UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NO DESENVOLVIMENTO DE BOTÕES FLORAIS DA TANGERINEIRA 'FORTUNE' SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

MONIQUE AYALA ARAÚJO DA SILVA

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

MAIO DE 2021

MONIQUE AYALA ARAÚJO DA SILVA

PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NO DESENVOLVIMENTO DE BOTÕES FLORAIS DA TANGERINEIRA 'FORTUNE' SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de concentração: Genética e Biologia molecular

ILHÉUS – BAHIA – BRASIL

MAIO DE 2021

MONIQUE AYALA ARAÚJO DA SILVA

PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NO DESENVOLVIMENTO DE BOTÕES FLORAIS DA TANGERINEIRA ‘FORTUNE’ SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Melhoramento Vegetal.

MONIQUE AYALA ARAÚJO DA SILVA

PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA NO DESENVOLVIMENTO DE BOTÕES FLORAIS DA TANGERINEIRA ‘FORTUNE’ SUBMETIDA AO DÉFICIT HÍDRICO

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Santa Cruz como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Área de Concentração: Genética e Melhoramento Vegetal.

Aprovada:

Dra. Dayse Drielly S. Santana Vieira (UFOPA)	Dr. Raner José Santana Silva (UESC)
Dr. Carlos Priminho Pirovani (UESC)	Dr. Abelmon da Silva Gesteira (Embrapa – Orientador)

“Meu abrigo, minha fortaleza,
Meu Deus em quem confio! (...)
Ele te esconde com suas penas,
Sob suas asas encontras abrigo.
Sua fidelidade é escudo e couraça.”

(Sl 91)

A todos os falecidos da família Araujo, Queiroz, Santos e amigos,
A todos que perderam suas vidas em decorrência da COVID-19,
A todas as famílias que perderam entes queridos durante a pandemia,
A todos os profissionais de saúde e cientistas,
A Mainha, Painho, Myckael, Mickaely e Maria Tereza,

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu amado e bom Deus por dar sentido a todas as coisas vividas neste tempo. Por todo amor, paternidade, amizade, consolo, proteção e sustento durante esse tempo. E a Nossa Senhora Rainha dos Anjos, pela maternidade e fiel intercessão.

Agradeço a Mainha, Maria Aparecida, por todo amor, zelo e por cada lágrima cheia de saudade. Pela paciência e compreensão em meio as ausências.

Agradeço a Painho, Luiz Marcos, pelo amor e apoio.

Agradeço aos meus irmãos, Marcos Myckael e Maria Mickaely, pelo amor e por sustentar a saudade.

Aos meus Avós, Izabel Porcina, Nelson Francisco (*in memorian*), Maria Santos e Luiz Vieira por cada amor e abraço de saudade.

Agradeço aos meus Tios, Maria e João, ao meu Padrinho, José Nilton, aos meus primos, Riandra e Thiago, pelo amor e alegrias. Também aos meus Padrinhos, Luciana e Valdo, Fátima e Jailton, apoio e encorajamento.

Agradeço a Comunidade Católica Shalom por ter me encorajado e por ter sido canal para que eu descobrisse e compreendesse que realizar o mestrado e viver a minha vocação, mesmo diante de grandes desafios era possível, porque era a vontade de Deus. Em especial as minhas Formadoras comunitárias: Maria Aparecida (Petrolina/PE), Mônica Farias (Eunápolis/BA), Vanda Castro e Regina Célia (Feira de Santana/BA). A minha Formadora Pessoal Ludmilla Santos. As Células Santa Terezinha do Menino Jesus (Missão Petrolina/PE), São Miguel Arcanjo (Missão Eunápolis/BA) e Porta do Céu (Obra Shalom Feira de Santana/BA). Aos irmãos da Comunidade de Vida e Aliança. Obrigada por terem me acolhido no amor!

Agradeço a D. Maria, Tyna e família, por terem me acolhido de braços abertos no seio da sua família em Cruz das Almas/BA. Obrigada pelo cuidado e carinho.

A Embrapa Mandioca e Fruticultura e a toda a equipe, em especial ao Sr. Santana e Jorginho. Obrigada pelo carinho, zelo e disponibilidade, que mesmo durante a pandemia não exitou em ajudar.

Ao meu orientador, Dr. Abelmon Gesteira, pelo cuidado, dedicação, carinho e amizade. Pelo jeito paterno na condução das conversas, brincadeiras e repreensões. Por todo o auxílio diante dos desafios enfrentados durante a montagem e execução dos experimentos. Por todo apoio! Muito obrigada!

Ao meu co-orientador, Dr. Maurício Coelho Filho, pela dedicação e incentivo.

Ao grupo de pesquisa em citros. Ao Éditon, ao Júnior, ao ítalo pelo auxílio, ajuda e suporte na montagem dos experimentos. Bem como a Andressa Sousa pelas conversas, cuidado, ajuda e amizade.

Ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal e Meteorologia por todo o apoio e amparo técnico durante a montagem e execução dos experimentos, em especial a Mabel. Obrigada pela amizade, cuidado e apoio.

A Dra. Shirley Costa por ceder os dados, e por, mesmo em meio aos desafios da maternidade, estar sempre à disposição para ajudar. Agradeço também à Laurinha por ceder sua mamãe para tais trabalhos. Muito obrigada!

Ao Dr. Marcos Pontes por todo o cuidado, zelo, dedicação e paciência.

Ao Dr. Edson por ter me ajudado em vários aspectos do desenvolvimento deste trabalho, em especial, pela dedicação nos resultados e na interpretação dos mesmos. Muito obrigada por todo o ensinamento.

A Dra. Fabienne Micheli por ter me acolhido em algo tão novo e contribuir de maneira grandiosa com o trabalho. Muito obrigada por me mostrar o caminho!

Agradeço a Lucas e Indiara pela grandiosa amizade, parceria, apoio e pelas conversas. Vocês são muito caros!

Agradeço aos meus amigos, por todo amor, compreensão e sustento. Em especial a Olga Souza, Laila Castro, Lucineide Almeida, Geisa Carla, Nadson Duarte, Izabela Christina, Emanuella Araújo, Jomário Gama, Wiliana Souza, Júnior Oliveira, Júnior Barreto, Ellen Carvalho, Rebeca Costa, Jullyanna Alves.

Agradeço a Ruana, Lanna, Railana e Jéssica pela amizade, cuidado e amor. Por estar comigo em momentos tão difíceis.

A Dra. Michely Diniz por todo o apoio e por continuar contribuindo na minha experiência profissional.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular em especial aos professores, bem como a Mara e a Fabrícia por toda a paciência, dedicação e disponibilidade.

À FAPESB pela conceção da bolsa.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO 17
OBJETIVOS 20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 21
2.2. SETOR CITRÍCOLA E A ECONOMIA BRASILEIRA 22
2.3. TANGERINEIRA 'FORTUNE' 24
2.4. O DÉFICIT HÍDRICO, INTERAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO E OS MECANISMOS DE RESPOSTA DA PLANTA 26
2.5.30 CARACTERÍSTICAS ENVOLVIDAS NO FLORESCIMENTO EM CITROS 30
2.6.1. Florescimento em Citros 30
2.6.2. Genes envolvidos com o florescimento 33
2.7. ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA 34
3. MATERIAL E MÉTODOS 40
3.1. MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS 40
3.2. ISOLAMENTO DE RNA E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ 44
3.3. ANÁLISE DE QUALIDADE, ALINHAMENTO E CONTAGEM DE *READS* 44
3.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL E VOLCANO PLOT 45
3.5. VOLCANO PLOT E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL 45
4. RESULTADOS 47
4.1. ANÁLISE DE QUALIDADE 47
4.2. ALINHAMENTO E CONTAGEM NO GENOMA 49
4.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL (DE) 50
4.4. ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL 52
4.4.1. Déficit hídrico x Controle 55
4.4.2. Tratamento hídrico severo 56
5. DISCUSSÃO 58
6. CONCLUSÃO 67
7. REFERÊNCIAS 68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxo de trabalho laboratorial e computacional para a identificação de expressão gênica..... **36**

Figura 2. Montagem do experimento, coleta e amostragem do material vegetal. (A) Material vegetal da tangerineira 'Fortune' enxertada no porta-enxerto BRS Bravo submetida à estresse hídrico; (B) botões florais retirados da tangerineira 'Fortune'; (C)/(D) Receptáculo floral e sepálas com epiderme cuticularizda e unisseriada, mesofilo parenquimatico e nectário; microscopia (E) Extratos parietais de botões com 1 a 4mm de comprimento, formado por epiderme, camada média, endótecio e tapete secretor; (F)- Extratos parietais de botões maiores que 4mm de comprimento, formado por epiderme, camada média e endótecio..... **41**

Figura 3. Desenho experimental mostrando (A) as condições de déficit hídrico, a qual as plantas foram submetidas: 20%, 40% e 100% da Capacidade de Pote (CP) e (B) o tamanho dos botões florais divididos em dois grupos: ≤ 4mm e > 4mm..... **43**

Figura 4. Visão geral do desenho experimental e pipeline de análise. O RNA dos botões florais foi coletado e formado pools de amostra, para sequenciamento Illumina RNA-Seq. Os dados foram verificados quanto a sua qualidade utilizando o fastQC e posteriormente alinhados contra o genoma de referência de Citrus clementina utilizando o algoritmo STAR. A contagem para cada gene foi realizada através do script HTseq-count. A análise diferencial de genes, feita pelo EdgeR, foi realizada por meio de comparações entre os tratamentos de déficit hídrico para cada combinação. Para isso, foram selecionados genes que apresentaram os seguintes parâmetros: FDR <0.001 e Log2FC > 2 (up) e FDR <0.001 e Log2FC < -2 (down), considerados genes diferencialmente expressos. Desses resultados, foi feito a plotagem do volcano plots de cada comparação e direcionados para a análise de enriquecimento funcional. Para a análise de enriquecimento funcional, as proteínas de Citrus clementina, foram anotadas funcionalmente com as ferramentas PANNZER2 e eggNOG-mapper. O plugin BiNGO foi usado para identificar o processo biológico (PB), função molecular (FM) e componente celular (CC), enriquecidos em genes up e down regulados..... **46**

Figura 5. Gráficos Volcano Plot mostrando a comparação da expressão gênica *pairwise* entre os diferentes tamanhos de botões florais da tangerineira 'Fortune' na condição de controle 100%/≤ 4 mm (DS100); e de déficit hídrico 20%/≤ 4 mm (DS20); 20%/≥ 4mm (DL20); 40%/≤ 4 mm (DS40); 40%/≥ 4mm (DL40). As comparações do grupo I (a-b) e do grupo II (c-d). O eixo "y" representa o *p-value* corrigido (*q-value*) em uma escala logarítmica que é diretamente proporcional à significância do logFC entre os diferentes tratamentos. O eixo "x" representa a mudança na expressão entre as condições. Os pontos azuis são genes únicos com variação de expressão não significativa (FDR <0.001 e Log2FC < -2) e os pontos vermelhos são os genes diferencialmente expressos (FDR <0.001 e Log2FC > 2)..... **49**

Figura 6. Diagrama de Venn mostrando a quantificação dos principais termos enriquecidos no 'processo biológico' (BP), 'função molecular' (MF) e 'componente celular' (CC) nos tratamentos (A) Grupo I: DS40 X DS100 e DS20 X DS100 e (B) Grupo II: DS20 X DS40 e DL20 X DL40..... **52**

Figura 7. Análise de enriquecimento funcional dos termos de Ontologia Gênica (GO) na categoria de processos biológicos para os conjuntos de genes diferencialmente

expressos entre os diferentes tamanhos de botões florais da tangerineira ‘Fortune’ na condição de controle 100%/≤ 4 mm (DS100); e de déficit hídrico 20%/≤ 4 mm (DS20); 20%/≥ 4mm (DL20); 40%/≤ 4 mm (DS40); 40%/≥ 4mm (DL40). Os pontos azuis são genes únicos com variação de expressão não significativa (*downregulated*) e os pontos vermelhos são os genes diferencialmente expressos (*upregulated*). Além disso, o processo pode estar ocorrendo (*increasing*) ou não (*decreasing*)..... **57**

Figura 8. Visão geral da regulação dos principais genes dos botões florais da tangerineira ‘Fortune’ submetida a diferentes tratamentos hídricos..... **66**

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Produção de laranja por estado (tn). Fonte: IBGE, 2018..... **23**

Gráfico 2 – Produção de tangerinas em toneladas (t) dos municípios baianos. Fonte: IBGE, 2019..... **25**

Gráfico 3. Representação da qualidade gerados pelo FastQC das bibliotecas da amostra DS20..... **48**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições de tratamento, tamanhos dos botões florais e nomenclatura correspondente a cada amostra..... **43**

Tabela 2. Estatísticas do conjunto de dados produzidos no sequenciamento RNA-Seq.. **47**

Tabela 3. Dados das leituras mapeadas pela ferramenta STAR..... **49**

EXTRATO

SILVA, Monique Ayala Araújo da, M.S., Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus, Maio de 2021. **Padrão de expressão gênica no desenvolvimento de botões florais da tangerineira 'Fortune' submetida ao déficit hídrico.** Orientador: Abelmon da Silva Gesteira. Coorientador: Maurício Antônio Coelho Filho.

Citrus é um gênero da família Rutaceae, que compreende várias espécies comercialmente importantes, sendo uma das principais culturas produzidas e consumidas por todo o mundo. A cadeia citrícola apresenta-se para o agronegócio brasileiro como um setor que tem alavancado a economia. Nos últimos anos, as mudanças climáticas têm gerado preocupação para a agricultura global. Um dos fatores limitantes para a obtenção de elevada produtividade é a escassez de água. Condições de déficit hídrico provocam alterações comportamentais que condicionam a planta estratégias para aclimatação ou adaptação. Em citros, o estresse por déficit hídrico e as baixas temperaturas são os principais fatores envolvidos na indução floral. Vários genes são induzidos ou reprimidos por estresse hídrico. Analisar a função desses genes faz-se necessário para compreender os mecanismos moleculares de resposta da planta à escassez de água, e assim buscar por meio do melhoramento genético, o aumento tolerância da planta à essas condições de estresse. O objetivo deste trabalho foi analisar como o estresse por déficit hídrico afeta o perfil de transcrição relacionado à floração da tangerineira 'Fortune'. O acesso da tangerina 'Fortune' foi enxertado no porta-enxerto BRS Bravo desenvolvido pelo Programa de Melhoramento de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura e submetido a diferentes tratamentos hídricos: 20%, 40% e 100% da Capacidade de Pote. Durante o período de floração, as amostras de botões florais em diferentes estádios de desenvolvimento, de cada tratamento hídrico, foram coletadas e selecionadas com base em seus tamanhos, classificando-os em dois grupos, a saber: ≤ 4 mm e > 4 mm de comprimento, para a identificação dos transcritos via RNA-Seq e análise da expressão diferencial dos genes envolvidos na produção de botões florais. Os resultados mostraram que o rendimento e a qualidade do sequenciamento eram altos para as análises posteriores. A partir disso, foram gerados, somando-se todas as bibliotecas, um número total de 15.994.555 *reads*, apresentando uma média de 84,72% de alinhamento único das leituras em relação ao genoma de referência de *Citrus clementina*. Foi identificado a expressão diferencial de vários genes candidatos a órgãos florais. Estes foram identificados, e um total de 1.476 transcrições mostrou variação significativa de expressão entre os tratamentos controle e de estresse por déficit hídrico, sendo que destes 693 eram genes induzidos e 783 eram genes reprimidos. Os genes diferencialmente expressos (DEGs) identificados estão envolvidos em vários processos biológicos, na sua maioria enriquecidos na montagem da parede de pólen, montagem dos componentes celulares envolvidos na morfogênese, organização da estrutura de encapsulamento externo e em resposta à estresse abiótico. Genes envolvidos à biossíntese de ácido abscísico (ABA) foram identificados. O gene NCED3 foi *up* regulado em todos os tratamentos. Vários

fatores de transcrição pertencentes a grandes famílias de genes mostraram papéis na resistência das plantas. Genes envolvidos na biossíntese de flavonoides também foram identificados. Esses resultados preliminares contribuirão para a compreensão da base molecular da formação e desenvolvimento floral da tangerineira ‘Fortune’, que permitirão contribuir com o conhecimento das vias de sinalização envolvidas no processo de resposta da planta a estresse por déficit hídrico.

