

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA  
MOLECULAR  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

JOYCE ETSUKO ARAKAKI

ANÁLISE DOS TRANSCRIPTOMAS DE *Paspalum notatum*  
Flüggé E *Paspalum vaginatum* Swartz EM CONDIÇÃO DE  
DÉFICIT HÍDRICO

São Carlos - SP  
2020

**JOYCE ETSUKO ARAKAKI**

**ANÁLISE DOS TRANSCRIPTOMAS DE *Paspalum notatum* Flüggé E *Paspalum vaginatum* Swartz EM CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) da Universidade Federal de São Carlos para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra

Co-orientadora: Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna

São Carlos – SP  
2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Joyce Etsuko Arakaki, realizada em 19/02/2020.

**Comissão Julgadora:**

Prof. Dr. Ricardo Cameiro Borra (UFSCar)

Profa. Dra. Bianca Baccili Zanotto Vigna (EMBRAPA)

Prof. Dr. Caio Cesar de Melo Freire (UFSCar)

Prof. Dr. Lucimara Chiari (EMBRAPA)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por todo o apoio e confiança depositados em mim, em especial à minha mãe, Anita Kimie Ito Arakaki, e à minha tia, Elza Satomi Ito.

Ao meu querido companheiro Yuri Nakau Fuzissaki, por todo apoio, carinho e principalmente paciência durante todos esses anos que compartilhamos no ambiente acadêmico e por sempre disponibilizar seu tempo me ajudando, seja me ensinando a usar diferentes programas ou me dando sugestões de escrever melhor os meus textos.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Bianca Bacilli Zanotto Vigna, por todo ensinamento passado, desde minha graduação enquanto realizava meu Trabalho de Conclusão de Curso, durante meu estágio e agora no mestrado. Por ser essa pesquisadora excepcional, que mesmo com várias atribuições e alunos, sempre foi muito solícita, atenciosa e presente.

Ao Dr. Wilson Malagó Jr., que também me acompanhou desde a graduação e me ensinou boa parte do que sei tanto parte experimental quanto na teórica, sempre explicando a teoria por trás de cada experimento e com uma calma e paciência admirável, facilitando muito o aprendizado.

À Dr<sup>a</sup>. Alessandra Pereira Fávero, por ser praticamente minha segunda orientadora, sempre ajudando e fornecendo seu conhecimento, por ter mostrado a relevância do *Paspalum*, dando ótimos exemplos de acontecimentos da sua vida, como as expedições de coleta, e sempre nos contando de forma descontraída.

Ao Dr. Mauricio de Alvarenga Mudadu, por se disponibilizar a me orientar na área de bioinformática, e ter paciência e me conduzir nessa área em que eu tinha pouco conhecimento, fornecendo as ferramentas/conhecimentos necessárias para melhorar meu aprendizado.

Ao Dr. Ricardo Carneiro Borra, por aceitar ser meu orientador na UFSCar, mesmo não me conhecendo e depositando sua confiança.

À Dr<sup>a</sup>. Patricia Menezes Santos, por dar todo o auxílio nos experimentos e análises fisiológicas de *Paspalum*.

À Dr<sup>a</sup>. Cintia Hiromi Okino, por tirar todas as nossas dúvidas relacionadas a PCR em tempo real, melhorando nosso desenho experimental.

Aos colegas da Embrapa Pecuária Sudeste do meu grupo da Biotec Vegetal pelas risadas e conhecimentos trocados, tanto os da pós-graduação como Naiana Barbosa Dinato e Tiago Maretti Gonçalves, quanto os estagiários que estão conosco há mais tempo como a Natalia Daniel e Julia Ruiz.

À CAPES, pela bolsa de fomento e outros auxílios.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular – PPGGEv da UFSCar, pela oportunidade de realização do Mestrado.

**MUITO OBRIGADA!**

## RESUMO

A seca é um dos estresses abióticos que mais afetam o crescimento e produtividade de plantas. Espécies do gênero *Paspalum* L. são utilizadas com sucesso em pastagens e gramados, sendo que alguns ecótipos de *Paspalum notatum* (grama-batatais) possuem boa qualidade de forragem, e de *Paspalum vaginatum* (capim-aramé-da-praia; grama-rasteira-da-praia), alta tolerância à salinidade. Além disso, já foi descrito o potencial de resistência à seca de ambas as espécies, tornando-as interessantes para estudos de transcriptoma sob déficit hídrico. O objetivo do projeto é avaliar o perfil de expressão gênica de dois genótipos de *Paspalum* em resposta ao déficit hídrico. Dois genótipos (*P. vaginatum* Swartz BGP 114 e *P. notatum* Flügge BGP 216) com diferentes estratégias de resistência à seca foram selecionados a partir de avaliação fisiológica prévia de cinco acessos de *Paspalum* (*P. indecorum* Mez BGP 24, *P. notatum* Flügge BGP 216, *P. vaginatum* Swartz BGP 114, *P. modestum* Mez BGP 23 e BGP 32) em resposta ao déficit hídrico. Amostras de folhas em duas condições hídricas foram coletadas: sem estresse hídrico (umidade relativa do solo 28%) e com umidade do solo a 6% alcançada após cinco dias de estresse hídrico para *P. notatum* e oito dias para *P. vaginatum*. Foram extraídos os RNAs das amostras e preparadas as bibliotecas de cDNA, as quais foram sequenciadas em plataforma Illumina HiSeq 2500. Análises de bioinformática foram realizadas para: caracterizar a qualidade da montagem *de novo* dos transcriptomas; analisar a expressão gênica diferencial entre plantas com e sem estresse hídrico e realizar a anotação funcional dos genes e vias metabólicas. As expressões gênicas encontradas *in silico* foram validadas via PCR em tempo real. A partir das análises fisiológicas e moleculares foi possível identificar que os genótipos combinam diferentes estratégias para resistir a seca, sendo que as estratégias de desidratação de retardo e de tolerância foram encontradas em ambos os acessos. O enriquecimento de termos de ontologia gênica possibilitou a identificação de estratégias específicas de cada genótipo, como a desidratação de escape para *P. vaginatum* e dormência para *P. notatum*. A caracterização e classificação desses acessos quanto às suas estratégias de tolerância ao estresse hídrico e o melhor entendimento dos mecanismos moleculares e fisiológicos envolvidos poderão contribuir para a identificação de genes de interesse visando a edição gênica com o objetivo de desenvolver gramíneas estresse-tolerantes mais bem adaptadas aos diferentes cenários e mudanças climáticas.

Palavras-chave: seca; desidratação; RNA-seq; expressão gênica diferencial.

## ABSTRACT

Drought is one of the abiotic stresses that most affect plant growth and productivity. Grasses of the genus *Paspalum* are used successfully in pastures and lawns, and some ecotypes of *Paspalum notatum* (bahiagrass) have good forage quality, while some *Paspalum vaginatum* (seashore paspalum) have high tolerance to salinity. In addition, the potential for drought resistance of both species has already been described, making them interesting for transcriptome studies under water deficit. The aim of the project is to evaluate the gene expression profile of two *Paspalum* genotypes in response to water deficit. Two genotypes (*P. vaginatum* BGP 114 and *P. notatum* BGP 216) with different drought resistance strategies were selected from five accessions of *Paspalum* (*P. indecorum* Mez BGP 24, *P. notatum* Flügge BGP 216, *P. vaginatum* Swartz BGP 114, *P. modestum* Mez BGP 23 and BGP 32) previously evaluated according to their physiological characteristics under water deficit. Leaf samples in two water conditions were collected: without water stress (soil relative moisture 28%) and with 6% soil moisture reached after five days of water stress for *P. notatum* and eight days for *P. vaginatum*. RNAs were extracted from the samples and cDNA libraries were prepared, which were sequenced on the Illumina HiSeq 2500 platform. Bioinformatics analyzes were carried out to: characterize the quality of the *de novo* assembly transcriptomes; analyze the differential gene expression between plants with and without water stress and perform the functional annotation of genes and metabolic pathways. The gene expressions found *in silico* were validated via real-time PCR. From the physiological and molecular analyzes it was possible to identify that the genotypes combine different strategies to resist drought, and the avoidance and tolerance dehydration strategies were found in both accessions. The enrichment of gene ontology terms enabled the identification of specific strategies for each genotype, such as escape dehydration for *P. vaginatum* and dormancy for *P. notatum*. The characterization and classification of these accessions regarding their water stress tolerance strategies and a better understanding of the molecular and physiological mechanisms involved may contribute to the identification of genes of interest aiming at gene editing in order to develop stress-tolerant grasses better adapted to the different scenarios and climate changes.

Keywords: drought; dehydration; RNA-seq; differential gene expression

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Monitoramento de secas no Brasil no período de 12 meses (Jan/2019 a Jan/2020)..	14
Figura 2. Acesso de <i>Paspalum notatum</i> Flüggé em casa de vegetação da Embrapa Pecuária Sudeste.....	18
Figura 3. Acesso de <i>Paspalum vaginatum</i> Swartz em casa de vegetação da Embrapa Pecuária Sudeste.....	20
Figura 4. Esquema da metodologia utilizada para os dois genótipos de <i>Paspalum</i> escolhidos.	24
Figura 5. Qualidade das bases em cada posição das <i>reads</i> da biblioteca NS_1 utilizando o software FastQC. ....	32
Figura 6. Perfis de ExN50 para montagens de transcriptomas.....	33
Figura 7. Análise BUSCO para as duas montagens das duas espécies de <i>Paspalum</i> , antes e após filtro dos transcritos.....	35
Figura 8. Mapas de calor representando a relação entre as réplicas biológicas, além do comportamento das amostras em diferentes condições, sob déficit hídrico (HS) e sem déficit hídrico (NS). ....	36
Figura 9. Análise de Componentes Principais de <i>Paspalum vaginatum</i> e <i>Paspalum notatum</i> .....	36
Figura 10. Volcanos plot gerados pelo pacote R edgeR.....	37
Figura 11. Quantidade de genes sub e super-expressos em <i>P. vaginatum</i> e <i>P. notatum</i> .....	37
Figura 12. Número de termos GO enriquecidos encontrados entre os genes diferencialmente expressos em <i>P. vaginatum</i> e <i>P. notatum</i> . ....	38
Figura 13. Termos gerais de ontologia gênica enriquecidos para <i>P. vaginatum</i> obtidos a partir do software Blast2GO. ....	39
Figura 14. Termos gerais de ontologia gênica enriquecidos para <i>P. notatum</i> obtidos a partir do software Blast2GO. ....	40
Figura 15. Mapa de árvore dos termos GO enriquecidos de <i>P. vaginatum</i> e agrupados pela plataforma REVIGO.....	41
Figura 16. Mapa de árvore dos termos GO enriquecidos de <i>P. notatum</i> e agrupados pela plataforma REVIGO.....	41
Figura 17. Perfil de curva de amplificação do teste de eficiência dos <i>primers</i> referentes ao gene THI1-2 utilizando a amostra HS_21 de <i>P. notatum</i> .....	45

Figura 18. Curva padrão do teste de eficiência do gene THI1-2. ....	46
Figura 19. Análise da estabilidade da expressão gênica dos quatro genes candidatos a controle endógeno.....	47
Figura 20. Expressões gênicas relativas das amostras de <i>Paspalum vaginatum</i> obtidas via qPCR e dos dados de RNA-seq. ....	49
Figura 21. Expressões gênicas relativas das amostras de <i>Paspalum notatum</i> obtidas via qPCR e dos dados de RNA-seq.....	50
Figura 22. Esquema do experimento hídrico para as análises fisiológicas de um acesso. ....	67
Figura 23. Taxa de alongamento foliar dos cinco acessos acompanhados em quatro períodos durante o déficit hídrico.....	68
Figura 24. Biomassa verde dos cinco acessos avaliados em relação a cada tratamento do experimento hídrico.....	68
Figura 25. Taxa de recuperação de perfilhos (TRP) dos cinco acessos de cada tratamento após 15 dias de reidratação. ....	70

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Identificação das bibliotecas de cDNA de <i>Paspalum vaginatum</i> com e sem déficit hídrico.....	25
Tabela 2. Identificação das bibliotecas de cDNA de <i>Paspalum notatum</i> com e sem déficit hídrico.....	25
Tabela 3. Genes escolhidos para validação via PCR em tempo real.....	31
Tabela 4. Estatísticas gerais obtidas após a montagem dos transcriptomas foliares das espécies <i>P. vaginatum</i> BGP 114 e de <i>P. notatum</i> BGP 216. ....	33
Tabela 5. Avaliação da estabilidade de expressão de quatro genes candidatos a controle endógeno.....	47
Tabela 6. Acessos de <i>Paspalum</i> avaliados no experimento hídrico e seus dados de coleta.....	65

**LISTA DE SIGLAS**

cDNA - Ácido Desoxirribonucleico complementar (do inglês: *complementary Deoxyribonucleic Acid*)

CPTEC - Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos

GDE - Gene Diferencialmente Expresso

GO - Ontologia Gênica (do inglês: *Gene Ontology*)

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

NCBI – do inglês *National Center for Biotechnology Information*

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*)

PN - *Paspalum notatum*

PV - *Paspalum vaginatum*

qPCR - Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (do inglês: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

TAF - Taxa de Alongamento Foliar

TMM - Média Aparada de Valores M (do inglês: *Trimmed Mean of M values*)

TPM - Transcritos por Milhão de Transcritos (do inglês: *Transcripts per Million Transcripts*)

TRP - Taxa de Recuperação de Perfilhos

URS - Umidade Relativa do Solo

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	i
RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....	v
LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE SIGLAS .....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Seca.....	13
2.1.1 Estratégias de adaptação a seca utilizada pelas plantas.....	15
2.2 O gênero <i>Paspalum</i> L.....	16
2.2.1 <i>Paspalum notatum</i> Flüggé.....	17
2.2.2 <i>Paspalum vaginatum</i> Swartz .....	19
2.3 Transcriptômica e seca em plantas .....	20
2.4 Hipóteses .....	21
3. OBJETIVO .....	22
3.1 Objetivo Geral .....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
4. METODOLOGIA.....	23
4.1 Extração de RNA e Preparo das Bibliotecas de cDNA.....	23
4.2 Qualidade das bibliotecas de cDNA.....	25
4.3 Montagem <i>de novo</i> dos transcriptomas .....	26
4.4 Avaliação das montagens dos transcriptomas .....	26
4.5 Quantificação de Transcritos .....	27
4.6 Correlação das amostras e réplicas biológicas .....	27

4.7	Expressão diferencial, anotação gênica e enriquecimento funcional .....	27
4.8	Validação via PCR em tempo real.....	28
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1	Avaliação das bibliotecas de cDNA .....	32
5.2	Avaliação das montagens dos transcriptomas .....	32
5.3	Correlação das amostras e réplicas biológicas .....	35
5.4	Expressão diferencial, anotação gênica e enriquecimento funcional .....	37
5.5	PCR em tempo real.....	45
6.	CONCLUSÕES .....	51
7.	REFERÊNCIAS .....	52
	APÊNDICE A – Ensaio hídrico e obtenção de amostras para sequenciamento .....	65
	Experimento hídrico .....	65
	Avaliação dos dados fisiológicos .....	68
	APÊNDICE B - Resultado do teste de eficiência dos primers dos genes avaliados na qPCR.	71

## 1. INTRODUÇÃO

Períodos de seca estão ocorrendo com maior frequência e intensidade em diversas regiões do mundo, como na costa leste dos Estados Unidos, na Amazônia e Nordeste brasileiro, Patagônia, na região mediterrânea, na maior parte da África e Nordeste da China (SPINONI et al, 2019). Há projeções de que regiões que já são propensas à seca, como no Mediterrâneo, Europa Central, sul da Amazônia e África Austral, terá um aumento na frequência e intensidade de secas e ondas de calor (IPCC, 2019).

O aumento na frequência e intensidade de secas levará a uma diminuição da disponibilidade de cultivares, além de afetar o crescimento, qualidade e a produtividade das plantas (IPCC, 2019). Trabalhos de Andrade et. al. (2014) e Pezzopane et. al. (2017) demonstraram que as cultivares de gramíneas forrageiras tropicais *Urochloa brizantha* cv. Marandu e *Megathyrsus maximus* (syn. *Panicum maximum*) cv. Tanzânia sofreram variações na produção causada por alterações na temperatura e disponibilidade de água. Essas variações na produção correspondem a um efeito comum também conhecido como estacionalidade de produção, o qual se refere a oscilações na produtividade em decorrência a mudanças na disponibilidade de luz (fotoperíodo), temperatura e/ou disponibilidade de água em um determinado período (MALDONADO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2016; GURGEL et al., 2017).

A partir disso, é extremamente importante o desenvolvimento de cultivares tolerantes à seca (IPCC, 2019), seja pelo melhoramento convencional a partir de genótipos ou espécies com essas características ou utilizando técnicas de edição gênica em espécies que não apresentam essa tolerância naturalmente.

Gramíneas do gênero *Paspalum* são encontradas por todo o território brasileiro (FLORA DO BRASIL, 2020) e apresenta importante valor agrônomico (PRESTES et al., 1976) servindo como base alimentar para bovinos. No continente americano, são encontradas cerca de 310 espécies do gênero (MORRONE et al., 2012), e destas, 215 espécies são encontradas no Brasil (FLORA DO BRASIL 2020, 2017). As diversas espécies são encontradas habitando regiões tropicais, subtropicais e temperadas (ZULOAGA & MORRONE, 2005), e são dominantes em campo aberto, mas podem ser encontradas em bordas de florestas e em ambientes salinos, ocorrendo desde o nível do mar até nos Andes (4600 metros de altitude) (ZULOAGA et al., 2004). Por apresentar várias espécies nativas e

de grande diversidade genética, oferece menor risco de desequilíbrio biológico pela exploração pecuária (STRAPASSON et al., 2000).

Diversos trabalhos apontam características interessantes como: alta tolerância a salinidade (BENNETT & DEPEW, 2002a; BENNETT & DEPEW, 2002b); resistência à seca (DUNCAN, 2002; WANG et al., 2006; BROSNAN & DEPUTY, 2008); resistência a pragas como as cigarrinhas (GUSMÃO et al., 2016); tolerância às condições de solos encharcados ou com problemas de drenagem (BATISTA et al., 1987; COELHO-SOUZA et al., 2011; MOLLARD et al., 2008); queimadas e frio (TORACIO et al., 2013).

Essa diversidade de características interessantes encontradas entre as várias espécies *Paspalum*, torna o gênero interessante para experimentos de cunho agrônomico visando o melhoramento das cultivares comerciais da espécie. Para isso, a transcriptômica é uma forma de gerar uma grande quantidade de dados permitindo uma maior compreensão dos mecanismos utilizados pelas plantas para resistirem/adaptarem à seca, desde a identificação de genes encontrados em comum a várias plantas, como genes que expressam mais ou são específicos de determinadas culturas (BENNY et al., 2019).

Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar diferentes espécies de *Paspalum* frente ao déficit hídrico em um experimento realizado em vasos em casa de vegetação. Os dados de transcriptômica obtidos por sequenciamento de nova geração foram explorados para a identificação de genes e vias a fim de compreender melhor as principais estratégias utilizadas por essas gramíneas para lidar com a seca. Os genes de interesse encontrados poderão ser utilizados em programas de melhoramento visando o desenvolvimento de gramíneas estresse-tolerantes mais bem adaptadas aos diferentes cenários e mudanças climáticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Seca

Segundo o relatório do “Intergovernmental Panel on Climate Change” (IPCC, 2019), mudanças climáticas podem agravar processos de degradação do solo, por meio do aumento da intensidade das chuvas e inundações, frequência e intensidade de secas, estresse por calor, vento, elevação do nível do mar e degelo. Há ainda a previsão de que ondas de calor irão aumentar em frequência, intensidade e duração na maior parte do mundo e a frequência e intensidade de secas estão projetadas para aumentar em algumas regiões que já são propensas à seca, predominantemente no Mediterrâneo, Europa Central, sul da Amazônia e África Austral.

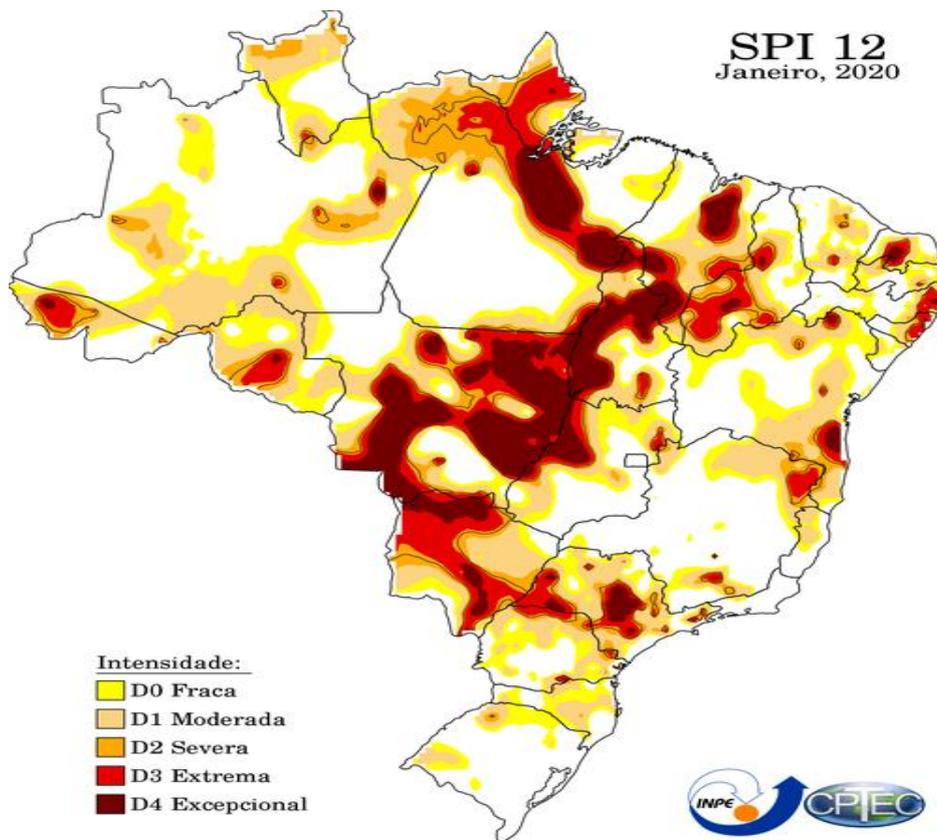
Um estudo recente avaliou mais de 4500 secas que ocorreram no mundo e observou um aumento na frequência de secas na costa leste dos Estados Unidos, na Amazônia e Nordeste brasileiro, Patagônia, na região mediterrânea, na maior parte da África e Nordeste da China enquanto no norte da Argentina, Uruguai e norte da Europa houve uma diminuição (SPINONI et al. 2019).

