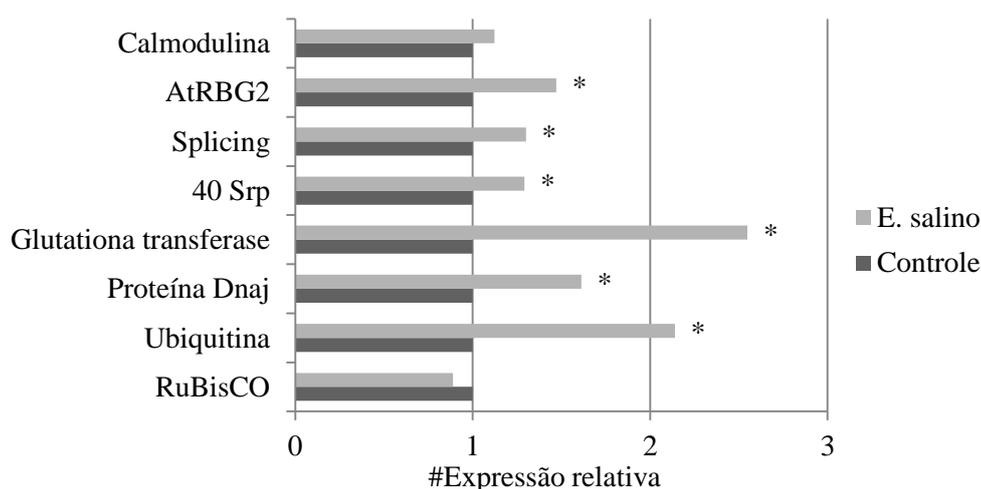


Fonte: Moreira, 2014

A figura 3 apresenta alguns transcritos identificados pelo BLAST e suas diferenças de expressão. De modo geral os resultados demonstraram aumento de

expressão para os transcritos na condição de estresse salino em comparação ao controle. Ubiquitina e Glutationa transferase são exemplos. Ainda, observou-se aumento de vias do metabolismo do RNA e processo de tradução. Tais achados dão indícios das mudanças metabólicas sofridas pela espécie em estudo para tolerar a condição de estresse. Os resultados parecem fornecer o panorama das respostas iniciais à condição de estresse. Foram observadas diferenças de expressão em transcritos identificados como Ubiquitina, proteínas do ribossomo e ligantes a RNA. Vale ressaltar que as respostas metabólicas estão sobrepostas, tendo em vista o *pool* que foi feito com os RNAs isolados de 1 h a 12 h. Tal fato explica a presença simultânea do aumento de vias antioxidativas, processo de tradução e fixação de carbono vistas na figura 3.

Figura 3. Alguns transcritos identificados pela ferramenta BLAST na condição de controle e estresse salino.



#=Dados de expressão relativa normalizados com GAPDH e Actina; *= expressão aumentada.

AtRBG2: Proteína rica em glicina ligante a RNA; Srp: Proteína ribossomal.

Fonte: Moreira, 2014.

Aumento da expressão de Ubiquitina pode desempenhar importante papel a curto e a meio prazo no cajueiro em resposta ao estresse. Em curto prazo pode aumentar a disponibilidade de aminoácidos livres diante ao estresse osmótico. Silveira e colaboradores (2003) demonstraram intenso acúmulo de prolina em folhas de cajueiro em resposta ao estresse salino, acompanhado pelo aumento da atividade proteolítica. Tais descrições corroboram com os resultados descritos para Ubiquitina.

Em um segundo momento, o cajueiro pode usar a via da Ubiquitina para geração de aminoácido para alimentação do processo de tradução e produção de metabólitos secundários. Segundo Cui e colaboradores (2013) os vegetais ativam a degradação de proteínas via Ubiquitina para tolerar a condição de estresse salino. Deste modo, essa proteína permite ao vegetal a utilização do material disponível na célula, assim, funcionando como uma espécie de “ciclador” de carbonos. Esse processo pode permitir que o vegetal faça às primeiras mudanças metabólicas em resposta a condição de estresse.

Adicionalmente, relatos têm demonstrado que variações funcionais dessa proteína podem afetar a produção de siRNAs e miRNAs (MAZZUCOTELLI et al, 2010). Assim, é possível que a espécie em estudo utilize a via da Ubiquitina para três propósitos principais: geração de aminoácidos livres, alimentação do metabolismo secundário e impactos na produção de ncRNAs.

Os resultados também apresentam impactos do estresse salino sobre transcritos relacionados ao metabolismo do RNA e processo de tradução. Proteínas ligantes ao RNA desempenham funções importantes no transporte, processamento, tradução e estabilidade da molécula de RNA (NAKAMINAMI et al, 2012). Aumento da expressão desse tipo de proteína vem sendo descrito na literatura em períodos curtos e longos de exposição ao estresse osmótico (SCHMIDT et al, 2010; AMBROSONE, 2011). Além disso, relatos afirmam que tais proteínas podem funcionar como chaperonas de RNA, isso permite aumento de disponibilidade para expressão dos transcritos e produção de miRNAs e siRNAs (JACOBSEN et al, 2010). Assim, AtRBG2 podem dar um maior tempo de “vida” aos mRNAs no cajueiro na condição de estresse, culminando na conservação de energia. Adicionalmente, é provável que o espécie possa criar uma regulação fina da expressão de genes com base em miRNAs e siRNAs. Ainda, é possível que o aumento da expressão dessas proteínas ocorra nos momentos iniciais do estresse até meio tempo de reposta.

Ainda, com relação às sequências ligadas ao processo de transcrição e tradução, houve aumento para proteínas constituintes do rRNA, fatores de *splicing* e Chaperonas. Os aumentos de *contigs* relacionados ao rRNA indicam intenso processo de tradução. Tais achados corroboram com os resultados descritos até aqui, acompanham o aumento global da produção de transcritos e embasam atividade da Ubiquitina no que diz respeito à disponibilização de aminoácidos livres. Já as Chaperonas e os fatores de *splicing* podem funcionar como meios de conservação de energia e alternativa traducional,

respectivamente. Cui e colaboradores (2014) relataram que a superexpressão de gene relacionado à modulação do *splicing* em condições de estresse salino promoveu a tolerância em transgênicos de plantas do gênero *Arabidopsis*. É provável que esses transcritos sejam chave no processo de resposta a salinidade nos vegetais de modo geral.

Muitos dos resultados encontrados no presente trabalho representam o primeiro relato na literatura que relaciona esses transcritos ou proteínas ao processo de resposta do cajueiro a salinidade. Além disso, dão indícios das mudanças metabólicas sofridas pela espécie. Embora, tais vias sejam descritas para outras espécies, vale ressaltar que estudos fisiológicos e bioquímicos adicionais são requeridos para aumentar as evidências da utilização das vias citadas por *Anacardium occidentale* L.

Contudo, as mudanças na expressão de enzimas antioxidativas, proteínas relacionadas à via da Glutathione e da RuBisCO aumentam confiabilidade dos resultados apresentados. Isso porque o aumento da expressão de Catalase e Glutathione já é relatado para o cajueiro em resposta ao estresse térmico e salino (FERREIRA-SILVA et al, 2012). Aumento de outras vias enzimáticas e não enzimáticas são relatadas para *Anacardium occidentale* L. (FERREIRA-SILVA et al, 2011).

Além disso, os resultados encontrados para Glutathione indicam um segundo momento de resposta ao estresse salino. É sabido na literatura que um dos efeitos da salinidade é o estresse iônico, que culmina no estresse oxidativo. Deste modo, o vegetal para manutenção da homeostase e desintoxicação aciona as vias antioxidativas. Tais achados ajudam no posicionamento das respostas metabólicas adquiridas pela análise da expressão global de genes, além de suportarem as outras mudanças vistas.

A expressão equiparada dos *contigs* relacionados à produção de RuBisCO entre controle e tratado podem dar indícios de alguns cenários de resposta ao estresse. Ferreira-Silva e colaboradores (2010) demonstraram que durante o período 15 dias de exposição ao estresse salino, plântulas de genótipo de cajueiro demonstraram elevada taxa de transpiração e estabilidade na atividade da RuBisCO. Tais achados indicam adequabilidade da espécie, visto que em condições de estresse salino a fixação de CO₂ é limitada, seja pela diminuição da difusão de gases ou fechamento dos estômatos (CHAVES et al, 2009).