Palavras-chave: citros, déficit hídrico, transcriptoma, RNA-Seq, floração, Fortune.

ABSTRACT

SILVA, Monique Ayala Araújo da, M.S., State University of Santa Cruz, Ilhéus, May 2021. **Pattern of gene expression in the development of flower buds of the 'Fortune' mandarin tree subjected to water deficit.** Advisor: Abelmon da Silva Gesteira. Advisor Committee: Maurício Antônio Coelho Filho.

Citrus is a genus of the Rutaceae family, which comprises several commercially important species, being one of the main crops produced and consumed worldwide. The citrus industry chain presents itself to Brazilian agribusiness as a sector that has leveraged the economy. In recent years, climate change has raised concerns for global agriculture. One of the limiting factors for obtaining high productivity is the scarcity of water. Water deficit conditions cause behavioral changes that condition the plant strategies for acclimatization or adaptation. In citrus, water stress and low temperatures are the main factors involved in floral induction. Several genes are induced or repressed by water stress. Analyzing the function of these genes is necessary to understand the molecular mechanisms of the plant's response to water scarcity, and thus seek, through genetic improvement, to increase the plant's tolerance to these stress conditions. The objective of this work was to analyze how stress due to water deficit affects the transcription profile related to the flowering of the 'Fortune' mandarin tree. The access of the 'Fortune' mandarin was grafted onto the BRS Bravo rootstock developed by the Citrus Improvement Program of Embrapa Mandioca and Fruticultura and submitted to different water treatments: 20%, 40% and 100% of the Pot Capacity. During the flowering period, samples of flower buds at different stages of development, from each water treatment, were collected and selected based on their sizes, classifying them in two groups, namely: ≤ 4 mm and > 4 mm of length, for the identification of transcripts via RNA-Seq and analysis of the differential expression of the genes involved in the production of flower buds. The results showed that the throughput and the quality of the sequencing were high for the subsequent analyzes. From this, a total number of 15,994,555 reads were generated, adding all libraries, presenting an average of 84.72% of unique alignment of the readings in relation to the reference genome of Citrus clementina. Differential expression of several candidate genes for floral organs has been identified. These were identified, and a total of 1,476 transcripts showed significant variation in expression between the control and water stress treatments, of which 693 were induced genes and 783 were repressed genes. The differentially expressed genes (DEGs) identified are involved in several biological processes, mostly enriched in the assembly of the pollen wall, assembly of the cellular components involved in morphogenesis, organization of the external encapsulation structure and in response to abiotic stress. Genes involved in abscisic acid (ABA) biosynthesis have been identified. The NCED3 gene was up regulated in all treatments. Several transcription factors belonging to large families of genes have shown roles in plant resistance. Genes involved in flavonoid biosynthesis have also been identified. Genes involved in flavonoid biosynthesis have also been identified. These preliminary results will contribute to the understanding of the

molecular basis of the formation and floral development of the 'Fortune' mandarin tree, which will contribute to the knowledge of the signaling pathways involved in the plant's response process to water deficit stress.

Key-words: citrus, water deficit, transcriptome, RNA-Seq, flowering, Fortune.

1. INTRODUÇÃO

Citrus pertence à família Rutaceae, e é uma das frutíferas mais produzidas no mundo, apresentando grande importância econômica, social e cultural. Nela estão incluídas as principais variedades com importância comercial como a laranja doce (*Citrus sinensis*), a tangerina (*Citrus reticulata* e *Citrus deliciosa*), limão (*Citrus limon*), limas ácidas como o Tahiti (*Citrus latifolia*), Galego (*Citrus aurantiifolia*), lima da Pérsia (*Citrus limettioides*), pomelo (*Citrus paradisi*), cidra (*Citrus medica*), laranja-azeda (*Citrus aurantium*) e as toranjas (*Citrus grandis*) (FANG; ROOSE, 1997; MATTOS JUNIOR et al., 2005; GROPPO, SALATINO e PIRANI, 2008).

As plantas cítricas são caracterizadas por árvores perenes, copas com ramos angulares, espinhos axilares, folhas unilobadas, flores brancas e aromáticas, isoladas ou em grupos, em geral com quatro a cinco sépalas e quatro a oito pétalas. O androceu é formado por vários estames e o gineceu possui ovário único com 8-15 carpelos fusionados (SWINGLE; REECE, 1967).

A história de dispersão dos citros associa-se a mudanças históricas nas civilizações oriental e europeia. No Brasil, a laranja doce foi introduzida em 1530 (HASSE, 1987; PASSOS, 1990). Hoje, além da laranja, a citricultura brasileira destaca-se na produção de tangerinas e lima ácida ‘Tahiti’, com a produção estabelecida principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e Pará (IBGE, 2019).

A produção de citros no Brasil é afetada por irregularidade de chuvas (SCHAFER et al., 2001). Um dos fatores mais limitantes para a obtenção de produtividade elevada e de boa qualidade é a distribuição pluviométrica irregular (SANTOS; CARLESSO, 1998; COELHO et al., 2006). Essa irregularidade afeta o balanço hídrico e consequentemente altera processos morfofisiológicos, principalmente durante estádios de crescimento e desenvolvimento da planta (KELLING, 1995).

O desenvolvimento da planta se dá em meio a fases de crescimento, as quais são divididas em fase vegetativa e fase reprodutiva. A mudança de uma fase para a outra é controlada por complexa rede gênica, a qual é permeada

por estímulos, sejam eles ambientais ou endógenos (HUIJSER; SCHMID, 2011), sendo caracterizada pelo desenvolvimento contínuo de órgãos, com características morfológicas distintas em cada fase.

A fase reprodutiva é marcada pela floração, necessitando de sinais externos e internos para promovê-la. A floração quando regulada, garante o sucesso reprodutivo e maximiza a produção, mostrando ser um processo de grande importância agronômica (WANG; WANG, 2015). A floração é uma etapa fundamental para produção, podendo influenciar nas características dos frutos como: tamanho, suco, textura e cor, (KRAJEWSKI; RABE, 1995). No entanto, os estudos moleculares das estruturas reprodutivas em *Citrus* ainda são escassos, sendo esta, uma importante ferramenta para programas de melhoramento genético por fornecer informações sobre seleção de variedades que possam ser viáveis economicamente.

A tolerância da planta à falta de água é um importante mecanismo de resistência, principalmente em regiões com recurso hídrico anual limitado (SANTOS e CARLESSO, 1998). A demanda hídrica para uma boa produção de frutos cítricos é cerca de 900 a 1.200 mm por ano, podendo sofrer variação de acordo com a demanda evapotranspiração, solo, copa e principalmente com o porta-enxerto utilizado (DONATO et al., 2007). A utilização de porta-enxertos vem da necessidade de superar novas dificuldades e alcançar objetivos pertinentes à modernização da citricultura mundial.

As plantas cítricas apresentam uma série de adaptações morfológicas e fisiológicas à deficiência hídrica, entre as quais podem ser citadas a arquitetura hidráulica das raízes, conformação de copa e a morfologia foliar (SAVÉ et al., 1995, ROSALES et al., 2019). Dois principais fatores influenciam na etapa da indução floral em citros: as baixas temperaturas e o déficit hídrico (SOUTHWICK; DAVENPORT, 1996; IGLESIAS et al., 2007).

O desenvolvimento floral é regulado por complexas redes moleculares. Genes envolvidos no desenvolvimento floral têm sido comumente identificados em plantas modelos, levando ao conhecimento das vias de sinalização, além de identificação da função desses genes. O interesse na descoberta de

recursos genéticos tolerantes à estresse biótico e abiótico em diferentes estágios de crescimento e desenvolvimento da planta tem-se tornado o objetivo de muitos estudos em citros (ZAHER-ARA et al., 2016). Conhecer vias moleculares conservadas na transição para a floração pode mostrar marcadores importantes para variedades comerciais (AHSAN et al., 2019).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar como o estresse por déficit hídrico afeta o perfil transcriptômico relacionado à floração da tangerineira ‘Fortune’.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar via RNA-Seq os transcritos que são regulados em botões florais durante o déficit hídrico;
- Analisar os níveis de expressão diferencial dos genes envolvidos na produção de botões florais da tangerineira ‘Fortune’, exposta a diferentes níveis de estresse por déficit hídrico;
- Realizar anotação funcional dos transcritos dos botões florais da tangerineira ‘Fortune’.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CITRICULTURA – CONTEXTO HISTÓRICO E ASPECTOS GERAIS

Citrus é um gênero da família Rutaceae, que compreende várias espécies comercialmente importantes, sendo uma das principais culturas produzidas e consumidas por todo o mundo, por suas excepcionais características organolépticas e teores altamente nutricionais (GROPPO, SALATINO e PIRANI, 2008; PIRANI; GROPPO, 2015).

As frutas cítricas de maior importância no comércio mundial são as laranjas, limões, limas, toranjas e tangerinas. De acordo com os dados de 2016 da *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) é a cultura mais produzida no mundo, com produção global total em 124,246 milhões de toneladas. Os principais produtores de frutas cítricas no mundo são China, Região Mediterrânea, Brasil, Índia, EUA e Espanha.

Questões sobre a origem e evolução dos citros continuam incertas para taxonomistas, botânicos, evolucionistas e geneticistas. Isso se deve a quatro principais fatores que dificultaram seu rastreamento: (i) o comportamento reprodutivo, (ii) a frequência das dispersões a longa distância durante a história evolutiva, (iii) as evidências fósseis para descrever com fidelidade a espécime, as quais são limitadas, além da (iv) dificuldade em identificar progenitores puros ou selvagens (WU et al., 2018; ZONG & NICOLOSI, 2020).

A análise filogenética da laranja doce (*Citrus sinensis*) realizada por Quiang et al. (2013) mostrou que os citros divergiram da ordem Malvales há 85 milhões de anos. Os principais centros de origem dos citros são as regiões tropicais e subtropicais do sudeste da Ásia, o nordeste da Índia no sopé do Himalaia, a Província de Yunnan, sudoeste da China, norte Mianmar, a península da Indochina e o arquipélago da Malásia. Quanto a isso, existe concordância no meio científico, graças à ascensão e uso das ferramentas moleculares no estudo dos citros nas últimas décadas (QIANG et al., 2013; ZONG & NICOLOSI, 2020).

A história de dispersão dos citros associa-se a mudanças históricas nas civilizações oriental e europeia. Nas Américas, a introdução da laranja doce aconteceu por meio de expedições das grandes navegações no século XVI. Hoje, com 1.432.473 ha, o continente americano é possuidor da segunda maior área de pomar cítrico dentre os continentes, e o maior produtor de citros (FAO, 2018).

No Brasil, a laranja doce foi introduzida a partir de 1530 após a expedição de Cristóvão Colombo (HASSE, 1987; PASSOS, 1990). Os estados da Bahia e São Paulo foram os primeiros a receberem as sementes de laranja doce no Brasil. O seu estabelecimento e rápido aumento na produtividade agrícola se deu pelas condições edafoclimáticas favoráveis ao seu cultivo nessas regiões, e no desenvolvimento de tecnologias para lidar com os desafios enfrentados (CAMARGO et al., 2013; NEVES et al., 2010; PASSOS, 1990).

3.2. SETOR CITRÍCOLA E A ECONOMIA BRASILEIRA

A safra citrícola gera receita desde 1960, principalmente com o comércio de exportação do suco concentrado. No mercado de suco de laranja concentrado congelado (SLCC), o Brasil lidera a produção mundial. A cadeia da indústria cítrica apresenta-se para o agronegócio nacional com alto valor social e cultural alavancando a economia do país, impactando positivamente na geração de empregos, de renda, e no desenvolvimento regional de todas as suas cadeias produtivas (NEVES et al., 2010).

Em 2018, o Brasil registrou uma produtividade de 28,37 t/ha, contribuindo com 22% na produção mundial de laranja. O gráfico 1 mostra a distribuição da produção de laranja nos estados do Brasil (FAO, 2018; IBGE, 2018). Essa produção está estabelecida principalmente nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Bahia, Sergipe, Rio Grande do Sul e Pará (IBGE, 2019). De acordo com dados apresentados, a Bahia é responsável por 3,3% de todo o cultivo no território nacional, encontrando-se na quarta posição no

ranking nacional da produção de citros, e o maior produtor do Nordeste (IBGE, 2019).

A maior parte da produção de citros do Nordeste está situada em Tabuleiros Costeiros, onde ocorrem longos períodos de deficiência hídrica, em virtude das irregularidades das chuvas (COELHO et al., 2006; PEIXOTO et al., 2006). Após o ciclo econômico da cana-de-açúcar e do fumo, a produção das culturas da mandioca e da laranja teve oportunidade no Recôncavo Baiano, principalmente nas regiões Litoral Norte e Recôncavo Sul (ALMEIDA et al., 2019; IBGE, 2018; RAMOS et al., 2014).

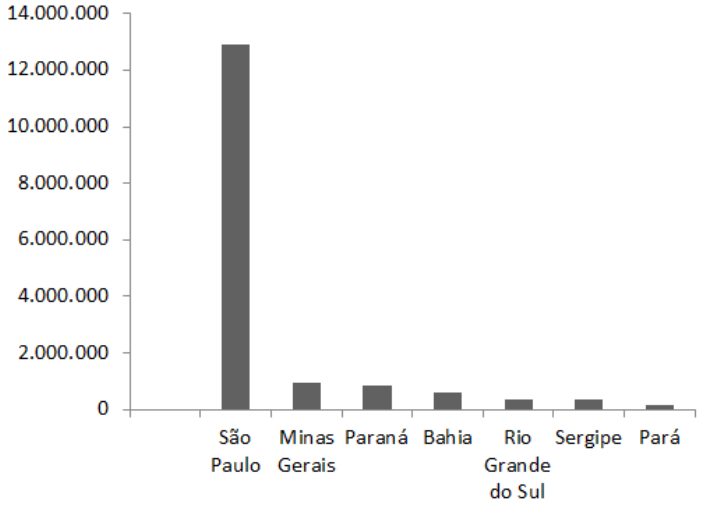


Gráfico 1. Produção de laranja por estado (tn). Fonte: IBGE, 2018.

Avanços nas técnicas de propagação, na criação de variedades de enxerto e porta-enxerto, no desenvolvimento de ferramentas para validação e caracterização genética e de práticas culturais como a irrigação, para a produção de materiais básicos de citros e árvores de viveiro, tem sustentado e expandido o cultivo de citros no Brasil (CARVALHO et al., 2019).

As previsões são de que haja um grande aumento populacional em todo o planeta. Como manter alimentos suficientes para as próximas gerações é um questionamento pertinente para muitos pesquisadores, produtores, representantes políticos e social. Além disso, com as mudanças climáticas cada vez mais intensificadas, principalmente quando se trata de escassez de

água, essa necessidade de aumentar a produção de alimentos, melhorar a utilização dos recursos disponíveis de forma ambientalmente sustentável e segura, a busca pela diminuição da perda na produção, a eficiência no armazenamento e a garantia de produtos de alta qualidade partem desse princípio. Por isso, compreender os mecanismos moleculares trazem inúmeros benefícios para o melhoramento e desenvolvimento agrícola. (rever esse parágrafo).

3.3. TANGERINEIRA 'FORTUNE'

As tangerinas são plantas vigorosas, de tamanho médio a grande, com poucos espinhos, folhagem densa, com folhas médias e lanceoladas. Seus frutos possuem um porte médio, de forma oblata, base com pescoço pequeno e ápice pouco deprimido. A casca é fina, firme, de superfície lisa, coloração intensa podendo variar da cor laranja a vermelha, apresentando de 9 a 13 segmentos, facilmente separáveis e de eixo aberto, sendo esta característica, uma das mais atrativas ao consumo, além da sua beleza e sabor. Sua polpa tem cor alaranjada, sucosa e aromática. Possui poucas sementes, mono ou poliembriônicas e cotilédones normalmente verdes. Sua maturação é de meia estação a tardia. Suas flores são comumente brancas, pequenas, isoladas, ou em inflorescência de pedúnculos curtos (HODGSON, 1967; SAUNT, 1992; DONADIO, 1998).