O aumento de eventos climáticos extremos pode atrapalhar a logística de produção de alimentos, como é o caso do que ocorreu em 2012 no cinturão de milho dos EUA que sofreu uma seca generalizada. A produção de milho nos EUA caiu 16% em relação a 2011 e 25% em relação a 2009. Esses tipos de perdas causadas pelas mudanças climáticas se tornarão mais frequentes e conseqüentemente levarão a uma maior instabilidade nos mercados agrícolas no futuro. Por isso, são necessárias práticas de adaptação e mitigação das mudanças causadas pela variação climática. Estas práticas incluem: aumento da matéria orgânica do solo, controle de erosão, correto manejo de fertilizantes, obtenção de novos cultivares tolerantes ao calor e à seca, entre outras (IPCC, 2019).

Um método para o monitoramento de secas é o Índice de Precipitação Padronizado (SPI) e atualmente é utilizado pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) no Brasil. Este método foi descrito por McKee e colaboradores (1993) e é baseado no produto de precipitação numa dada escala de tempo (por mês). Devido à grande extensão territorial do Brasil, são encontradas variadas características climáticas nas diferentes regiões e o impacto que a seca pode provocar nas atividades humanas e sociais podem gerar grandes prejuízos. Por isso é interessante monitorar os eventos de seca em várias épocas já que afeta a

agricultura, os recursos hídricos, o setor elétrico, entre outros. Na figura a seguir, podemos observar o monitoramento de secas no Brasil no período de um ano (Jan/2019 a Jan/2020) e que todas as regiões sofrem com algum grau de seca, sendo que as regiões Centro-Oeste, Nordeste, parte do Pará e São Paulo sofrem com uma seca mais intensa.

Figura 1. Monitoramento de secas no Brasil no período de 12 meses (Jan/2019 a Jan/2020). Fonte: Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos/Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (CPTEC/INPE). Disponível em: <http://clima1.cptec.inpe.br/spi/pt>.



De acordo com o trabalho de Laxa e colaboradores (2019), a seca pode ser classificada como leve, moderada e severa. A transição entre os estágios depende tanto na duração quanto na intensidade da desidratação, e por isso, um valor absoluto de desidratação não pode ser atribuído. Várias unidades são utilizadas para descrever as limitações de água como teor de umidade do solo, conteúdo relativo de água, conteúdo de água (grama de água por grama de solo), capacidade de campo, entre outros. O consenso é que o conteúdo relativo de água (RWC – *relative water content*) em um estresse leve varia entre 60-70% e um controle  $\geq 90\%$ , no estresse moderado é entre 40-60% e no severo entre 0-40%. O trabalho ainda reúne diversos trabalhos com diferentes unidades, entretanto a classificação utilizando conteúdo relativo de água é consistente entre diferentes espécies, mesmo que a duração aplicada para

atingir esses estados sejam bem diferentes. Ainda cita que condições severas de estresse hídrico podem ser atingidos rapidamente no intervalo de uma semana quando há o uso de solos com baixa capacidade de retenção de água. A ausência de irrigação num período de uma a duas semanas mostrou ser a condição mais adequada para testar a tolerância à seca e a recuperação de várias espécies cultivadas em solo como em *Arabidopsis thaliana* (GE et al., 2018; LI et al., 2018), arroz (GAO et al., 2018), tabaco (XIA et al., 2018), cana-de-açúcar (AUGUSTINE et al., 2015) e tomate (ZHU et al., 2014).

A seca juntamente à salinidade e temperatura são os estresses abióticos que mais limitam o crescimento e produtividade das plantas (VORASOOT et al., 2003; JALEEL et al., 2009; GOLLDACK et al., 2014). As plantas possuem vários sensores capazes de perceber estímulos de estresse e ativar vias de sinalização envolvendo mensageiros secundários, hormônios vegetais, transdutores de sinal e reguladores transcricionais (CVIKROVA et al. 2013, DANQUAH et al. 2014, GILROY et al. 2014; ZANDALINAS et al., 2018). Além disso, utilizam diferentes estratégias para sobreviverem à seca e envolvem vários aspectos morfológicos e fisiológicos (BLUM, 1996; REICH, 2014; NORTON et al., 2016).

### **2.1.1 Estratégias de adaptação a seca utilizada pelas plantas**

Nos trabalhos de Levitt e colaboradores (1980) e Ludlow (1989) são descritas as duas principais estratégias que as plantas perenes utilizam para resistirem à seca e/ou sobreviverem. Uma das estratégias é chamada de retardo de desidratação, que permite que a planta mantenha o turgor e volume celular ao realizar o acúmulo de osmólitos compatíveis, como glicina-betaína e prolina, aumento do crescimento das raízes e também por meio do fechamento estomático com o objetivo de evitar a perda de água (GARWOOD & SINCLAIR, 1979; VOLAIRE et al., 1998; VERSLUES et al., 2006; GOLLDACK et al., 2014; NORTON et al., 2016). Esta estratégia é suficiente para a planta manter seu desempenho quando estiver sob estresses moderados por longos períodos (KRAMER & BOYER, 1995; NORTON et al., 2016).

A segunda estratégia é a tolerância de desidratação e ocorre assim que o déficit hídrico atinge um ponto crítico e a planta começa a ter dificuldades em evitar a perda de água. Esta estratégia utiliza mecanismos moleculares importantes para evitar o dano celular (WEST et al., 1990; VERSLUES et al., 2006) e possibilitar a recuperação da planta quando reidratada (BEWLEY, 1995; VOLAIRE & LEVIÈVRE, 2001, VOLAIRE, 2018). Alguns desses mecanismos podem ser alterações metabólicas, controle dos níveis de espécies reativas de

oxigênio e acúmulo de osmólitos compatíveis e proteínas protetoras, como as deidrininas e proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) cuja atividade aumenta durante a seca (VERSLUES et al., 2006; GOLLDACK et al., 2014; NORTON et al., 2016).

Com o desenvolvimento de pesquisas sobre as respostas das plantas a seca, ficou claro que os eventos moleculares iniciados pela baixa disponibilidade de água não se aplicam exclusivamente a um tipo de desidratação (retardo ou tolerância), e muitas vezes as plantas mostram várias respostas combinadas para suportar a seca (LUDLOW, 1989; VERSLUES et al., 2006). Um exemplo disso é o caso das deidrininas que podem atuar como hidrofílicas, que são proteínas com função de retenção de água (característica da desidratação de retardo) além da função de proteger as estruturas celulares (característica da desidratação de tolerância) (CLOSE, 1997). Sob déficit hídrico moderado, é esperado que a maioria das gramíneas perenes continue se desenvolvendo e crescendo. O termo resistência a seca pode ser usado tanto para a capacidade da planta manter a produtividade sob déficit hídrico moderado quanto para a recuperação da planta após seca severa em espécies lenhosas ou gramínea, e utiliza diversas estratégias como as de escape, tolerância e retardo de desidratação (VOLLAIRE, 2018). Para déficit hídrico severo, espera-se que a planta saiba quando não deve crescer para sobreviver a condições potencialmente letais (BIELENBERG, 2011). Neste último caso, o termo “sobrevivência a seca” é mais adequado do que “resistência a seca”, pois combina a capacidade de não crescer durante o período seco para sobreviver e poder se recuperar após o término do período de escassez de água (VOLLAIRE et al., 2014).

Uma ampla variabilidade de respostas de gramíneas a seca tem sido descrita em espécies de *Panicum hallii* (LOVELL et al., 2016), *Megathyrsus maximus* (BELONI et al., 2017), *Sorghum sudanense* (ZHU et al., 2017), *Urochloa* (BELONI et al., 2018) e *Dactylis glomerata* (BRISTIEL et al., 2019). No entanto, mais caracterizações fisiológicas são necessárias para a avaliação de mais genótipos, assim como respostas genéticas e moleculares de como as plantas respondem à seca, pois ainda há mecanismos que são pouco conhecidos em gramíneas tropicais ou subtropicais. O sequenciamento de RNA e/ou proteínas pode ajudar a decifrar os mecanismos que as plantas utilizam para adaptar-se a diversos ambientes e pode auxiliar no remodelamento dos sistemas de cultivares no futuro.

## **2.2 O gênero *Paspalum* L.**

O gênero *Paspalum* pertence à tribo Paniceae, subfamília Panicoideae e família Poaceae (BARRETO, 1974). Há cerca de 330 espécies do gênero catalogadas no mundo e

podem ser encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas (ZULOAGA & MORRONE, 2005). No Brasil são conhecidas 215 espécies (FLORA DO BRASIL 2020, 2020), encontradas sob diferentes ecossistemas e condições ecológicas (BARRETO, 1974; ZULOAGA et al., 2004). De acordo com Toracio (2013), algumas espécies do gênero são recomendadas para formação de pastagens, gramados, controle da erosão, conservação de taludes, formação de piquetes para criação de cavalos, bezerros entre outros, e apresentam boa resistência à seca, às queimadas e às baixas temperaturas. Espécies deste gênero como *P. notatum* Flügge, *P. dilatatum* Poir, *P. plicatulum* Michx. e *P. guenoarum* Arechav são utilizadas como gramados e forragens em vários locais com sucesso, como Estados Unidos, Argentina e Austrália (EVERS & BURSON, 2004; SANDHU et al., 2010; ACUÑA et al., 2011; CASTRO et al., 2015; RIOS et al., 2017). Embora haja uma grande diversidade de espécies de *Paspalum* disponíveis no Brasil, o seu uso ainda é pequeno como forrageira cultivada, apesar de ser encontrada nas pastagens naturais no Sul do Brasil (BARRETO, 1974; QUADROS et al., 2003; PILLAR et al., 2009).

### **2.2.1 *Paspalum notatum* Flügge**

A espécie *Paspalum notatum* Flügge (PARODI, 1937), também conhecida no Brasil como grama-batatais, é uma gramínea perene subtropical nativa da América do Sul amplamente distribuída dos Estados Unidos até a Argentina, incluindo as Ilhas Caribenhas (CHASE, 1929; BURTON, 1948; BASHAW et al., 1970; OCHOGAVÍA et al., 2018). O citótipo mais comum encontrado desta espécie é tetraploide ( $2n = 4x = 40$ ), apomítico, pseudogâmico e auto-compatível (BURTON 1948; BASHAW et al., 1970; SANDHU et al., 2010; ORTIZ et al., 2013; FELITTI et al., 2015), sendo também encontrados diploides sexuais auto-incompatíveis ( $2n = 2x = 20$ ) em uma área limitada no nordeste da Argentina (BURTON 1946; DAURELIO et al. 2004). Além disso, genótipos triploides e pentaploides apomíticos também foram identificados em populações naturais (QUARÍN et al. 1989; TISCHLER & BURSON, 1995; ORTIZ et al., 2013).

É uma das espécies de gramíneas de maior importância como espécie forrageira tropical, apresentando boa qualidade de forragem, alta resistência ao pisoteio dos animais, bem adaptada a solos arenosos inférteis e requer pouco manejo (POZZOBON & VALLS, 1997; RIOS et al., 2017). Segundo Steiner (2005), as gramíneas de *P. notatum* podem ser utilizadas para fins ornamentais em gramados, jardins, paisagismo, parques e quadras de esportes além do valor agrônomo como forrageira. A grama-batatais é utilizada principalmente no combate à erosão, pois suas raízes se entrelaçam e retêm o solo e, por isso,

pode ser cultivada em terrenos acidentados, taludes e ao longo de canais e rodovias (MAEDA & PEREIRA, 1997; MARASCHIN, 2001), além de ser plantada em extensas áreas como margens de rodovias, ferrovias e laterais de pistas de decolagem/aterriagem em aeroportos (SOUZA et al., 2016).

Diversos ecótipos de *P. notatum* são listados no trabalho de Acuña e colaboradores (2019), entre eles, cultivares resistentes a frio (FINLAYSON, 1941; TAKAI & KOMATSU, 1998; BLOUNT & ACUÑA, 2009), com alta palatabilidade (WILSON, 1987; TAKAI & KOMATSU, 1998; BLOUNT & ACUÑA, 2009), rápida germinação (BLOUNT & ACUÑA, 2009; ANDERNSON et al., 2011) e bom vigor (BLOUNT & ACUÑA, 2009). Essas variadas características encontradas nos diversos ecótipos de *P. notatum* tornam a espécie interessante para experimentos de cunho agrônomo visando o melhoramento das cultivares comerciais da espécie. Na Embrapa Pecuária Sudeste há uma grande variabilidade de acessos conservados no Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* e reúne 36 acessos de *P. notatum* Flüggé (ALELO, 2020) como o BGP 216 (Figura 2).

Figura 2. Acesso de *Paspalum notatum* Flüggé em casa de vegetação da Embrapa Pecuária Sudeste. Fonte: Wilson Malagó Jr.



Atualmente, existem algumas sequências depositadas em bancos de dados, como os transcriptomas de *P. notatum* de indivíduos sexuais e apomíticos a partir de amostras de folhas (OLIVEIRA et al., 2020) e flores (ORTIZ et al., 2017), e também bibliotecas de sRNAs a partir de espiguetas (ORTIZ et al., 2019) possibilitando a descoberta de genes e componentes regulatórios relacionados a apomixia.

### 2.2.2 *Paspalum vaginatum* Swartz

*Paspalum vaginatum* Swartz (Figura 3), conhecida como *gramilla* ou *gramilla blanca* na Argentina, é uma gramínea perene halofítica, diploide ( $2n = 2x = 20$ ), auto-incompatível, de rápido crescimento e de estação quente. Desenvolve-se em dunas de areia e pode crescer em locais com alto teor de sal, em condições encharcadas ou aquecidas pela areia (DUNCAN & CARROW, 2000; JIA et al., 2015; GUO et al., 2016; POMPEIANO et al., 2016).

Na região costeira, cresce bem sob clima extremamente quente e úmido, e é utilizada para evitar erosões do solo. É usada também para produção de grama para paisagens e gramados em campos de golfe e outros esportes em regiões de clima tropical (DUNCAN & CARROW, 2000; BROSNAN & DEPUTY, 2009; GUSMÃO et al., 2016). Além disso, tem um longo histórico de uso para biorremediação de solos contaminados (ex.: contaminação por metais pesados ou produtos químicos) ou não produtivos (DUNCAN & CARROW, 2000; DUNCAN, 2003). Esta gramínea possui tolerância a diversos estresses: tolerância a salinidade, cresce em pHs de 3,6 até 10,2, tolerância a seca, alagamentos, baixas temperaturas, condições de baixa quantidade de oxigênio e também a baixa intensidade de luz (DUDECK & PEACOCK 1985; LAKANMI & OKUSANYA 1990; DUNCAN, 2000; BROSNAN & DEPUTY, 2009; JIA et al., 2015; GUO et al., 2016; GUSMÃO et al., 2016; POMPEIANO et al., 2016).

Acuña e colaboradores (2019) reuniram em seu trabalho 19 cultivares comerciais de *P. vaginatum* dos quais as cultivares *Sea Isle I* (DUNCAN, 2002; BROSNAN & DEPUTY, 2008), *SeaWay* (BENNETT & DEPEW, 2002a) e *SeaGreen* (BENNETT & DEPEW, 2002b) são tolerantes a seca, sendo que as duas últimas também apresentam superior tolerância a salinidade. Devido a essas características únicas de crescimento, é uma espécie com grande potencial para estudos de tolerância a seca e salinidade (DUNCAN & CARROW, 2000; WANG et al., 2006), como já ocorre na Universidade da Geórgia (EUA), onde há um programa de melhoramento de *Paspalum vaginatum* ([www.gapaspalum.com](http://www.gapaspalum.com)) que estuda além da tolerância a seca e salinidade, mas também outros aspectos como resistência a pragas, herbicidas e fungos.

Há também algumas sequências disponíveis para *P. vaginatum*, como o transcriptoma de *P. vaginatum* (JIA et al., 2015) e mapas genéticos a partir da técnica de genotipagem por sequenciamento para a descoberta de SNPs em grandes quantidades (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*) como no trabalho de Qi e colaboradores (2019) comparando-o

com o genoma da gramínea *Sorghum bicolor* e também no trabalho de tolerância a salinidade de Eudy (2016) comparando com os genomas de *Setaria italica* e *Sorghum bicolor*.

Figura 3. Acesso de *Paspalum vaginatum* Swartz em casa de vegetação da Embrapa Pecuária Sudeste. Fonte: Wilson Malagó Jr.



### 2.3 Transcriptômica e seca em plantas

Análises de expressão gênica podem contribuir com a descoberta de genes candidatos relacionada às respostas ao estresse hídrico pela comparação entre grupos em condições normais e de seca, e isso pode abrir novas rotas para melhoramento genético e edição gênica. O aperfeiçoamento e aplicação de técnicas moleculares e genômicas tem melhorado muito a caracterização e melhoramento de recursos genéticos disponíveis (VAN et al., 2011). O advento das tecnologias de Sequenciamento de Nova Geração (NGS – *Next Generation Sequencing*) possibilitou o estudo dos sistemas biológicos num nível antes nunca imaginado. O desenvolvimento tanto na parte experimental (métodos de preparação da amostra), quanto nas ferramentas computacionais permitiram um aumento nas possíveis utilizações da tecnologia de NGS, sendo que essas áreas ainda precisam ser mais exploradas a fim de obter o máximo de informações das plataformas.

O trabalho de Jia et al. (2015) demonstrou que o sequenciamento *paired-end* da Illumina é um método rápido e de bom custo-benefício para descoberta de genes e desenvolvimento de marcadores moleculares em *P. vaginatum*. Algumas das aplicações das técnicas de NGS podem ser utilizadas para análises de expressão gênica (OPTIZ et al., 2014), desenvolvimento de marcadores moleculares na presença (WEBER et al., 2007; CHEUNG et

al., 2006) ou ausência (NOVAES et al., 2008) de genoma de referência, mecanismos de regulação gênica, melhor conhecimento de vias metabólicas, entre outros (VAN DIJK et al., 2014; GOODWIN, et al., 2016).

O sequenciamento de transcriptomas de plantas facilita o entendimento de mecanismos moleculares envolvidos na resposta à seca, pois possibilita o mapeamento de genes candidatos relacionados ao déficit hídrico, como é descrito em estudos de comparação de níveis de transcritos em milho (OPTIZ et al., 2014), em trigo (OKAY et al., 2014) e também no estudo de meta-análise em diversas plantas (BENNY, et al., 2019).

Estudos em gramíneas revelaram potenciais genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico quando comparados os transcriptomas de tecidos em condições normais e de seca. Estes genes estão envolvidos em mecanismos de regulação transcricional, transdução de sinal, metabolismo celular, entre outros. É possível também identificar genes candidatos sem um conhecimento prévio de sua associação com a seca, como reportado nos trabalhos de Zhu et al. (2017) em *Sorghum sudanense* e no de Wang et al. (2018) em *Lolium perene*. A busca por genes candidatos também pode ser realizada pela comparação de transcriptomas de linhagens diferentes submetidas ao déficit hídrico como descritos em *Lolium multiflorum* (PAN et al., 2016) e em *Cynodon dactylon* e *Cynodon transvaalensis* (ZHOU et al., 2014).

Análises comparativas de transcriptomas de tecidos submetidos a estresse hídrico e sem estresse identificaram genes ativadores que estimulam a expressão de outros genes importantes que promovem a resistência à seca (JAMES et al., 2008; ONETO et al., 2016). Estes ativadores podem ser utilizados para transformar espécies de *Paspalum* e outros cultivares de interesse comercial para obter maior resistência a seca, como realizado em *P. notatum* (JAMES et al., 2008) transformado com o gene *Dreb1A*, e em milho (ONETO et al., 2016) com o gene *ipt*.

## 2.4 Hipóteses

Há diferenças no padrão de expressão gênica de um indivíduo quando ele está sob déficit hídrico em comparação com condições de disponibilidade hídrica normal.

Os genes diferencialmente expressos encontrados possibilitarão identificar quais estratégias são utilizadas na adaptação/tolerância das plantas à seca.

Os níveis de expressão gênica encontradas *in silico* corresponderão de forma equivalente às encontradas *in vivo*.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

Analisar os transcriptomas de duas espécies de *Paspalum* submetidos ao déficit hídrico e compará-los com controle para a identificação de genes e vias metabólicas a fim de melhor compreender os mecanismos envolvidos na adaptação das plantas à seca.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Realizar e avaliar a montagem *de novo* dos transcriptomas foliares sob estresse hídrico e sem estresse;
- Identificar genes e vias diferencialmente expressas entre as amostras submetidas ao estresse e as amostras controle sem estresse hídrico;
- Validar as expressões gênicas encontradas *in silico* via Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa (qPCR) em tempo real;
- Identificar quais estratégias de resistência a seca são utilizadas pelos acessos de *Paspalum*.

## 4. METODOLOGIA

Para melhor acompanhamento deste trabalho, o experimento hídrico realizado para a avaliação fisiológica dos genótipos e a escolha das amostras para sequenciamento foi descrito no Apêndice A. A partir dos resultados fisiológicos, os RNAs totais de folhas, em triplicatas biológicas, dos genótipos *Paspalum notatum* BGP 216 e *Paspalum vaginatum* BGP 114 nos tempos controle (T0) e com 7% de umidade relativa do solo (T1) foram enviados para o preparo das bibliotecas em empresa especializada.

### 4.1 Extração de RNA e Preparo das Bibliotecas de cDNA

As amostras de folhas nos tempos T0 (controle) e T1 (7% URS) dos dois acessos tiveram seus RNAs totais extraídos e enviadas para sequenciamento. A extração de RNA total de folhas foi realizada utilizando o “RNeasy Plant Mini Kit” da QIAGEN (ID: 74904) conforme instruções do fabricante e o material extraído foi armazenado em ultra freezer.

A construção das bibliotecas de cDNA e o sequenciamento foram realizados no Centro de Genômica Funcional da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ - USP, Piracicaba), especializada em Sequenciamento de Nova Geração (NGS – *Next Generation Sequencing*). Os RNAs totais foram avaliados pelo equipamento “2100 Bioanalyzer – Agilent Technologies” para averiguar a quantidade, pureza e integridade. Posteriormente, a purificação do mRNA e o preparo das bibliotecas de cDNA foi realizado com o kit “TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit” (Illumina) e o material foi sequenciado de acordo com protocolos Illumina em equipamento “HiSeq 2500” (Illumina) com “Kit HiSeq-V4” (Illumina) e leituras 2x100 pb do tipo *paired-end* em duplicata.