Vias de fosforilação estão envolvidas nas respostas iniciais de muitos vegetais frente ao estresse salino. Resultados obtidos no presente trabalho sugerem uma não mudança na expressão de genes relacionados às vias como a da Calmodulina e 14-3-3 nas primeiras 12 horas de resposta. Hu e colaboradores (2013) relataram a identificação de proteínas relacionadas às vias citadas nas primeiras 24h de resposta a salinidade em milho. Como tal espécie é grupo diferente do cajueiro, os resultados sugerem utilização de outros mecanismos de biossinalização nas primeiras horas de resposta ao estresse. Descrições na literatura afirmam que a via da Calmodulina medeia à resposta ao estresse e tolerância, enquanto a 14-3-3 ativa transcrição e está relacionada à defesa (PARKER et al, 2006; MAHAJAN et al, 2008; WANG et al, 2008). Deste modo, em cajueiro essas vias podem fazer parte de uma possível resposta lenta ao estresse salino. Por outro lado, é possível que o tempo de resposta analisado não cubra os aumentos dessas vias, assim, estudos posteriores podem revelar participação mais ativa das vias citadas.

As identificações com base na ferramenta BLAST forneceram informações relevantes acerca das mudanças metabólicas sofridas pelo cajueiro frente à condição de estresse. Verificou-se que os transcritos que tiveram sua expressão aumentada no tratamento já foram descritos na literatura para outras espécies ou para o próprio cajueiro como tendo importância na resposta a salinidade. Além disso, as mudanças vistas parecem englobar respostas ao estresse osmótico e iônico-oxidativo.

5.4 Termos de GO e KEGG pathways

A figura 4 apresenta a distribuição dos transcritos classificados com base nos termos de *Gene Ontology*, a saber: processo biológico, componente celular e função molecular. Cada uma destas classificações possui categorias e estas subdivisões.

A categoria resposta a estímulo, inserida em processos celulares, reúne os transcritos relacionados: (1) resposta a estímulo biótico, (2) resposta a estímulo abiótico, (3) resposta a estímulo químico e (4) estresse. No presente trabalho, identificamos um aumento considerável destes termos nos transcritos obtidos de folhas submetidas ao estresse salino. Assim, verificamos que as células estão alterando o seu metabolismo na tentativa de evitar as consequências diretas e indiretas do excesso de sal nas raízes (ver Apêndice G).

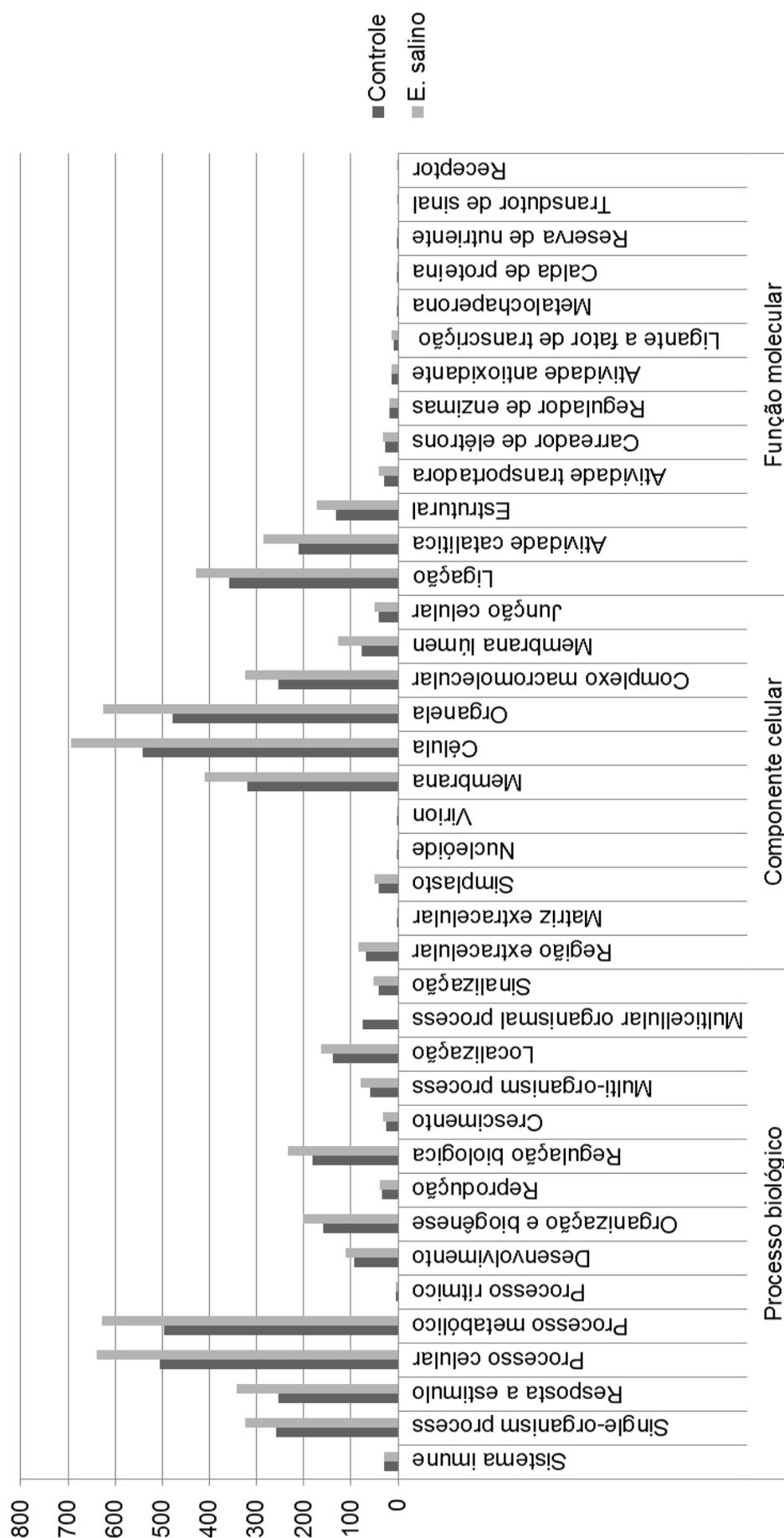
Além disso, vale ressaltar que houve incrementos de identificações para as subclassificações: processo metabólico primário, desenvolvimento de estruturas anatômicas e processo biosintético. Tais resultados dão indícios da manutenção do metabolismo primário e/ou recuperação das estruturas danificadas pelo estresse.

Em termos da classificação componente celular, a maior parte foi distribuída nas subclasses: Membrana, Célula, Organela e Complexo macromolecular (ver Apêndice H). Já para Função molecular, mais de 87% da classificação ficou distribuída entre ligação, atividade catalítica e função estrutural. De modo mais específico foi encontrado para essa classe a distribuição de 74 oxirredutases para condição de controle e 104 para a condição estudada, demonstrando alterações no metabolismo redox nas plantas em condições de salinidade elevada. Além disso, para a categoria ligação, foram encontrados aumentos de 62% para ligantes a pequenas moléculas, de 25% para ligantes à íons e 26% de transcritos de proteínas ligantes à compostos orgânicos cíclicos (ver Apêndice I).

Resultados semelhantes para os termos de GO encontrados no presente trabalho foram reportados para *Reaumuria trigyna* (DANG et al, 2013). Dang e colaboradores (2013) estudaram as alterações globais no transcriptoma de uma espécie originária do deserto sob uma condição de estresse salino. Os autores relataram aumentos dos termos de GO para resposta a estímulo, ligantes e etc.

Wang e colaboradores (2014) relataram uma maior abundância na identificação de transcritos para as subclasses de atividade catalítica e ligação em raízes de *Tamarix hispida* sob condição de salinidade. Vale salientar que um dos efeitos decorrentes do estresse salino é o aumento dos íons nas células, resultando em estresse iônico por desencadear uma alteração no balanço de cargas nas células. Assim, o aumento dos termos das proteínas ligantes a íons sugere o possível papel destas no “sequestro” do excesso de íons.

Figura 4. Classificação dos transcritos com base nos termo de GO: Processo biológico, Componente celular e Função molecular.