Dentre as variedades comercialmente importantes, encontra-se a tangerineira 'Fortune' (*C. clementina* hort. ex Tanaka x *C. tangerina* hort. ex Tanaka). Um híbrido de maturação tardia (julho a setembro) e de boa qualidade; a planta é vigorosa e produtiva. Seus frutos são de tamanho médio, coloração adequada, a casca é pouco aderia, e por isso, apresenta dificuldade no descascar. Além de apresentar poucas sementes (SAUNT, 1990; DONADIO, 1998).

Entre as tradicionais variedades de tangerinas, encontram-se a 'Cravo', 'Mexerica', 'Ponkan' e 'Murcott' (DONADIO, 1998). Os principais países

produtores de tangerinas são a China, a Espanha, a Turquia e o Egito. O Brasil ocupa o quinto lugar entre os países produtores, contribuindo com 19,01 t/ha de toda produção mundial, no qual a Bahia é o décimo estado que mais contribui na produção, sendo os principais produtores baianos os municípios de Bom Jesus da Lapa, Santo Antônio de Jesus, Ibicoara e Barra da Estiva (Gráfico 2) (IBGE, 2019).

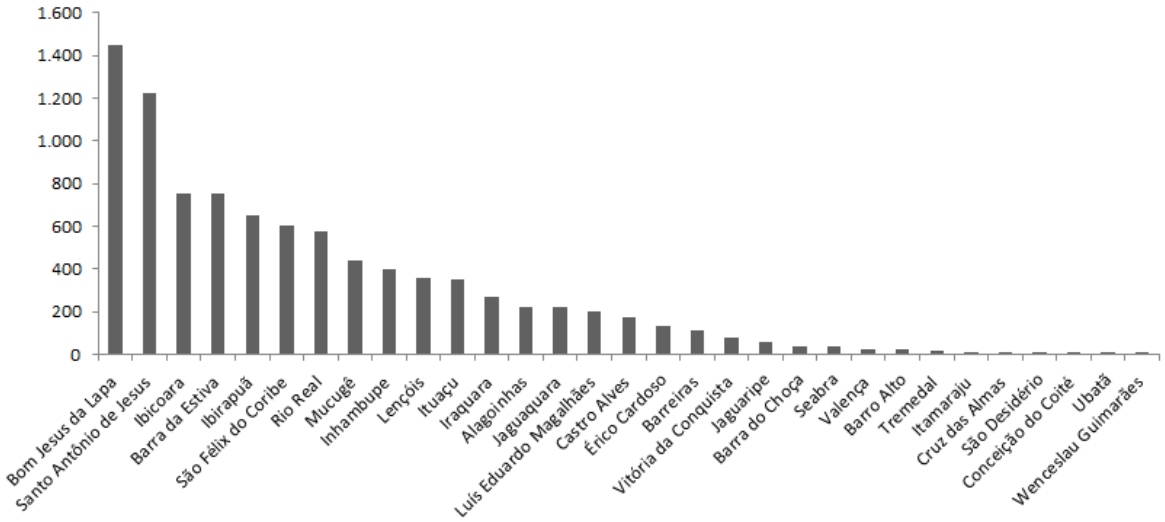


Gráfico 2 – Produção de tangerinas em toneladas (t) dos municípios baianos.
Fonte: IBGE, 2019.

O mercado de tangerinas *in natura* no Brasil pode render maiores lucros, como ocorre entre alguns dos principais produtores, como a Turquia e o Egito, que possuem uma área plantada inferior à do Brasil, e obtém produção mais elevada, por focar no mercado de frutas frescas e por investir na produção de frutas sem sementes, tornando-a ainda mais atrativa ao consumo, além de impulsionar a indústria de suco, já que a presença de sementes está associada a compostos aromáticos indesejáveis e amargos (IBGE, 2019; FAO 2016).

A criação de híbridos triploides é uma estratégia importante de melhoramento genético, uma vez que variedades deste tipo produzem frutos com características fenotípicas e organolépticas imprescindíveis para o mercado de frutas frescas (ALEZA et al., 2010). No entanto, Lourkisti et al. (2021) mostraram que variedades triploides não apresentou tolerância maior

que as variedades diploides, mas, aumentou a capacidade de recuperação após período de deficiência hídrica. Os resultados também mostraram que as plantas triploides exibiram maior teor de prolina, permitindo um ajuste osmótico eficaz e aliviando os efeitos do acúmulo de ROS.

Embora a triploidia apresente vantagens produtivas e consequentemente comerciais, as propriedades de tolerância dessas plantas ao estresse hídrico necessita de mais investigação. Entretanto, uma melhor tolerância ao estresse hídrico já foi relatada em plantas de citros poliploides, principalmente em tetraploides (KHALID, et al. 2019).

3.4. O DÉFICIT HÍDRICO, INTERAÇÃO COPA/PORTA-ENXERTO E OS MECANISMOS DE RESPOSTA DA PLANTA

Nos últimos anos, as mudanças climáticas têm despertado preocupação na agricultura global, principalmente quando se trata da intensidade da seca, a qual tem se agravado nos últimos anos (GONÇALVES et al., 2019). Estresses abióticos ocorrem em diferentes intensidades e variações temporais em todas as áreas agrícolas do Brasil, submetendo a planta a períodos de escassez de água, altas temperaturas ou excesso de salinidade, sendo estas, situações desafiantes para o seu desenvolvimento.

O Brasil é detentor de grande diversificação agroclimática e condições particulares de cultivo. Algumas regiões apresentam distribuição irregular de chuvas, a exemplo da região Nordeste, que tem mostrado reduções nos índices hídricos e de umidade, além de mostrar tendências para o aumento da temperatura (PEREIRA et al., 2009; SANTOS et al., 2010) implicando no desenvolvimento e produtividade de culturas.

Para a planta ter pleno desenvolvimento, e isto inclui o seu crescimento máximo e seu potencial reprodutivo, é preciso que ela esteja em meio a condições ideais para o crescimento. Portanto, condições ambientais que não permitem que a planta alcance seu desenvolvimento pleno, é chamado de

‘estresse’. A mínima limitação na disponibilidade de água gera estresse na planta, afetando várias de suas funções. Assim, o estresse por déficit hídrico é o principal fator limitante para a produção (TAIZ et al., 2017).

Os efeitos do déficit hídrico na planta são inúmeros. Imediatamente, os estômatos se fecham, e com isso, diminui a perda de água através da transpiração, reduz a captação de CO_2 e de nutrientes, altera vias metabólicas, promovendo a redução da taxa fotossintética, que por sua vez, resulta na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), tendo um efeito negativo no crescimento, no desenvolvimento e na produtividade. O crescimento reduzido das raízes laterais ou a inibição do crescimento de rebentos são alguns efeitos que ocorrem nas raízes (BASU et al., 2016; LAWLOR; CORNIC, 2002; TAIZ et al., 2017). Além disso, os efeitos da escassez de água podem refletir nos parâmetros morfológicos e organolépticos dos frutos (GARCIA-TEJERO et al., 2010).

Ambavaram et al. (2014) mostraram que o fator de transcrição HYR (HIGHER YIELD RICE) é um regulador da fotossíntese, ativando genes envolvidos no metabolismo fotossintético do carbono, resultando em melhor rendimento do arroz em condições de estresse. Mecanismos fisiológicos como ajuste osmótico, aumento da biomassa radicular, enrijecimento da parede celular, diminuição do potencial osmótico no ponto de perda de turgor e estimulo da atividade da peroxidase guaiacol tem sido descritos em estudos com plantas submetidas a estresse hídrico (SILVA et al., 2019).

As plantas desenvolveram a capacidade de perceber e responder a essas condições estressantes, a qual depende inteiramente da efetividade dos mecanismos de defesa e de sinalização, que vão desde respostas à baixa umidade até mecanismos de sobrevivência, como o florescimento precoce (HUBER; BAUERLE, 2016). A regulação hormonal também influencia na adaptação da planta. Fitormônios como o ácido abscísico (ABA), citocinina (CK), ácido giberélico, auxina e etileno, interagem e modulam respostas (BASU et al., 2016).

Estudos mostram que o ABA também conhecido como “hormônio da seca”, é o principal hormônio sintetizado nas raízes e translocado para as

folhas, como resposta inicial da planta ao déficit hídrico. Ele está associado a vários processos biológicos metabólicos e celulares, que em níveis normais, mantém o crescimento da parte aérea da planta (SHARP; LENOBLE, 2002).

Em condições de déficit hídrico, o ABA desempenha papel central no rápido fechamento estomático, resultando na diminuição das taxas fotossintéticas (SANTANA-VIEIRA et al., 2016), que associado a genes responsivos ao estresse, como os genes ost1 e sad1, participa da indução de proteínas funcionais (SOUZA et al., 2010) e aumenta a resistência da planta à deficiência hídrica (GUZEL DEGER et al., 2015; SARADADEVI et al., 2017; SHARP et al., 2004).

As respostas ao déficit hídrico vão depender da cultura, da duração, severidade do estresse e do estádio de desenvolvimento da planta. A condição do déficit hídrico pode ser leve, moderado ou severo (SANTOS; CARLESSO, 1998; IMADI et al., 2016). A depender da cultura, as plantas podem tolerar o estresse até um limiar; contudo, além desse limite, o estresse pode provocar uma queda no crescimento e na produção, podendo levá-la a morte. Os efeitos do estresse hídrico na produção dependem do estágio fenológico da planta (VAUX; PRUITT, 1983; WAKCHAURE et al., 2018).

Algumas espécies apresentam fases críticas de desenvolvimento, nas quais a falta de água pode resultar na redução da produção. No caso dos citros, a floração e frutificação são consideradas as fases mais críticas do desenvolvimento e crescimento da planta (DOORENBOS; KASSAM, 1979). Na busca em compreender as diferentes respostas fisiológicas, bioquímicas e moleculares da planta quando submetida a diferentes condições de disponibilidade hídrica, que estudos morfológicos, fisiológicos e moleculares têm sido desenvolvidos em diferentes culturas (MOHAWESH, 2018; SANTOS et al., 2019).

No entanto, algumas espécies florescem à medida que são submetidas a algum tipo de estresse, tornando-se este, um fator indutor da floração, além do fotoperiodismo e da vernalização. Em citros, baixas temperaturas e o estresse por déficit hídrico moderado e prolongado são os principais fatores que promovem o florescimento (NIR et al., 1972; SOUTHWICK; DAVENPORT,

1986). Pingping et al. (2017) mostraram em estudo realizado com a *Averrhoa Carambola* submetida a déficit hídrico, que houve aumento no acúmulo de carboidratos e promoveu o florescimento, sugerindo que o estresse pode induzir a floração. A promoção da floração pelo estresse não é um evento incomum, mas traz em si grande significado biológico (TAKENO, 2016).

Vários genes são induzidos ou reprimidos por essas tensões. Nos últimos anos, com o advento das técnicas de biologia molecular, genes induzidos por estresse foram sendo identificados em várias espécies, a partir de técnicas de *microarray* e, mais recentemente, de RNA-Seq. Analisar a função desses genes é necessário para compreender os mecanismos moleculares da resposta da planta a estresses, bem como buscar por meio do melhoramento genético, o aumento dessa tolerância.

Outro mecanismo que contribui para a capacidade de resposta da planta ao estresse é a modificação epigenética por meio da metilação da citosina, desempenhando papel fundamental na regulação gênica (BOYKO; KOVALCHUK, 2008). Os níveis de metilação podem aumentar ou diminuir em resposta ao estresse (SUDAN; RAINA; SINGH, 2018). Estudos têm mostrado que plantas cítricas submetidas a recorrentes situações de estresse hídrico têm seus perfis de metilação alterados e que a adaptação da memória da planta a essas condições dependem do genótipo (SANTOS et al., 2021).

Assim como acontece em várias culturas, plantas cítricas também apresentam adaptações morfológicas, fisiológicas e moleculares para tolerar a desidratação (SAVÉ et al., 1995, ROSALES et al., 2019). Além disso, para reduzir e até mesmo mitigar os riscos causados por fatores abióticos nos pomares, a busca pela diversificação de porta-enxertos, que apresentem uma eficiente extração de água do solo, por exemplo, é de grande importância para a citricultura (SAMPAIO et al., 2021).

A enxertia é uma técnica amplamente utilizada em várias culturas, sendo para a planta cítrica, a principal forma de propagação. Potenciais porta-enxertos podem oferecer resistência a fatores bióticos e abióticos, promovendo na planta a vantagem da tolerância ao déficit hídrico, a redução do período

juvenil, aumento da qualidade dos frutos e o aumento taxa de sobrevivência (BASTOS et al., 2014; SANTANA-VIEIRA et al., 2016; COSTA et al., 2020).

As interações copa/porta-enxerto pode desempenhar um papel fundamental na expressão gênica envolvida na indução da floração em citros (BENNICI et al., 2021). Desta forma, interações que mostrem características de interesse agronômico, como a tolerância á seca, são valiosas para o desenvolvimento e sobrevivência das plantas em diferentes condições de estresse (CERQUEIRA et al., 2004; SANTANA-VIEIRA et al., 2016). Assim, escolha acertada do porta-enxerto pode induzir maior eficiência produtiva, tornando-se posteriormente, a principal escolha dos produtores (SAMPAIO et al., 2021).

Gonçalves et al. (2019) realizou uma análise no transcriptoma de folhas de laranja doce enxertadas em limoeiro 'Cravo' submetidas a tratamentos controle e de estresse por déficit hídrico. Seus resultados mostraram que uma pequena fração funcional do transcriptoma foi regulada diferencialmente pelo estresse hídrico, sugerindo que a tolerância à seca induzida pelo porta-enxerto, está associada a ativação transcricional de genes.

3.5. CARACTERÍSTICAS ENVOLVIDAS NO FLORESCIMENTO EM CITROS

3.5.1. Florescimento em Citros

O ciclo de vida da planta é marcado por transições no seu desenvolvimento, chamados de ‘mudança de fase’, que são centralizadas no meristema apical caulinar. Essas mudanças são processos coordenados temporal e espacialmente, levando a planta a passar por duas fases: vegetativa e reprodutiva. O desenvolvimento vegetativo é ainda dividido em duas fases: fase vegetativa juvenil e adulta. Mas, é somente durante a transição da fase vegetativa juvenil para a adulta, que a planta vai adquirindo competência reprodutiva, caracterizada pelo surgimento de brotos de floração (BÄURLE & DEAN, 2006; POETHIG, 1990; WANG et al., 2011).

De modo geral, as fases vegetativas são marcadas pelo crescimento da planta tanto em tamanho, quanto em massa, assim como pelo aumento da sua capacidade fotossintética. As transições são induzidas por vários fatores, como por exemplo, o comprimento do dia, a intensidade da luz, a temperatura e a ação hormonal (HUIJSER, 2011). No entanto, esses fatores e as mudanças morfológicas são específicos da espécie (MATSOUKAS, 2014).

A fase reprodutiva da planta é marcada pela floração, estando esta regulada por complexas vias moleculares, juntamente com outros fatores endógenos como a disponibilidade de carboidratos, os níveis de fitohomônios, o ciclo circadiano e fatores ambientais (AMASINO, 2010; HUIJSER, 2011). As transições estão sujeitas a programas genéticos que são desencadeados e modulados por sinais ambientais e endógenos (HUIJSER, 2011). O aumento da atividade mitótica nas regiões do meristema vegetativo indica que todas essas zonas estão envolvidas na produção das partes reprodutivas da planta (CORSON, 1969).

Em *Arabidopsis thaliana* e em outras plantas, como na maçã, no abacate e na manga, os miR-156 e miR-172 são chaves no controle da transição da fase juvenil para a fase adulta e da fase adulta para a reprodutiva (AHSAN et al., 2019; GUO et al., 2017; JIA et al., 2017; WANG et al., 2009). Matsoukas (2014) sugere em seu trabalho que a transição prolongada entre as fases pode ser devido a sinais antiflorigênicos suficientes para afetar a expressão de genes *FT* (FLOWERING LOCUS T) e *SPL*. Nos cereais, a seca e o estresse por calor, em estágios específicos do desenvolvimento, afetam o transporte de açúcar nas anteras e nos ovários (XUEMEI et al., 2010).