Para cada uma das duas espécies foram sequenciadas três réplicas biológicas de folhas nas duas situações, com e sem déficit hídrico, totalizando seis bibliotecas por espécie. Os dados brutos gerados pelo NGS foram convertidos para o formato FASTQ pelo software CASAVA v.1.8.2. e separados em bibliotecas (Tabelas 1 e 2). Para iniciar as análises, as duplicatas técnicas sequenciadas em canaletas diferentes (L002 e L003), das seis bibliotecas de cDNA de cada espécie, foram concatenadas (Tabelas 1 e 2) por recomendação do protocolo do Trinity (HAAS et al., 2013) e estes arquivos foram os utilizados nas análises subsequentes.

As análises realizadas desde a montagem dos transcriptomas até a anotação dos genes diferencialmente expressos seguiram o *pipeline* e *scripts* fornecidos pela página do Trinity no

GitHub (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki>). Foram utilizados os servidores do Laboratório Multiusuário de Bioinformática da Embrapa Informática localizada em Campinas-SP. Antes da montagem, as bibliotecas de cDNA foram avaliadas quanto a sua qualidade para dar prosseguimento as análises posteriores. Um esquema dos passos realizados após a escolha dos genótipos está demonstrado na Figura 4.

Figura 4. Esquema da metodologia utilizada para os dois genótipos de *Paspalum* escolhidos.



Tabela 1. Identificação das bibliotecas de cDNA de *Paspalum vaginatum* com e sem déficit hídrico.

<i>Paspalum vaginatum</i>					
Condição hídrica	Replicatas Biológicas	Replicata técnica 1	Replicata técnica 2	Amostras concatenadas	ID amostra
T0 - sem déficit hídrico*	Planta A	1_L002_R1	1_L003_R1	1_L000_R1	NS_1
		1_L002_R2	1_L003_R2	1_L000_R2	
	Planta B	2_L002_R1	2_L003_R1	2_L000_R1	NS_2
		2_L002_R2	2_L003_R2	2_L000_R2	
	Planta C	3_L002_R1	3_L003_R1	3_L000_R1	NS_3
		3_L002_R2	3_L003_R2	3_L000_R2	
T1 - com déficit hídrico**	Planta A	13_L002_R1	13_L003_R1	13_L000_R1	HS_13
		13_L002_R2	13_L003_R2	13_L000_R2	
	Planta B	14_L002_R1	14_L003_R1	14_L000_R1	HS_14
		14_L002_R2	14_L003_R2	14_L000_R2	
	Planta C	15_L002_R1	15_L003_R1	15_L000_R1	HS_15
		15_L002_R2	15_L003_R2	15_L000_R2	

\*umidade do solo em 28% medida por tensiômetro; \*\*umidade do solo em 7% medida por tensiômetro.

Tabela 2. Identificação das bibliotecas de cDNA de *Paspalum notatum* com e sem déficit hídrico.

<i>Paspalum notatum</i>					
Condição hídrica	Replicatas Biológicas	Replicata técnica 1	Replicata técnica 2	Amostras concatenadas	ID Amostra
T0 - sem déficit hídrico*	Planta A	7_L002_R1	7_L003_R1	7_L000_R1	NS_7
		7_L002_R2	7_L003_R2	7_L000_R2	
	Planta B	8_L002_R1	8_L003_R1	8_L000_R1	NS_8
		8_L002_R2	8_L003_R2	8_L000_R2	
	Planta C	9_L002_R1	9_L003_R1	9_L000_R1	NS_9
		9_L002_R2	9_L003_R2	9_L000_R2	
T1 - com déficit hídrico**	Planta A	19_L002_R1	19_L003_R1	19_L000_R1	HS_19
		19_L002_R2	19_L003_R2	19_L000_R2	
	Planta B	20_L002_R1	20_L003_R1	20_L000_R1	HS_20
		20_L002_R2	20_L003_R2	20_L000_R2	
	Planta C	21_L002_R1	21_L003_R1	21_L000_R1	HS_21
		21_L002_R2	21_L003_R2	21_L000_R2	

\* umidade do solo em 28% medida por tensiômetro; \*\*umidade do solo em 7% medida por tensiômetro.

## 4.2 Qualidade das bibliotecas de cDNA

O software FastQC (versão 0.11.5) foi utilizado para avaliar a qualidade das *reads* (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) por meio de vários módulos de

avaliação, como: Qualidade da sequência por base; Pontuações de qualidade por sequência; Conteúdo de base por sequência; Conteúdo de GC por sequência; Conteúdo de N por base; Distribuição do Comprimento das Sequências; Sequências Duplicadas; Sequências Super-representadas e Conteúdo de Adaptadores.

### 4.3 Montagem *de novo* dos transcriptomas

Confirmada a qualidade das bibliotecas de cDNA, as montagens *de novo* dos transcriptomas foram realizadas utilizando o *software* Trinity v. 2.5.1 (GRABHERR et al., 2011), método eficiente e robusto para montagens que não possuem genoma de referência, como é o caso das espécies em estudo neste trabalho. Para esta análise, a maioria dos parâmetros foi utilizada na opção padrão (*default*), mas alguns parâmetros foram adicionados ou modificados e estão descritos a seguir: `--seqType fq` para indicar que o formato do arquivo é FastQ; `--normalize_by_read_set` para normalização de reads; `--min_kmer_cov 3` para remoção de k-mers com alta taxa de erros de sequenciamento e, conseqüentemente, diminuindo a complexidade dos gráficos e tempo de execução do programa; e `--trimmomatic` para realizar a trimagem das amostras para remoção de adaptadores e regiões de qualidade ruim. Devido a grande quantidade de transcritos semelhantes, o software CD-HIT (FU et al., 2012) foi utilizado para filtrar os transcritos com mais de 95% de similaridade.

### 4.4 Avaliação das montagens dos transcriptomas

Antes de realizar as análises de expressão diferencial, os transcriptomas montados foram avaliados quanto à qualidade. Para isso, *scripts* foram utilizados para obter parâmetros de qualidade como valores de *contig* N50 (*script* *TrinityStats.pl*) e ExN50 (*script* *contig\_ExN50\_statistic.pl* e *plot\_ExN50\_statistic.Rscript*). Além disso, foi realizada uma busca por homologia contra o banco de dados do SwissProt e NCBI, utilizando o *software* DIAMOND (BUCHFINK et al., 2014), seguido do uso do *script* *analyze\_blastPlus\_topHit\_coverage.pl* para identificar os transcritos considerados próximos de *full-length* (Transcritos com uma cobertura de alinhamento acima de 80% segundo o Trinity - <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/Counting-Full-Length-Trinity-Transcripts>). O *software* Transrate v. 1.0.3 (SMITH-UNNA et al., 2016) também avaliou a qualidade da montagem dos transcriptomas gerando uma pontuação a partir da avaliação dos *contigs* e *reads* mapeadas. Os dados foram previamente filtrados para os transcritos de maior expressão para cada gene (*script* *filter\_low\_expr\_transcripts.pl*), já que o software considera

todos os comprimentos de todos os *contigs*, acarretando em uma pontuação muito abaixo do esperado.

Para avaliar o quão completos estavam os transcriptomas montados, o *software* BUSCO v.3 (SIMÃO et al., 2015) foi utilizado para comparar os dados contra o conjunto de genes ortólogos altamente conservados em, pelo menos, 90% das embriófitas presentes no banco de dados *OrthoDB* v.9. Devido à grande quantidade de transcritos similares para o mesmo gene, também foi feita a análise para os transcritos de maior expressão (*script filter\_low\_expr\_transcripts.pl*), a fim de diminuir o número exagerado de cópias duplicadas.

A fim de estimar o percentual de *reads* mapeados, o *software* Bowtie2 (LANGMEAD & SALZBERG, 2012) mapeou as *reads* contra os transcritos montados pelo Trinity.

#### 4.5 Quantificação de Transcritos

O *software* RSEM (LI & DEWEY, 2011) foi utilizado para estimar a abundância de transcritos e inferir os valores de Transcritos por Milhão de Transcritos (TPM, do inglês: *Transcripts Per Million Transcripts*) e de Média Aparada de Valores M (TMM, do inglês: *Trimmed Mean of M values*) para normalização da expressão dos transcritos.

#### 4.6 Correlação das amostras e réplicas biológicas

Estimada a abundância de transcritos, as réplicas biológicas foram analisadas para verificar se estavam bem correlacionadas e também observar a relação entre as amostras de diferentes condições utilizando o *script PtR* (Perl-to-R, <https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/QC-Samples-and-Biological-Replicates>).

#### 4.7 Expressão diferencial, anotação gênica e enriquecimento funcional

O pacote R edgeR (ROBINSON et al., 2010) foi utilizado para a análise de expressão diferencial utilizando valores de  $\log_2\text{Fold-Change} \geq 2$  e  $p\text{-valor} \leq 0.001$  para ajuste da taxa de falsas descobertas (FDR - *False Discovery Rate*). Para a anotação dos genes diferencialmente expressos, inicialmente foi utilizado o *software* Transdecoder (HAAS et al., 2013) para identificar possíveis regiões codificantes (CDS) nos transcritos sequenciados. A fim de reiterar as sequências CDS encontradas, as sequências obtidas pelo Transdecoder foram comparadas por meio do algoritmo BLASTp (ALTSCHUL et al., 1997) contra o banco de dados de proteínas SwissProt (UniProt - <https://www.uniprot.org/>), e também foi utilizado o programa HMMER (v.3.2.1) para buscar peptídeos para domínios de proteínas usando o Pfam como referência.

O *software* Trinotate (v. 3.1.1) (BRYANT et al., 2017) (<https://github.com/Trinotate/Trinotate.github.io/wiki>) foi usado para realizar a anotação funcional e os métodos empregados foram: busca por homologia BLASTx nos transcritos gerados pelo Trinity e, BLASTp, nas proteínas preditas pelo TransDecoder, utilizando os bancos de dados SwissProt (UniProt - <https://www.uniprot.org/>) e o banco de dados não redundante do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>); identificação de domínios de proteínas no banco de famílias de proteínas PFAM (EL-GEBALI et al., 2018) utilizando o programa HMMER (v3.2.1) (EDDY, 2011); predição de peptídeos sinal utilizando o programa signalP 4.1 (PETRSEN et al., 2011) e domínios transmembrana através do programa tmHMM v. 2.0 (KROGH et al., 2001), e anotação com vários bancos de dados como *Gene Ontology Consortium* (ASHBURNER et al., 2000) e Kegg (KANEHISA & GOTO, 2000). Os dados de anotação funcional obtidos foram integrados no banco de dados SQLite a fim de reunir todas as anotações associadas a cada transcriptoma em um único relatório.

O pacote GoSeq (YOUNG et al., 2010) foi utilizado para o enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos (GDEs) de acordo com a classificação do *Gene Ontology Consortium*, dividindo os genes preditos em três classes: Processo Biológico, Função Molecular e Componente Celular. A plataforma online REVIGO (SUPEK et al., 2011) foi utilizada para resumir e visualizar as listas de termos GO obtidos com os parâmetros padrões. Como entrada, foram utilizados os termos GO encontrados nos GDEs e seus respectivos p-valores.

O pacote Blast2GO também foi utilizado para as anotações funcionais e para o enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos.

#### **4.8 Validação via PCR em tempo real**

As diferentes expressões gênicas encontradas entre as amostras foram validadas por PCR em tempo real. Para tal, 12 alvos (Tabela 4) foram escolhidos, sendo quatro alvos avaliados somente para *P. vaginatum*, quatro para *P. notatum* e quatro em comum para as duas espécies. Dentre estes transcritos, quatro foram classificados como “desconhecidos” pois não foram encontradas correspondências contra os bancos de dados avaliados, e o critério de escolha foi o *fold-change*. Para os alvos conhecidos, ou seja, que apresentaram anotação gênica, foi levado em consideração sua relação com a seca e/ou *fold-change*. Foram selecionados quatro genes candidatos a endógenos a partir de buscas de genes já conhecidos como endógenos em diversos organismos na literatura (YANG et al., 2015; MARTINS et al.,

2016; ANDRADE et al., 2017; LIU et al., 2017; JIN et al., 2019). O comportamento desses genes também foi observado nos dados *in silico*. Os quatro genes (NADH desidrogenase (ND); Fator de splicing U2af (U2); Enzima Ubiquitina conjugada E2 (UB); Fator de alongação 1 $\alpha$  (EF)) foram testados, sendo que os dois que se apresentaram mais estáveis foram utilizados como controles endógenos e calibradores para as análises nas duas espécies (Tabela 3). Os valores de expressão dos quatro genes foram avaliados pela ferramenta online RefFinder (XIE et al., 2012), que integra quatro algoritmos (Genorm (VANDESOMPELE et al., 2002), NormFinder (ANDERSEN et al., 2004), BestKeeper (PFALL et al., 2004) e o método comparativo delta-Ct (SILVER et al., 2006)) comparando os resultados e fornecendo uma classificação compreensiva dos outros métodos. Os valores de expressão gênica relativa foram determinados utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001; RAO et al., 2013).

Os *primers* foram desenhados com auxílio das ferramentas Primer3Input (v. 0.4.0) (UNTERGASSER et al, 2012), NetPrimer (PREMIER Biosoft) e primer-BLAST (YE et al., 2012). O Primer3Input foi utilizado para obter os possíveis pares de *primers* e os parâmetros configurados foram: tamanho do primer entre 18 a 22 bases, sendo 20 o tamanho ideal; tamanho do produto de amplificação entre 70 e 150 pb; Tm entre 55 a 60 °C e conteúdo de GC menor que 60%. Já o NetPrimer foi utilizado para conferir principalmente a presença de dímeros, heterodímeros e *hairpin* nos *primers* desenhados. O primer-BLAST foi utilizado para identificar se a sequência desenhada para os primers correspondiam com sequências inespecíficas, ou seja, com outros alvos que não fosse o gene anotado.

Um micrograma de RNA total foi incubado com “DNase I (RNase Free)” (1u/ $\mu$ l), Buffer (10x) e água DEPC (para completar) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado EDTA (25 mM) e incubado a 65 °C por 10 minutos para inativar a atividade da enzima. A síntese de cDNA foi realizada com o kit “GoScript™ Reverse Transcription System” (Promega, Madison, WI, USA) utilizando o RNA, previamente tratado com DNase, e incubado com primers Oligo(dT)<sub>15</sub> (0,5  $\mu$ g/reação) e primers randômicos (0,5  $\mu$ g/reação) a 70 °C por 5 minutos, seguido de banho de gelo por 5 minutos. Em seguida, esta reação foi misturada com o mix contendo Buffer (1x), MgCl<sub>2</sub> (25 mM), dNTPs (10 mM), RNAsin (20 u) e enzima transcriptase reversa (200 u) para um volume final de 20,5  $\mu$ l. Esta reação foi então incubada a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 1h e 70 °C por 15 minutos.

A qPCR foi realizada no sistema “7500 Real Time PCR” (Applied Biosystems) usando o reagente “GoTaq® qPCR Master Mix” (Promega, Madison, WI, USA). As reações foram feitas em duplicatas com volume final de 15  $\mu$ l e foram utilizados 25 ng de cDNA ,

GoTaq® qPCR Master Mix (1X) e cada par de primer (10 µM) sob as seguintes condições: 1 ciclo de 95 °C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, e posteriormente, 95 °C por 15 segundos. Foi feito o teste de eficiência em todos os primers utilizando cinco pontos de diluição 1:5 (75 ng, 15 ng, 3 ng, 0,6 ng e 0,12 ng de cDNA) para a obtenção da curva padrão de eficiência, e cada ponto foi feito em duplicata. O cálculo de eficiência é feito pelo software 7500 v.2.0.6 pela seguinte fórmula:

$$[\text{Eficiência} = 10^{(-1/\text{slope})} - 1]$$

Tabela 3. Genes avaliados via PCR em tempo real.

Espécie*	Situação	Anotação	ID Gene	Sigla	FW 5' - 3'	RV 5' - 3'
PV	UP	Late embryogenesis abundant protein Lea14-A	LEA14-A	LE	CACCTACACGCTCAAGTTCG	AAGTCGTAGGGCACCTTGG
PV	UP	Desconhecido	TRINITY_DN10681_c0_g2_i1	T1	CCATCAGGTCCTTGGGTATC	CCTACCAAGCACCAAGAAGC
PV	DOWN	Protein MET1, chloroplastic	MET1	ME	ACAGCCATCCAAGCAAAGTC	AGTCAACTTGCGTCCAAACC
PV	DOWN	Desconhecido	TRINITY_DN15447_c0_g4_i2	T7	TCTCACATTACGCGCTCATC	CTGGAGGATTACCCGAGTTC
PN	UP	CSC1-like protein ERD4	ERD4	CS	TGCCCTTGGATGGCTTATAG	GCCCATTGCTCTCGTAGTTAG
PN	UP	Desconhecido	TRINITY_DN18835_c3_g7_i1	T5	ATGCGCTGCACAAACTACAC	CATATAGGCCGGATTTGCTG
PN	DOWN	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	PEP1	CA	CGACAAGCTCGTTGAGTACG	AGCTCGTAGCACTCCTGGAC
PN	DOWN	Desconhecido	TRINITY_DN20760_c0_g4_i1	T0	CTGATGTTCTTGCCACCTTG	CATAATGGCAAGGGTGTGTG
PV/PN	UP	Aquaporin TIP4-2	TIP42_MAIZE	TI	ATCCTCCTCCGCTACCTCAC	GAGGATCATCTCCATCACCAG
PV PN	UP	Thiamine thiazole synthase 2	THI1-2	TH	GATCGTCACCGGAATGGAG TGGAGGTGGCAGAGATTGAC	CTTCTGGCCGGAGATCATC
PV PN	DOWN	Phosphoglycerate kinase	PGKH	PG	TTGTACCACGGCTGTCTGAG	ACGTTCTCGAGGAGCACAAC ACCGATTTCTCAACGTCAGG
PV/PN	DOWN	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase	RCA	RC	TCGTCCACCTCTCCAAGAAC	AGACAAGCTCGCATTGGAAG
PV PN	Endógeno	Elongation factor 1-alpha	EF1A	EF4 EF5	TCCTTGCGTTCCTTGG CTTGGAGTGAGGCAGATGATC	ACGGGCCTTGGAGTACTTG GCCACTTCCTTCACGATCTC
PV/PN	Endógeno	Splicing factor U2af small subunit B	U2AF35B	U2	GCAACCTGTAGGCAGTTTGAG	CTCCTGGAAGCAGAATGTCC
PV/PN	Endógeno	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	At3g08610	ND	ACGCCAGTACTTCATCCAC	GACGTCCCACATATCGTTCC
PV/PN	Endógeno	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 23	UBC23	UB	AGTTGGCTTCCAAGATGGTG	CATATATTTTCATGAGGCCCAAC

\*PV = *Paspalum vaginatum*; PN = *Paspalum notatum*; FW = Primer Forward; RV = Primer Reverse; UP = super-expresso; DOWN = sub-expresso

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação das bibliotecas de cDNA

A partir do sequenciamento foram obtidos, aproximadamente, 20 milhões de pares de *reads* por biblioteca. Para as análises, as replicatas técnicas foram concatenadas gerando 40 milhões de pares de *reads* por biblioteca.

Antes de realizar a montagem dos transcriptomas, as bibliotecas foram avaliadas quanto sua qualidade por meio do software FastQC que forneceu um relatório de controle de qualidade. A Figura 5 mostra uma visão geral da qualidade das bases em cada posição das *reads* da amostra NS\_1. Podemos observar que a maioria das *reads* encontram-se na região de cor verde. Essa região indica que o *Phred score* é maior que 28, o que indica boa qualidade das bibliotecas. É comum também observar que as posições finais das *reads* geralmente tem um decaimento de qualidade e podem ser encontradas mais próximas da região laranja.

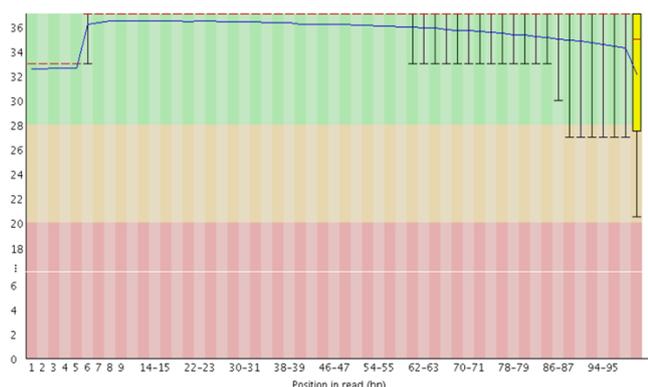


Figura 5. Qualidade das bases em cada posição das *reads* da biblioteca NS\_1 utilizando o software FastQC.

Todas as outras bibliotecas foram avaliadas pelo FastQC e apresentaram um perfil semelhante, ou seja, todas estão com boa qualidade e viáveis para as próximas análises, indicando que não houve problemas relacionados ao sequenciamento ou manipulação do material para produção das bibliotecas de cDNA.

### 5.2 Avaliação das montagens dos transcriptomas

Após a montagem dos transcriptomas, foram geradas as estatísticas gerais e estão descritas na Tabela 4.

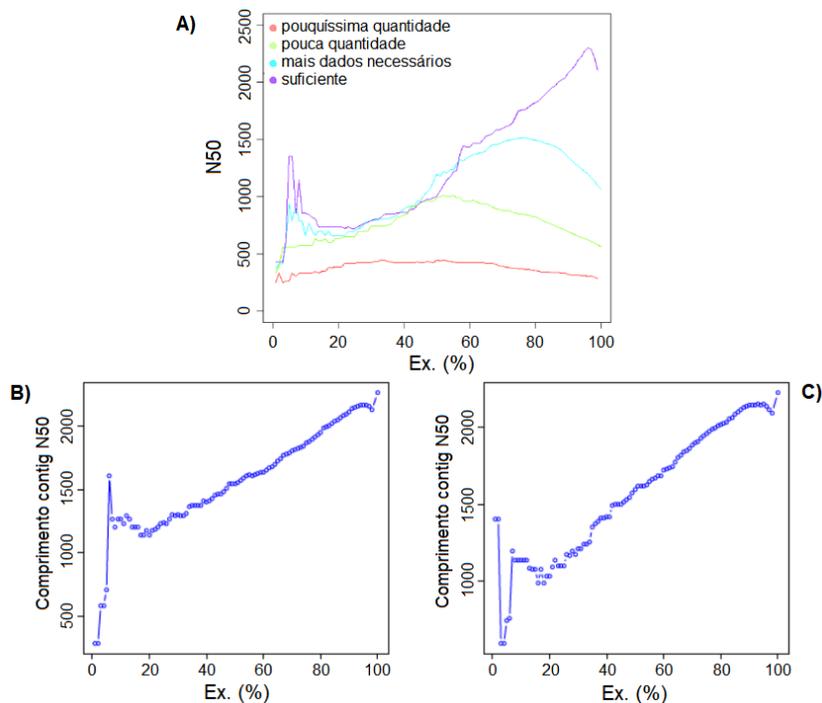
A Figura 6A exemplifica o perfil ExN50 para conjuntos de dados utilizados em montagens, desde pouquíssima quantidade de *reads* até quantidades consideradas suficientes. Esta análise se limita aos transcritos mais expressos que representam x% do total de dados de expressão normalizados, e geralmente, quando Ex está próximo de 90, é quando há um maior

valor de N50 (50% das bases montadas são encontradas em contigs com o comprimento de pelo menos o valor dado por contig N50). Podemos observar que as montagens de *Paspalum vaginatum* e *Paspalum notatum*, Figuras 6B e 6C respectivamente, possuem perfil semelhante à linha roxa da Figura 6A, indicando quantidade suficiente de *reads* para uma boa montagem.