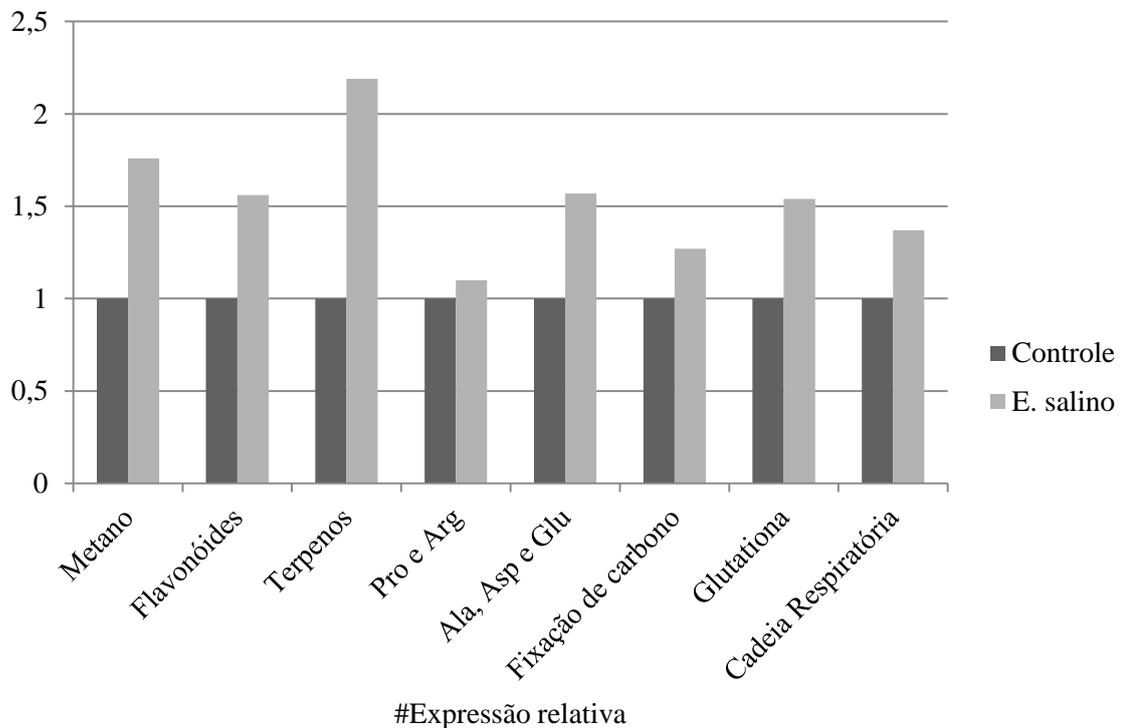
Fonte: Moreira, 2014.

Em trabalho realizado com *Gossypium aridum*, Xu e colaboradores (2013) relacionaram o tempo de exposição ao estresse com os impactos observados nos termos de GO. Segundo os autores a espécie em estudo aumentou a atividade de cinases, fosfotransferase (tendo álcool como aceptor) e resposta a estímulos de 3h as 12h. Já para as últimas horas (72h a 144h) relataram aumento na atividade de transporte. Por fim, ligantes a coenzimas foram por todo o período de estresse (XU et al, 2013). Em contraste, os resultados encontrados no presente trabalho dão indícios que o cajueiro já nas primeiras 12 h de resposta a salinidade, aumenta a quantidade de transportadores.

Os resultados de *KEGG pathways* permitiram a obtenção de 52 e 61 mapas metabólicos para a condição controle e de estresse salino, respectivamente (ver Apêndice J). Foi possível a visualização de vias para a degradação de lipídeos, produção de hormônios, produção de metabólitos secundários, produção de energia, entre outras. A figura 5 demonstra algumas vias encontradas na condição em estudo, juntamente com as diferenças de expressão dos transcritos relacionados. Observa-se para a condição de estresse aumento de vias relacionadas a produção de metabólitos secundários como Flavonóides, Terpenos e Metano. Ainda, demonstra aumento das vias de fixação de carbono, produção de energia, aminoácidos e vias antioxidativas. Tais resultados corroboram com os descritos para BLAST e termos de GO.

O aumento de vias relacionadas à produção de aminoácidos corresponde com as mudanças vistas nos resultados de BLAST, confirmando intensa atividade tradução e atividade de osmoproteção. FERREIRA-SILVA e colaboradores (2010) relataram acúmulo nas folhas em genótipo de cajueiro de prolina e outros aminoácidos livres. A prolina é descrita na literatura como importante para manutenção da homeostase nos vegetais em condições de estresse, estabilização das proteínas, modulação da atividade da mitocôndria, divisão e morte celular (SZABADOS e SAVOURE, 2009). Além da prolina, outros aminoácidos como a glicina desempenham função no processo de osmoproteção.

Figura 5. Vias metabólicas encontradas para a condição controle e estresse salino com base no *KEGG pathways*.



#=Dados de expressão relativa normalizados com GAPDH e Actina.

Fonte: Moreira, 2014.

Silveira e colaboradores (2003) demonstraram acúmulo de prolina em folhas de cajueiro estressado pela salinidade. A acumulação da prolina e outros aminoácidos livres parece ser uma via conservada em alguns vegetais, visto que é relatada para algumas espécies. Desempenha importante papel na resposta ao estresse salino, térmico e em condições de seca. Todas as situações citadas são rotineiras na região semiárida do nordeste brasileiro, indicando adaptabilidade da espécie em estudo (SILVEIRA et al, 2003). O leve aumento das vias relacionadas durante as primeiras horas de indução do estresse em cajueiro podem ter relação com a intensa atividade da Ubiquitina. Assim, a disponibilidade de aminoácidos nas 12 h de salinidade deve ficar por conta da atividade de Ubiquitina.

Para superar o estresse osmótico e manter o turgor, várias espécies também acumulam nas raízes e folhas: carboidratos e metabólitos secundários. Costa e colaboradores (2013) relataram aumento de triterpenóides nas raízes e folhas frente aplicação de diferentes estressores osmóticos (COSTA et al, 2013). Adicionalmente as vias descritas para a osmoproteção no

cajueiro, os metabólitos secundários podem ter importante papel no que diz respeito a proteção frente ao estresse osmótico.

Por outro lado, o metabolismo secundário pode ter importância para a espécie em resposta ao estresse oxidativo. Em condições de estresse abiótico observa-se aumento do fluxo de carbonos para alimentação do metabolismo secundário (VICKERS et al, 2009; COSTA et al, 2013). As moléculas provenientes dessa via têm importância por funcionarem como antioxidantes “primários” enquanto as células vegetais preparam as vias enzimáticas e da Glutathione. Aumento de vias para produção de metabólitos secundários em condições de estresse abiótico já é descrito para outros vegetais, contudo, esse é o primeiro relato na literatura para o cajueiro.

Dessa forma, o aumento de vias da produção de Terpenos e Flavonóides descritos no presente trabalho podem ter no cajueiro duas vertentes principais: ajudar na osmoproteção e defesa contra o desequilíbrio iônico e redox. Tais achados ampliam sobre os mecanismos de tolerância à salinidade por *Anacardium occidentale* L. É importante ressaltar que os resultados obtidos para as análises via *KEGG* corroboram com os dados obtidos utilizando o *BLAST*.

Além disso, os metabólitos secundários podem ter outra importante função na condição de estresse: a comunicação. Os compostos orgânicos voláteis (BVOCs) vêm sendo descritos como importantes agentes de sinalização e desencadeando o processo de proteção na planta (LORETO e SCHNITZLER, 2010). Tais compostos estão sendo apontados como tendo relação com a resposta das plantas ao estresse biótico e abiótico (FEUSSNER et al, 2002; FEUSSNER e WASTERNAK, 2004; LORETO e SCHNITZLER, 2010; BEHNKE et al, 2013; BOURTSOUKIDIS et al, 2014). Há pelo menos três vias principais para produção de BVOCs: Terpenos, Flavonóides e Oxilipídios. Parece haver uma preferência pelos vegetais da utilização da via dos terpenos, isso devido à limitação de sua produção por períodos específicos depois do estresse (GUENTHER ET AL, 1995; LORETO e SCHNITZLER, 2010). Os resultados apresentados no presente trabalho corroboram com tal informação, tendo em vista o aumento de expressão para via de produção de terpenos diante a dos Flavonóides.

Alguns BVOCs têm importância na defesa da planta frente ao estresse oxidativo, como os Terpenos e Flavonóides (LORETO e SCHNITZLER, 2010). Além disso, os autores relatam a importância do metano e do metanol como indicadores do estado da planta visando sinalizar a existência de uma condição prejudicial. Desta forma, permitindo que outras partes da própria planta emissora ou plantas vizinhas possam alterar o seu metabolismo com o intuito

de iniciar um sistema prevenido de defesa. O Aumento da produção da via dos Terpenos, Flavonóides e Metano, indicados no presente trabalho, sugere à importância destes compostos na resposta a condição de estresse. Esse é o primeiro relato na literatura que relaciona aumento da produção de metano frente a salinidade em cajueiro.

Mesmo em outros vegetais a via do Metano e de outros BVOCs é um assunto novo. Assim, há muita especulação sobre da importância de tais moléculas para esse tipo de estresse abiótico. Contudo, pode ser uma via importante de resposta da espécie em estudo, tendo em vista a função que tais moléculas desempenham na comunicação intra-planta, planta-planta e planta-outros-organismos. Além disso, pode representar uma estratégia de sobrevivência coletiva da espécie.