Citros é uma cultura arbórea perene, policárpica, portadora de características reprodutivas bem particulares, as quais podem trazer informações valiosas para a compreensão da sua biologia reprodutiva, fundamental para a manutenção das espécies, e consequentemente para o aprimoramento de programas de melhoramento genético. Os citros possuem períodos de juvenilidade relativamente longos, sendo que a maioria das espécies precisam de um período de pelo menos cinco anos para iniciar a

floração principal (ABOUZARI & NEZHAD, 2016); esta é uma realidade limitante para práticas agrícolas.

Quando se inicia a diferenciação dos botões florais, estes seguem sem interrupção para o desenvolvimento floral e a floração (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). Em citros, o estresse por déficit hídrico e as baixas temperaturas são considerados como os principais fatores envolvidos na indução floral (SOUTHWICK; DAVENPORT, 1996; IGLESIAS et al., 2007). A intensidade da floração vai depender do tempo de exposição aos estímulos indutivos e da intensidade desses estímulos (CASSIN et al., 1969).

A brotação e a floração dos botões podem ocorrer durante todo o ano, no entanto, em regiões subtropicais ocorre comumente durante o final do inverno e início da primavera; em regiões de clima tropical, tende a ocorrer após o reestabelecimento das chuvas; e em clima árido, ocorre após o período de estresse imposto pela estiagem, com o uso da irrigação (ERICKSON, 1968; MONSELISE, 1985). A duração do período de floração é afetada pelas diferentes sazonalidades. Climas quentes logo promoverá abertura das flores; enquanto climas frios podem prolongar a floração (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996).

As plantas cítricas passam por repetidos ciclos de floração e frutificação. O desencadeamento da indução floral se dá por fatores ambientais ou fatores endógenos (SPIEGEL-ROY; GOLDSCHMIDT, 1996). A diferenciação floral tem início nos primeiros estádios de desenvolvimento das brotações das gemas na primavera. A abertura das flores, por sua vez, ocorre após o processo de indução e diferenciação (DAVENPORT, 1990). A transição para o meristema floral é apenas o início de vários processos de desenvolvimento, que produzirá sementes e frutos. Nos últimos anos, estudos têm buscado compreender os mecanismos e a complexa rede de genes envolvidos na sinalização do desenvolvimento floral.

Costa (2017) observou o mesmo padrão das flores de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae), na tangerineira ‘Fortune’ *Citrus reticulata* Blanco (Rutaceae): diminutas, pentâmeras, actinomorfas, diclamídeas e monoclinas (SOUZA et al., 2003). Além disso, foi visto que a baixa disponibilidade de água

não foi capaz de alterar o desenvolvimento de botões florais da tangerineira ‘Fortune’. A formação e diferenciação das flores em citros tem sido objeto de estudo na busca por compreender quais mecanismos moleculares estão ali envolvidos (ALMEIDA et al., 2019).

3.5.2. Genes envolvidos com o florescimento

Genes envolvidos no desenvolvimento floral têm sido comumente identificados em plantas modelos, como em *Arabidopsis*. Estes resultados permitem levar ao conhecimento das vias de sinalização, além de identificar a função de genes na floração em citros. Estudos desenvolvidos conseguiram identificar genes que são homólogos aos de Arabidopsis como *TERMINAL FLOWER (TFL)* (PILLITTERI et al., 2004), *LEAFY (LFY); APETALAI (API)* (PILLITTERI; LOVATT; WALLING, 2004), *APETALA3 (AP3); SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1); WUSCHEL (WUS)* (TAN; SWAIN, 2007), *FLOWERING LOCUS T (FT)* (NISHIKAWA et al., 2007; ENDO, 2005), *FLOWERING LOCUS C (FLC)*; *BARELY ANY MERITED (BAM)* (ZANG et al., 2009a; 2009b), *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* (LI et al., 2010) e que estão relacionados à floração em citros.

Em *Arabidopsis* o gene *TFL1* é um regulador chave no desenvolvimento da inflorescência e do tempo de floração, agindo como repressor. Trabalhos mostram que sua superexpressão além de causar um alongamento na fase vegetativa, aumenta a produção de inflorescências secundárias (HANANO & GOTO, 2011; SHANNON & MEEKS-WAGNER, 1993). Já que *TFL1* mantém o meristema Arabidopsis em um estado indeterminado, a cooperação dos genes de identidade floral LFY, AP1 e *CAULIFLOWER (CAL)*, produz meristemas florais determinadas (PELAZ et al., 2001).

Por outro lado, o *FT* age como ativador da floração, uma vez que carrega a responsabilidade de ser o principal florígeno, regulando a mudança para o desenvolvimento reprodutivo. Outro gene que tem mostrado regular o tempo de floração por diferentes estímulos, é o SOC1 (HANANO & GOTO, 2011; VOIGT, 2013). A floração iniciada, a interação de genes específicos e a

expressão do gene WU, garantem uma flor com estrutura determinada com quatro verticilos (TAN & SWAIN, 2007).

É visto que o conhecimento sobre os mecanismos genéticos e moleculares que regulam a floração em espécies modelo tem contribuído para a identificação de genes reguladores da floração em várias culturas. No entanto, culturas que são continuamente submetidas a condições adversas, e vão se adaptando a diferentes ambientes, provavelmente tenham esses mecanismos modificados. Sendo assim, identificar, caracterizar e compreender a regulação de genes que regulam a floração em citros precisa ainda ser bem explorado.

3.6. ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA

O transcriptoma é o conjunto de transcritos em uma célula, tecido ou organismo específico, em determinado estágio de desenvolvimento ou condição fisiológica que inclui RNA mensageiro (mRNA) e RNA não codificante (ncRNA) (OKAZAKI et al., 2002). Estudos em transcriptoma são uma poderosa vertente para investigar a relação entre o genótipo e o fenótipo levando ao conhecimento de elementos funcionais do genoma e seus constituintes moleculares (QIAN et al., 2014).

A caracterização do transcriptoma é capaz de revelar os transcritos, a estrutura transcricional dos genes, padrões de *splicing* e a expressividade de genes durante o desenvolvimento sob diferentes condições, uma vez que as células possuem padrões de transcrição altamente específicos (WANG et al., 2009; ZHICHENG e YAN, 2013).

Para isso, duas principais tecnologias foram desenvolvidas nos últimos 20 anos (WANG et al., 2010; WOLFF et al., 2018). A tecnologia de *microarrays* surgiu na década de 1990. Com o passar dos anos, foi sendo cada vez mais aprimorada e tornou-se uma ferramenta amplamente utilizada na análise transcriptomica (SCHENA et al., 1995). No entanto, aos poucos esta técnica começou a apresentar desvantagens, como por exemplo, a necessidade de um conhecimento prévio das sequências de referência ou sequência de interesse,

dando espaço para o surgimento de outra técnica de sequenciamento do transcriptoma de alto rendimento, o sequenciamento de RNA, comumente conhecido como RNA-Seq (WANG et al., 2009).

Nos últimos 10 anos esta ferramenta tornou-se indispensável e tem ganhado cada vez mais espaço na biologia molecular, pela alta resolução e sensibilidade, pelo aumento no rendimento e pela redução de custos, que contribuíram para o seu avanço, que inclusive, tem moldado muitos aspectos da compreensão da função genômica, tornando-se a principal opção para esses estudos (COSTA-SILVA et al., 2017; RUTTER et al., 2019; STARK et al., 2019).

A utilização do RNA-Seq na biologia molecular tem revolucionado os estudos em diversas áreas como a biologia, agronomia e medicina. A técnica utiliza o Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing – NGS*) para quantificar o conteúdo de RNA em amostras biológicas (RUTTER et al., 2019). Em comparação com as técnicas de *microarray*, o RNA-Seq não necessita do conhecimento prévio das sequências de referência e apresenta uma gama de aplicações.

Dentre suas aplicações, pode ser feito a montagem *de novo* do transcriptoma, avaliação de variações de nucleotídeos, avaliação de padrões de metilação, detecção dos processos de *splicing* alternativos, identificação da expressão de isoformas, entre outras (COKUS et al., 2008; WANG et al., 2010; TRAPNELL et al., 2010). Apesar de possuir várias aplicações, o RNA-Seq é frequentemente utilizado para identificar genes diferencialmente expressos (DGEs) entre grupos de tratamento.

Experimentos com este viés são controlados, e as análises são realizadas para comparar a expressão de genes entre a amostra controle e a amostra tratada. O trabalho de Santos et al. (2021) utilizando os porta-enxertos *'Sunki Maravilha'* e '*Sunki Tropical'*, que por sua vez apresentam diferentes estratégias de sobrevivência à seca em combinação com *Citrus sinensis* (L.) Osb. (Valencia Orange), revelou genes e complexas redes envolvidas na tolerância à seca.

A partir de dados baseados em RNA-Seq, mapas transcriptômicos para espécies modelo como *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Homo sapiens*, foram construídos. No entanto, estudos com plantas fornecem apenas resultados a partir de estágios de desenvolvimento, órgãos ou condições. Estudos tendem a mostrar a dinâmica da expressão gênica em processos cruciais na vida da planta, como por exemplo, a transição para a floração, o desenvolvimento da flor, do óvulo, principalmente focando nos órgãos e nos estágios de desenvolvimento (KLEPIKOVA et al., 2016).

Apesar de existir sobreposição de genes expressos mesmo em tecidos muito distintos, a dinâmica da expressão pode variar em cada tecido. Dentro do sistema de órgãos, existem alguns genes marcadores específicos, a exemplo de marcadores individuais nos órgãos reprodutivos, que podem ser facilmente identificados em *A. thalianna* (SCHMID et al., 2005).

De modo geral, o fluxo de trabalho para quantificar a expressão gênica tem seu início na bancada do laboratório e as etapas finais, são computacionais (Figura 1) (STARK et al., 2019). Assim, da mesma forma que a técnica foi sendo aperfeiçoada, o número de métodos e *softwares* para análises de dados também aumentou rapidamente, para atender finalidades diversas, considerando que o conjunto de dados gerados são grandes, complexos, não apresentando uma opção de interpretação direta (OSHLACK, ROBINSON & YOUNG, 2010; COSTA-SILVA et al., 2017).

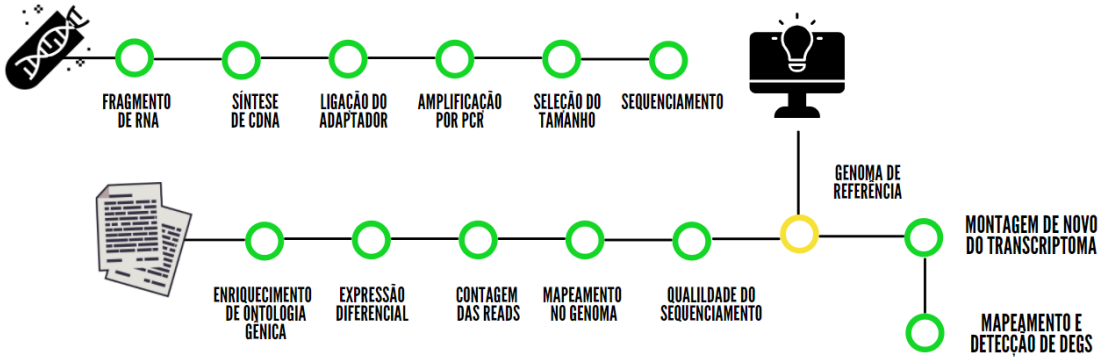


Figura 1. Fluxo de trabalho laboratorial e computacional para a identificação de expressão gênica.

Assim como em toda a pesquisa científica, a escolha dos protocolos, ferramentas e métodos são essenciais para o sucesso do RNA-Seq. Apesar disso, não existe uma concordância sobre o pipeline mais adequado a ser utilizado para a identificação de genes diferencialmente expressos a partir de dados de RNA-Seq (ZHANG et al., 2014; COSTA-SILVA et al., 2017) permitindo que o pesquisador adapte as ferramentas a serem utilizadas de acordo com seus objetivos.

Alguns trabalhos se detêm na avaliação do desempenho de ferramentas de software, suas vantagens e desvantagens, através de estudos comparativos, contribuindo na projeção de experimentos de RNA-Seq eficientes para seus estudos sob diferentes perspectivas (ZHANG et al., 2014; COSTA-SILVA et al., 2017).

A análise computacional dos dados trabalha com grandes quantidades de dados brutos, ou seja, sequências de fragmentos de DNA, chamadas de 'leituras'. Essas leituras passam por uma série de etapas como mostrado na figura 1, para enfim, por exemplo, medir a expressão gênica. Desta forma, para cada uma dessas etapas, existem ferramentas computacionais sofisticadas para realizá-las. Além disso, nessas análises são incorporadas ferramentas de plotagem, uma vez que os resultados apresentam-se visualmente por meio de gráficos (RUTTER et al., 2019).

No sequenciamento, um grande volume de dados é gerado em alta velocidade. A análise desses dados brutos precisa ser conduzida de forma gradual por ferramentas de software. A primeira etapa do trabalho do bioinformata nessa cascata de análises é verificar a qualidade dos dados (*Quality Control* - QC). Para isto, várias metodologias e ferramentas estão disponíveis para avaliar leituras ou a qualidade do mapeamento filtrando dados de baixa qualidade, que impactariam de maneira negativa as análises *downstream*, adicionando ao conjunto de dados, ruídos ou viés sistemáticos (ALBRECHT; ANDRADE-NAVARRO; FONTAINE, 2020; MERINO et al., 2016). Uma ferramenta de controle de qualidade bastante utilizada é FastQC (http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/), a qual fornece um

relatório de qualidade trazendo informações sobre as estatísticas básicas das sequências, qualidade geral do sequenciamento.

A etapa seguinte é considerada fundamental para as análises. Nela é feito o alinhamento do conjunto de leituras sequenciadas. Existem dois caminhos: ou o alinhamento é feito contra um genoma de referência, ou é feito um alinhamento *de novo*, onde modelos gráficos são construídos reunindo todos os transcritos diretamente das leituras de RNA-Seq. Este último parece ser mais desafiador e tem uma menor precisão no alinhamento, apesar de ser importante no estudo de espécies onde dados de alta qualidade não estão disponibilizados (DOBIN; GINGERAS, 2015; YU et al., 2020).

Existem vários algoritmos de alinhamento de sequências. Estes algoritmos devem estar comprometidos com a sensibilidade, precisão no alinhamento, alta velocidade e ter potencial para alinhar com precisão leituras longas. O algoritmo *Spliced Transcripts Alignment to a Reference* (STAR) é bastante utilizado para essas análises por dispor dessas características. Além disso, o STAR gera arquivos *output* que podem ser usados para quantificação de transcrição, expressão gênica diferencial, detecção de isoformas, entre outros (DOBIN et al., 2013; DOBIN; GINGERAS, 2015).

Em seguida, é realizada a contagem das *reads*. Essa contagem é realizada através de *scripts* para quantificar as leituras mapeadas para cada gene. O HTseq-count é um script que realiza a análise de expressão diferencial por meio da contagem para cada gene as leituras que são mapeadas para ele (ANDERS; PYL; HUBER, 2014).

Após a contagem, é realizada a análise para a identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs). O edgeR é um software pertencente ao projeto Bioconductor bastante utilizado, que realiza análise de dados de expressão, localizando mudanças entre duas ou mais condições (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010).

Por fim, é realizada a análise de enriquecimento funcional, a fim de compreender como os genes relacionam-se entre si funcionalmente. Essa análise é realizada através de servidor Web. Dentre os servidores Web

disponíveis para este objetivo, está o PANNZER2; de execução rápida, fornece anotações do Gene Ontology (GO) e previsões de descrição de texto livre (DE) (TORONEN, MEDLAR; HOLM, 2018). Outra ferramenta de anotação funcional é o eggNOG-mapper, que realiza análise de grandes conjuntos de sequências, com base em atribuições de ortologia (HUERTA-CEPAS et al., 2017).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL VEGETAL E TRATAMENTOS

Os perfis de expressão em diferentes condições de déficit hídrico foram realizados com o acesso de tangerina 'Fortune'. O acesso de tangerina 'Fortune', do Banco Ativo de Germoplasma de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, foi enxertado no porta-enxerto BRS Bravo {tangerina 'Sunki' comum [*C. sunki* (Hayata) hort. ex Tanaka]} x {'Cravo' (*C. limonia* Osbeck) x laranja trifoliata [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.]} desenvolvido pelo Programa de Melhoramento de Citros da Embrapa Mandioca e Fruticultura, e então transferido para recipientes de 45 L contendo um mistura de areia lavada, solo e Rendmax Citrus, um substrato comercial de casca de pinheiro (2: 1: 2) (Figura 2A).