Tabela 4. Estatísticas gerais obtidas após a montagem dos transcriptomas foliares das espécies *P. vaginatum* BGP 114 e de *P. notatum* BGP 216.

	<i>P. vaginatum</i>	<i>P. notatum</i>
<b>Total de genes preditos</b>	31.835	38.002
<b>Total de transcritos preditos</b>	59.000	68.829
<b>Percentual de GC</b>	49,29	48,43
<b>Contig N50</b>	2.259	2.226
<b>Median Contig Length</b>	1.193	1.083
<b>Tamanho médio dos contigs</b>	1528,11	1450,46
<b>Total de bases montadas</b>	207.818.421	244.416.030

Figura 6. Perfis de ExN50 para montagens de transcriptomas. A) Exemplo de montagens com diferentes quantidades de *reads*, desde pouquíssimas *reads* (em vermelho) até uma quantidade suficiente (em roxo). B) e C) representam os perfis obtidos das montagens de *Paspalum vaginatum* e *Paspalum notatum*, respectivamente.



O mapeamento das *reads*, pelo software Bowtie2, nos transcriptomas montados, resultaram em 91,39% de *reads* pareadas corretamente para *P. vaginatum* e 91,61% para *P. notatum*. O resultado foi considerado satisfatório, já que se espera que um transcriptoma

montado pelo Trinity tenha cerca de 70 a 80% de *reads* pareadas corretamente (<https://github.com/trinityrnaseq/trinityrnaseq/wiki/RNA-Seq-Read-Representation-by-Trinity-Assembly>).

Outro método para avaliar a qualidade da montagem é observar a quantidade de transcritos próximos de estarem completos (cobertura de alinhamento acima de 80%). O *script analyze\_blastPlus\_topHit\_coverage.pl* foi utilizado contra o banco de dados do UniProt/SwissProt e TrEmbl, e resultou em 17831 transcritos (42,5% de 40907 transcritos) que coincidem com proteínas em pelo menos 80% da sua cobertura para *P. vaginatum*, e 17422 transcritos (36,6% de 47514) para *P. notatum*. O trabalho de Lim et al. (2017) sobre transcriptoma de folha de *Banksia hookeriana* utilizou o mesmo script e obteve cerca de 20% de transcritos quase completos.

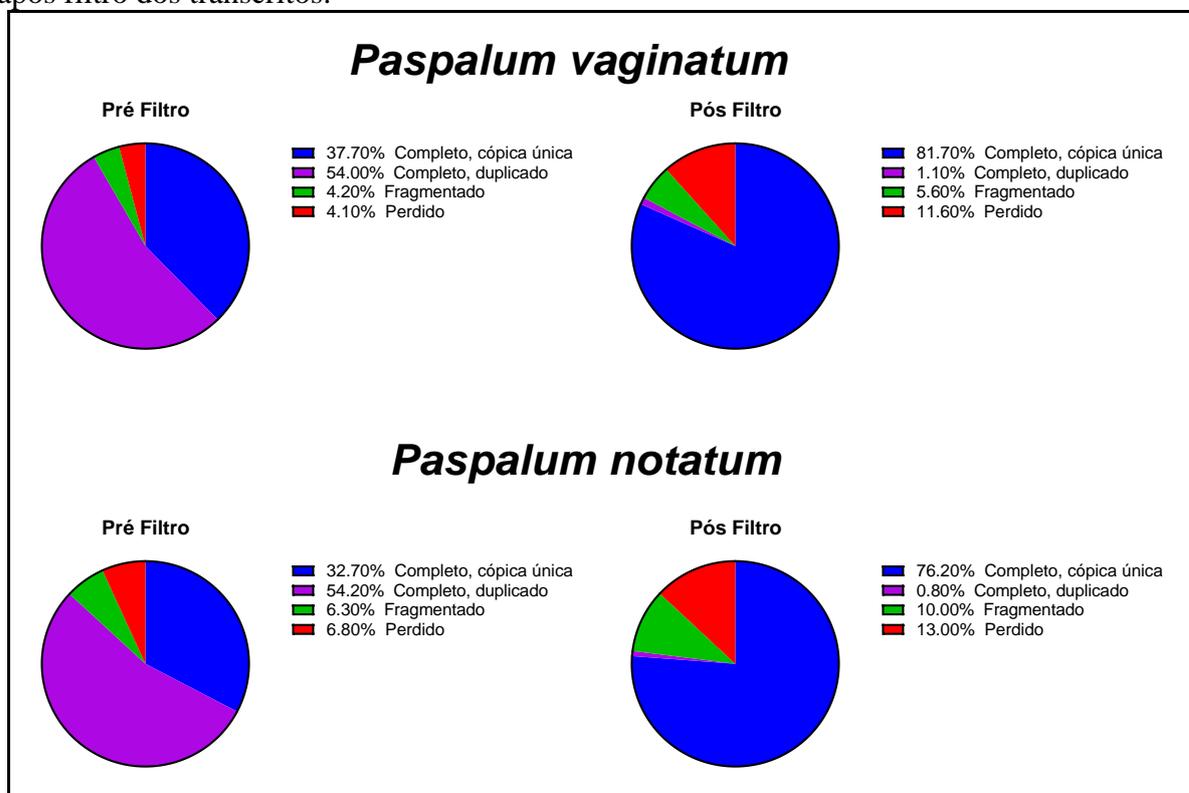
Para verificar a completude dos transcriptomas montados foi utilizado o software BUSCO. O BUSCO foi utilizado tanto para os transcritos filtrados como não filtrados. O resultado do BUSCO classifica em genes ortólogos completos (representado por um único transcrito), duplicados (completos e representados por mais de um transcrito), fragmentados (parcialmente recuperado) e perdidos (não encontrado). O resultado antes e após o filtro está descrito na Figura 7.

Podemos observar na Figura 8 que, antes do filtro, cerca de 91% (*P. vaginatum*) e 86% (*P. notatum*) dos transcriptomas estavam completos (completo cópia única + completo duplicado). Após o filtro, o alto número de duplicados diminuiu drasticamente e a porcentagem de BUSCOs perdidos aumentou, já que o filtro removeu diversos transcritos. No entanto, a porcentagem de BUSCOs completos diminuiu, mas permaneceu acima de 75% para ambas as espécies. Dados parecidos com os BUSCOs não filtrados foram observados no trabalho de Hoang e colaboradores (2018), com uma alta taxa de duplicados em cana de açúcar, e esta alta taxa de duplicados se deve a grande quantidade de transcritos semelhantes gerados durante a montagem *de novo* dos transcriptomas.

O *software* Transrate estimou e avaliou os *contigs* e a quantidade de *reads* mapeadas e a partir disso, forneceu a pontuação da montagem dos transcriptomas. Do total de bases de *Paspalum vaginatum*, 44.962.419 (21,6%) bases foram utilizadas, e foram estimados 44.842 *contigs* e destes, 44.741 (99,8%) foram considerados bons. Para *Paspalum notatum*, 50.725.010 (20,7%) bases foram utilizadas e 56.718 *contigs* foram estimados, sendo 56.504 (99,6%) bons. Ambas as montagens obtiveram uma pontuação alta para *reads* mapeadas com

um percentual acima de 85%, e 77% consideradas boas. Percentagens semelhantes foram encontradas no trabalho de Blande et al. (2017) em *Noccaea caeruleascens*.

Figura 7. Análise BUSCO para as duas montagens das duas espécies de *Paspalum*, antes e após filtro dos transcritos.



A pontuação final para a montagem do transcriptoma de *P. vaginatum* foi de 0.393 e, 0.3701 para *P. notatum*, sendo que a pontuação varia de zero a 1, onde 1 é a melhor. No trabalho de Smith-Unna et al. (2016), o *software* Transrate foi aplicado em 155 trabalhos de montagens *de novo* de transcriptomas (todos com *reads paired-end* Illumina) a fim de fornecer uma referência para pontuação. Uma montagem com pontuação de 0.22 foi considerada melhor que 50% dos transcriptomas avaliados pelo software. A partir desta referência, as montagens de *Paspalum* foram consideradas boas.

### 5.3 Correlação das amostras e réplicas biológicas

Antes de realizar as análises de expressão gênica, as réplicas biológicas foram avaliadas. As análises resultaram em mapas de calor (Figura 8) e Análise de Componentes Principais (Figura 9) para mostrar a relação entre as amostras e as duas condições, sem déficit hídrico e com déficit hídrico.

Os mapas de calor demonstraram as diferenças entre as amostras das duas condições. Quanto mais próximas da cor roxa, maiores as diferenças entre as amostras, e quanto mais próximas do amarelo, mais semelhantes.

Figura 8. Mapas de calor representando a relação entre as réplicas biológicas, além do comportamento das amostras em diferentes condições, sob déficit hídrico (HS) e sem déficit hídrico (NS).

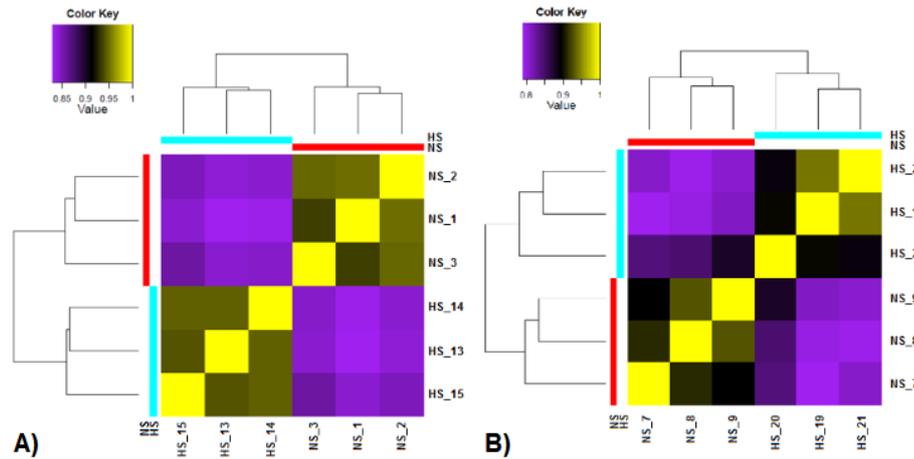
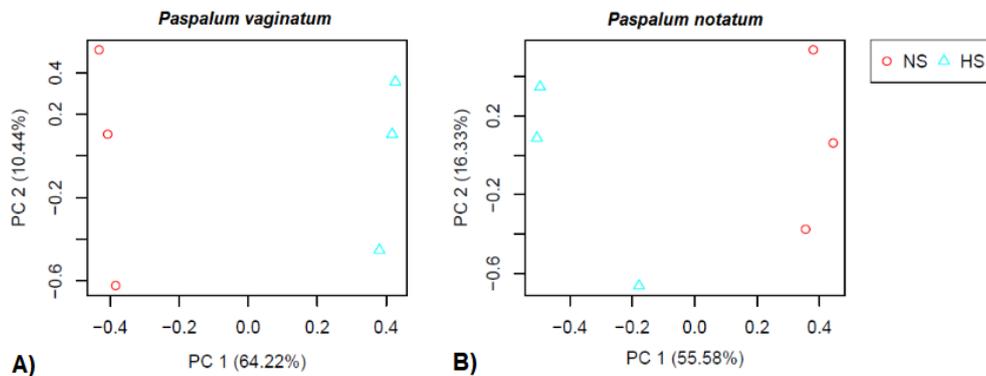


Figura 9. Análise de Componentes Principais de *Paspalum vaginatum* e *Paspalum notatum*. Os círculos vermelhos indicam as amostras sem déficit hídrico (NS) e os triângulos azuis são as amostras sob déficit hídrico (HS).

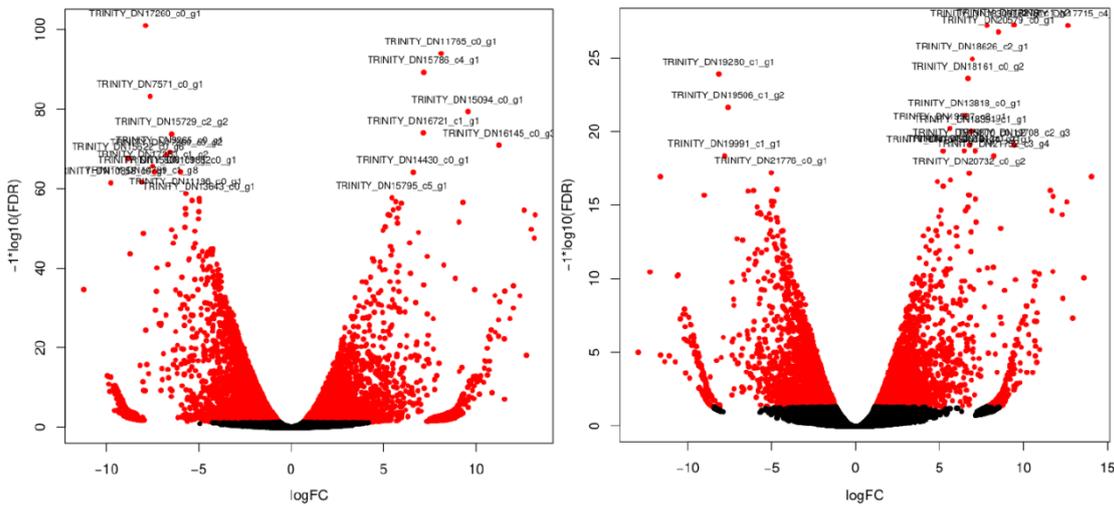


Podemos observar que há uma maior diferença entre as amostras com e sem estresse hídrico, que é o esperado, já que se aproximam da coloração roxa. Já a relação entre as replicatas biológicas está dentro do esperado, ou seja, próximo da coloração amarela, exceto na Figura 8B, onde a amostra HS\_20 (sob déficit hídrico) apresenta uma coloração preta, tanto quando é comparada com as réplicas biológicas, quanto com as amostras sem déficit hídrico. No entanto, podemos observar que mesmo com o comportamento desta amostra, a Análise de Componentes Principais conseguiu dividi-las em suas respectivas condições, sob estresse hídrico (HS) e sem estresse (NS), em ambas as espécies.

#### 5.4 Expressão diferencial, anotação gênica e enriquecimento funcional

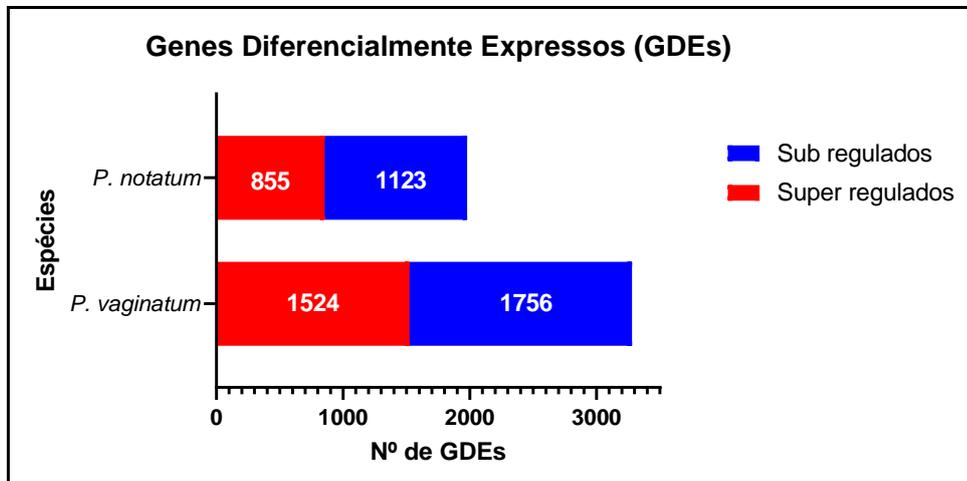
O software RSEM estimou as quantidades de transcritos e genes expressos, obtendo 59000 transcritos e 31835 genes para *P. vaginatum*, e 68829 transcritos e 38002 genes para *P. notatum*. Os parâmetros configurados no pacote edgeR para considerar quais eram os GDEs foram  $\log_2\text{Fold-Change} \geq 2$ , p-valor ajustado  $\leq 0,001$  e taxa de falsas descobertas (FDR - False Discovery Rate)  $< 0,05$ . Os GDEs podem ser observados como sendo os pontos vermelhos plotados no gráfico Volcano na Figura 10.

Figura 10. Volcanos plot gerados pelo pacote R edgeR. A esquerda, representação dos genes diferencialmente expressos (pontos vermelhos) de *P. vaginatum*, e a direita, os GDEs de *P. notatum*. Foram considerados GDEs, aqueles com  $\text{FDR} < 0.05$  e  $\log\text{Fold-Change} \geq 2$ .



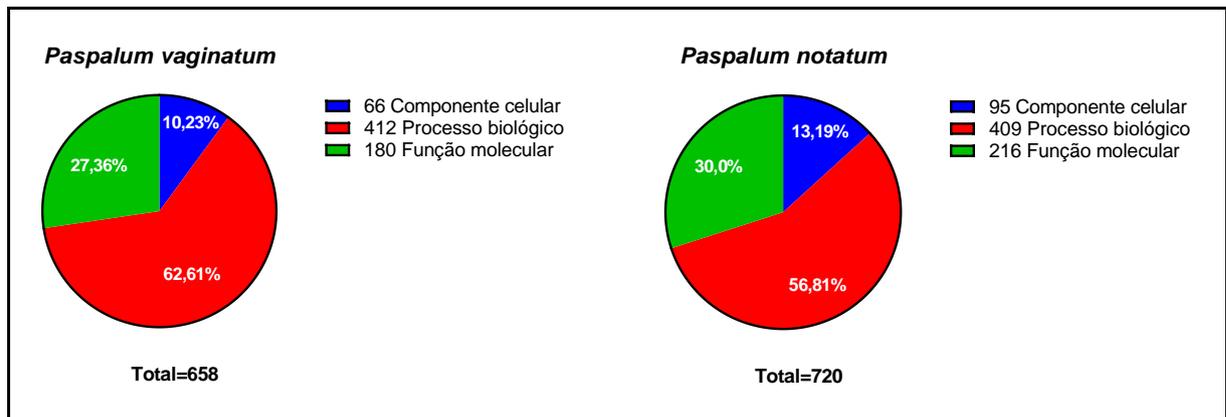
Para *P. vaginatum* foram identificados 3280 GDEs e para *P. notatum*, 1978 GDEs. O número de genes super e sub regulados estão descritos na Figura 15.

Figura 11. Quantidade de genes sub e super-expressos em *P. vaginatum* e *P. notatum*.



O software GOSeq foi utilizado para o enriquecimento funcional, e desta análise, resultaram em 658 termos enriquecidos para *Paspalum vaginatum* e 720 para *Paspalum notatum*, como pode ser observado na Figura 12.

Figura 12. Número de termos GO enriquecidos encontrados entre os genes diferencialmente expressos em *P. vaginatum* e *P. notatum*.



Podemos observar que mais da metade dos termos GO provenientes da análise de enriquecimento funcional pertencem à classe “processo biológico”, representando 62,6% em *P. vaginatum* e 56,8% em *P. notatum*.

Observou-se que entre os termos GO enriquecidos, foram encontrados os GO:0009414, G:0009415 e GO:2000070 em *P. vaginatum* e o GO:0009415 em *P. notatum*. Estes termos estão relacionados à seca, como privação de água, resposta a seca e resposta a desidratação.

O software Blast2GO fornece resultados gerais dos termos de ontologia gênica enriquecidos (Figuras 13 e 14). Já a plataforma online REVIGO, a partir das anotações funcionais utilizando o Trinotate e enriquecimento com GOSeq, demonstra resultados com mais sub-classes em formato de mapa de árvore como pode ser observado nas Figuras 15 e 16 nos quais estão representados os termos GO com maior significância na classe Processo Biológico. Neste tipo de gráfico, cada retângulo com determinada cor é um agrupamento representativo e o tamanho de cada um reflete seu p-valor.

Figura 13. Termos gerais de ontologia gênica enriquecidos para *P. vaginatum* obtidos a partir do software Blast2GO.

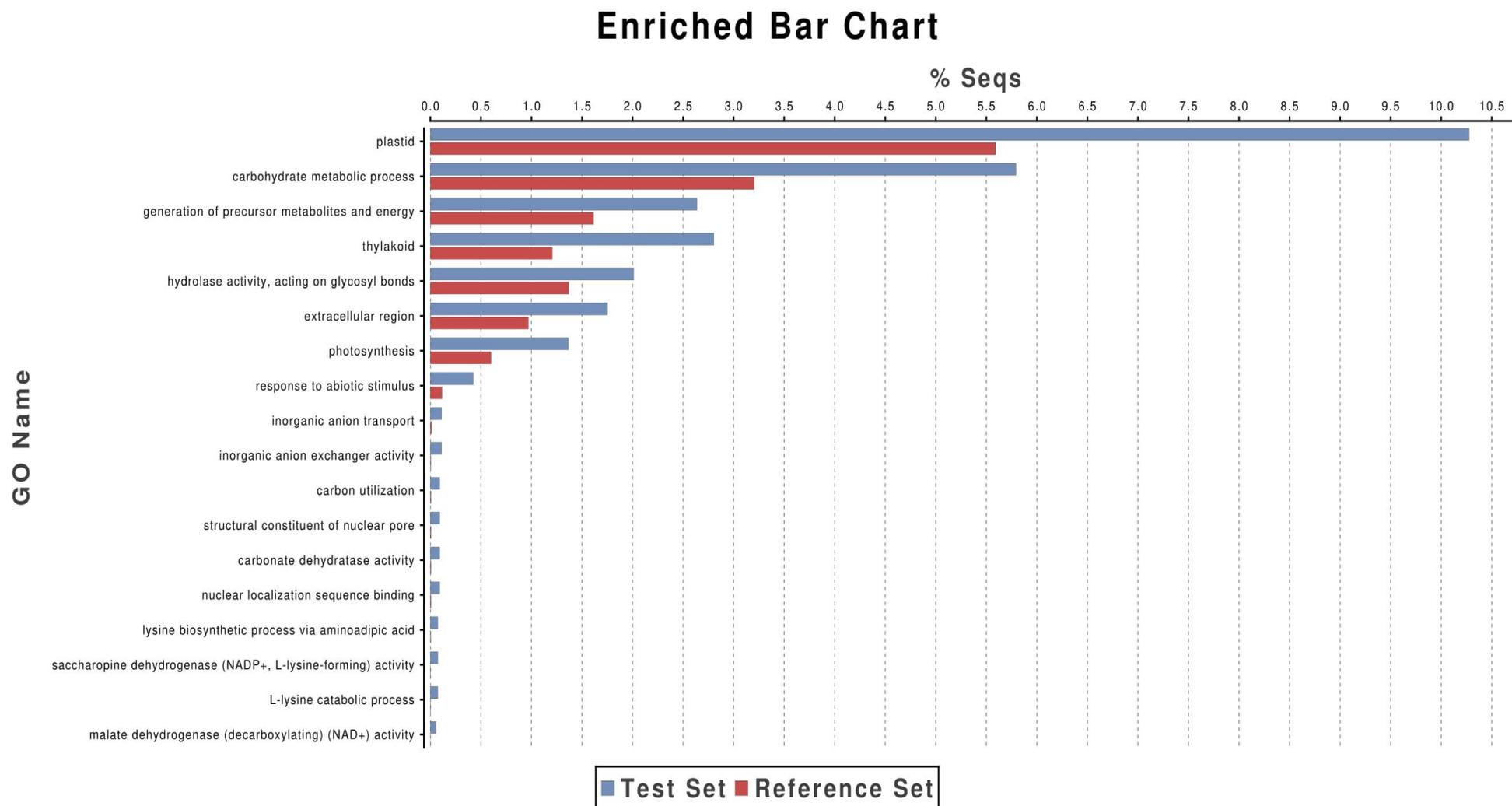


Figura 14. Termos gerais de ontologia gênica enriquecidos para *P. notatum* obtidos a partir do software Blast2GO.