Além desses resultados, foi possível a visualização de vias do metabolismo central como a via da glicólise/gliconeogênese, ciclo do ácido cítrico, via das pentoses fosfato. Também, foi possível a observação de mudanças no metabolismo para produção de açúcares, principalmente Frutose e Manose. Durante o estresse salino alguns vegetais tendem a aumentar o fluxo de carbonos para o ciclo do ácido cítrico (HILL et al, 2013). No cenário do estresse abiótico, o ciclo deve manter a produção de energia, além de fornecer seus intermediários para as vias de produção de aminoácidos e nucleotídeos (NELSON; COX, 2008).

Já a via das pentoses fosfato pode desempenhar dois importantes papéis na resposta do cajueiro a salinidade. O primeiro pode ter relação com o fornecimento de carbono para a síntese de outras moléculas. Em um possível cenário de recuperação de estruturas celulares, tal via pode fornecer as coenzimas reduzidas necessárias para síntese de lipídeos. Ambos os cenários são suportados pelos resultados obtidos para intensa atividade de transcrição, tradução e aumento de vias antioxidativas (NELSON; COX, 2008).

Em contraste, a quantidade de açúcares solúveis tende a aumentar em condições de estresse salino e de seca. Esse fenômeno é acompanhado pela diminuição na quantidade de açúcares de reserva (CHAVEZ, 1991). Isso culmina na ação de açúcares solúveis (ex: glicose e frutose) como moléculas sinalizadoras que podem interagir com hormônios e modular a expressão de genes (CHAVES e OLIVEIRA, 2004; ROLLAND et al, 2006; CHAVES et al, 2009). Além disso, podem manter a produção de energia necessária para resposta ao estresse salino.

Os resultados de GO e *KEGG pathways* corroboraram com os vistos pelo BLAST, além de expandir o conhecimento sobre vias que foram afetadas pela condição de estresse. Além disso, os achados obtidos com os termos de GO corroboram com as descrições na literatura para outras espécies. Esse fato permitiu um melhor entendimento das respostas da espécie. Os mapas obtido pelo *KEGG pathways* aumentam o conhecimento sobre possíveis vias que o cajueiro pode usar em resposta a salinidade.

6 Conclusão

A análise global da expressão de genes como base na montagem do transcriptoma *De novo* permitiu a identificação de vias metabólicas relacionadas à tolerância da planta aos principais estresses abióticos, consequentes do cultivo em alta salinidade, a saber: resposta ao estresse osmótico e manutenção da homeostase iônica e redox. Por fim, vale salientar que os resultados obtidos fornecem importantes informações moleculares que permitirão, em estudos futuros, a melhor compreensão do metabolismo do cajueiro.

Referências Bibliográficas

AFFEK, H.P.; YAKIR, D. Protection by isoprene against singlet oxygen in leaves. **Plant Physiol.** 129, 269–277, 2002.

ALVES-FILHO, J. G. **Análises transcriptômica e proteômica de sementes de cajueiro (*Anacardium occidentale* L) visando aplicações biotecnológicas.** 2013. 206 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ALTSCHUL, S. F., MADDEN, T. L., SCHÄFFER, A. A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W. E LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402. 1997.

ANDREWS, S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 30 de setembro de 2013.

AMBROSONE, A. et al. Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. **Plant Science**, 182, 12-18, 2012.

AMBROSONE, A.; et al. Differential gene regulation in potato cells and plants upon abrupt or gradual exposure to water stress, **Acta Physiol. Plant.**, v.33, p.1157-1171, 2011.

AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI T. Regulation of neuronal glutathione synthesis. **J. Pharmacol. Sci.**, 108, 227-238, 2008.

ARTHUR, J.R. The glutathione peroxidases. **Cell Mol. Life Sci.**, 57, 1825-1835. 2000.

BALDWIN, I.T. et al. Volatile signaling in plant-plant interactions: ‘talking trees’ in the genomics era. **Science**. 311, 812–815, 2006.

BEHNKE, K.; et al. Isoprene function in two contrasting poplars under salt and sunflecks. **Tree Physiology**, v.1, p.1-17, 2013.

BOER, A.; LEEUWEN, I. Fusicocanes: diterpenes with surprising biological functions. **Trends in Plant Science**, v. 17, p. 360-368, 2012.

BOURTSOUKIDIS, E.; et al. Impact of flooding and drought conditions on the emission of volatile organic compounds of *Quercus robur* and *Prunus serotina*. **Trees**, v.28, p.193-204, 2014.

CAVALCANTI, F. R.; et al. Superoxide dismutase, catalase and peroxide activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**. 163, 563–571, 2004.

CAVALCANTI, J. J. V. et al. Avanços, desafios, e novas estratégias do melhoramento genético do cajueiro no Brasil. In: **I Simpósio Nordeste de Genética e Melhoramento de Plantas**. Fortaleza: EMBRAPA/CNPAT, 2009. 210 p.

CHAMPIGNY, M. J. *Eutrema salsugineum* plants growing in an extreme natural habitat and in controlled growth cabinet conditions. **BMC Genomics**, v. 14:578, p. 23, 2013.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**. 103, 551-560, 2009.

CHAVES, M.M. Effects of water deficits on carbon assimilation. **Journal of Experimental Botany**. 42, 1–16, 1991.

CHAVES, M.M.; OLIVEIRA, M.M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of Experimental Botany**, 55, 2365–2384, 2004.

CONESA, A., GÖTZ, S., GARCÍA-GÓMEZ, J. M., TEROL, J., TALÓN, M., & ROBLES, M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. **Bioinformatics**, v. 21, n. 18, p. 3674–3676. 2005.

COSTA, F. et al. Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 66, p. 56-62, 2013.

CRISÓSTOMO, L. A. et al. **Cultivo do cajueiro ano precoce**: Aspectos fitotécnicos com ênfase na adubação e na irrigação. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2001.

CUI, F.; et al. Arabidopsis Ubiquitin Conjugase UBC32 Is an ERAD Component That Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance. **The Plant Cell**, v. 24, p. 233-244, 2012.

CUI, P. et al. Dynamic regulation of genome-wide pre-mRNA splicing and stress tolerance by the Sm-like protein LSm5 in *Arabidopsis*. **Genome Biology**. 15, 18, 2014.

DANG, Z.; et al. Transcriptomic profiling of the salt-stress response in the wild cretorehalophyte *Reaumuria trigyna*. **BMC Genomics**, v. 14:29, p. 16. 2013.

DUDAREVA, N. et al. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiol**, 135, 1993–2011, 2004.

EWING, B. e GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res.**, v. 8(3), p. 186-194, 1998.

FERREIRA-SILVA, S.L.; SILVEIRA, J.A.G.; VOIGT, E.L.; SOARES, L.S.P.; VIÉGAS, R.A. Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. 20, 51–59, 2008.

FERREIRA-SILVA, S. L. F. et al. Physiological alterations modulated by rootstock and scion combination in cashew under salinity. **Scientia Horticulturae**. 127, 39–45, 2010.
FERREIRA-SILVA, S. L.; et al. High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 162– 170, 2011.

- FERREIRA-SILVA, S. L.; et al. Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. **Biologia Plantarum**, v. 56, p. 172-176, 2012.
- FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annu. Rev. Plant Biol.** 53, 275–297, 2002.
- FEUSSNER, I.; WASTERACK, C. The lipoxygenase pathway. **Annu. Rev. Plant Biol.**, 53, 275–297, 2002.
- GARG, R. et al. De Novo Assembly of Chickpea Transcriptome Using Short Reads for Gene Discovery and Marker Identification. **DNA Research**. 18, 53-63, 2011.
- GONZÁLEZ-BURGOS, E.; GÓMEZ-SERRANILLOS, M.P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current Medicinal Chemistry**, 19, 5319-5341, 2012.
- GUENTHER, A.B. et al. A global model of natural volatile organic compound emissions. **J. Geophys. Res.** 100, 8873–8892, 1995.
- HAHLAOUI, H. et al. Differential effects of salt stress on osmotic adjustment and solutes allocation on the basis of root and leaf tissue senescence of two silage maize (*Zea mays* L.) varieties. **Industrial Crops and Products**. 31, 122–130, 2010.
- HAJLAOUI, H.; DENDEN, M.; BOUSLAMA, M. Effet du chlorure de sodium sur les critères morfo-physiologiques et productifs du pois chiche (*Cicer arietinum* L.). **Ann. INRGREF.**, v.8, p171-187, 2006.
- HANNON LAB. FASTX Toolkit. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html. Acesso em: 02 de outubro de 2013.
- HARLAN, J. R.; DE WET, J. M. J. On the quality of evidence for origin and dispersal of cultivated plants. **Current Anthropology**, v.14, p.51-62, 1973.
- HILL, C. B. et al. Characterization of Ion Contents and Metabolic Responses to Salt Stress of Different *Arabidopsis AtHKT1;1* Genotypes and Their Parental Strains. **Molecular Plant**. 6, 350-368, 2013.
- HU, Y. et al. Comparative analysis of salt-responsive phosphoproteins in maize leaves using Ti⁴⁺-IMAC enrichment and ESI-Q-TOF MS. **Electrophoresis**. 34, 485-492.
- IRVING, L.J.; ROBINSON, D. A dynamic model of Rubisco turnover in cereal leaves. **New Phytol.** 169, 493–504, 2006.
- JACOBSEN, A. et al. Signatures of RNA binding proteins globally coupled to effective microRNA target sites. **Genome Res.**, 20, 1010-1019, 2010.
- JOHNSON, D. V. **O caju do Nordeste do Brasil: um estudo geográfico**. Trad. José Alexandre Robotto Orrico. Fortaleza: ETENE, 1974, 169p.