Antes do início do experimento, todas as plantas foram mantidas a 100% da Capacidade de Pote (CP). Antes de iniciar o tratamento, todas as plantas foram submetidas a um déficit hídrico inicial, com a irrigação suspensa até o ponto de murcha, que ocorreu em aproximadamente 10% da fração de água disponível no pote (potencial matricial do solo de -1,5 Mpa). Após atingir este nível de umidade, 10 dias foram passados antes que a irrigação fosse retomada para induzir o florescimento.

Após esse período de 10 dias, as plantas foram hidratadas a três níveis de tratamento hídrico, a saber, tratamento hídrico severo, moderado e nenhum (controle) a 20, 40 e 100% da CP, respectivamente. As superfícies dos vasos foram cobertas com papel alumínio para evitar a evaporação (Figura 2A e Figura 3).

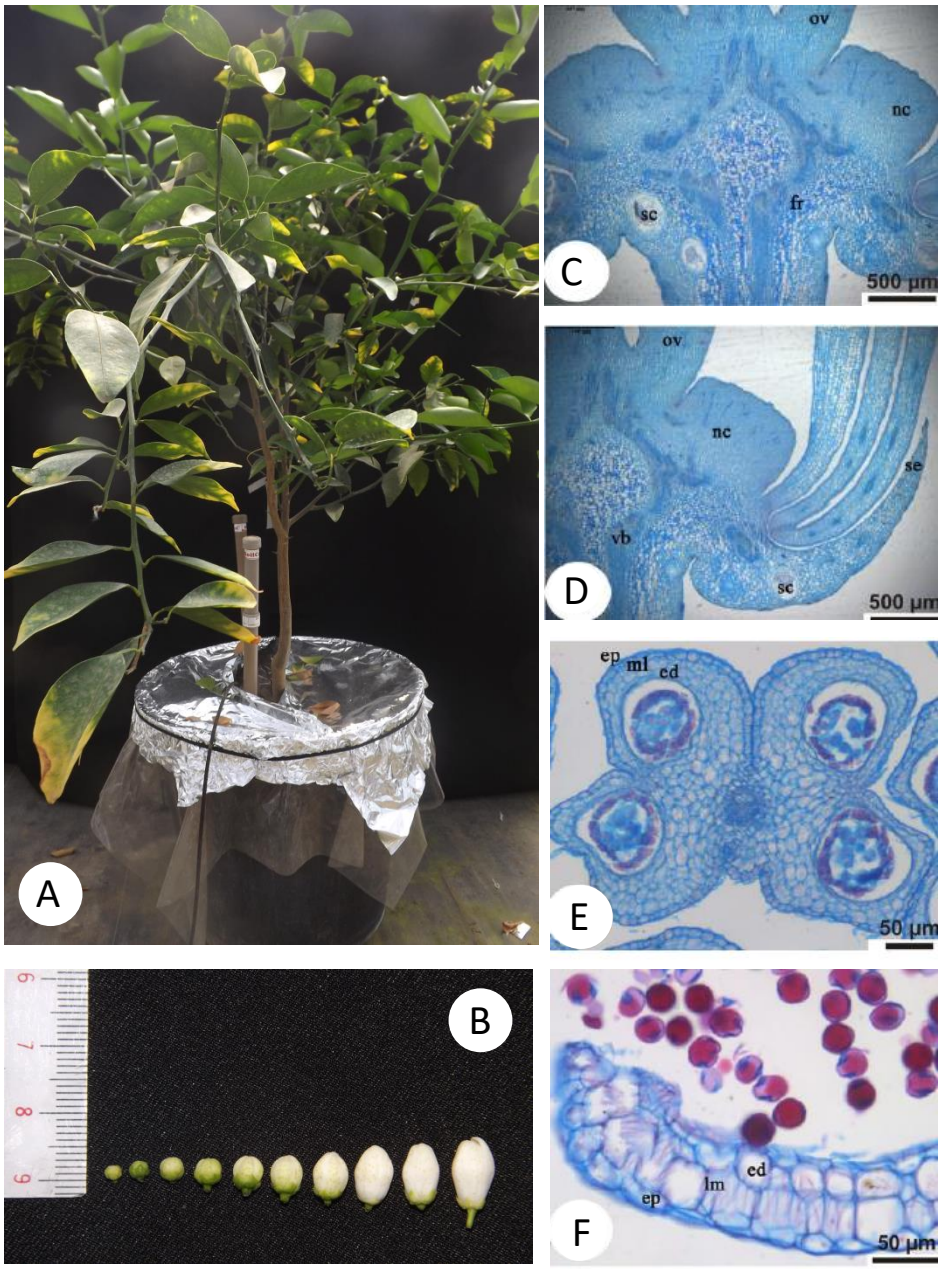


Figura 2. Montagem do experimento, coleta e amostragem do material vegetal. (A) Material vegetal da tangerineira 'Fortune' enxertada no porta-enxerto BRS Bravo submetida à estresse hídrico; (B) botões florais retirados da tangerineira 'Fortune'; (C)/(D) Receptáculo floral e sepálas com epiderme cuticularizda e unisseriada, mesofilo parenquimatico e nectário; microscopia (E) Extratos parietais de botões com 1 a 4mm de comprimento, formado por epiderme, camada média, endótecio e tapete secretor; (F)- Extratos parietais de botões maiores que 4mm de comprimento, formado por epiderme, camada média e endótecio.
Fotos: COSTA, 2017.

O potencial matricial foi estimado no Laboratório de Física do Solo da Embrapa Mandioca e Fruta, Cruz das Almas, Bahia, Brasil, com base no modelo de Van Genuchten (1980) e nos valores de umidade.

O conteúdo de água do solo foi acessado por meio de uma sonda de refletometria no domínio do tempo construída à mão e contendo três hastes de aço inoxidável com 0,003 m de diâmetro, 0,15 m de comprimento, espaçadas de 0,022 m, isoladas com resina de poliéster e equipadas com cabos coaxiais RG58 (50 ohms) com 0,75 m de comprimento. As plantas foram irrigadas a cada dois dias com base nos dados obtidos nas leituras da refletometria no domínio do tempo, substituindo apenas a quantidade de água necessária para estabilizar o tratamento.

Durante o período de floração da planta para a amostragem de tecido, apenas amostras de flores não abertas foram coletadas. Assim, botões de flores em vários estágios de desenvolvimento da variedade de tangerina 'Fortune' foram coletados e selecionados com base em seus tamanhos (Figura 2B). Os botões florais de cada tratamento hídrico foram classificados em dois grupos, a saber: ≤ 4 mm e > 4 mm de comprimento, totalizando cinco amostras (Figura 3). As amostras de flores foram congeladas em nitrogênio líquido logo após a amostragem e armazenadas a −80 ° C. Na tabela 1, informações sobre as amostras são relatadas.

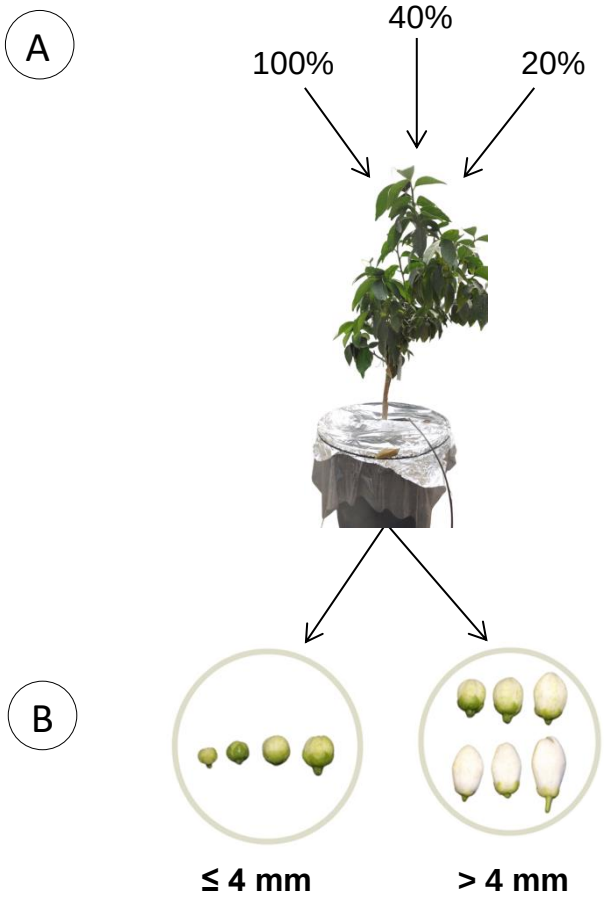


Figura 3. Desenho experimental mostrando (A) as condições de déficit hídrico, a qual as plantas foram submetidas: 20%, 40% e 100% da Capacidade de Pote (CP) e (B) o tamanho dos botões florais divididos em dois grupos: ≤ 4mm e > 4mm.

Tabela 1. Condições de tratamento, tamanhos dos botões florais e nomenclatura correspondente a cada amostra.

Tratamento Hídrico (CP)*	Flores em botão com ≤ 4 mm	Nomenclatura utilizada*	Flores em botão com ≥ 4 mm	Nomenclatura utilizada
20%	68-70-1	DS20	68-70-2	DL20
40%	98-1	DS40	98-2	DL40
100%	100-111-1	DS100	-	-

*CP = Capacidade de pote; D = Déficit; S = *Small*; L = *Larger*.

4.2. ISOLAMENTO DE RNA E CONSTRUÇÃO DE BIBLIOTECAS DE RNA-SEQ

O RNA total foi extraído das amostras de aproximadamente 75 mg de botões florais de cada *pool*, maceradas com nitrogênio líquido, usando o Kit RNAqueous® seguindo as recomendações do fabricante (Applied Biosystems, Ambion). A qualidade do RNA foi verificada em eletroforese com gel de agarose 1% e, para visualização da banda, foi utilizado o corante fluorescente Gel Red®. As imagens foram capturadas com o fotodocumentador Kodak Gel Logic®.

O fluorômetro Qubit (Life Technologies) mediu a concentração de RNA usando um kit de ensaio Qubit RNA (Life Technologies) para marcação de RNA. A biblioteca de RNA-seq foi preparada com o kit e protocolo Illumina TruSeq e, a seguir, quantificada por qPCR (PCR em tempo real) usando o kit Kapa® e o aparelho Applied Biosystems 7500 Fast. O sequenciamento da biblioteca ocorreu na plataforma Illumina MiSeq.

4.3. ANÁLISE DE QUALIDADE, ALINHAMENTO E CONTAGEM DE *READS*

A qualidade das *reads* obtidas no sequenciamento (dado bruto no formato *.fastq) foi avaliada usando o software FastQC (versão 0.11.4) (BABRAHAM INSTITUTE, [s.d.]). O software STAR (versão 2.6.0) foi usado para alinhar as leituras processadas contra o genoma de referência do *Citrus clementina* (OUESLATI et al., 2017), obtido na base de dados do Phytozome versão 1.1 (https://phytozome.jgi.doe.gov/). As *reads* alinhadas, no formato *.bam, foram submetidas na etapa de contagem, usando o script Python HTseq-count (ANDERS; PYL; HUBER, 2014).

4.4. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL E VOLCANO PLOT

As contagens das *reads* foram submetidas à análise para identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) utilizando o pacote EdgeR (ROBINSON et al., 2010) do ambiente estatístico R. Foram realizadas as comparações entre os tratamentos de déficit hídrico para cada combinação: DS40 x DS100; DS20 x DS100; DS20 x DS40; DL20 x DL40. Os genes que apresentaram o valor de FDR <0.001 e Log2 do *fold change* (Log2FC) > 2 ou < - 2 foram considerados diferencialmente expressos.

4.5. VOLCANO PLOT E ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

O resultado do FDR e Log2FC produzidos pelo EdgeR foram empregados para a plotagem do volcano plots de cada comparação, em ambiente R, com os pacotes *maser*, *rtracklayer*, *calibrate* e *ggplot2* (DIOGO, 2020; LAWRENCE; GENTLEMAN; CAREY, 2009; WICKHAM et al., 2020). Os genes diferencialmente expressos *up* (FDR <0.001 e Log2FC > 2) e *down* regulados (FDR <0.001 e Log2FC < -2) foram selecionados e direcionados para a análise de enriquecimento funcional.

Para a análise de enriquecimento funcional um arquivo de anotação de GOs foi criado. Para isso, as proteínas de *Citrus clementina,* disponível no Phytozome, foram anotadas funcionalmente com as ferramentas PANNZER2 e eggNOG-mapper (TORONEN; MEDLAR; HOLM, 2018; HUERTA-CEPAS et al., 2017). As proteínas e seus respectivos GO IDs foram customizados no formato de input para o *plugin* BiNGO (https://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Customize.html), o qual foi utilizado para identificar processo biológico (PB), função molecular (FM) e componente celular (CC), enriquecidos em genes *up* e *down* regulados (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005). O output do BiNGO foi empregado em um script em linguagem Python para formatação de acordo o padrão do programa *GoPlot* (https://wencke.github.io/).

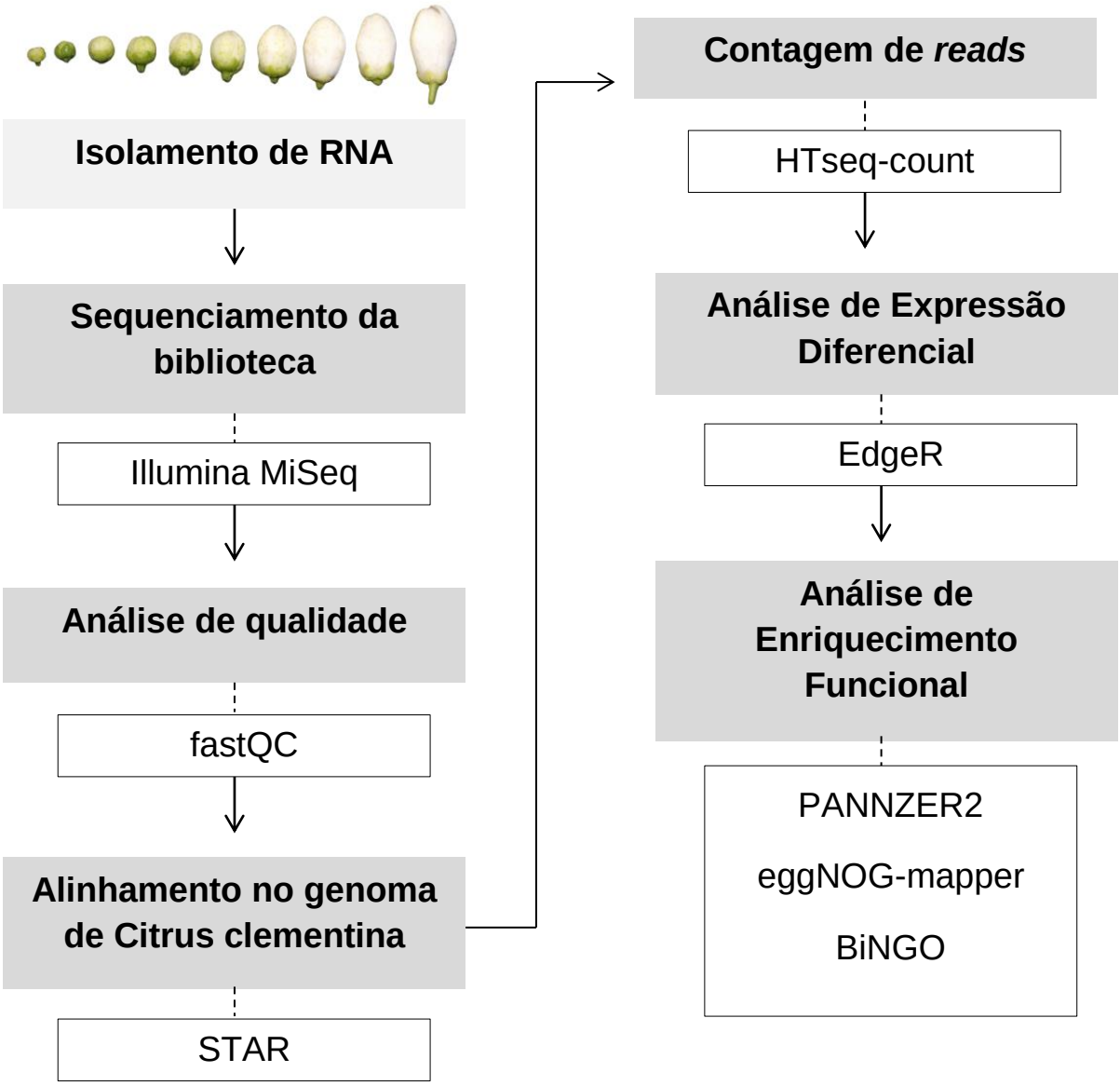


Figura 4. Visão geral do desenho experimental e pipeline de análise. O RNA dos botões florais foi coletado e formado pools de amostra, para sequenciamento Illumina RNA-Seq. Os dados foram verificados quanto a sua qualidade utilizando o fastQC e posteriormente alinhados contra o genoma de referência de *Citrus clementina* utilizando o algoritmo STAR. A contagem para cada gene foi realizada através do script HTseq-count. A análise diferencial de genes, feita pelo EdgeR, foi realizada por meio de comparações entre os tratamentos de déficit hídrico para cada combinação. Para isso, foram selecionados genes que apresentaram os seguintes parâmetros: FDR <0.001 e Log2FC > 2 (*up*) e FDR <0.001 e Log2FC < -2 (*down*), considerados genes diferencialmente expressos. Desses resultados, foi feito a plotagem do volcano plots de cada comparação e direcionados para a análise de enriquecimento funcional. Para a análise de enriquecimento funcional, as proteínas de *Citrus clementina*, foram anotadas funcionalmente com as ferramentas PANNZER2 e eggNOG-mapper. O plugin BiNGO foi usado para identificar o processo biológico (PB), função molecular (FM) e componente celular (CC), enriquecidos em genes *up* e *down* regulados.