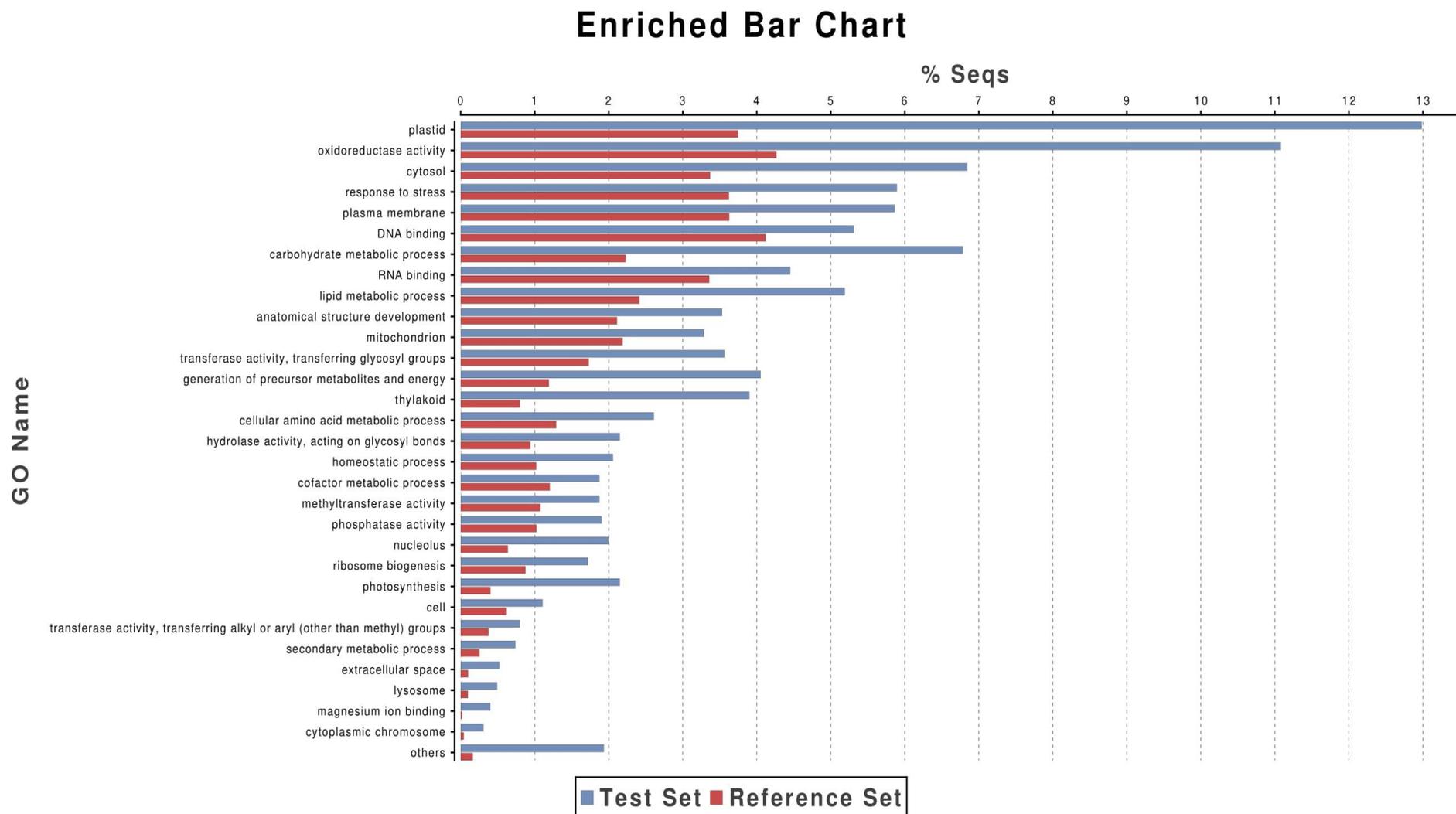


Figura 15. Mapa de árvore dos termos GO enriquecidos de *P. vaginatum* e agrupados pela plataforma REVIGO.

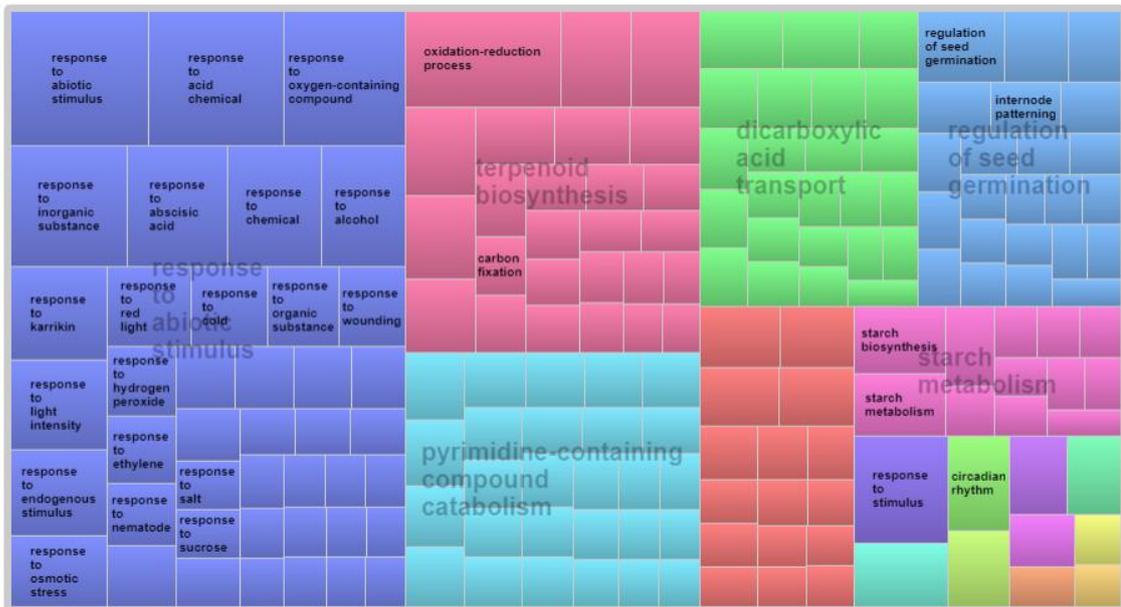
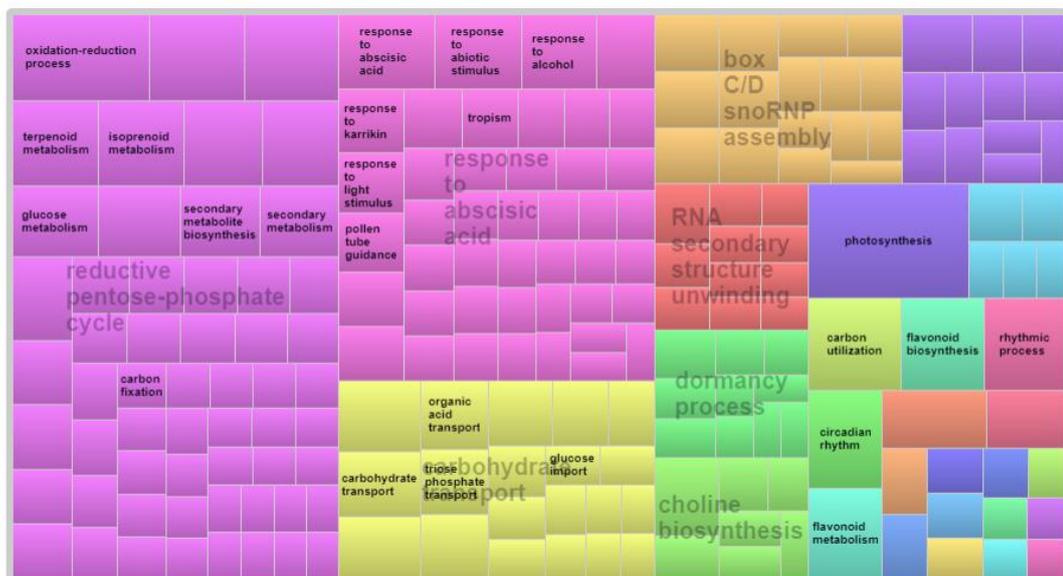


Figura 16. Mapa de árvore dos termos GO enriquecidos de *P. notatum* e agrupados pela plataforma REVIGO.



Uma das primeiras respostas das plantas frente ao déficit hídrico é o fechamento de estômatos a fim de evitar a perda de água via transpiração. Consequentemente, há uma diminuição na captação de  $\text{CO}_2$  pela fotossíntese e essa menor disponibilidade leva a uma oxigenação da ribulose-1,5-bifosfato, que por sua vez, leva a produção de peróxido de hidrogênio nos peroxissomos (NOCTOR, et al., 2002; LAXA et al., 2019). A baixa quantidade do acceptor de elétrons  $\text{CO}_2$  leva a uma diminuição na oxidação de NADPH no ciclo de Calvin-Benson e com a baixa disponibilidade de  $\text{NADP}^+$ , ocorre um acúmulo de

elétrons e uma grande redução no transporte de elétrons fotossintéticos. Isso leva a um aumento na taxa de redução de oxigênio comoceptor de elétrons na reação de Mehler no fotossistema I e ocorre a liberação de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Assim, os cloroplastos são os mais afetados durante a seca quando há luz para a fotossíntese mas baixa captação de CO<sub>2</sub> (LAXA et al., 2019), e por isso o termo plastídeo é o mais encontrado dentre os termos GO das duas espécies (Figuras 13 e 14).

Outro termo enriquecido nas duas espécies foi a atividade de glicosil hidrolases que são enzimas envolvidas em importantes processos fisiológicos de plantas, como respostas a estresses bióticos e abióticos, defesa contra herbívoros, ativação/inativação de fitormônios, lignificação e remodelamento da parede celular (OPASSIRI et al., 2006; CAO et al., 2017). As atividades de diversas enzimas desta família foram reportadas em estudos de déficit hídrico como em arroz (OPASSIRI et al., 2006), em *Arabidopsis* e arroz (CAO et al., 2017), em milho (XIN et al., 2018) e em *Camellia sinensis* (KOECH et al., 2019).

Na Figura 14, referente aos dados de *P. notatum*, podemos observar também uma grande quantidade de sequências relacionadas a atividade de oxidoredutases, como é o caso da catalase, superóxido dismutase e ascorbato peroxidase que foram encontradas entre os genes diferencialmente expressos. Estas enzimas possuem a função de detoxificar as espécies reativas de oxigênio, a fim de evitar o dano celular e permitir uma maior tolerância das plantas frente ao estresse hídrico (SARKER & OBA, 2018; LAXA et al., 2019). Esse comportamento pode ser uma das justificativas de como *P. notatum* teve uma menor queda da biomassa verde entre os tratamentos e entre os genótipos avaliados.

Entre os termos encontrados em Processo Biológico, os de maior relevância para *P. vaginatum* foram resposta a estímulo abiótico, biossíntese de terpenóides e produtos do catabolismo de pirimidinas. Para *P. notatum*, redução do ciclo de pentose-fosfato, resposta a ácido abscísico (ABA) e transporte de carboidratos foram os grupos relevantes. No grupo estímulo abiótico, aparecem resposta a ácidos químicos, resposta a componentes contendo oxigênio, resposta a substância inorgânica, resposta a ácido abscísico e resposta a estímulos.

Estes resultados correspondem a características relacionadas a seca, pois foram descritas em outros estudos de plantas sob déficit hídrico. O trabalho de Grundy et al. (2015) mostra genes importantes relacionados ao ciclo circadiano que regulam genes de resposta a seca, os níveis de espécies reativas de oxigênio, além de regular fitormônios, como o etileno e o ABA. Este, em condição de estresse hídrico ou salinidade, acumula rapidamente e controla as respostas de adaptação ao estresse (AGARWAL & JHA, 2010).

O uso de produtos de pirimidinas tem sido descrito para aumentar as respostas a diversos estresses abióticos (CANSEV et al., 2016). Seu acúmulo em condição de déficit hídrico foi observado em diversas plantas como em arroz (CASARTELLI et al., 2018) e soja (DAS et al., 2017). O acúmulo de metabólitos secundários como produtos de pirimidinas e terpenos (THOLL, 2015; MOSTOFA et al., 2018) foram encontrados em diversas plantas e citados no estudo de Selmar e Kleinwächter (2013). O trabalho de Das e colaboradores (2017) também demonstrou que sob condição de déficit hídrico, metabólitos essenciais de soja foram encontrados diferencialmente regulados em vários processos metabólicos, incluindo glicólise, ciclo de Krebs, via das pentoses e biossíntese de amido que regulam o metabolismo de carboidratos. Também foi afetado o metabolismo de aminoácidos e peptídeos, a biossíntese de purinas e pirimidinas e também o metabolismo relacionado a metabólitos secundários, principalmente os fitoquímicos. Foi observado um acúmulo de carboidratos como glicose, frutose, rafinose e sucrose, comportamento observado também nos dados de *Paspalum*.

Estudos recentes (DAS et al., 2017; WANG et al., 2018) mostraram que enzimas importantes envolvidas nos processos fotossintéticos e ciclo de Krebs estão sub regulados quando submetidos à seca. Este mesmo comportamento foi observado nos dados de *P. vaginatum* e *P. notatum*, já que alguns GDEs associados ao termo GO de fotossíntese foram encontrados sub regulados, como os genes *PPDK1*, *PPDK2*, e *CAPP* que traduzem, respectivamente, para piruvato fosfato diquinase 1, piruvato fosfato diquinase 2 e fosfoenolpiruvato carboxilase.

Os termos cloroplasto, plastídeo e tilacóide foram os termos mais representativos para Componente Celular, pois são os locais onde ocorre a fotofosforilação e envolvem os fotossistemas I e II. O fotossistema I (FQR-dependente, rota Ferredoxina-Plastoquinona-Redutase dependente) realiza a transferência cíclica de elétrons para a plastoquinona por meio da ferredoxina, enquanto o fotossistema II é dependente de NADH (LEHTIMÄKI et al., 2010).

Comparando os termos GO e os genes diferencialmente expressos de *P. vaginatum* e *P. notatum*, podemos sugerir que estas espécies adotam diferentes estratégias de adaptação à seca, conforme a terminologia de Levitt (1972) demonstrada por Verslues et al. (2006). Os dados encontrados *in silico* de ambas espécies de *Paspalum* juntamente aos dados de fisiologia, indicam que estes genótipos utilizam estratégias combinadas para resistir ao estresse.

Em *P. vaginatum* foi encontrado o termo regulação de germinação de semente em seu mapa de árvore (Figura 13), sendo que esta característica pertence a estratégia de desidratação de escape (NORTON et al., 2016).

Já a estratégia de tolerância a seca foi encontrada nos dois genótipos. Esta estratégia combina tanto mecanismos de prevenção da desidratação/perda de água (acúmulo de metabólitos) quanto de tolerância a desidratação para evitar o dano celular, e envolve: acúmulo de solutos e proteínas protetoras, mudanças metabólicas e controle de espécies reativas de oxigênio. Dentre os transcritos mais diferencialmente super expressos, foram encontradas correspondências com a proteína protetora LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), sendo esta extensivamente descrita super expressa em diversas plantas sob déficit hídrico (VERSLUES et al., 2006; OSAKABE et al., 2014; MAGWANGA et al., 2018). Foi observado também a presença de fatores de transcrição da família *ARF* entre os transcritos mais diferencialmente expressos. Os genes desta família foram descritos como reguladores da expressão de auxinas, que estão envolvidas no crescimento e desenvolvimento de plantas (LI et al., 2016) e, além disso, já foram relacionadas a respostas a estresses bióticos e abióticos em tomate (BOUZROUD et al., 2018).

Em *P. vaginatum*, também foi encontrada homologia com o domínio DUF4220 de uma proteína hipotética traduzida pelo gene *SAC1*, e este, ao ser mutado (ZHU et al., 2017), foi relacionado ao acúmulo de açúcares em folhas de arroz. De acordo com DAS et al. (2017), o acúmulo de carboidratos nas plantas é utilizado para manutenção e ajuste osmótico.

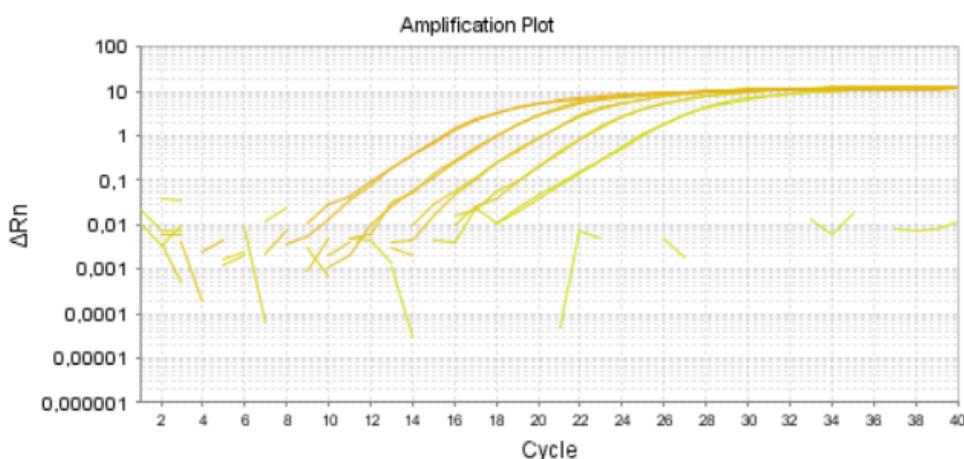
Foi observado que muitos genes diferencialmente expressos relacionados a fotossíntese estavam sub regulados para os dois genótipos, possivelmente pela diminuição da absorção de CO<sub>2</sub> devido ao fechamento de estômatos, mas também pela regulação de fitormônios (PINHEIRO & CHAVES, 2010). Este comportamento ocorre logo nos primeiros sintomas de seca para evitar a perda de água via transpiração, sendo uma característica da desidratação de retardo. Porém, mesmo que o mapa de árvore de *Paspalum notatum* tenha destacado esta característica, também aparece o processo de dormência, o qual envolve uma série de processos que leva a redução ou quase cessa o crescimento foliar, a completa ou parcial senescência foliar e, em alguns casos, a desidratação endógena dos meristemas (VOLAIRE & NORTON, 2006). Este processo tem sido demonstrado em diversos estudos ser muito importante para melhorar a sobrevivência da planta sob longos períodos e secas intensas (NORTON et al., 2006; MALINOWSKI et al., 2010; HAYES et al., 2010; ANNICCHIARICO et al., 2011; VOLAIRE, 2018).

Esta característica de dormência pode explicar o que foi observado nos dados de fisiologia de *P. notatum*, visto que mesmo em um estresse hídrico de 3 a 4% de umidade do solo, a planta demonstrou uma redução no crescimento da parte aérea, um declínio na biomassa verde (senescência das folhas), mas após o término do período seco, ou seja, após a reidratação, conseguiu rebrotar novos perfilhos, o que não ocorreu para *P. vaginatum*.

### 5.5 PCR em tempo real

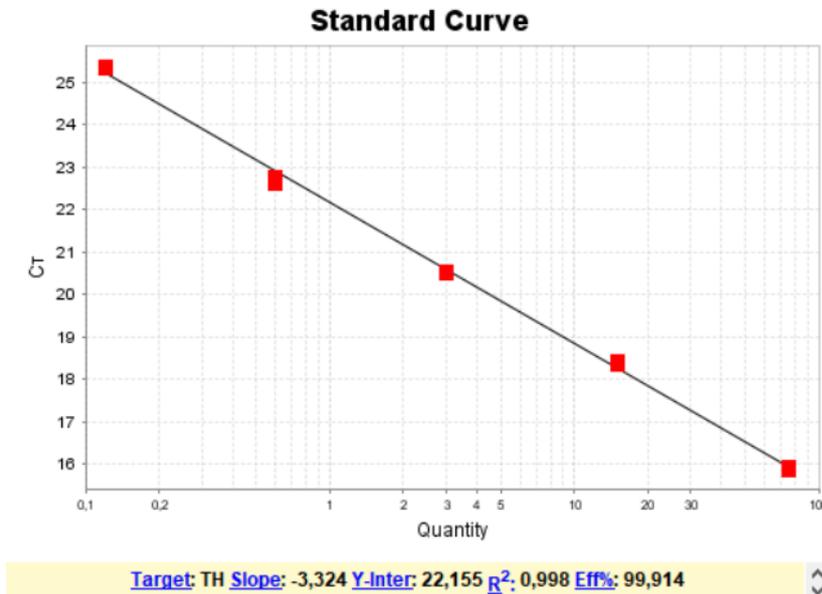
A partir dos testes de eficiência dos primers, todos apresentaram eficiências entre 95 e 105%, que é o padrão desejado. A Figura 17 representa o perfil de amplificação do gene THI1-2 na amostra HS\_21 de *P. notatum* com cinco pontos de diluição de cDNA 1:5 (75 ng, 15 ng, 3 ng, 0,6 ng e 0,12 ng de cDNA).