KANEHISA, M. e GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, p. 27-30, 2000.

KEPPLER, F. et al. Methane emission from terrestrial plants under aerobic conditions. **Nature**, 439, 187–191, 2006.

KEPPLER, F. et al. Methoxyl groups of plant pectin as a precursor of atmospheric methane: evidence from deuterium labelling studies. **New Phytol.** 178, 808–814, 2008.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, 30, 620-650, 2002.

KUMAR, V. et al. Enhanced proline accumulation and salt stress tolerance of transgenic indica rice by over-expressing P5CSF129A gene. **Plant Biotechnol Rep.** 4, 37-48, 2010.

LEE, J.M.; JOHNSON, J.A. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **J. Biochem. Mol. Biol.**, 37, 139–143, 2004.

LIMA, V. P. M. S. A cultura do cajueiro no nordeste do Brasil. In: BARROS, L. M. **Melhoramento**. Fortaleza: Etene, 1988. p. 321-356.

LORETO, F. et al. ¹³C labelling reveals chloroplastic and extra- chloroplastic pools of dimethylallyl pyrophosphate and their contribution to isoprene formation. **Plant Physiol.** 135, 1903–1907, 2004.

LORETO, F. et al. Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. **Plant Physiol.** 26, 993–1000, 2001.

LORETO, F.; DELFINE, S. Emission of isoprene from salt-stressed *Eucalyptus globulus* leaves. **Plant Physiol.** 123, 1605-1610, 2000.

LORETO, F.; SCHNITZLER, J. P. Abiotic stresses and induced BVOCs. **Trends in Plant Science.** 15, 154-166, 2010.

MAHAJAN, S.; PANDEY, G. K.; TUTEJA, N. Calcium- and salt-stress signaling in plants: Shedding light on SOS pathway. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.471, p.146-158, 2008.

MANDHANIA, S. Differential response in salt tolerant and sensitive genotypes of wheat in terms of ascorbate, carotenoids proline and plant water relations. **Asian J. Exp. Biol. Sci.** 1, 4, 792-797, 2010.

MATES, M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicol.**, 153, 83-104, 2000.

MAZZUCOTELLI, E.; et al. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, v. 174, p. 420-431, 2008.

MITCHELL, J. D.; MORI, S. A. **The cashew and its relatives (Anacardium: Anacardiaceae)**. Mem. NY Bot. Gard., 1987, 42: 1-76.

MORTAZAVI, A.; et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v.5, p.621-628, 2008.

MUNNS, R.; JAMES, R.A.; LAUCHLI, A. Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. **Journal of Experimental Botany**. 57, 1025–1043, 2006.

NAKAMINAMI, K.; et al. RNA regulation in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 149-153, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. São Paulo, Sarvier, 2008. pp 527-615.

NOBUTA, K. et al. Bioinformatics analysis of small RNAs in plants using next generation sequencing technologies. **Methods Mol Biol**. 592, 89-106, 2010.

OWEN, J.B.; BUTTERFIELD, D.A. Measurement of Oxidized/ Reduced Glutathione Ratio. **Methods Mol. Biol.**, 648, 269-277, 2010.

PAIVA, J. R.; CRISÓSTOMO, J. R.; BARROS, L. M. **Recursos genéticos do cajueiro: coleta, caracterização e utilização**. Fortaleza: Embrapa, 2003.

PARCHMAN, T. L. et al. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery. **BMC Genomics**. 11, 180, 2010.

PARKER, R.; et al. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. **J. Exp. Bot.**, v.57, p.1109-1118, 2006.

PETERS, R. J.. Two rings in them all: The labdane-related diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, 27, 1521–1530, 2010.

QING, D. J. et al. Comparative profiles of gene expression in leaves and roots of maize seedlings under conditions of salt stress and the removal of salt stress. **Plant Cell Physiol**. 50, 889-903, 2009.

ROLLAND, F.; BAENA-GONZALEZ, E.; SHEEN, J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms. **Annual Review of Plant Biology**. 57, 675–709, 2006.

RUZLCKA, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. **Experientia**, v. 9, p.357-367, 1953.

SCHMIDT, F. et al. A proteomic analysis of oligo(dT)-bound mRNP containing oxidative stress-induced *Arabidopsis thaliana* RNA-binding proteins ATGRP7 and ATGRP8. **Mol Biol Rep**. 37, 839-845, 2010.

SCHNITZLER, J. P. et al. Poplar volatiles - biosynthesis, regulation and (eco)physiology of isoprene and stress-induced isoprenoids. **Plant Biol**. 12, 302–316, 2010.

- SILVEIRA, J. A. G.; et al. Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**. 160, 115–123, 2003.
- SILVEIRA, J. A. G.; et al. Salt resistance in two cashew species is associated with accumulation of organic and inorganic solutes. **Acta Physiol Plant**. 34, 1629-1637, 2012.
- SPENCER, J. P. E.; et al. Intracellular metabolism and bioactivity of quercetin and its in vivo metabolites. **Biochemistry**, v. 372, p. 173–181, 2003.
- SU, S.Y.; HSU, Y.T.; KAO, C.H. The effect of polyethylene glycol on proline accumulation in rice leaves. **Biol. Plant**. 46, 73–78, 2003.
- SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**. 15, 89-97, 2009.
- TEUBER, M. et al. VOC emission of Grey poplar leaves as affected by salt stress and different N sources. **Plant Biol**. 10, 86–96, 2008.
- UNESCO WATER PORTAL. Disponível na: <http://www.unesco.org/water>. Acessado em 24 de janeiro de 2014.
- URANO, K. et al. ‘Omics’ analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**. 13, 132-138, 2010.
- VALKO, M. *et al.* Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact**, 160, 1–40, 2006.
- VAUZOUR, D. et al. The neuroprotective potential of flavonoids: a multiplicity of effects. **Genes & Nutrition**, v. 3, p. 115-126, 2008.
- VICKERS, C. E.; et al. Isoprene synthesis protects tobacco plants from oxidative stress. **Plant Cell Environ**, v.32, p.520-531, 2009.
- VICKERS, C. E.; et al. A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. *Nature Chemical Biology*, v.5, p.283-291, 2009.
- VICTORIAN BIOINFORMATICS CONSORTIUM. VelvetOptimiser. Disponível em: <https://github.com/Victorian-Bioinformatics-Consortium/VelvetOptimiser.git>. Acesso em: 03 de outubro de 2013.
- WANG, C. et al. Comprehensive transcriptional profiling of NaHCO₃-stressed *Tamarix hispida* roots reveals networks of responsive genes. **Plant Mol Biol**. 84, 145-157, 2014.
- WANG, J. et al. The diploid genome sequence of an Asian individual. **Nature**. 456, 60-65, 2008.
- WANG, M. C.; et al. Proteomic analysis on a high salt tolerance introgression strain of *Triticum aestivum/Thinopyrum ponticum*. *Proteomics*, v.8, p.1470-1489, 2008.

WANG, X. W. et al. De novo characterization of a whitefly transcriptome and analysis of its gene expression during development. **BMC Genomics**. 11, 400, 2010.

WANG, X.; et al. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. **Planta**, v.228, p.167–177, 2008.

WANG, Z. et al. De novo assembly and characterization of root transcriptome using Illumina paired-end sequencing and development of cSSR markers in sweetpotato (*Ipomoea batatas*). **BMC Genomics**. v. 11, p. 726-740, 2010.

XIONG, L.; ZHU, J. K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell and Environment**. v. 25, p. 131-139, 2002.