5. RESULTADOS

5.1. ANÁLISE DE QUALIDADE

O padrão de expressão gênica dos botões florais de plantas da tangerineira ‘Fortune’ que foram submetidas à diferentes tratamentos de estresse por déficit hídrico, foi analisado utilizando a tecnologia de RNA-Seq. Cinco bibliotecas de cDNA foram construídas, sendo duas para o tratamento hídrico de 20%, representando os dois tamanhos florais, duas para o tratamento hídrico de 40%, representando os dois tamanhos florais, e uma para o controle, 100% da capacidade de pote, representando o tamanho floral ≤ 4 mm. A ausência de amostras controle para o tamanho floral > 4 mm se deu pela insuficiência de botões florais neste tamanho. A partir desses dados, diferentes parâmetros de qualidade das bibliotecas de cDNA foram analisados pelo FastQC.

Foram disponibilizadas informações estatísticas do conjunto de dados como: quantidade de sequências, tamanho das *reads*, sequências sinalizadas como baixa qualidade, comprimento da sequência e conteúdo CG (%). O sequenciamento gerou um total de 16.131.276 sequências/leituras com uma cobertura de aproximadamente 3.226.255,2 milhões de *reads* por biblioteca. O tamanho das sequências variou entre 35-76 pb, e o conteúdo CG (%) variou entre 44%-47% entre as amostras (Tabela 2). Nenhuma sequência foi sinalizada como de baixa qualidade (Gráfico 1; Apêndice A).

Tabela 2. Estatísticas do conjunto de dados produzidos no sequenciamento RNA-Seq.

Biblioteca de RNA-seq	Total de sequências	Tamanho das sequências	%CG
DS20	5213259	35-76	47
DL20	2062242	35-76	45
DS40	3568045	35-76	44
DL40	3138006	35-76	45
DS100	2149724	35-76	44

O gráfico 2 traz a representação da qualidade por base. Neste, pode-se observar que o eixo Y possui três regiões com cores distintas, que representam a qualidade dos escores. Além disso, também é determinada pelo tamanho dos boxplots. A qualidade do escore é definida como baixa (0 ≤ Q < 20), representada pela faixa vermelha; razoável (20 ≤ Q < 28), representada pela faixa amarela e boa (Q ≥ 28), representada pela faixa verde.

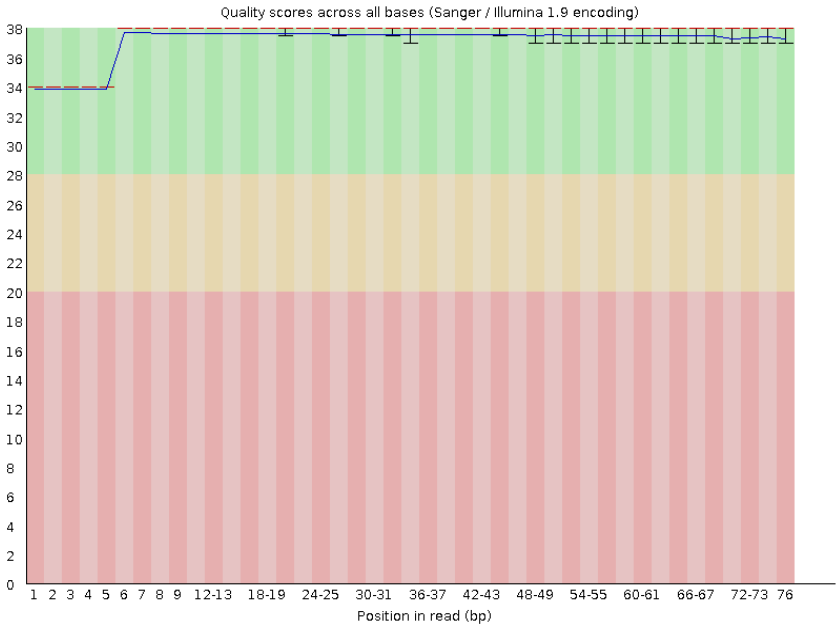


Gráfico 3. Representação da qualidade gerados pelo FastQC das bibliotecas da amostra DS20.

Diante disso, foi possível determinar que as amostras apresentaram boa qualidade, ao observar que, além dos boxplots serem pequenos, o que indica as posições onde a qualidade foi mais consistente nos *reads*, os boxplots encontraram-se nas posições mais elevadas do eixo Y (região verde), indicando que as leituras apresentaram boa qualidade (Q ≥ 28).

Outro resultado que assegura a qualidade das sequências é o parâmetro 'Por qualidade de sequência de bloco' (*Per tile sequence quality)* que mostra informações sobre o desvio em relação à qualidade média dentro de uma *tile*, onde as cores quentes indicam que os fragmentos que estavam em determinada *tile* tiveram uma qualidade média pior que a média das demais, e

a *tile* de cor azul, tiveram boa qualidade. Os resultados desta análise, por sua vez, mostraram *tiles* de cor azul para todas as amostras.

Todos esses resultados mostraram que o rendimento e a qualidade do sequenciamento eram altos para as análises posteriores.

5.2. ALINHAMENTO E CONTAGEM NO GENOMA

Os alinhamentos foram realizados na presença do genoma de referência da *Citrus clementina* (*reference-guided*). Após o alinhamento das leituras no genoma de referência com o software STAR foram gerados, somando-se todas as bibliotecas, um número total de 15.994.555 *reads* e uma média geral de 3.198.911 *reads* por biblioteca. Além disso, apresentaram uma média de 84,72% de alinhamento único das leituras em relação ao genoma de referência (Tabela 3). A amostra DS20 mostrou um baixo alinhamento (58,76%), o que possivelmente justifica a possibilidade de que o subconjunto de transcrição não tenha sido capturado.

Tabela 3. Dados das leituras mapeadas pela ferramenta STAR.

Biblioteca	Leituras iniciais	Leituras únicas alinhadas	Leituras múltiplas alinhadas	Leituras não alinhadas
DS20	5213259	58,76%	22,79%	4,65%
DL20	2062242	90,54%	2,56%	6,74%
DS40	3138006	87,93%	2,85%	9,08%
DL40	3568045	92,77%	2,69%	4,33%
DS100	2013003	93,64%	3,33%	2,61%
	15.994.555	84,72%	6,844%	5,48%

5.3. ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL (DE)

Para serem considerados diferencialmente expressos, os genes que apresentaram o valor de FDR <0.001 e Log2FC > 2 (*up regulation)* e FDR <0.001 e Log2FC < -2 (*down regulation)* foram selecionados. As comparações foram realizadas entre tamanhos de botões florais (≤ 4 mm e > 4 mm) das plantas que foram submetidas à diferentes tratamentos de déficit hídrico. As comparações foram agrupadas para análise, a saber:

I – Déficit hídrico x Controle (DS40 x DS100; DS20 x DS100) (Figura 5 a-b);

II – Tratamento hídrico severo (DS20 x DS40; DL20 x DL40) (Figura 5 c-d).

Os genes diferencialmente expressos foram identificados e um total de 1.476 transcrições mostrou variação significativa de expressão entre os tratamentos controle e de estresse por déficit hídrico em diferentes tamanhos de botões florais, sendo que destes, 693 eram genes induzidos (*up regulation*) e 783 eram genes reprimidos (*down regulation*).

As comparações da expressão gênica (*pairwise*) desses transcritos estão representadas na figura 5 através das análises de Volcano Plot, os quais, pela significância estatística, representam a mudança na expressão entre os tratamentos com base em um *p-value* corrigido (q-value). Eles mostram a expressão diferencial de genes únicos do transcriptoma dos botões florais de diferentes tamanhos da tangerineira 'Fortune', indicando genes induzidos, sendo estes os que possuem o FC relevante, representados na figura 5 por pontos vermelhos, e genes reprimidos, estes representados por pontos azuis.

Nas comparações dos grupos I e II, foi avaliada a interferência do tratamento hídrico moderado e severo no perfil transcriptômico dos botões florais. No gruo I, no qual foi avaliado o tratamento hídrico de 40% da Capacidade de Pote, a maior parte dos genes estava sendo induzidos (230 genes), enquanto que no tratamento hídrico com 20% da Capacidade de Pote, houve uma maior quantidade de genes que estavam sendo reprimidos (258 genes) (Figura 5a e 5b).

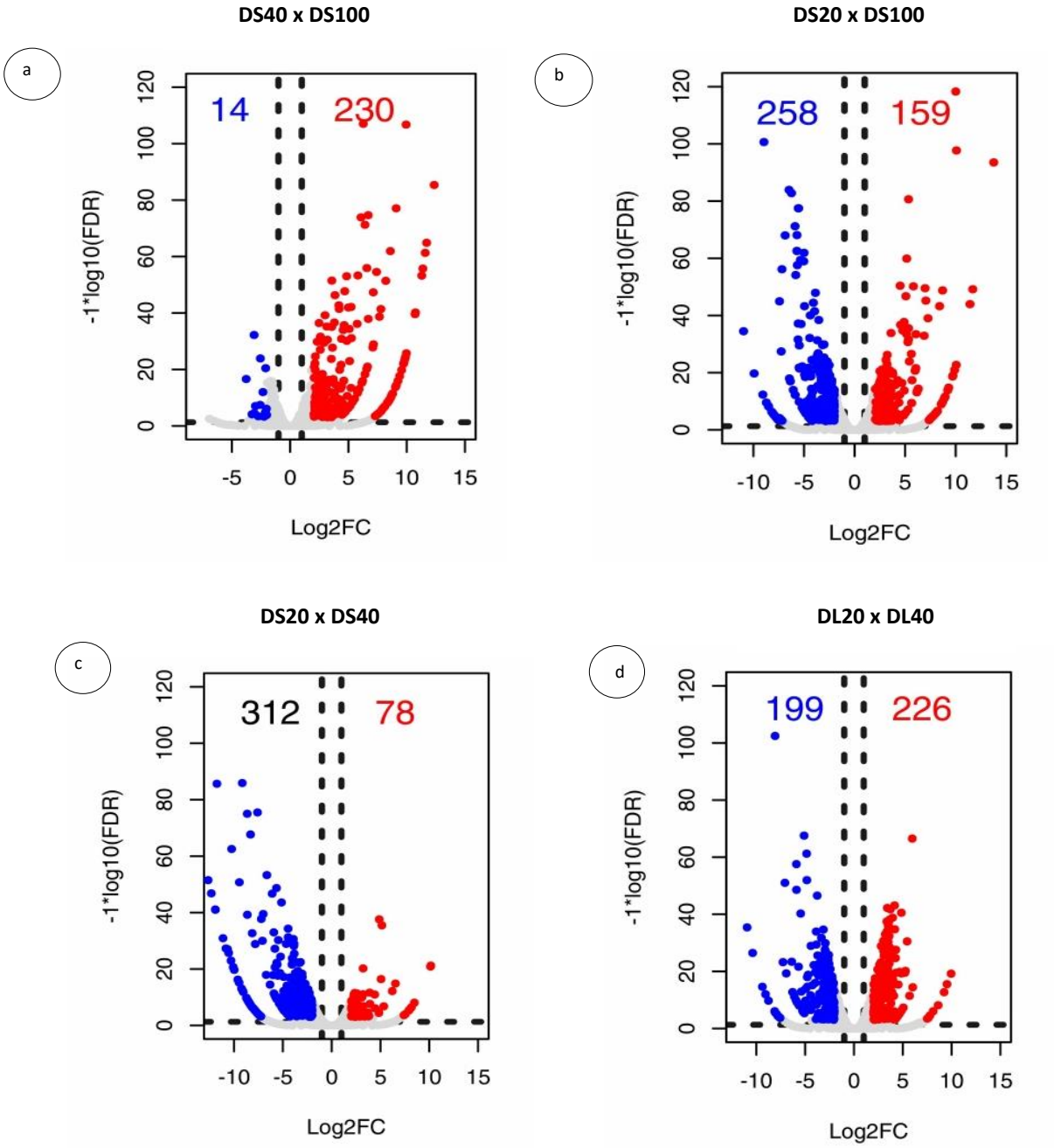


Figura 5. Gráficos Volcano Plot mostrando a comparação da expressão gênica *pairwise* entre os diferentes tamanhos de botões florais da tangerineira 'Fortune' na condição de controle 100%/≤ 4 mm (DS100); e de déficit hídrico 20%/≤ 4 mm (DS20); 20%/≥ 4mm (DL20); 40%/≤ 4 mm (DS40); 40%/≥ 4mm (DL40). As comparações do grupo I (a-b) e do grupo II (c-d). O eixo "y" representa o *p-value* corrigido (*q-value*) em uma escala logarítmica que é diretamente proporcional à significância do logFC entre os diferentes tratamentos. O eixo "x" representa a mudança na expressão entre as condições. Os pontos azuis são genes únicos com variação de expressão não significativa (FDR <0.001 e Log2FC < -2) e os pontos vermelhos são os genes diferencialmente expressos (FDR <0.001 e Log2FC > 2).

No grupo II, foi avaliada a interferência do déficit hídrico severo no perfil transcriptômico dos botões florais de tamanhos diferentes (≤ 4 mm e > 4 mm). Foi observado que no botão floral ≤ 4 mm, houve um aumento na repressão dos genes (312 genes) quando a planta era submetida no tratamento hídrico severo, enquanto apenas 78 genes eram induzidos. Já nos botões florais > 4 mm, a maior parte dos genes estava sendo induzidos (226 genes), apesar de um número significativo de genes estarem sendo reprimidos (199 genes) (Figura 5c e 5d).