Figura 17. Perfil de curva de amplificação do teste de eficiência dos *primers* referentes ao gene THI1-2 utilizando a amostra HS\_21 de *P. notatum*. No gráfico podemos observar a taxa de fluorescência ( $\Delta Rn$ ) por ciclo.



Já a Figura 18 demonstra a curva padrão e uma taxa de eficiência de aproximadamente 100% do gene THI1-2. Observa-se ainda que o *Slope* (taxa de declínio do gráfico) é de -3,32, e está dentro do desejável (-3,2 a -3,5) e o  $R^2$  acima de 0,98 (KUANG et al., 2018). Alguns pares de primers tiveram alguns pontos de diluição removidos devido a possíveis erros de pipetagem, mas sempre foi mantido o mínimo de três pontos para obtenção da curva padrão. A porcentagem de eficiência de cada par de primer pode ser encontrada no Apêndice B.

Figura 18. Curva padrão do teste de eficiência do gene THI1-2. O eixo X representa a quantidade de cDNA e o eixo Y é a quantidade de ciclos necessários para que seja possível captar um sinal de fluorescência acima do limiar de leitura.



Após testar as eficiências dos primers, os quatro genes candidatos a controle endógeno foram avaliados quanto a sua estabilidade e o resultado pode ser observado na Figura 19. Foi desenhado um par de primer para o gene Elongation Factor 1- $\alpha$  (EF) para cada genótipo e por isso há a distinção entre EF4 (primer para *P. vaginatum*) e EF5 (para *P. notatum*). A análise compreensiva apresentada na Figura 19 levou em consideração os valores de Ct obtidos de cada amplificação utilizando os resultados dos cinco métodos reunidos pelo RefFinder que são apresentados na Tabela 5. Podemos observar que os genes U2 e o ND foram os mais estáveis e, portanto, escolhidos para controle interno nas comparações dos valores de expressão gênica diferencial.

Figura 19. Análise da estabilidade da expressão gênica dos quatro genes candidatos a controle endógeno.

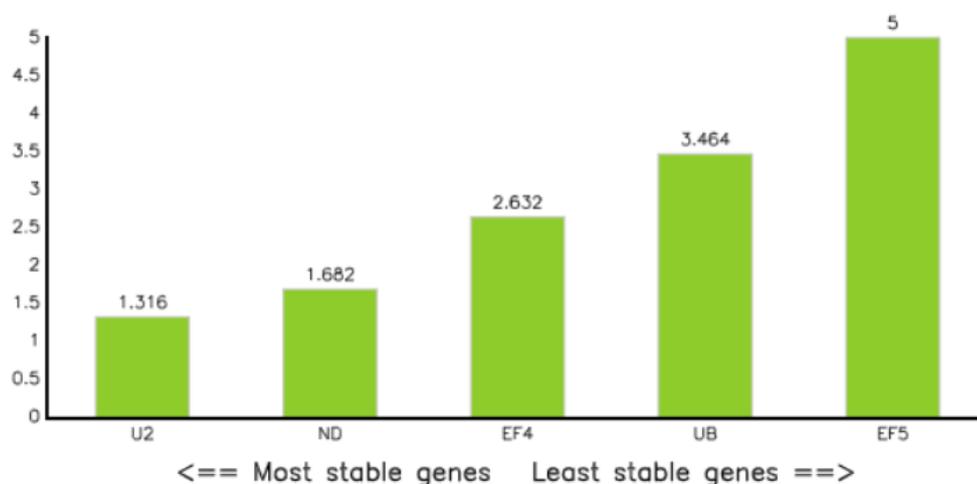


Tabela 5. Avaliação da estabilidade de expressão de quatro genes candidatos a controle endógeno.

Método	Ranking				
	1	2	3	4	5
<b>Delta CT</b>	U2	ND	UB	EF4	EF5
<b>BestKeeper</b>	EF4	ND	U2	UB	EF5
<b>Normfinder</b>	U2	ND	UB	EF4	EF5
<b>Genorm</b>	ND U2		EF4	UB	EF5

Nas Figuras 20 e 21 podemos observar os resultados de expressão relativa dos genes avaliados via qPCR e nos dados de RNA-seq de *P. vaginatum* e *P. notatum*, respectivamente. Para fazer a comparação entre as amostras controle e tratamento para obtenção da expressão relativa nos resultados de qPCR, os valores de expressão dos genes ND e U2 foram os utilizados para a normalização dos dados de todas as amostras controle e tratamento e foram considerados como o zero no eixo X (calibrador). Comparando os gráficos de qPCR e RNA-seq, podemos observar que valores de expressão gênica relativa encontrados por meio da qPCR segue o mesmo perfil que os encontrados por RNA-seq. É observado algumas variações entre os valores, já que a técnica de qPCR está sujeita a ligeiras diferenças devido a eficiência da amplificação (KUANG et al., 2018). Outros possíveis fatores que possam ter contribuído para essas diferenças é o que foi relatado pelo estudo de Everaert e colaboradores (2017) que avaliou um conjunto de dados de RNAs humanos via qPCR e 15% não

apresentaram resultados consistentes, sendo que geralmente, esses genes eram menores, com poucos éxons e/ou baixa qualidade das *reads*.

Figura 20. Expressões gênicas relativas das amostras de *Paspalum vaginatum* obtidas via qPCR e dos dados de RNA-seq. No eixo X são os genes avaliados: TI - gene TIP42; TH - gene THI1-2; T1 - gene desconhecido TRINITY\_DN10681\_c0\_g2\_i1; LE - gene LEA14-A; PG - gene PGKH; T7 - gene desconhecido TRINITY\_DN15447\_c0\_g4\_i2; ME - gene MET1; RC - gene RCA;

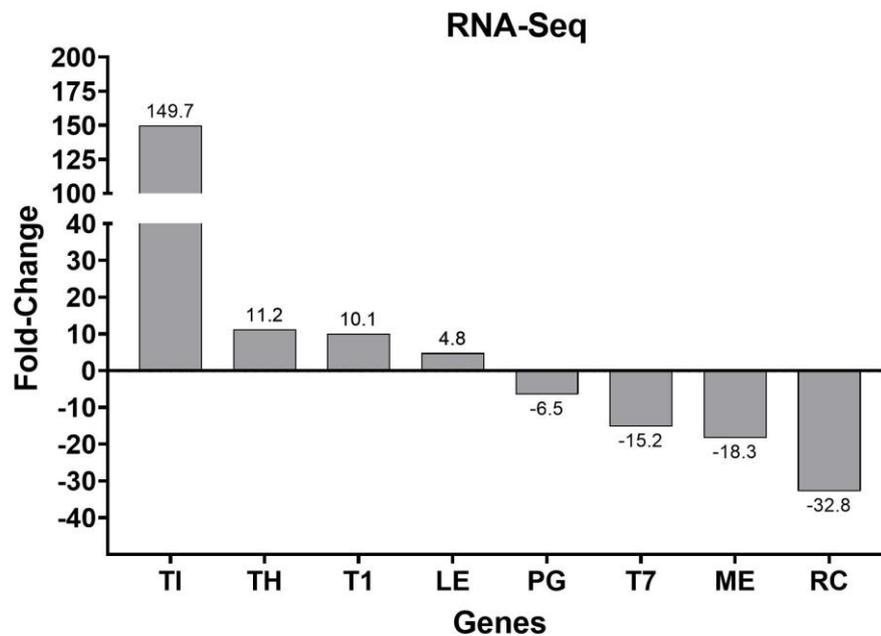
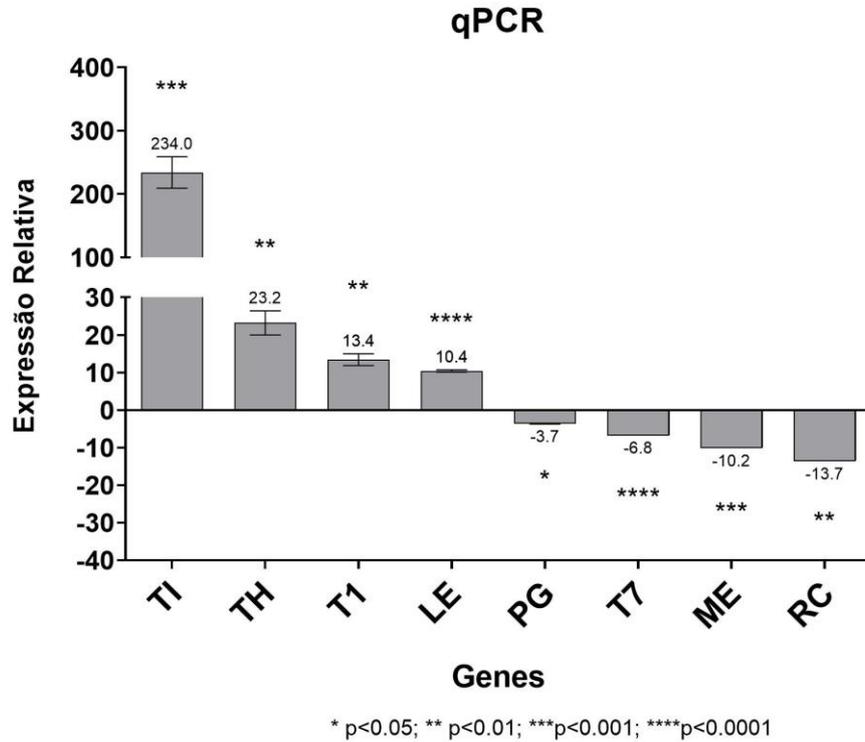
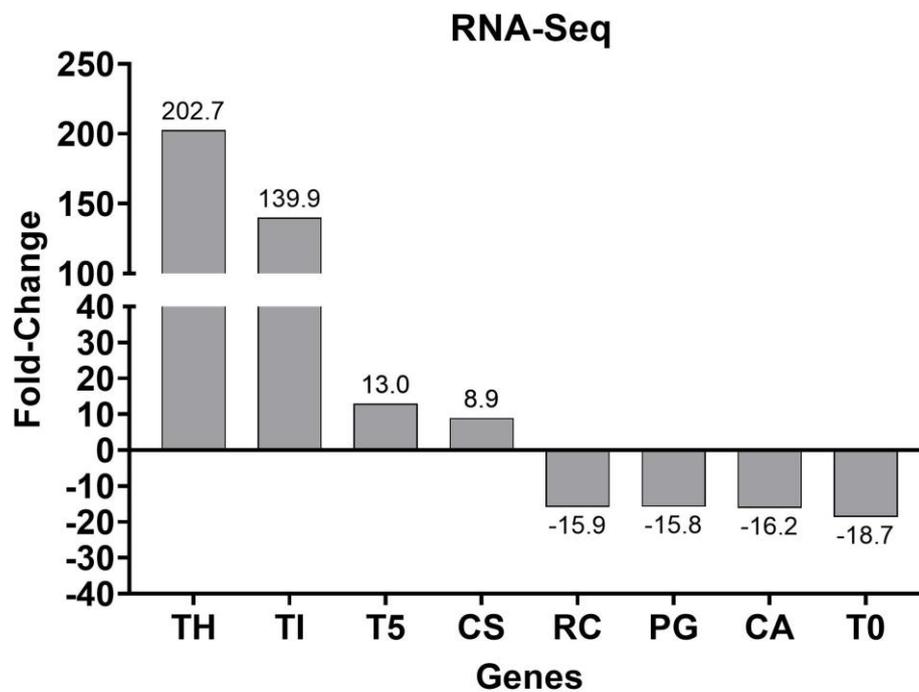
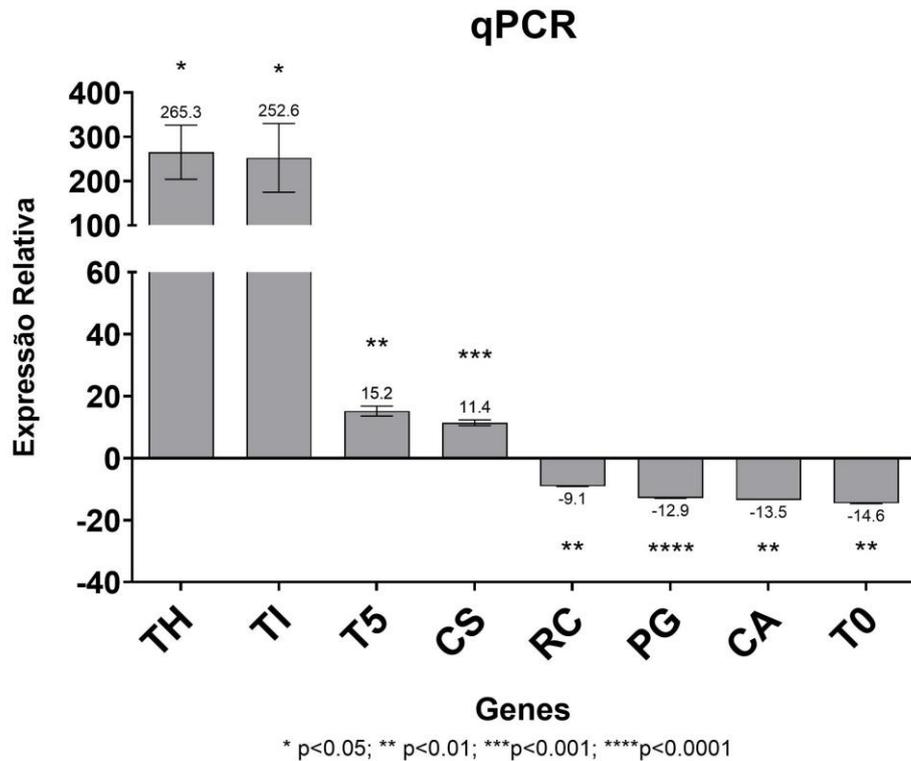


Figura 21. Expressões gênicas relativas das amostras de *Paspalum notatum* obtidas via qPCR e dos dados de RNA-seq. Eixo X: TH - gene TH11-2; TI - gene TIP42; T5 - gene desconhecido TRINITY\_DN18835\_c3\_g7\_i1; CS - gene ERD4; RC - gene RCA; PG: gene PGKH; CA - gene PEP1; T0 - gene desconhecido TRINITY\_DN20760\_c0\_g4\_i1.



## 6. CONCLUSÕES

A partir dos dados fisiológicos de *Paspalum notatum* e *Paspalum vaginatum* obtidos da avaliação de três variáveis (taxa de alongamento foliar, biomassa verde e taxa de recuperação de perfilhos) junto aos dados de transcriptômica, foi possível identificar as diferentes estratégias utilizadas pelos genótipos para resistir a seca. Ambos utilizam a estratégia de retardo e de tolerância a desidratação, porém *Paspalum vaginatum* utiliza ainda a estratégia de escape de desidratação enquanto *Paspalum notatum* utiliza o processo de dormência.

A partir dos testes para escolha de genes endógenos, identificou-se que os genes Fator de splicing U2af (U2) e Enzima Ubiquitina conjugada E2 (UB) apresentaram expressão gênica estável tanto em *Paspalum notatum* quanto em *Paspalum vaginatum* nas duas condições hídricas (controle e sob estresse hídrico).

Além disso, os resultados de qPCR mostraram o mesmo comportamento que os dados de expressão gênica diferencial obtidos *in silico*. A partir disso, consideramos que as duas técnicas foram validadas.

A partir dos dados encontrados foi possível identificar expressões gênicas diferenciais em relação a seca e controle. Estes genes poderão se tornar possíveis alvos a serem utilizados no desenvolvimento de plantas resistentes à seca, além de serem possíveis marcadores moleculares. Além disso, alguns genes diferencialmente expressos não obtiveram nenhuma correspondência ao serem comparados a diversas sequências de bancos de dados e por isso alvos para caracterização funcional.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABERNETHY, G. A.; FOUNTAIN, D. W.; MCMANUS, M. T. Observations on the leaf anatomy of *Festuca novae-zelandiae* and biochemical responses to a water deficit. **New Zealand Journal of Botany**, v. 36, n. 1, p. 113-123, 1998.
- ACUÑA, C. A. et al. Tetraploid bahiagrass hybrids: breeding technique, genetic variability and proportion of heterotic hybrids. **Euphytica**, v. 179, n. 2, p. 227-235, 2011.
- ACUÑA, C. A. et al. Reproductive Systems in *Paspalum*: Relevance for Germplasm Collection and Conservation, Breeding Techniques, and Adoption of Released Cultivars. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 1377, 2019.
- AGARWAL, P. K.; JHA, B. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. **Biologia Plantarum**, v. 54, n. 2, p. 201-212, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ØRNTTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- ANDRADE, A. S. et al. Climate change and future scenarios for palisade grass production in the state of São Paulo, Brazil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 10, p. 745-753, 2014.
- ANDRADE, L. M. et al. Reference genes for normalization of qPCR assays in sugarcane plants under water deficit. **Plant Methods**, v. 13, n. 1, p. 28, 2017.
- ANNICCHIARICO, P. et al. Adaptation of contrasting cocksfoot plant types to agricultural environments across the Mediterranean basin. **Environmental and Experimental Botany**, v. 74, p. 82-89, 2011.
- ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
- AUGUSTINE, S. M. et al. Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid). **Plant cell reports**, v. 34, n. 2, p. 247-263, 2015.
- BABRAHAM BIOINFORMATICS: Software FastQC  
<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- BARRETO, I.L. O gênero *Paspalum* (Gramineae) no Rio Grande do Sul. 1974. 258 f. Tese (Livre Docência em Fitotecnia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre: 1974.

- BASHAW, E. C. et al. Apomixis, its evolutionary significance and utilization in plant breeding. In: Proceedings of the XI International Grassland Congress held at Surfers Paradise, Queensland, Australia, 13-23 April 1970. 1970.
- BATISTA, L.A.R.; GODOY, R.; VALLS, J.F.M. Melhoramento genético de forrageiras do gênero *Paspalum*. In: ENCONTRO INTERNACIONAL SOBRE MELHORAMENTO GENÉTICO DE *PASPALUM*, 1987, Nova Odessa. **Resumos...** Nova Odessa: IZ/CNPGC, p.49, 1987.
- BELONI, T. et al. Morphological and physiological responses and the recovery ability of *Paspalum* accessions to water deficit and waterlogging. **Grass and Forage Science**, v. 72, n. 4, p. 840-850, 2017.
- BELONI, T. et al. Large variability in drought survival among *Urochloa* spp. cultivars. **Grass and Forage Science**, v. 73, n. 4, p. 947-957, 2018.
- BENNETT, S. T.; DEPEW, M. **Seashore paspalum ‘SFX-14’**. U.S. Patent Application n. 09/502,903, 22 out. 2002, 2002a.
- BENNETT, S. T.; DEPEW, M. **Seashore paspalum ‘SGX-6’**. U.S. Patent Application n. 09/502,904, 22 out. 2002, 2002b.
- BENNY, J. et al. Identification of key genes and its chromosome regions linked to drought responses in leaves across different crops through meta-analysis of RNA-Seq data. **BMC Plant Biology**, v. 19, n. 1, p. 194, 2019.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation tolerance-a retrospect. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, n. 4, p. 393-403, 1995.
- BIELENBERG, D. G. Knowing when not to grow. **New Phytologist**, v. 189, n. 1, p. 3-5, 2011.
- BLANDE, D. et al. De novo transcriptome assemblies of four accessions of the metal hyperaccumulator plant *Noccaea caerulescens*. **Scientific Data**, v. 4, p. 160131, 2017.
- BLOUNT, A. R.; ACUÑA, C. A. Bahiagrass. In: **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement**:. CRC press, p. 86-106., 2009.
- BLUM, A. Crop responses to drought and the interpretation of adaptation. In: **Drought tolerance in higher plants: genetical, physiological and molecular biological analysis**. Springer, Dordrecht, p. 57-70, 1996.
- BOUZROUD, S. et al. Auxin Response Factors (ARFs) are potential mediators of auxin action in tomato response to biotic and abiotic stress (*Solanum lycopersicum*). **PloS One**, v. 13, n. 2, p. e0193517, 2018.
- BRISTIEL, P. et al. Coping with drought: root trait variability within the perennial grass *Dactylis glomerata* captures a trade-off between dehydration avoidance and dehydration tolerance. **Plant and Soil**, v. 434, n. 1-2, p. 327-342, 2019.
- BROSNAN, J. T.; DEPUTY, J. Seashore paspalum. Cooperative Extension Service, College of Tropical Agriculture and Human Resources, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii. 2008.

BROSNAN, J. T.; DEPUTY, J. Preliminary observations on the traffic tolerance of four seashore paspalum cultivars compared to hybrid bermudagrass. **Hort Technology**, v. 19, n. 2, p. 423-426, 2009.

BRYANT, D. M. et al. A tissue-mapped axolotl de novo transcriptome enables identification of limb regeneration factors. **Cell Reports**, v. 18, n. 3, p. 762-776, 2017.

BUCHFINK, B. et al. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 59, 2014.

BURTON, G. W. Bahia grass types. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 38, p. 273-281, 1946.

BURTON, G. W. Method of reproduction in common bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Journal of the American Society of Agronomy**, v. 40, p. 443-452, 1948.

CANSEV, A. et al. Use of pyrimidines in stimulation of plant growth and development and enhancement of stress tolerance. U.S. Patent Application n. 14/769,652, 7 jan. 2016.

CAO, Y. et al. A phylogenetically informed comparison of GH1 hydrolases between Arabidopsis and rice response to stressors. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 350, 2017.

CASARTELLI, A. et al. Exploring traditional aus-type rice for metabolites conferring drought tolerance. **Rice**, v. 11, n. 1, p. 9, 2018.

CASAVA SOFTWARE. Disponible em: [https://support.illumina.com/downloads/casava\\_software\\_version\\_18\\_user\\_guide\\_\(15011196\\_b\).html](https://support.illumina.com/downloads/casava_software_version_18_user_guide_(15011196_b).html)

CHEUNG, F. et al. Sequencing *Medicago truncatula* expressed sequenced tags using 454 Life Sciences technology. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, p. 272, 2006.

CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 291-296, 1997.

COELHO-SOUZA, S. et al. Mercury and flooding cycles in the Tapajós river basin, Brazilian Amazon: The role of periphyton of a floating macrophyte (*Paspalum repens*). **Science of the Total Environment**, 409. p. 2746-2753, 2011.

CVIKROVÁ, M. et al. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 73, p. 7-15, 2013.

DANQUAH, A. et al. The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 1, p. 40-52, 2014.

DAS, A. et al. Metabolomic profiling of soybeans (*Glycine max* L.) reveals the importance of sugar and nitrogen metabolism under drought and heat stress. **Plants**, v. 6, n. 2, p. 21, 2017.