XU, P.; et al. De novo transcriptome sequencing and comparative analysis of differentially expressed genes in *Gossypium aridum* under salt stress. **Gene**. v. 525, p. 26-34, 2013.

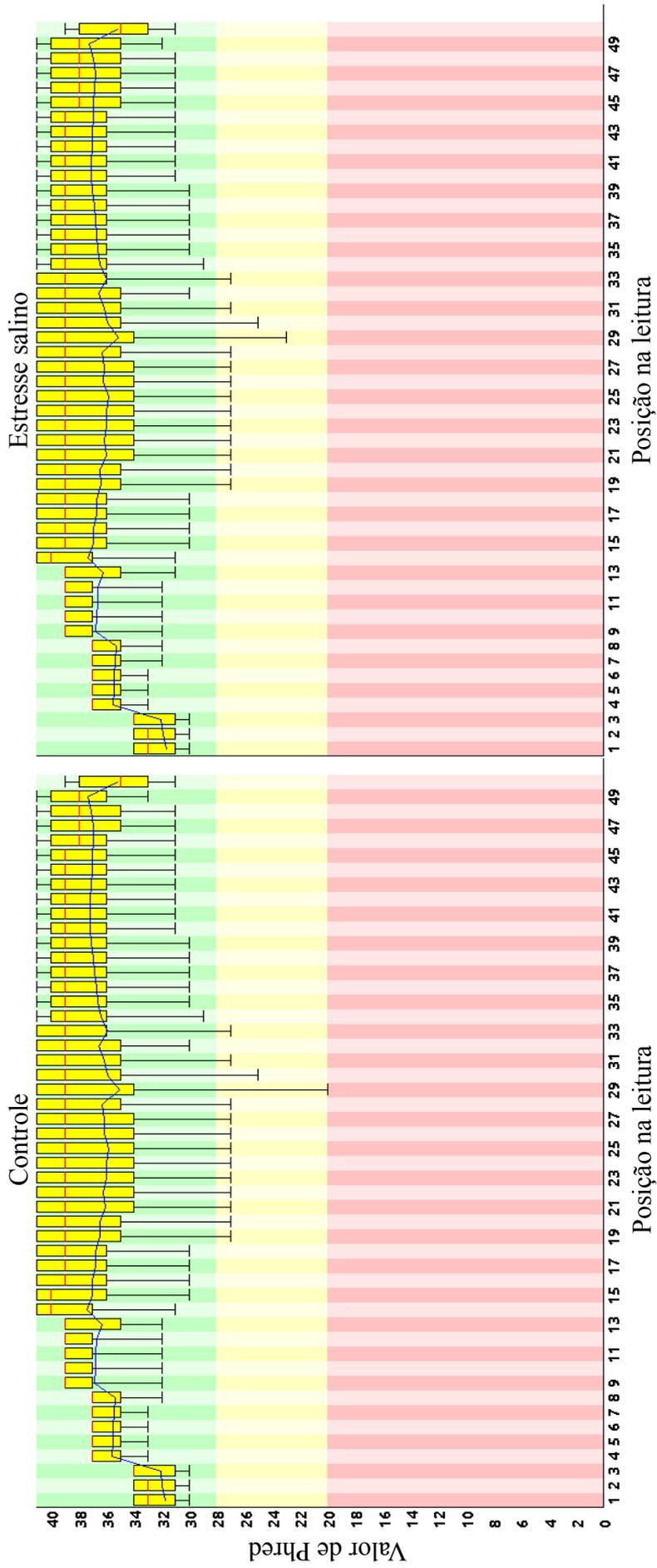
ZENG, J. et al. Effects of Salt Stress on the Growth, Physiological Responses, and Glycoside Contents of *Stevia rebaudiana* Bertoni. **J. Agric. Food Chem.** v. 61, p. 5720–5726, 2013.

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

ZIEMANN, M. et al. Analysis of the barley leaf transcriptome under salinity stress using mRNA-Seq. **Acta Physiol Plant**. v. 35, p. 1915–1924, 2013.