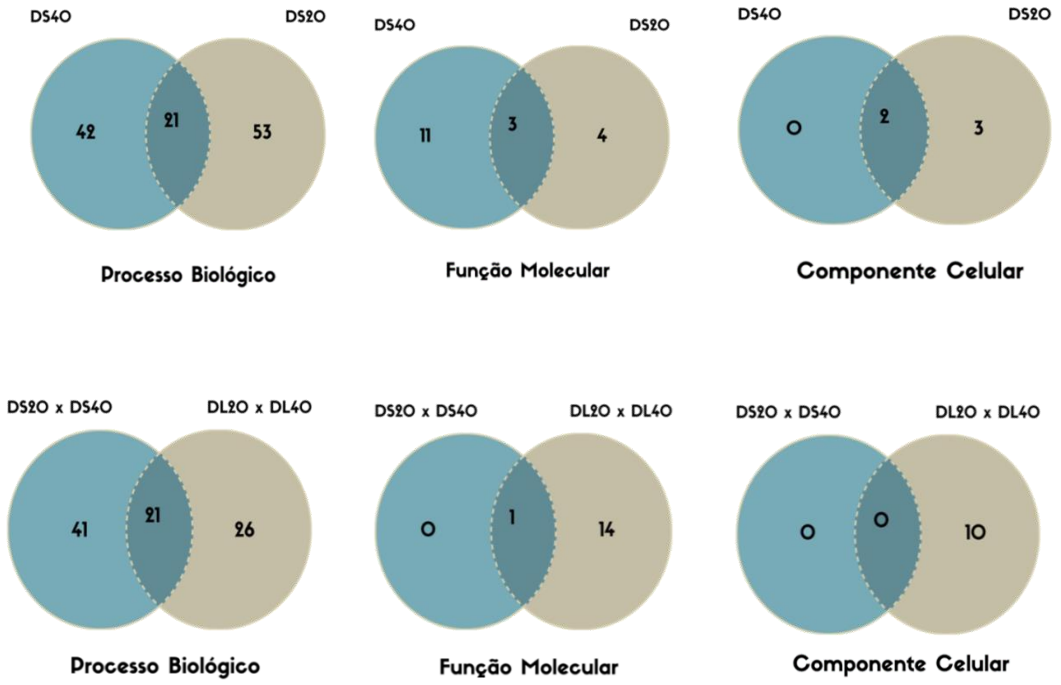


Figura 6. Diagrama de Venn mostrando a quantificação dos principais termos enriquecidos no 'processo biológico' (BP), 'função molecular' (MF) e 'componente celular' (CC) nos tratamentos (A) Grupo I: DS40 X DS100 e DS20 X DS100 e (B) Grupo II: DS20 X DS40 e DL20 X DL40.

5.4. ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO FUNCIONAL

Para classificar funcionalmente os DEGs foram utilizadas as ferramentas PANNZER2 e eggNOG-mapper. A análise de enriquecimento funcional foi utilizada para classificar as principais funções unigênicas que foram atribuídas aos termos GOs. Os principais termos enriquecidos em genes *up* e *down* regulados em todos os tratamentos foram quantificados. No domínio "processo

biológico” (PB) as atribuições foram enriquecidas e totalizadas em 301 termos; na “função molecular” (MF) totalizou-se 60 termos e no domínio “componente celular” (CC) foram atribuídos um total de 31 termos ao analisar todas as comparações (Figura 6).

As funções moleculares e os componentes celulares de cada tratamento encontram-se listados no Apêndice B. O enfoque a partir de agora, será nos processos biológicos. Uma visualização circular dos dez processos biológicos mais significativamente enriquecidos das comparações é representada na figura 7 indicando a regulação dos genes envolvidos e a pontuação de enriquecimento. Foram selecionados para a investigação, cinco dos 10 processos biológicos que estavam ocorrendo com maior intensidade. Para esta discussão, as análises das comparações continuaram separadas nos três grupos anteriormente citados.

No grupo I, os processos biológicos ‘desenvolvimento de pólen’ (GO:0009555) e ‘montagem da parede de pólen’ (GO:0010208) foram bem representados nas condições de déficit moderado e severo. No entanto, no tratamento moderado, todos os genes da ‘montagem da parede de pólen’ estavam sendo induzidos; enquanto que no tratamento severo, a maior parte dos genes neste mesmo processo estava sendo reprimidos, e alguns poucos estavam sendo induzidos.

Os processos biológicos no tratamento moderado (DS40 x DS100) tiveram seus genes *up* regulados, apesar de que em 50% dos processos, genes também estavam sendo reprimidos; enquanto que no tratamento severo, os genes foram *down* regulados, apesar de que na maioria dos processos (80%), alguns genes também estavam sendo induzidos.

O ‘processo metabólico secundário’ (GO:0019748), ‘desenvolvimento de organismo multicelular’ (GO:0007275) e ‘desenvolvimento do gametófito’ (GO:0048229) foram termos *up* regulados mais enriquecidos e específicos para o tratamento de déficit moderado. Na categoria função molecular a ‘atividade do transportador transmembrana ativo’ (GO:0022804), ‘atividade transportadora transmembrana ativa secundária’ (GO:0015291), ‘atividade de hidrolase, atuando nas ligações glicosiladas’ (GO:0016798) e ‘atividade

oxidorredutase, atuando em doadores pareados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular' (GO:0016705) foram específicos dentro do grupo.

A 'resposta ao estímulo abiótico' (GO:0009628), 'processo biossintético de esporopolenina' (GO:0080110), 'organização da estrutura de encapsulamento externo' (GO:0045229) foram processos específicos e *up* regulados no tratamento severo (DS20 x DS100); sendo que na 'resposta para estímulo abiótico', genes estavam sendo induzidos, enquanto outros estavam sendo reprimidos. Na função molecular as funções relacionadas a 'atividade transportadora transmembrana de açúcar' (GO:0051119), 'ligação de proteína não dobrada' (GO:0051082), 'atividade ativadora de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase', 'autoassociação de proteínas' (GO:0046863) foram enriquecidas e específicas neste tratamento.

No grupo II, voltando a atenção para o tratamento déficit hídrico severo e relacionando-o com o tamanho menor (≤ 4 mm) e maior (> 4 mm) dos botões florais, os termos comuns em ambas as comparações foram 'montagem de parede de pólen' (GO:0010208) e 'organização da estrutura de encapsulamento externo' (GO:0045229).

Especificamente no botão floral de tamanho pequeno, os termos mais enriquecidos foram 'processo biossintético da esporopolenina' (GO:0080110), 'resposta ao estímulo de temperatura' (GO:0009266) e a 'formação de exina de pólen' (GO:0010584). Na função molecular, a 'atividade transportadora transmembrana de açúcar' (GO:0051119), 'ligação de lipídios' (GO:0008289) e 'atividade do transportador de transmembrana de carboidratos' (GO:0051119) foram enriquecidas. O processo biológico 'resposta ao estímulo de temperatura' (GO:0009266) foi enriquecido somente no botão floral de tamanho menor, quando submetido ao estresse severo.

Nos botões florais de tamanho maior (> 4 mm), foi visto que em todos os processos biológicos alguns genes estavam sendo induzidos, enquanto que outros estavam sendo reprimidos. Os termos específicos foram 'regulação do ritmo circadiano' (GO:0007623), 'montagem de componentes celulares envolvidos na morfogênese' (GO:0048646) e 'processo rítmico' (GO:0048511).

Na função molecular, o termo mais enriquecido foi o de ‘ligação de proteína não dobrada’ (GO:0051082).

5.4.1. Déficit hídrico x Controle

Os cinco processos biológicos melhor representados nos botões florais de plantas submetidas ao déficit moderado totalizaram 65 DEGs, onde a grande maioria estava sendo induzidos, com exceções de alguns poucos genes que estavam sendo reprimidos, concomitantemente nos mesmos processos. Dentro desse grupo, 49 DEGs foram específicos.

A análise da expressão gênica mostrou o enriquecimento de genes responsivos ao desenvolvimento de estruturas como a parede e revestimento do pólen (CalS5, MS1), envolvidos nos estágios de seu desenvolvimento; transportadores pertencentes à família ABC (ABCG1, ABCG9, ABCG21 e PDR3); fatores de transcrição como NAC, MYB, EAT1 e ERF; na biossíntese de substâncias como a esporopolenina (ACOS5) e exina (CYP704B1), metabólitos secundários, como flavonoides (TT4, LAP6), compostos como espermidina (SHT), fenilpropanoide (CYP716A1) e esterol (CAS1); na absorção de açúcar (STP8), além da resposta ao estresse (NAC025, LAC7, UG74E2, FAB1, BBX19) pelas vias hormonais como a do etileno (NAC100) e a do ácido abscísico (NCED3), responsiva à a seca. Genes com expressão transitória (MS2, QRT3) e de reparação (RBR1), também foram identificados.

Os botões florais de plantas em condições de déficit hídrico severo totalizaram 69 DEGs, sendo que destes, 54 DEGs eram específicos dentro do grupo. Os DEGs no déficit hídrico severo envolvidos no ‘processo biossintético da esporopolenina’ foram totalmente reprimidos, como LAP5, LAP6, DRL1 e TKPR2, envolvidos na síntese de ácidos graxos e fenólicos e na biossíntese de esporopolenina. Em outros processos, de modo geral, a maioria dos DEGs estavam sendo reprimidos, enquanto alguns eram induzidos.

Tais DEGs estão envolvidos na biossíntese de esterol, compostos como a espermidina e de metabólitos secundários; envolvidos no reparo de danos; codificando fatores de transcrição envolvidos na formação da parede e

no revestimento de pólen; codificando proteínas responsáveis pela organização estrutural de compartimentos e desenvolvimento do tapete das anteras; reguladores do relógio circadiano e das respostas à estresse biótico e abiótico, como condições de choque térmico e estresse hídrico, desempenhando, por exemplo, papel fundamental na via do ABA. Além de DEGs envolvidos na termotolerância e na prevenção de estresse foto-oxidativo.

5.4.2. Tratamento hídrico severo

As comparações do tratamento hídrico severo em relação ao tamanho do botão floral revelaram que no botão floral de menor tamanho, a grande maioria dos fatores de transcrição, transportadores, reguladores foram reprimidos. Estes totalizaram 37 DEGs, sendo que destes, 24 eram específicos dentro deste grupo. Os genes reprimidos eram transportadores, fatores de transcrição, reguladores do desenvolvimento floral, genes importantes para o desenvolvimento das anteras, para a biossíntese de esporopolenina e maturação do pólen. Genes envolvidos na resposta ao estresse pelo frio também foram reprimidos.

No botão floral maior das plantas submetidas ao estresse severo, foi quantificado 19 DEGs para os principais processos biológicos, sendo que destes, 13 eram específicos para este grupo. Os genes envolvidos no ritmo circadiano foram os mais contrastantes, além de genes necessários para o desenvolvimento normal da planta em condições de estresse. Fatores de transcrição, genes que desempenham funções na via fotorrespiratória, e que controlam a germinação em condições salinas foram regulados diante da condição de estresse e da fase de desenvolvimento do botão floral. O processo de ‘organização da estrutura de encapsulamento externo’ no botão de menor tamanho teve a regulação de 15 DEGs, enquanto no botão maior, teve a regulação de 8 DEGs.

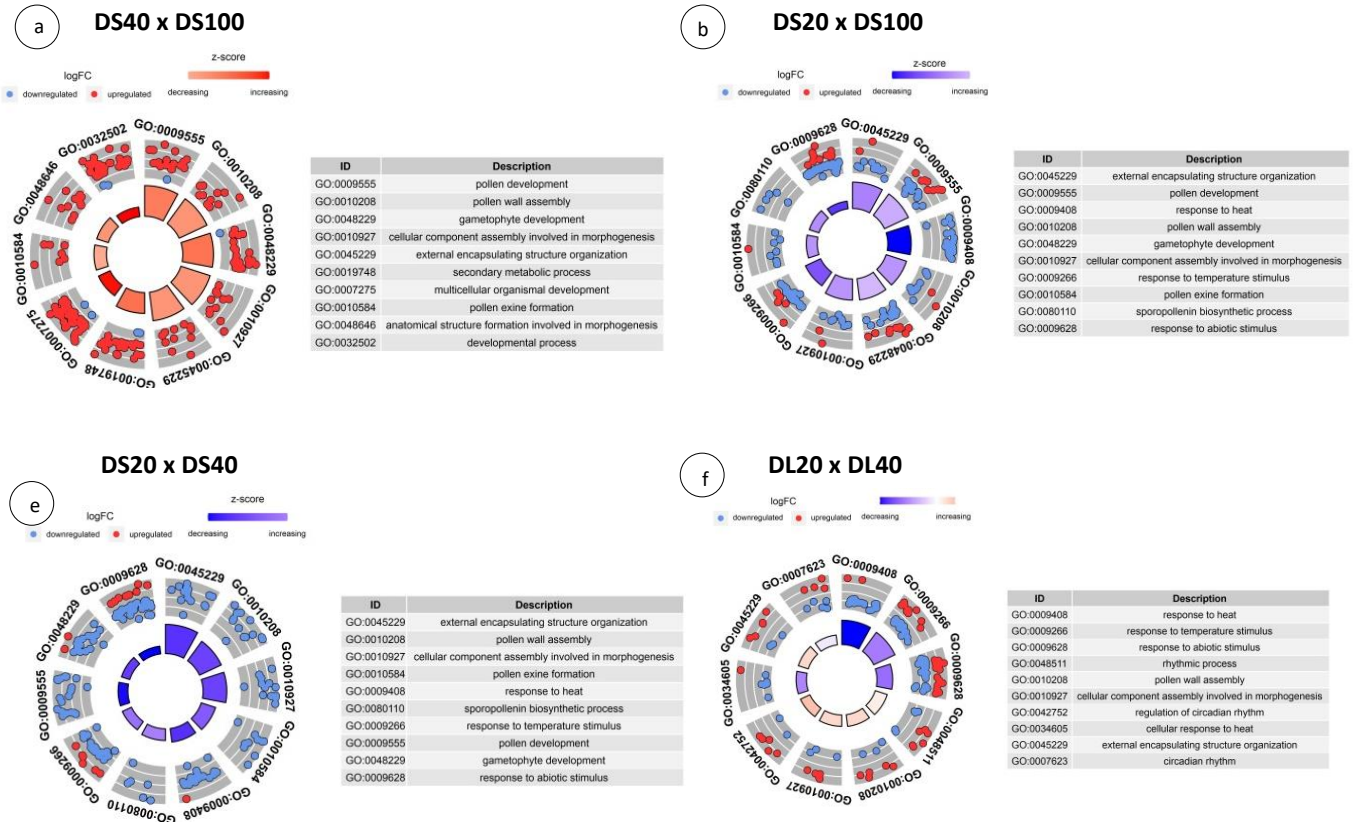


Figura 7. Análise de enriquecimento funcional dos termos de Ontologia Gênica (GO) na categoria de processos biológicos para os conjuntos de genes diferencialmente expressos entre os diferentes tamanhos de botões florais da tangerineira ‘Fortune’ na condição de controle 100%/≤ 4 mm (DS100); e de déficit hídrico 20%/≤ 4 mm (DS20); 20%/≥ 4mm (DL20); 40%/≤ 4 mm (DS40); 40%/≥ 4mm (DL40). Os pontos azuis são genes únicos com variação de expressão não significativa (*downregulated*) e os pontos vermelhos são os genes diferencialmente expressos (*upregulated*). Além disso, o processo pode estar ocorrendo (*increasing*) ou não (*decreasing*).

6. DISCUSSÃO

A compreensão de como acontece a resposta durante o desenvolvimento reprodutivo as tensões abióticas ainda é muito limitada, principalmente quando se trata de culturas agrícolas como citros (SU et al., 2013). A capacidade de tolerar a escassez hídrica é algo ambiciosamente desejada pelos citricultores e programas de melhoramento. Na investigação realizada por Costa et al. (2017), foi demonstrado que o desenvolvimento dos botões florais da tangerineira 'Fortune' não foi afetado quando as plantas foram submetidas aos tratamentos de seca. Neste estudo, um total de 175 DEGs foram destacados dentro dos 5 processos biológicos mais enriquecidos. Genes responsivos ao desenvolvimento floral e em resposta à seca foram diferencialmente expressos.

Quatro transportadores ABC foram identificados regulados positivamente no tratamento moderado. O transportador ABCG1 é necessário para a integridade do pólen (YADAV et al., 2014) e foi regulado positivamente em todos os tratamentos hídricos. ABCG9 está envolvido no acúmulo de esteril glicosídeo na superfície do pólen, participando do processo de maturação do revestimento polínico (CHOI et al., 2014). Dois transportadores envolvidos na resposta à deficiência hídrica também foram identificados. ABCG21 ainda precisa ser investigado, mas sugere-se que tenha relação com a regulação estomática (KUMORI et al., 2017) e o transportador PDR, PDR3, é indicado como um regulador positivo da sinalização de ABA em células guarda (GALBIATI et al., 2008). Ambos tiveram regulação positiva em ambos tamanhos de botões florais das plantas submetidas aos tratamentos moderado e severo.