DAURELIO, L. D. et al. Genetic diversity in sexual diploid and apomictic tetraploid populations of *Paspalum notatum* situated in sympatry or allopatry. **Plant Systematics and Evolution**, v. 244, n. 3-4, p. 189-199, 2004.

DUDECK, A. E.; PEACOCK, C. H. Effects of Salinity on Seashore Paspalum Turfgrasses 1. **Agronomy Journal**, v. 77, n. 1, p. 47-50, 1985.

DUNCAN, R. R. **Seashore paspalum plant ‘SEA ISLE 2000’**. U.S. Patent Application n. 09/552,104, 14 maio 2002.

DUNCAN, R. R.; CARROW, R. N. **Seashore paspalum: The environmental turfgrass**. John Wiley & Sons, 2000.

DUNCAN, R. R.; CASLER, M. D. Seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz). **Turfgrass biology, genetics and breeding**. John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 295-307, 2003.

EDDY, S. R. Accelerated profile HMM searches. **PLoS Computational Biology**, v. 7, n. 10, 2011.

EL-GEBALI, S. et al. The Pfam protein families database in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D427-D432, 2018.

EUDY, D. **Genetic control of salt tolerance traits in seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Sw.)**. Tese de Doutorado. University of Georgia. 2016.

EVERAERT, C. et al. Benchmarking of RNA-sequencing analysis workflows using whole-transcriptome RT-qPCR expression data. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2017.

EVERS, G.; W.; BURSON, B. L. Dallisgrass and other *Paspalum* species. **Warm- Season (C4) Grasses**, n. warmseasonc4gra, p. 681-713, 2004.

FELITTI, S. A. et al. Transcriptome analysis of seed development in apomictic *Paspalum notatum*. **Annals of Applied Biology**, v. 167, n. 1, p. 36-54, 2015.

FINLAYSON, E. H. Pensacola—a new, fine-leaved bahia. **South. Seedsman, December issue**, 1941.

**Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB13432>>. Acesso em: 28 Jan. 2020.

FORBES, I.; BURTON, G. W. Cytology of Diploids, Natural and Induced Tetraploids, and Intra-species Hybrids of Bahiagrass, *Paspalum Notatum* Flugge 1. **Crop Science**, v. 1, n. 6, p. 402-406, 1961.

FU, L. et al. CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 23, p. 3150-3152, 2012.

GAO, Y. et al. A maize phytochrome-interacting factors protein ZmPIF1 enhances drought tolerance by inducing stomatal closure and improves grain yield in *Oryza sativa*. **Plant Biotechnology Journal**, v. 16, n. 7, p. 1375-1387, 2018.

GARWOOD, E. A.; SINCLAIR, J. Use of water by six grass species. 2. Root distribution and use of soil water. **The Journal of Agricultural Science**, v. 93, n. 1, p. 25-35, 1979.

GE, H. et al. The expression of CARK1 or RCAR11 driven by synthetic promoters increases drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1945, 2018.

GILROY, S. et al. A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. **Trends in Plant Science**, v. 19, n. 10, p. 623-630, 2014.

- GOLLDAK, D. et al. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 151, 2014.
- GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333, 2016.
- GRABHERR, M. G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644, 2011.
- GRUNDY, J. et al. A. Circadian regulation of abiotic stress tolerance in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 648, 2015.
- GUO, H. et al. Growth response and ion regulation of seashore paspalum accessions to increasing salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 131, p. 137-145, 2016.
- GURGEL, A. L. C. et al. Estrutura do pasto e desempenho de ovinos em capim-massai na época seca em resposta ao manejo do período das águas. **Boletim de Indústria Animal**, v. 74, n. 2, p. 86-95, 2017.
- GUSMÃO, M. R. et al. Warm-Season (C4) Turfgrass Genotypes Resistant to Spittlebugs (Hemiptera: Cercopidae). **Journal of Economic Entomology**, v. 109, n. 4, p. 1914-1921, 2016.
- HAAS, B. J. et al. De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, v. 8, n. 8, p. 1494, 2013.
- HAYES, R. C. et al. Perennial pastures for recharge control in temperate drought-prone environments. Part 1: productivity, persistence and herbage quality of key species. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 53, n. 4, p. 283-302, 2010.
- HOANG, N. V. et al. De novo assembly and characterizing of the culm-derived meta-transcriptome from the polyploid sugarcane genome based on coding transcripts. **Heliyon**, v. 4, n. 3, p. e00583, 2018.
- INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE. IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems. 2019.
- JALEEL, C. A. et al. Drought stress in plants: a review on morphological characteristics and pigments composition. **International Journal of Agriculture and Biology**, v. 11, n. 1, p. 100-105, 2009.
- JAMES, V. A.; NEIBAUR, I.; ALTPETER, F. Stress inducible expression of the DREB1A transcription factor from xeric, *Hordeum spontaneum* L. in turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flüggé) enhances abiotic stress tolerance. **Transgenic Research**, v. 17, n. 1, p. 93-104, 2008.
- JIA, X. et al. Characterization of the global transcriptome using Illumina sequencing and novel microsatellite marker information in seashore paspalum. **Genes & Genomics**, v. 37, n. 1, p. 77-86, 2015.
- JIN, Y. et al. Identification of reliable reference genes for qRT-PCR in the ephemeral plant *Arabidopsis pumila* based on full-length transcriptome data. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.

- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.
- KOECH, R. K. et al. Functional annotation of putative QTL associated with black tea quality and drought tolerance traits. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-11, 2019.
- KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. **Water relations of plants and soils**. Academic press, 1995.
- KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567-580, 2001.
- KUANG, J. et al. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. **PloS one**, v. 13, n. 5, 2018.
- LAKANMI, O. O.; OKUSANYA, O. T. Comparative ecological studies of *Paspalum vaginatum* and *Paspalum orbiculare* in Nigeria. **Journal of Tropical Ecology**, v. 6, n. 1, p. 103-114, 1990.
- LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature Methods**, v. 9, n. 4, p. 357, 2012.
- LAXA, M. et al. The role of the plant antioxidant system in drought tolerance. **Antioxidants**, v. 8, n. 4, p. 94, 2019.
- LEHTIMÄKI, N. et al. Drought stress-induced upregulation of components involved in ferredoxin-dependent cyclic electron transfer. **Journal of Plant Physiology**, v. 167, n. 12, p. 1018-1022, 2010.
- LEVITT, J. **Responses of Plants to Environmental Stresses**. New York: Academic Press, 1972.
- LEVITT, J. et al. **Responses of Plants to Environmental Stress, Volume 1: Chilling, Freezing, and High Temperature Stresses**. Academic Press., 1980.
- LI, B.; DEWEY, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. **BMC Bioinformatics**, v. 12, n. 1, p. 323, 2011.
- LI, S. B. et al. A review of auxin response factors (ARFs) in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 47, 2016.
- LI, X. et al. ABA receptor subfamily III enhances abscisic acid sensitivity and improves the drought tolerance of Arabidopsis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 7, p. 1938, 2018.
- LIM, S. L. et al. Characterization of leaf transcriptome in *Banksia hookeriana*. **Genomics, Proteomics & Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 49-56, 2017.
- LIU, Y. et al. Identification and validation of reference genes for seashore paspalum response to abiotic stresses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1322, 2017.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>ΔΔCT method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

- LOVELL, J. T. et al. Drought responsive gene expression regulatory divergence between upland and lowland ecotypes of a perennial C4 grass. **Genome Research**, v. 26, n. 4, p. 510-518, 2016.
- LUDLOW, M. M. Strategies of response to water stress. **In: Kreeb, K. H.; Richter, H.; Hinckley, T. M.; Structural and functional responses to environmental stress: water shortage.** Hague: SPB Academic Publishing BV, p. 269-281, 1989.
- MAEDA, J. A.; PEREIRA, M. F. D. A. Caracterização, beneficiamento e germinação de sementes de *Paspalum notatum* Flügge. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 19, n. 1, p. 100-105, 1997.
- MALDONADO, H. et al. Efeito da irrigação na produção de matéria seca do capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum) em Campos dos Goytacazes, RJ. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 34, 1997.
- MALINOWSKI, D. P.; KIGEL, J.; PINCHAK, W. E. Water deficit, heat tolerance, and persistence of summer-dormant grasses in the US Southern Plains. **Crop Science**, v. 49, n. 6, p. 2363-2370, 2009.
- MAGWANGA, R. O. et al. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton. **BMC Genetics**, v. 19, n. 1, p. 6, 2018.
- MARASCHIN, G. E. A planta forrageira no sistema de produção: grama batatais, forquilha e bahiagrass. **In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM**, 17, 2001, Piracicaba. Anais... Piracicaba: FEALQ, p. 393, 2001.
- 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**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016.
- MARTÍNEZ, E. J. et al. Inheritance of apospory in bahiagrass, *Paspalum notatum*. **Hereditas**, v. 135, n. 1, p. 19-25, 2001.
- MATTOS, J. L. S.; GOMIDE, J. A.; Y HUAMAN, C. A. M. Crescimento de espécies do gênero *Brachiaria*, sob déficit hídrico, em casa de vegetação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 746-754, 2005.
- MCKEE, T. B. et al. The relationship of drought frequency and duration to time scales. **In: Proceedings of the 8th Conference on Applied Climatology**. p. 179-183. 1993.
- MOLLARD, F.P.O. et al. Flooding tolerance of *Paspalum dilatatum* (Poaceae: Paniceae) from upland and lowland positions in a natural grassland. **Flora**, 203p. 548–556, 2008.
- MORRONE, O. et al. Phylogeny of the Paniceae (Poaceae: Panicoideae): integrating plastid DNA sequences and morphology into a new classification. **Cladistics**, v. 28, n. 4, p. 333-356, 2012.
- MOSTOFA, M. G. et al. Strigolactones in plant adaptation to abiotic stresses: an emerging avenue of plant research. **Plant, Cell & Environment**, 2018.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION - NCBI. Disponível em:<[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>.

- NOCTOR, G. et al. Drought and oxidative load in the leaves of C3 plants: a predominant role for photorespiration? **Annals of Botany**, v. 89, n. 7, p. 841-850, 2002.
- NORTON, M. R.; MALINOWSKI, D. P.; VOLAIRE, F. Plant drought survival under climate change and strategies to improve perennial grasses. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 2, p. 29, 2016.
- NORTON, M. R.; VOLAIRE, F.; LELIEVRE, F. Summer dormancy in *Festuca arundinacea* Schreb.; the influence of season of sowing and a simulated mid-summer storm on two contrasting cultivars. **Australian Journal of Agricultural Research**, v. 57, n. 12, p. 1267-1277, 2006.
- NOVAES, E. et al. High-throughput gene and SNP discovery in *Eucalyptus grandis*, an uncharacterized genome. **BMC Genomics**, v. 9, n. 1, p. 312, 2008.
- OCHOGAVÍA, A. et al. Structure, target-specificity and expression of PN\_LNC\_N13, a long non-coding RNA differentially expressed in apomictic and sexual *Paspalum notatum*. **Plant Molecular Biology**, v. 96, n. 1-2, p. 53-67, 2018.
- OKAY, S.; DERELLI, E.; UNVER, T. Transcriptome-wide identification of bread wheat WRKY transcription factors in response to drought stress. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 289, n. 5, p. 765-781, 2014.
- OLIVEIRA, F. A. et al. Coexpression and Transcriptome analyses identify active Apomixis-related genes in *Paspalum notatum* leaves. **BMC Genomics**, v. 21, p. 78, 2020.
- OLIVEIRA, V. S. et al. Efeito da irrigação na produção e qualidade de pastagens durante o período da seca. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, p. 1-10, 2016.
- ONETO, C. D. et al. Water deficit stress tolerance in maize conferred by expression of an isopentenyltransferase (IPT) gene driven by a stress-and maturation-induced promoter. **Journal of Biotechnology**, v. 220, p. 66-77, 2016.
- OPASSIRI, R. et al. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12  $\beta$ -glucosidase. **BMC Plant Biology**, v. 6, n. 1, p. 33, 2006.
- OPITZ, N. et al. Transcriptomic complexity in young maize primary roots in response to low water potentials. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 741, 2014.
- ORTIZ, J. P. A. et al. Harnessing apomictic reproduction in grasses: what we have learned from *Paspalum*. **Annals of Botany**, v. 112, n. 5, p. 767-787, 2013.
- ORTIZ, J. P. A. et al. A reference floral transcriptome of sexual and apomictic *Paspalum notatum*. **BMC genomics**, v. 18, n. 1, p. 318, 2017.
- ORTIZ, J. P. A. et al. Small RNA-seq reveals novel regulatory components for apomixis in *Paspalum notatum*. **BMC genomics**, v. 20, n. 1, p. 487, 2019.
- OSAKABE, Y. et al. Response of plants to water stress. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 86, 2014.
- PAN, L. et al. Transcriptional profiles of drought-related genes in modulating metabolic processes and antioxidant defenses in *Lolium multiflorum*. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 519, 2016.

- PARODI, L. R. Contribución al estudio de las gramíneas de género *Paspalum* de la Flora Uruguaya. **Revista del Museo de la Plata**, v. 1, n. 4, p. 211-250, 1937.
- PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785, 2011.
- PEZZOPANE, J. R. M. et al. Panicum maximum cv. Tanzânia: climate trends and regional pasture production in Brazil. **Grass and Forage Science**, v. 72, n. 1, p. 104- 117, 2017.
- PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.
- PILLAR, V. de P. et al. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Ministério do Meio Ambiente, 2009.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 3, p. 869-882, 2010.
- POMPEIANO, A. et al. Growth responses and physiological traits of seashore paspalum subjected to short-term salinity stress and recovery. **Agricultural Water Management**, v. 163, p. 57-65, 2016.
- PONSENS, J. et al. Characterization of phenotypic diversity, yield and response to drought stress in a collection of Rhodes grass (*Chloris gayana* Kunth) accessions. **Field Crops Research**, v. 118, n. 1, p. 57-72, 2010.
- POZZOBON, M. T; VALLS, J. M. Chromosome number in germplasm accessions of *Paspalum notatum* (Gramineae). **Brazilian Journal Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 1, p. 29-34, 1997.
- PRESTES, P.J.Q.; FREITAS, E.A.G.; BARRETO, I.L. Hábito vegetativo e variação estacional do valor nutritivo das principais gramíneas da pastagem nativa do Rio Grande do Sul. **Anuário Técnico do Instituto de Pesquisas Zootécnicas “Francisco Osório”**, v. 3, p. 516-531, 1976.
- QUADROS, F. L. F. et al. Levantamento das pastagens naturais da região de Santa Maria-RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 921-927, 2003.
- QUARIN, C. L. Híbridos Interespecíficos de *Paspalum notatum* x *P. modestum*. **Bonplandia**, p. 235-242, 1983.
- QUARIN, C. L. et al. Registration of Q4188 and Q4205, sexual tetraploid germplasm lines of bahiagrass.(Registrations of Germplasms). **Crop Science**, v. 43, n. 2, p. 745-747, 2003.
- QUARIN, C. L.; BURSON, B. L.; BURTON, G. W. Cytology of intra-and interspecific hybrids between two cytotypes of *Paspalum notatum* and *P. cromyorrhizon*. **Botanical Gazette**, v. 145, n. 3, p. 420-426, 1984.
- QUARIN, C. L.; NORRMANN, G. A.; URBANI, M. H. Polyploidization in aposporous *Paspalum* species. **Apomixis Newsletter**, v. 1, p. 28-29, 1989.

- RAO, X. et al. An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. **Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics**, v. 3, n. 3, p. 71, 2013.
- REICH, P. B. The world-wide 'fast-slow' plant economics spectrum: a traits manifesto. **Journal of Ecology**, v. 102, n. 2, p. 275-301, 2014.
- RIOS, E. et al. Breeding apomictic bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé) with improved turf traits. **Plant Breeding**, v. 136, n. 2, p. 253-260, 2017.
- ROJAS-DOWNING, M. M. et al. Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. **Climate Risk Management**, v. 16, p. 145-163, 2017.
- ROBINSON, M. D. et al. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.
- SANDHU, S. et al. Apomixis and ploidy barrier suppress pollen-mediated gene flow in field grown transgenic turf and forage grass (*Paspalum notatum* Flüggé). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 5, p. 919-929, 2010.
- SARKER, U.; OBA, S. Catalase, superoxide dismutase and ascorbate-glutathione cycle enzymes confer drought tolerance of *Amaranthus tricolor*. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-12, 2018.
- SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant and Cell Physiology**, v. 54, n. 6, p. 817-826, 2013.
- SILVA, M. M. P. et al. Respostas morfogênicas de gramíneas forrageiras tropicais sob diferentes condições hídricas do solo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 5, p. 1493-1504, 2005.
- SILVER, N. et al. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, v. 7, n. 1, p. 33, 2006.
- SIMÃO, F. A. et al. BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. **Bioinformatics**, v. 31, n. 19, p. 3210-3212, 2015.
- SKINNER, R. H.; NELSON, C. J. Elongation of the grass leaf and its relationship to the phyllochron. **Crop Science**, v. 35, n. 1, p. 4-10, 1995.
- SMITH-UNNA, R. et al. TransRate: reference-free quality assessment of de novo transcriptome assemblies. **Genome Research**, 2016.
- SOUZA, F. H. D. et al. Atributos desejáveis para gramados a serem cultivados sob condições brasileiras: uma proposta. **Embrapa Agroindústria Tropical-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2016.
- SPINONI, J. et al. A new global database of meteorological drought events from 1951 to 2016. **Journal of Hydrology: Regional Studies**, v. 22, p. 100593, 2019.
- STEINER, M. G. Caracterização agrônômica, molecular e morfológica de acessos de *Paspalum notatum* e *Paspalum guenoarum* Arech. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em

Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

STRAPASSON, E.; VENCOVSKY, R.; BATISTA, L. A. R. Seleção de descritores na caracterização de germoplasma de *Paspalum* sp. por meio de componentes principais. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 29, n. 2, p. 373-381, 2000.

SUPEK, F. et al. REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e21800, 2011.

TAKAI, T.; KOMATSU, T. Comparison on physical strength and structure of the leaf blade between Nan-ou and Nangoku varieties of bahiagrass (*Paspalum notatum* Flüggé). **Bulletin of the National Grassland Research Institute (Japan)**, 1998.

THOLL, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. In: **Biotechnology of Isoprenoids**. Springer, Cham, p. 63-106, 2015.

TISCHLER, C. R.; BURSON, B. L. Evaluating different bahiagrass cytotypes for heat tolerance and leaf epicuticular wax content. **Euphytica**, v. 84, n. 3, p. 229-235, 1995.

TORACIO, M. A. P.; GOETZKE, S.; SABBI, L. B. C. Avaliação do uso de resíduos de roçada (palha) no controle da erosão viária. **Cadernos da Escola de Saúde**, Curitiba. v. 2, p. 191-202, 2013.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115-e115, 2012.

VAN, K. et al. Genomics of plant genetic resources: past, present and future. **Plant Genetic Resources**, v. 9, n. 2, p. 155-158, 2011.

VAN DIJK, E. L. et al. Ten years of next-generation sequencing technology. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 9, p. 418-426, 2014.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. research0034. 1, 2002.

VERSLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 523-539, 2006.

VOLAIRE, F. A unified framework of plant adaptive strategies to drought: Crossing scales and disciplines. **Global Change Biology**, v. 24, n. 7, p. 2929-2938, 2018.

VOLAIRE, F.; BARKAOUI, K.; NORTON, M. Designing resilient and sustainable grasslands for a drier future: adaptive strategies, functional traits and biotic interactions. **European Journal of Agronomy**, v. 52, p. 81-89, 2014.

VOLAIRE, F.; LELIEVRE, F. Drought survival in *Dactylis glomerata* and *Festuca arundinacea* under similar rooting conditions in tubes. **Plant and Soil**, v. 229, n. 2, p. 225-234, 2001.

VOLAIRE, F.; NORTON, M. Summer dormancy in perennial temperate grasses. **Annals of Botany**, v. 98, n. 5, p. 927-933, 2006.

- VOLAIRE, F.; THOMAS, H.; LELIEVRE, F. Survival and recovery of perennial forage grasses under prolonged Mediterranean drought: I. Growth, death, water relations and solute content in herbage and stubble. **The New Phytologist**, v. 140, n. 3, p. 439-449, 1998.
- VORASOOT, N. et al. Effect of water stress on yield and agronomic characters of peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Songklanakarin J. Sci. Technol**, v. 25, n. 3, p. 283-288, 2003.
- WANG, M. L. et al. Characterization of seashore paspalum (*Paspalum vaginatum* Swartz) germplasm by transferred SSRs from wheat, maize and sorghum. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 53, n. 4, p. 779-791, 2006.
- WANG, Z. et al. Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. **Biology Open**, v. 7, n. 11, p. bio035279, 2018.
- WEBER, A. P. M. et al. Sampling the *Arabidopsis* transcriptome with massively parallel pyrosequencing. **Plant Physiology**, v. 144, n. 1, p. 32-42, 2007.
- WEST, C. P.; OOSTERHUIS, D. M.; WULLSCHLEGER, S. D. Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v. 30, n. 2, p. 149-156, 1990.
- WIECKO, G. Management of tropical turfgrasses. In: **Handbook of Turfgrass Management and Physiology**. CRC Press, 2007. p. 128-150.
- WILSON, G. P. M. *Paspalum notatum* Flüggé (bahia grass) cv. competitor (Reg. No. A-7c-1). **Tropical Grasslands**, v. 21, p. 93-94, 1987.
- XIA, Z. et al. Overexpression of the maize sulfite oxidase increases sulfate and GSH levels and enhances drought tolerance in transgenic tobacco. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 298, 2018.
- XIE, F. et al. miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. **Plant Molecular Biology**, v. 80, n. 1, p. 75-84, 2012.
- XIN, L. et al. Physiological and proteomic analysis of maize seedling response to water deficiency stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 228, p. 29-38, 2018.
- YANG, Chunxiao et al. Selection of reference genes for RT-qPCR analysis in a predatory biological control agent, *Coleomegilla maculata* (Coleoptera: Coccinellidae). **Scientific Reports**, v. 5, p. 18201, 2015.
- YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.
- YOUNG, M. D. et al. Gene ontology analysis for RNA-seq: accounting for selection bias. **Genome Biology**, v. 11, n. 2, p. R14, 2010.
- ZANDALINAS, S. I. et al. Plant adaptations to the combination of drought and high temperatures. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 1, p. 2-12, 2018.
- ZHANG, J.; DAVIES, W. J. Changes in the concentration of ABA in xylem sap as a function of changing soil water status can account for changes in leaf conductance and growth. **Plant, Cell & Environment**, v. 13, n. 3, p. 277-285, 1990.