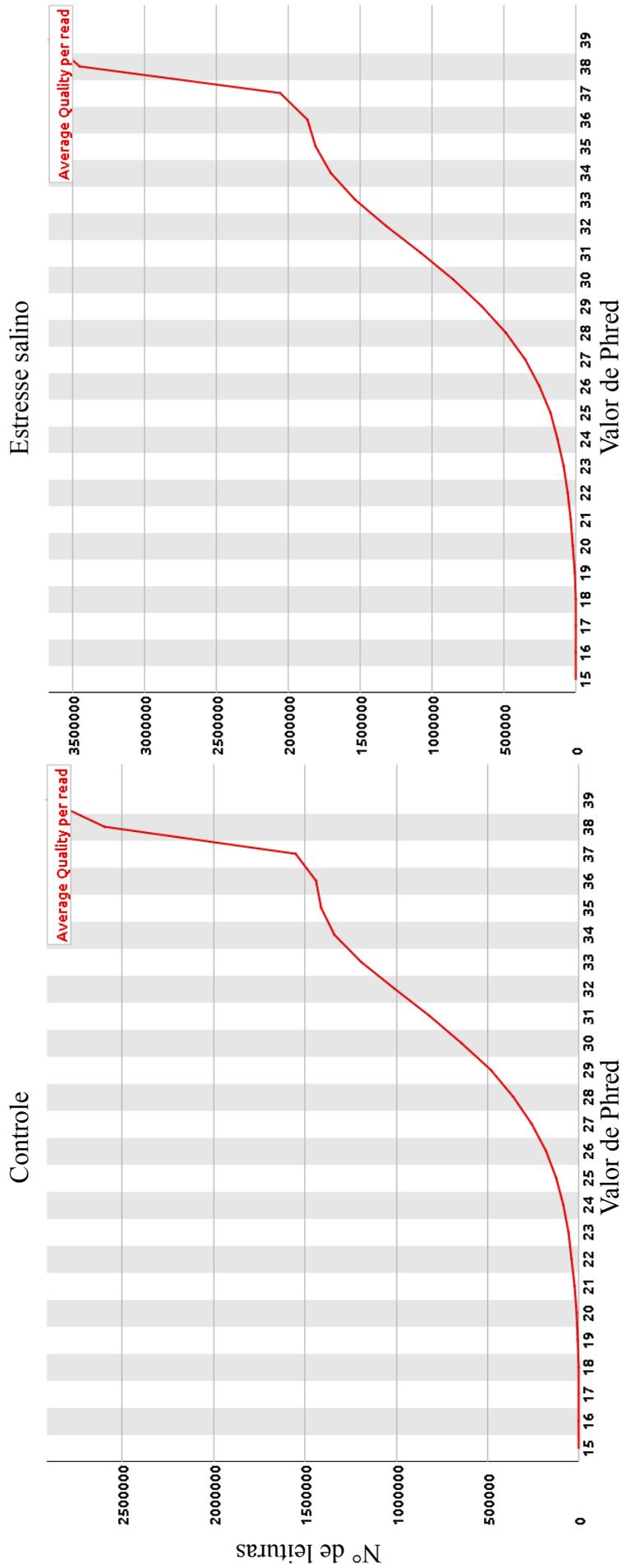
Apêndices

APÊNDICE A – Qualidade de todas as bases nas sequências após filtragem



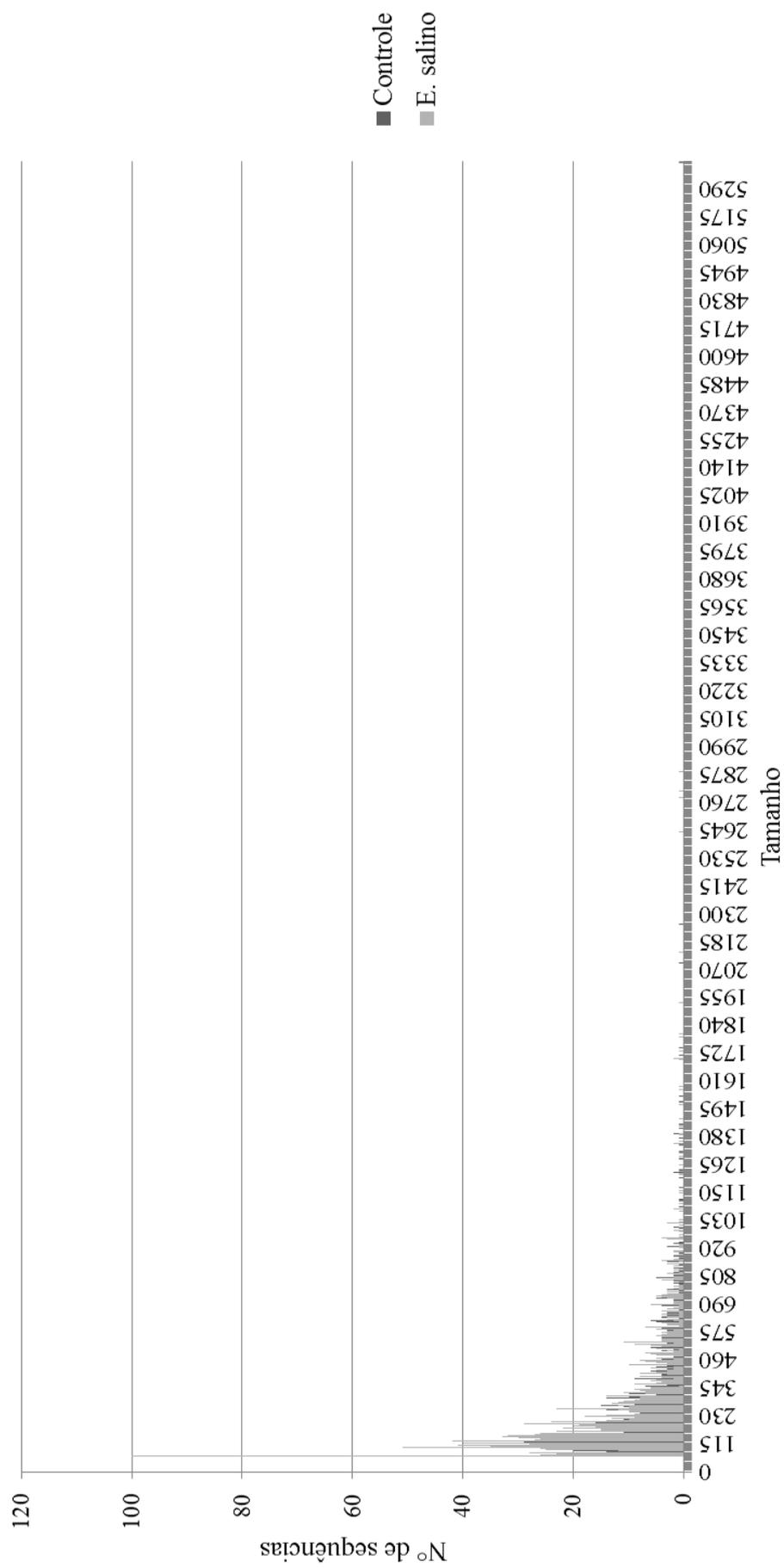
Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE B – Distribuição de qualidade nas sequências após filtragem



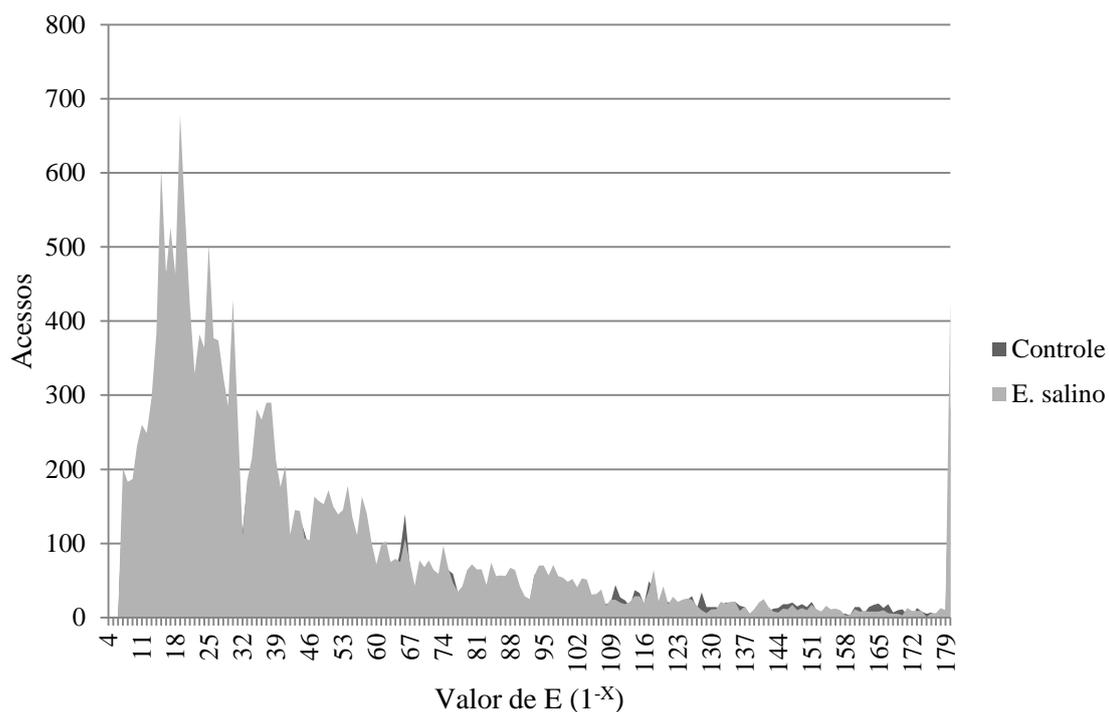
Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE C – Distribuição de tamanho de sequências com 50 vezes de cobertura



Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE D – Distribuição dos valores de E dos transcritos identificados por BLAST



Fonte: Moreira, 2014.

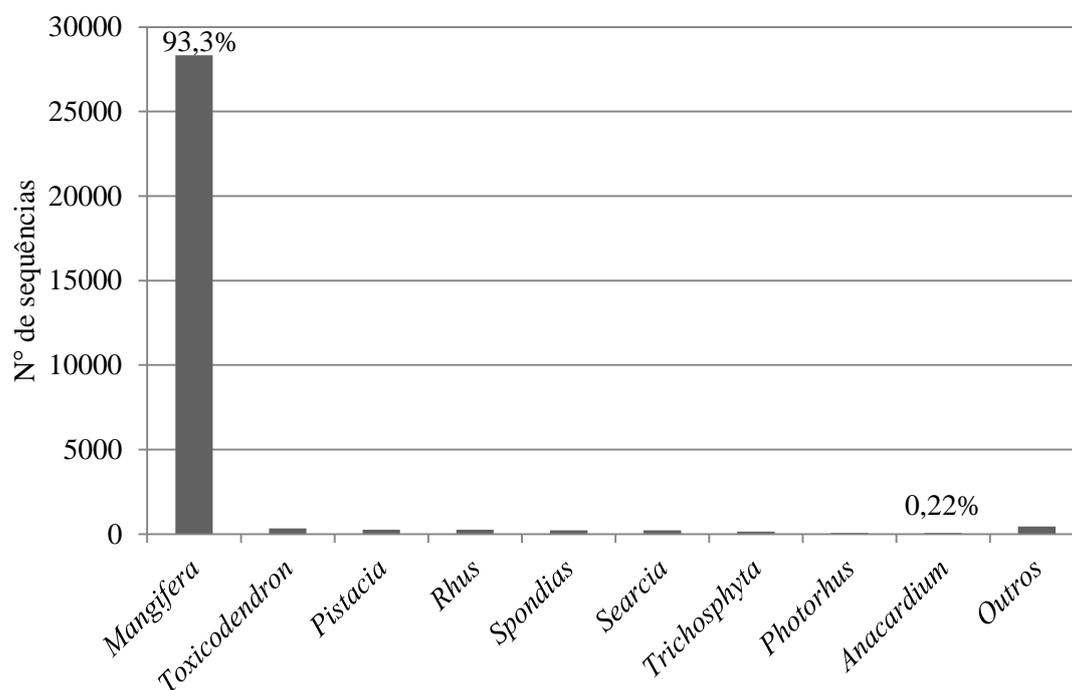
APÊNDICE E – Informações genômicas disponíveis no NCBI para a Ordem Sapindales

Organismos	Informações moleculares disponíveis no NCBI		
	Genoma montado	Cromossomos	Organelas
<i>Azadirachta indica</i>	1	0	1
<i>Citrus clementina</i>	1	9	0
<i>Citrus sinensis</i>	2	9	1

Informações oriundas do NCBI.

Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE F – Informações moleculares disponíveis no NCBI para a família
Anacardiaceae



Informações oriundas do NCBI.

Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE G – Termo de GO: Processo biológico nível 3

	Controle	E. salino
Biogênese de componentes celulares	100	127
Crescimento celular	21	25
Crescimento de organismos multicelulares	1	1
Desenvolvimento	22	22
Desenvolvimento de estruturas anatômicas	76	91
Desenvolvimento de organismos multicelulares	74	87
Detecção de estímulos	9	8
Dormência	1	0
Efeto do processo imunológico	1	2
Estabilização de localização	132	158
Interações interespecies	2	2
<i>Localização celular</i>	54	80
Localização macromolecular	58	75
Metilação	27	35
Modificações morfológicas ou fisiológica em outros organismos	1	1
Morte	22	25

<i>Multi-multicellular organism process</i>	8	9
<i>Multi-organism cellular process</i>	2	3
Organização ou biogênese da parede celular	15	17
Organização de componentes celulares	141	175
Pigmentação	2	1
Processamento e apresentação de antígenos	1	1
Processo biosintético	288	389
Processo catabólico	117	148
Processo de desenvolvimento celular	34	40
Processo envolvendo a reprodução	3	5
Processo metabólico celular	462	568
Processo metabólico de c. nitrogenados	191	241
Processo metabólico de hormônios	2	3
Processo metabólico de s. orgânicas	407	525
Processo metabólico primário	395	505
Processo reprodutivo	32	36
Proliferação celular	3	4
Regulação da função molecular	30	41
Regulação da qualidade biológica	38	44
Regulação do processo biológico	166	216
Reprodução de organismos multicelulares	2	2
Reprodução sexual	1	1
Resposta a estímulo abiótico	135	184
Resposta a estímulo biótico	55	71
<i>Resposta a estímulo celular</i>	77	98
Resposta a estímulo endógeno	43	51
Resposta a estímulo externo	6	7
Resposta a estímulo químico	157	203
Resposta a outros organismos	52	71
Resposta ao estado redox	0	1
Resposta ao estresse	166	225
Resposta imune	28	29
Ritmo circadiano	5	5
<i>Single organism signaling</i>	40	52
<i>Single-multicellular organism process</i>	75	88
<i>Single-organism cellular process</i>	218	281
<i>Single-organism developmental process</i>	70	81
<i>Single-organism metabolic process</i>	192	251
Utilização de carbono	1	2

Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE H – Termo de GO: Componente celular nível 3

	Controle	E. salino
Cadeia respiratória	13	22
Capsídeo viral	1	1
<i>Columella</i>	0	1
Complexo ATPase: transporte de prótons	10	8
Complexo NADH desidrogenase	2	4
Conexões entre núcleo e r. endoplasmático	0	3
Envelope	98	132
Envelope da organela	97	132
Estrutura externa encapsulada	53	74
<i>Exina</i>	0	1
<i>Extraorganismal space</i>	0	1
Extrínseco da membrana	3	6
Extrínseco da membrana de organelas	0	1
Fotosistema	59	58
Intracelular	529	679
Intrínseco da membrana	42	58
Lúmen da organela	78	128
M. da organela	39	62
M. plasmática	150	220
M. reticulo endoplasmático	0	3
Matriz extracelular	1	0
Parede de pólen	0	1
Parte intracelular	520	669
Parte intracelular da organela	307	421
Periferia celular	175	238
Plasmodesma	40	49
Projeção celular	1	1
<i>Retromer complex</i>	0	1
<i>Sexine</i>	0	1
Sistema endomembranario	4	13
Subcompartimento da organela	105	118

Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE I – Termo de GO: Função molecular nível 3

	Controle	E. salino
Atividade de chaperona	1	1
Atividade de isomerase	8	15
Atividade enzimática	10	10
Atividade hidrolítica	51	73
Carboidrato transportador	4	3
Constituinte da cromatina	3	3
Constituinte da parede celular	2	0
Constituinte do citoesqueleto	6	6
Constituinte do ribossomo	114	156

Fator de transcrição	10	14
Glutathiona desidrogenase	0	1
Inibidor de atividade enzimática	6	7
Liase	22	25
Ligante de a pequenas moléculas	87	120
Ligante a amônio	4	4
Ligante a c. orgânicos cíclicos	212	268
Ligante a cofator	18	25
Ligante a cromatina	8	7
Ligante a íons	204	256
Ligante a pigmento	7	7
Ligante a proteína	90	94
Ligante a ribonucleoproteína	5	6
Ligante c. heterocíclicos	212	268
Ligantes a amida	2	1
Ligantes a carboidratos	2	6
Ligantes a lipídeos	20	18
Ligantes a metal	7	8
Ligase	31	35
Ligantes a compostos de enxofre	0	1
Oxidoreductase	74	104
<i>Pattern binding</i>	0	1
Peroxidase	9	9
<i>Radical SAM enzyme activity</i>	1	1
Receptor de sinal	0	1
Regulador de peptidase	4	4
Regulador de quinase	1	1
Regulador nucleosídeo trifosfatase	1	1
Superóxido desmutase	4	4
Transdutor de sinal	0	1
Transferase	38	53
Transportador de membrana	20	23
Transporte de elétrons	9	9
Transporte específico	22	27

Fonte: Moreira, 2014.

APÊNDICE J – Vias metabólicas encontradas pelo *KEGG pathways*

Vias metabólicas	Controle		Estresse salino	
	Nº sequências	Nº enzimas	Nº sequências	Nº enzimas
Glicólise/ Gliconeogênese	17	4	23	7
Metabolismo do Metano	16	3	22	5

Metabolismo da Frutose e Manose	14	1	19	5
Metabolismo do Glioxilato e Dicarboxilato	12	6	18	9
Via das Pentoses Fosfato	14	1	16	2
Metabolismo das Purinas	7	3	12	4
Metabolismo da Alanina, Aspartato e Glutamato	4	2	10	4
Fosforilação Oxidativa	5	3	10	3
Metabolismo da Glicina, Serina e Treonina	5	5	10	8
Metabolismo da Glutathione	7	3	9	4
Metabolismo das Pirimidinas	5	2	8	3
Biossíntese dos Flavonóides	4	4	7	5
Metabolismo do Enxofre	3	1	7	3
Metabolismo da Cisteína e Metionina	5	4	7	4
Biossíntese de Fenilpropanoide	4	2	6	3
Metabolismo do Triptofano	4	2	6	3
Metabolismo do Nitrogênio	5	3	6	3
Citrocomo	4	2	12	4
Metabolismo da Fenilalanina	4	2	5	3
Metabolismo do Piruvato	3	2	5	4
Metabolismo dos <i>Selenocompound</i>	2	1	4	1
Metabolismo da beta-Alanina	2	2	4	4

Metabolismo do Ascorbato e aldorato	4	2	4	3
Metabolismo do acido linoleico			4	2
Fotossíntese	7	2	4	2
Metabolismo da Prolina e Aginina	4	2	4	2
Degradação da Lisina	4	2	3	2
Metabolismo de Eter-Lipídeos	0	0	3	1
Metabolismo dos Glicerofosfolipídeos	1	1	3	1
Metabolismo do Inositol	0	0	3	2
Metabolismo da Clorofila e Porfirina	2	2	3	4
Metabolismo do acido alfa-Linoleico	1	1	3	1
Metabolismo do acido Araquidônico	0	0	3	1
Metabolismo da Tirosina	2	2	3	3
<i>One carbon pool by folate</i>	2	2	2	1
Interconverções entre Pentose e Glucuronato	1	1	2	2
Degradação Fluorobenzenoato	4	1	2	1
Degradação de Ciclorohexano e Clorobenzeno	4	1	2	1
Metabolismo de açúcares amino e açúcares nucleotídeos	1	1	2	2
Metabolismo da Histidina	1	1	2	2
Degradação do Tolueno	4	1	2	1
Metabolismo Cianomato	1	1	2	1

Biossíntese de Flavona e Flavonol	1	1	2	1
<i>Limonene and pinene degradation</i>	1	1	1	1
Biossíntese da Ubiquinona e terpenoides-quinonas	0	0	1	1
Biossíntese de esqueletos de terpenóides	1	1	1	2
Metabolismo do Butanoato	1	1	1	1
Metabolismo de Glicerolip�deos	2	3	1	1
Ciclo do acido cítrico	0	0	1	1
Fixa�o de carbono	18	5	1	1
Metabolismo de a�c�res de reserva	0	0	1	1
Degrada�o de ácidos graxos	2	2	1	1
Biossíntese Pantotenato e CoA	0	0	1	1
Biossíntese de Horm�nios esteroides	0	0	1	1
Degrada�o do Estireno	0	0	1	1
Degrada�o Cloroalcanos e Cloroalcenos	2	2	1	1
Metabolismo do propanoato	1	1	1	1
Degrada�o de Valina, Leucina e Isoleucina	1	1	1	1
Metabolismo do acido Lipoico	1	1	1	1

Biossíntese de Tropanos, Piperidinas e Alcalóides piridinas	2	1	1	1
Biossíntese de Isoquinona	1	1	0	0

Fonte: Moreira, 2014.