ZHOU, P. et al. Characterization of gene expression associated with drought avoidance and tolerance traits in a perennial grass species. **PloS One**, v. 9, n. 8, p. e103611, 2014.

ZHU, M. et al. The abiotic stress-responsive NAC-type transcription factor SINAC4 regulates salt and drought tolerance and stress-related genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Plant Cell Reports**, v. 33, n. 11, p. 1851-1863, 2014.

ZHU, X. et al. Mutation of the OsSAC1 gene, which encodes an endoplasmic reticulum protein with an unknown function, causes sugar accumulation in rice leaves. **Plant and Cell Physiology**, v. 59, n. 3, p. 487-499, 2017.

ZULOAGA, F. O.; MORRONE, O. Revisión de las especies de *Paspalum* para América del Sur austral (Argentina, Bolivia, sur del Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay). Monographs in systematic botany from the Missouri Botanical Garden, v. 102, 2005.

ZULOAGA, F. O.; PENSIERO, José; MORRONE, Osvaldo. Systematics of *Paspalum* Group Notata (Poaceae-Panicoideae-Paniceae). **Systematic Botany Monographs**, p. 1- 75, 2004.

## APÊNDICE A – Ensaios hídricos e obtenção de amostras para sequenciamento

### Experimento hídrico

Inicialmente, cinco acessos (Tabela 6) de porte baixo do Banco Ativo de Germoplasma de *Paspalum* (Embrapa Pecuária Sudeste) foram escolhidos para o experimento de acordo com seu porte baixo e aspecto visual adequado para gramados, alguns com conhecida tolerância à seca e outros sem informação sobre esse aspecto. O experimento de seca foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Pecuária Sudeste (Nov/2016).

Tabela 6. Acessos de *Paspalum* avaliados no experimento hídrico e seus dados de coleta.

Acessos	BRA ID*	Latitude	Longitude	Cidade	Estado	País
<i>Paspalum modestum</i> Mez – BGP 23	00028185-7	-30,8333	-55,0500	Santana do Livramento	Rio Grande do Sul	Brasil
<i>Paspalum indecorum</i> Mez – BGP 24	00028186-5	-30,2166	-56,4666	Santana do Livramento	Rio Grande do Sul	Brasil
<i>Paspalum modestum</i> Mez – BGP 32	00028194-9	-29,5500	-56,8000	Uruguaiiana	Rio Grande do Sul	Brasil
<i>Paspalum vaginatum</i> Sw. – BGP 114	00028276-4	-24,3666	-48,7300	Laguna	Santa Catarina	Brasil
<i>Paspalum notatum</i> Flügge – BGP 216	00028378-8	-	-	Corrientes	Corrientes	Argentina

\*Identificador para busca tanto na plataforma Genesys (<https://www.genesys-pgr.org/>) quanto na Alelo (<http://alelobag.cenargen.embrapa.br/AleloConsultas/Passaporte/busca.do>).

*Paspalum modestum* é uma espécie encontrada em áreas de chaco, pântanos e bordas de rio (ZULOAGA & MORRONE, 2005), logo, não se espera que seja uma das melhores candidatas a ter tolerância a seca dentro do grupo de genótipos de hábito prostrado. No entanto, seu mecanismo de resposta ao déficit hídrico é desconhecido. Especificamente o acesso BGP 32 foi coletado em Uruguaiiana, em uma praia arenosa na beira da Barragem Sanchu, e o acesso BGP 23 foi coletado no município de Santana do Livramento, abaixo de um viaduto sob várzea do Rio Ibicuí, em solo argiloso.

*Paspalum vaginatum* é encontrado de forma natural em áreas de beira de praia, na areia e restingas. Logo, deve ter uma alta tolerância a salinidade e possuir um sistema radicular mais profundo (WIECKO, 2008).

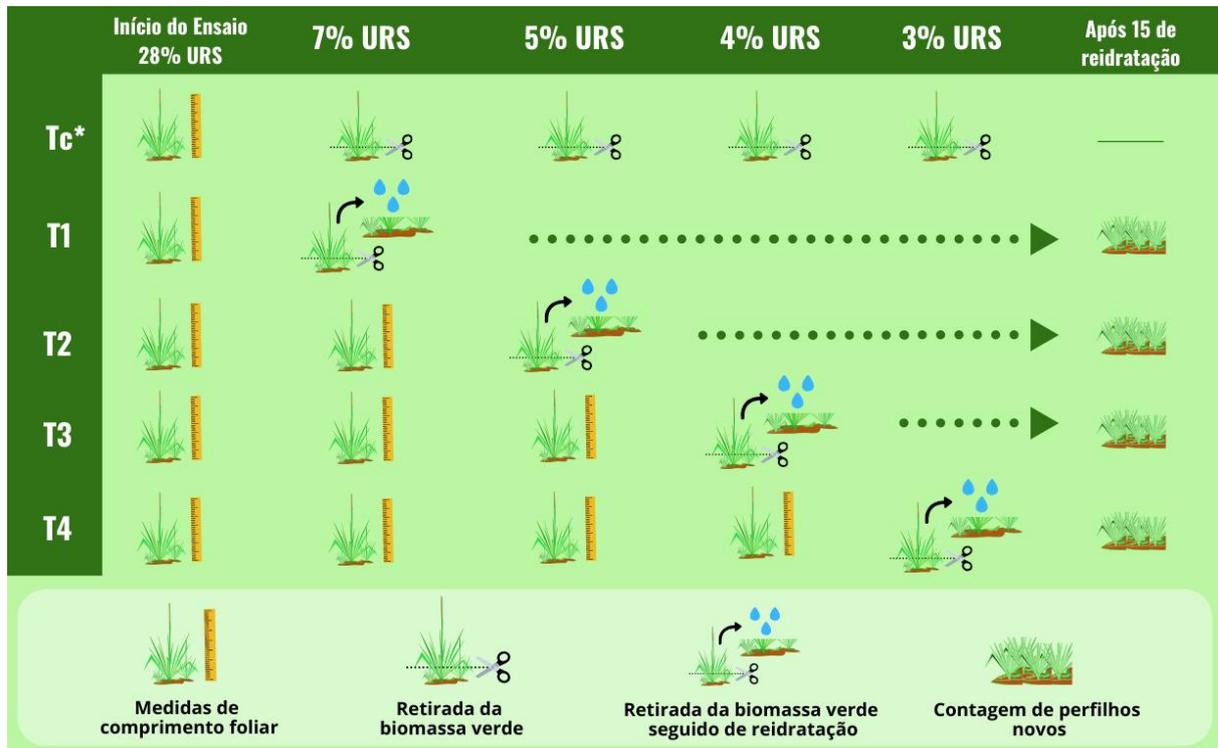
*Paspalum notatum* Flüggé BGP 216 é um tetraploide sexual, obtido a partir do cruzamento de *P. notatum* Pensacola sexual, tetraploidizado artificialmente via colchicina (FORBES & BURTON, 1961), com um *P. notatum* apomítico chamado WSB, caracterizado pela presença de estigmas brancos (QUARÍN, 1983; QUARÍN et al., 2003). Apesar de anteriormente ter sido considerado apomítico facultativo por apresentar alta taxa de sexualidade (70%) (QUARÍN et al., 1984; MARTÍNEZ et al., 2001), amostras do BGP 216 foram avaliadas pelo nosso grupo de pesquisa e foi encontrado 100% de sexualidade (Frederico P. Matta, comunicação pessoal).

*Paspalum indecorum* é uma espécie encontrada em locais secos, arenosos e pedregosos (ZULOAGA & MORRONE, 2005). O acesso BGP 24 foi encontrado em Santana do Livramento em um topo de morro basáltico com afloramento rochoso, litossolo raso.

Dois ensaios (A e B) de seca foram realizados utilizando o delineamento experimental de Blocos Completos ao Acaso, com os cinco acessos cultivados em vasos e com três réplicas biológicas (plantas clones) por tratamento. A diferença entre os ensaios foi referente as quantidades de pontos de coleta e porcentagem de umidade relativa do solo (URS).

O **Ensaio A** (Figura 22) foi realizado para as análises fisiológicas com o objetivo de observar o comportamento dos acessos sob seca a partir da mensuração de três variáveis: taxa de alongamento foliar, biomassa verde e taxa de recuperação de perfilhos após reidratação. Para o período submetido ao déficit foram determinados cinco pontos para a coleta de dados: T1) primeiros sintomas de estresse hídrico com 7% URS (após 5 dias de estresse); T2) 5% URS (após 7 dias); T3) 4% URS (após aproximadamente 10 dias) e T4) 3% URS (após 13 dias). Cada ponto experimental (T1, T2, T3 e T4) teve um grupo controle (Tc) mantido paralelamente a 28% de URS. Além disso, após cada tratamento atingir a porcentagem de seca esperada e remoção da biomassa verde, os vasos dos tratamentos T1 a T4 foram reidratados por 14 dias e feita a avaliação de taxa de recuperação de perfilhos.

Figura 22. Esquema do experimento hídrico para as análises fisiológicas de um acesso. \*Tc = cada ponto experimental (T1, T2, T3 e T4) possui seu próprio grupo controle.



As variáveis medidas foram realizadas da seguinte forma:

- Taxa de alongamento foliar: A cada semana, as folhas mais novas em expansão (aquelas cuja ponta tenha aparecido) foram marcadas. Duas a três vezes por semana, o comprimento da ponta da folha até a lígula da segunda folha mais nova expandida foi medido com uma régua. A taxa de alongamento foi estimada como a diferença de comprimento entre duas medidas consecutivas dividida pelo intervalo de dias.
- Biomassa verde: a parte aérea das plantas foi retirada (acima de 5 cm), sendo que as folhas e hastes foram separadas do material morto e levadas para estufas para pesagem do material seco.
- Taxa de recuperação de perfilhos: Após a coleta da biomassa verde de cada tratamento submetido ao déficit hídrico, os vasos foram reidratados por 15 dias, e ao final deste período, foi contada a quantidade de perfilhos por planta.

Já o **Ensaio B** foi realizado para a obtenção do material a ser enviado para sequenciamento. Neste ensaio, as coletas foram realizadas em quatro pontos: T0) controle sem estresse hídrico (28% URS); T1) primeiros sinais de estresse hídrico com 7% URS; T2) 6% URS e T3) após reidratação (28% URS).

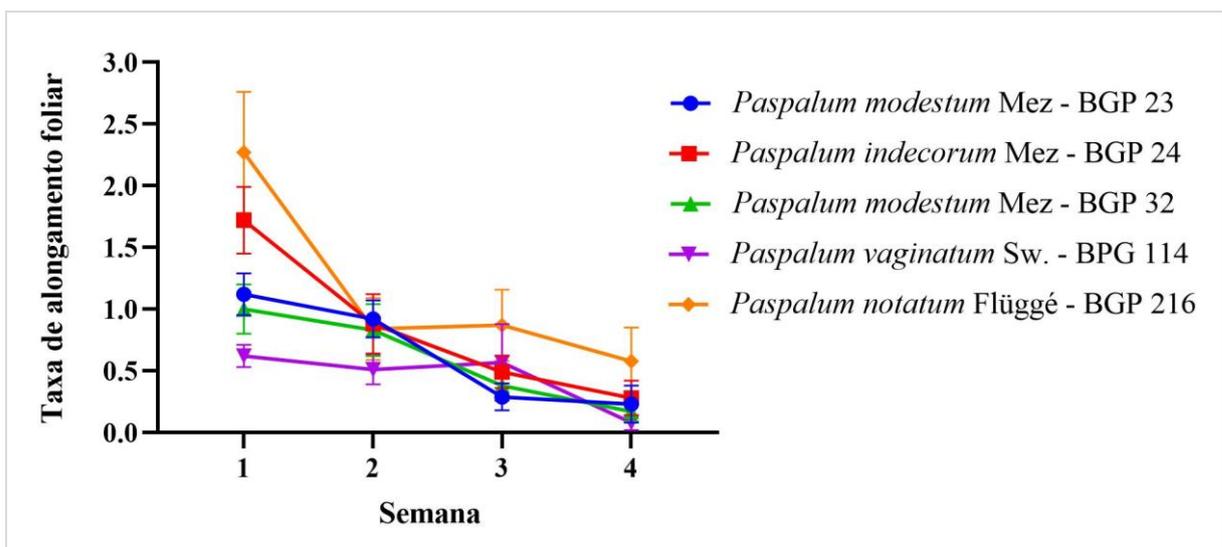
Amostras de folhas de cada réplica biológica foram coletadas nos quatro pontos e armazenadas em nitrogênio líquido e, posteriormente, em ultra freezer a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Devido a disponibilidade de recursos, as análises fisiológicas foram utilizadas para identificar dois acessos com características contrastantes em relação a seca.

### Avaliação dos dados fisiológicos

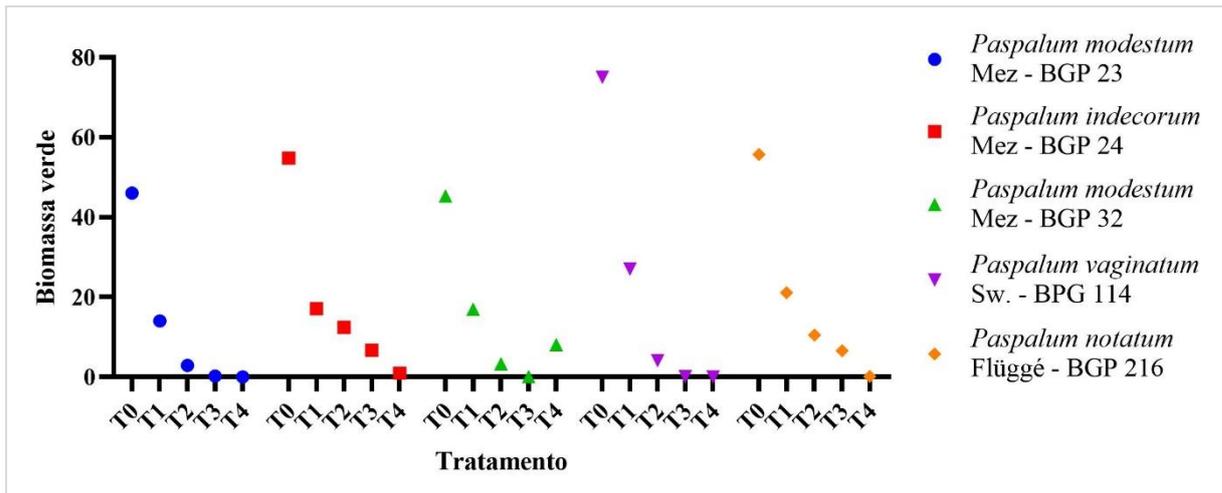
A partir das análises dos dados coletados durante o ensaio A, foi possível observar o comportamento dos acessos nas três variáveis testadas. As Figuras 23, 24 e 25 mostram os resultados obtidos das medidas de alongamento foliar, biomassa verde e taxa de recuperação de perfilhos, respectivamente.

Figura 23. Taxa de alongamento foliar dos cinco acessos acompanhados em quatro períodos durante o déficit hídrico.



Podemos observar que na primeira semana tanto *Paspalum notatum* quanto *Paspalum indecorum* possuem índices maiores de TAF (Figura 23). Já após a segunda semana houve uma queda que se mantém até a última semana de medidas, mas ainda é possível identificar que as plantas conseguiram crescer um pouco. Estes dois genótipos também tiveram comportamentos parecidos em relação a biomassa (Figura 24), pois tiveram uma grande queda em T0 e T1, mas depois mantêm uma queda constante até chegar próximo de zero em T4.

Figura 24. Biomassa verde dos cinco acessos avaliados em relação a cada tratamento do experimento hídrico. T0 é o controle sem déficit hídrico, T1 com 7% URS, T2 com 5% URS, T3 com 4% URS e T4 com 3% URS.



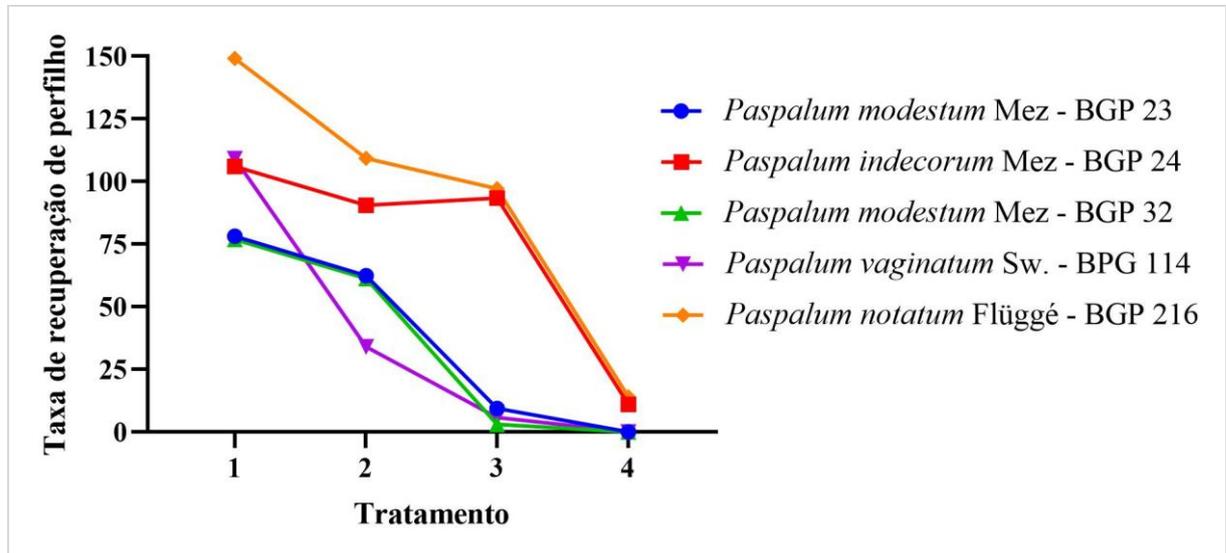
Os dois acessos de *Paspalum modestum* demonstraram um perfil semelhante em relação a TAF, a qual decresceu aos poucos, com uma maior queda na semana 3, e o mesmo comportamento ocorreu para biomassa, que diminuiu até próximo a zero já em T2. Para o BGP 32 no ponto T4, possivelmente houve um erro na medição de biomassa verde já que em T3 a biomassa é praticamente zero, e sem uma reidratação, não é possível a rebrota da planta.

Já *Paspalum vaginatum* mostrou uma baixa taxa de alongamento foliar desde a primeira semana de déficit hídrico, assim como pode ser notado também uma boa diminuição da biomassa verde (Figura 24) dos tratamentos sob déficit hídrico quando comparado com o controle. Isso possivelmente indica que logo nos primeiros sintomas de seca, a planta escolheu priorizar outros tecidos, como por exemplo, os meristemas ou a produção de sementes. Além disso, é possível que este acesso utilize mais mecanismos da desidratação de retardo, como por exemplo o crescimento de raízes para alcançar maiores profundidades a fim de aumentar a superfície de contato para a captação de água. Porém, como o experimento foi feito em vasos, isso pode ter influenciado o modo como o acesso se comportou frente a seca e consequentemente afetou o crescimento da parte aérea (VOLLAIRE, et al., 2014; NORTON et al., 2016).

Após cada tratamento atingir a porcentagem de umidade do solo desejada, os vasos foram reidratados por 15 dias e foi realizada a contagem de números de perfilhos como pode ser observado na Figura 25. Tanto os acessos *Paspalum notatum* quanto *Paspalum indecorum* demonstraram uma boa taxa de recuperação até a tratamento 3. Porém, no tratamento 4 houve uma drástica diminuição já que estresse hídrico foi mais intenso, no entanto, ainda houve o aparecimento de novos perfilhos mesmo que a uma baixa taxa. Já para os dois acessos de *P. modestum* e *P. vaginatum*, a TRP já foi considerada bem baixa no tratamento 3 e praticamente

ausente na semana 4, indicando que em um estresse hídrico mais severo, estes acessos não sobreviveriam, pelo menos quando considerando seu comportamento em vasos.

Figura 25. Taxa de recuperação de perfilhos (TRP) dos cinco acessos de cada tratamento após 15 dias de reidratação.



No geral, a restrição hídrica leva a alterações morfológicas nos genótipos como a taxa de expansão foliar, aparecimento foliar (MATTOS et al., 2005; SILVA et al., 2005) e senescência foliar (PONSENS et al., 2010). Devido ao déficit hídrico, o alongamento foliar é reduzido em consequência a um influxo de água menor na zona de divisão celular responsável pela expansão da lâmina (SKINNER & NELSON, 1995). Além disso, é possível que, em resposta a seca, o sistema radicular envie um sinal químico específico à zona de alongamento foliar, a fim de parar a multiplicação celular (ZHANG & DAVIES, 1990), no qual o ácido abscísico, um fitormônio, é apontado como sendo este sinal químico (ABERNETHY et al., 1998).

A partir destes resultados fisiológicos, *P. notatum* e *P. indecorum* aparentam ser cultivares que utilizam mais as estratégias de tolerância a seca, sendo estes melhores adaptados a solos rasos ou déficits hídricos mais severos, enquanto que os acessos de *P. modestum* e *P. vaginatum* aparentam ser cultivares que sobrevivem melhor em solos profundos ou sob déficit hídrico moderado pois provavelmente priorizam as estratégias de desidratação de retardo (NORTON et al., 2016).

Desta forma, *P. notatum* e *P. vaginatum* foram escolhidos para o sequenciamento de nova geração por apresentarem estratégias diferentes de resistência a seca.

## APÊNDICE B - Resultado do teste de eficiência dos primers dos genes avaliados na qPCR

Espécie*	Anotação	ID Gene	Eficiência (%)
PV	Late embryogenesis abundant protein Lea14-A	LEA14-A	98,3
PV	Desconhecido	TRINITY_DN10681_c0_g2_i1	95,1
PV	Protein MET1, chloroplastic	MET1	99,4
PV	Desconhecido	TRINITY_DN15447_c0_g4_i2	98,9
PN	CSC1-like protein ERD4	ERD4	104,5
PN	Desconhecido	TRINITY_DN18835_c3_g7_i1	97,0
PN	Phosphoenolpyruvate carboxylase 1	PEP1	95,2
PN	Desconhecido	TRINITY_DN20760_c0_g4_i1	105,4
PV/PN	Aquaporin TIP4-2	TIP42_MAIZE	95,9
PV	Thiamine thiazole synthase 2, chloroplast	THI1-2	95,8
PN			99,9
PV	Phosphoglycerate kinase, chloroplastic	PGKH	98,7
PN			104,3
PV/PN	Ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase activase, chloroplastic	RCA	100,6
PV/PN	Splicing factor U2af small subunit B	U2AF35B	100,3
PV/PN	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex subunit 1	At3g08610	102,5