O polissacarídeo especializado, CalS5, foi visto ser altamente expresso nas anteras, sendo responsável pela síntese de calose na parede celular temporária dos micrósporos (DONG et al., 2005), que atua como molde, sendo preenchido pela primexina e no qual a esporopolenina é depositada, levando à formação da parede final da exina em Arabidopsis (STANLEY; LINKENS, 1974). A parede celular rica em calose é necessária, uma vez que ela circunda

e separa cada microsporócito impedindo sua fusão e coesão. Com isso, a degradação propícia das paredes facilita da liberação de micrósporos das tétrades durante a meiose (DONG et al., 2005). O gene QRT3 foi visto com expressão restrita no tapete nos estágios finais da microsporogênese em botões florais, desempenhando papel direto e específico (RHEE et al., 2003).

O gene MALE STERILITY1 (MS1) foi *up* regulado durante o tratamento moderado e *down* regulado no tratamento severo nos botões florais < 4 mm da tangerineira 'Fortune'. No tratamento severo, esse gene nos botões florais ≥ 4 mm foi *up* regulado. Ele atua por meio de fatores de transcrição, para regular a expressão de genes que são associados à formação da parede do pólen (YANG et al., 2007), envolvidos na biossíntese de componentes da via fenilpropanoide (CYP716A1) (SOTELO-SILVEIRA et al., 2013) e ácidos graxos ω-hidroxilados de cadeia longa (CYP704B1, ACOS5) (DOBRITSA et al., 2009) que podem servir como blocos de construção na esporopolenina e compostos fenólicos necessários para a biossíntese de esporopolenina (ACOS5).

Nossos resultados mostram que o comportamento da expressão desses genes corroboram com a regulação do gene MS1, que está envolvido na formação do revestimento de pólen e é especificamente ativo nas células do tapete como proposto em estudos anteriores (ITO et al., 2007; REIMEGÅRD et al., 2017). No entanto, pouco ainda se sabe sobre sua estrutura precisa e a rede genética que determina sua síntese (DOBRITSA et al., 2009). O gene ESTERILIDADE MASCULINA2 (MS2) está envolvido na formação da exina de pólen (AARTS et al., 1997). Sua expressão foi induzida somente no tratamento moderado e em botões florais ≥ 4 mm de plantas submetidas ao déficit severo. A expressão de FAB1 é essencial para o desenvolvimento de pólen viável (WHITLEY et al., 2009). Em nosso estudo ele foi *up* regulado em ambos os tratamentos hídricos.

Os botões florais (≤ 4mm e > 4 mm) da tangerineira 'Fortune' submetida ao déficit hídrico moderado e severo mostrou que SPERMIDINE HYDROXYCINNAMOYL TRANSFERASE (SHT) foi altamente expresso. Sua expressão é específica nas células do tapete. Sugere-se que SHT esteja envolvido na metilação na biossíntese de conjugados de espermidina

(GRINENBERGER et al., 2009), uma poliamina que desempenha papel importante na indução floral (KAUR-SAWHNEY et al., 1988).

Vários fatores de transcrição pertencentes a famílias MYB, NAC, BBX e fator responsivo ao etileno (ERF) mostraram papéis na resistência das plantas, inclusive desempenhando papel importante na resposta ao estresse regulado pelo ABA (ABE et al., 2003; FUJITA et al., 2004; BUSCAILL; RIVAS, 2014). Alguns fatores de transcrição de famílias conhecidas foram identificados em nosso trabalho.

Os fatores de transcrição da família NAC foram identificados nos cinco processos biológicos mais significativos dos botões das tangerineiras que foram submetidas a estresse moderado que foram selecionados para este trabalho. A família NAC está envolvida em todos os estágios de crescimento e desenvolvimento, incluindo o desenvolvimento de órgãos florais e resposta à seca. Dentre seus papéis está a regulação da divisão celular, desenvolvimento da flor, senescência da planta, crescimento da parede secundária, desenvolvimento da raiz lateral, resistência ao estresse e resistência a doenças (HU et al., 2010; NURUZZAMAN et al., 2010).

Em *Vernicia fordii* o fator de transcrição NAC025 mostrou participar predominantemente no desenvolvimento do estame e do pólen (MAO et al., 2017). O membro da subfamília NAM, ANAC100, é indutível por etileno em Arabidopsis (JENSEN et al., 2010; PE et al., 2013), alvo do miR-164, uma família conservada de microRNAs de plantas (SIEBER et al., 2007). Nosso estudo mostrou que ele teve sua expressão diminuída no estresse severo. A superexpressão de DRL1 reduziu a viabilidade e germinação do pólen em *Vitis vinífera* (LI et al., 2020). Na tangerineira ‘Fortune’ ele foi *up* regulado somente no tratamento moderado. No tratamento severo, seu comportamento foi reprimido.

O grupo de fatores de transcrição MYB foram representados em ambos os tratamentos. Devaiah et al. (2009) sugerem que a superexpressão de MYB62 impacta na floração, uma vez que suprime fatores de transcrição associados a genes homeóticos florais, como SOC1 e SUP. MYB62 foi *up*

regulada apenas em botões florais de tangerineiras ‘Fortune’ submetidas ao déficit moderado.

Evidências mostram papel de MYB33 no alongamento de órgãos e no desenvolvimento das anteras de Arabidopsis, sugerindo que ele medeia o sinal de giberelina (GA) (GOCAL et al., 2001; MILLAR; GUBLER, 2005). Em nossos resultados, o fator de transcrição MYB33 foi *up* regulado em ambos os tratamentos hídricos, mostrando maior intensidade no tratamento moderado. No entanto, estudos realizados com variedades cítricas, mostraram que GA está associada a repressão da indução floral (GOLDBERG-MOELLER et al., 2013).

Além disso, o ABA e o GA são reconhecidos como fitormônios que desempenham papéis antagônicos (LIU e HOU, 2018; GARMENDIA et al., 2019). Nossos resultados sugerem ainda, que a tangerineira ‘Fortune’ não acompanha esse padrão de regulação, uma vez que os resultados aqui apresentados mostram que o NCED3, gene chave para a regulação da biossíntese de ABA, também foi *up* regulado em condições de estresse hídrico moderado e severo.

MYB80 foi detectado no tapete e nos micrósporos contendo tétrades de Arabidopsis, onde sua expressão persistiu até a degeneração do tapete (HIGGINSON et al., 2003). Nos botões florais da tangerineira ‘Fortune’, MYB80 teve sua expressão reprimida.

Evidências suportaram que o papel do gene BBX19, membro da família de fatores de transcrição BBX (HUANG et al., 2012), é um regulador negativo do tempo de floração em *Arabidopsis* interagindo com o ativador transcricional CONSTANS (CO), necessário para a indução de FLOWERING LOCUS T (FT) (WANG et al., 2014). A subfamília ERF tem participação em diversos eventos regulatórios nas plantas, incluindo um grande número de genes que estão envolvidos no aumento da tolerância ao estresse abiótico ou a resistência a doenças (XU et al., 2011). No arroz transgênico, a superexpressão de ERF1 ativou a expressão da síntese de ABA e aumentou sua tolerância à seca (ZHANG et al., 2010). No tratamento moderado houve maior expressão do gene ERF1, do que no tratamento severo nos botões da tangerineira ‘Fortune’.

Outro fator de transcrição é EAT1 (ETERNAL TAPETUM 1). Ele está relacionado ao desenvolvimento no tapete da antera de *Oryza sativa* (NIU et al., 2013; ONO et al., 2019).

Foi descoberto que NPC2 é envolvido na regulação de respostas de estresse abiótico (SONG et al., 2017) e que desempenha papel crucial na gametogênese durante o desenvolvimento da flor juntamente com NPC6 (NGO et al., 2018). Nossos resultados mostram que em todas as comparações, esse gene teve expressão induzida em todas as comparações e nos dois tamanhos de botões florais.

Um membro da subfamília de proteínas intrínsecas semelhantes a NOD26 (NIPs) das Aquaporinas (AQP) específico do pólen em Arabidopsis, NIP4;2 mostrou funcionalidade exclusiva durante o crescimento do tubo polínico. As AQP do pólen transportam água, pequenos solutos e / ou gases durante o desenvolvimento do pólen, germinação e crescimento do tubo polínico (GIORGIO et al., 2016; SOTO et al., 2008 ; WUDICK et al., 2014). Léran et al. (2020) sugeriu que NPF4.3 se comporta como transportador de efluxo de ABA.

Os genes do CITOCROMO P450 (P450s) têm papel importante na homeostase dos fitormônios e na biossíntese de metabólitos secundários. Estudos revelam a regulação de seus genes durante o estresse abiótico e biótico em culturas como a soja, arroz, cereais e frutas (YAN et al., 2016; TAMIRU et al., 2015; WANG et al., 2016). Em citros, o conhecimento sobre os mecanismos de regulação e as funções dos genes P450s ainda são escassos. No entanto, sabe-se da ativação dos genes P450s e o acúmulo de flavonoides após estresses abióticos e bióticos, como Huanglonbing (HLB) (WANG et al., 2016). Nesse estudo, P450s como CYP703A2, CYP704B1, CYP716A e CYP98A3 foram identificados.

O gene CYP704B1 é um gene envolvido na produção de exina de pólen. Os genes CYP704B1, CYP703A2 e MS2 foram vistos altamente coregulados, sugerindo envolvimento no metabolismo de ácidos graxos específicos da exina, como ácidos graxos hidroxilados de cadeia longa (DOBRITSA et al., 2009). Nos botões florais da tangerineira ‘Fortune’ submetidas ao tratamento

moderado, esses genes foram *up* regulados, enquanto que no tratamento severo foram reprimidos.

A subfamília de genes CYP716A é altamente conservada nas plantas, a qual está envolvida na biossíntese de triterpenóides (FUKUSHIMA et al., 2011). No nosso estudo CYP716A foi *up* regulado em todos os tratamentos. Em citros, os limonóides são os principais triterpenóides encontrados e são relacionados à atividades que podem trazer benefícios à saúde, sugerindo-o como potencial inibidor de crescimento de células cancerígenas (PATI et al., 2017). Normalmente, plantas submetidas ao déficit hídrico produzem elevados níveis de metabólitos secundários, inclusive triterpenóides (SELMAR; KLEINWACHTER, 2013). .

O uso eficiente do déficit hídrico pode aumentar a produção de metabólitos secundários na planta. No entanto, uma atenção especial deve ser tomada quanto ao estresse oxidativo (LEI et al., 2006). Okubo e Yoshiki (2000) mostratam que os triterpenóides possuem atividade antioxidante. CYP98A3 foi down regulado em todas as comparações, corroborando com os resultados de Souza et al. (2007), que mostrou que o gene CYP98A3 foi negativamente regulado em *Citrus sinesis*.

Os flavonoides são metabólitos secundários importantes, pois desempenham papéis no crescimento e desenvolvimento das plantas. A rede biossintética de flavonoides é ampla e complicada (DAO et al., 2011). Em citros, os níveis de flavonoides antioxidantes demonstram-se variados em alguns germoplasmas (ARBONA et al., 2015). *Citrus* é uma fonte de flavonoides antioxidantes, que além de proteger as plantas, estimula o sistema imunológico e diminui o risco de inúmeras doenças crônicas no homem (BUTELLI et al., 2008; LIU et al., 2012; PATIL et al., 2017).

TT4 é um dos genes de biossíntese de flavonoides antioxidantes (NAKABAYASHI et al., 2014). Sua expressão nos botões florais da tangerineira ‘Fortune’ foi *up* regulada nos tratamentos moderado e severo. RAO et al. (2020) mostrou que a expressão de TT4 na laranja doce (*Citrus sinesis*) foi significativamente induzida após o estresse hídrico a partir da superexpressão do gene CYT75B1, e que linhagens transgênicas tiveram rápido acúmulo de

flavonoides antioxidantes promovendo boa aclimatação, exibindo tolerância ao estresse hídrico e com baixo conteúdo de radicais superóxidos e ROS.

CAS1 é necessário para a viabilidade das células e sugere-se que está envolvida na regulação da biossíntese de triterpenóides (BABIYCHUCK et al., 2008). Foi significativamente induzido nos tratamentos hídricos e severos, no entanto, foi reprimido no botão floral (≤ 4 mm) da planta submetida ao tratamento hídrico severo. O ácido abscísico é o hormônio mais abundante na planta, envolvido na regulação de diversos processos fisiológicos, sendo essencial na resposta adaptativa das plantas ao estresse biótico (FUJITA et al., 2006) e abiótico (ZHU, 2002). Os níveis de ABA nos tecidos vegetais são dinâmicos, e essa variação se deve às mudanças fisiológicas e estímulos ambientais. Em condições de déficit hídrico o ABA aumenta rapidamente e regula o fechamento estomático para reduzir a perda de água (SHARP et al., 2000).

A etapa de limitação da taxa na biossíntese de ABA é catalisada pelas dioxigenases 9-cis-epoxicarotenóide (NCED), uma enzima chave na clivagem oxidativa das xantofilas, 9’-cis-violaxantina e/ou 9'-cis-neoxantina, para produzir xantoxina, o precursor direto do ABA (RODRIGO et al., 2006). Estudos mostraram que o aumento dos níveis de transcrição NCED pode promover a biossíntese de ABA, aumentando o seu acúmulo nas plantas (LIOTENBERG et al., 1999). Evidências mostram que o gene NCED3 desempenha um papel importante na regulação dos níveis endógenos de ABA durante o desenvolvimento da planta e tolerância ao estresse. Sua expressão foi induzida nesse estudo.

Neves (2011) mostrou que a percepção e a indução dos sinais como resposta da planta a deficiência hídrica se dá pelas raízes. Em seu estudo, a partir da avaliação da expressão dos genes NCEDs nas raízes do limoeiro ‘Cravo’ e tangerineira ‘Sunki’, foi constatado que o gene NCED3 foi expresso somente no limoeiro ‘Cravo’, atribuindo ao mecanismo de tolerância á seca e à síntese de ABA nesse cultivar. Plantas transgênicas de Arabidopsis que superexpressaram *At*NCED3 exibiram um aumento na tolerância ao estresse. Em estudo realizado, o gene *Bn*NCED3 foi isolado de *Brassica napus* e revelou

que além da sua expressão nas folhas, seu aumento durante a senescência foliar, atraso na germinação das sementes, sua superexpressão alterou os níveis de expressão dos genes do tempo de floração e do relógio circadiano da planta, promovendo uma floração precoce, com a transição da fase vegetativa para a reprodutiva (XU; CAI, 2016).

O RETINOBLASTOMA-RELATED PROTEIN 1 (RBR1) está envolvido em quase todos os estágios do desenvolvimento e é crucial para as transições de fase de desenvolvimento que ocorrem durante o ciclo de vida da planta (DESVOYES; GUTIERREZ, 2020). Biedermann et al. (2017) mostraram que RBR1 controla aspectos das respostas a danos no DNA, como a repressão da expressão de vários genes DDR e papel direto no reparo do DNA.

Alguns genes foram diferencialmente expressos especificamente nos botões florais de plantas submetidas ao estresse severo como HSFA6b, CP29, FKF1, PRR5, LHY e GI. Em Arabidopsis, HSFA6b é um regulador positivo da sinalização ABA, mediando respostas de salinidade e estresse à seca (HUANG et al., 2016). No entanto, em nossos resultados, sua expressão foi reprimida. Os genes PRR5, FKF1 e GI e LHY estão envolvidos na regulação da expressão de CONSTANS (CO), que integra o ritmo circadiano, mediando sua relação e os genes que controlam a identidade do meristema reprodutivo (KAMIOKA et al., 2016; SAWA et al., 2007). O gene CP29 envolvido na fosforilação das proteínas do fotossistema II (PSII) (LIU et al., 2009) também foi identificado. Genes possivelmente relacionados às vias autônomas e de vernalização (DORNELAS et al., 2007) não foram identificados dentro dos cinco processos biológicos selecionados com regulação altamente significativa.

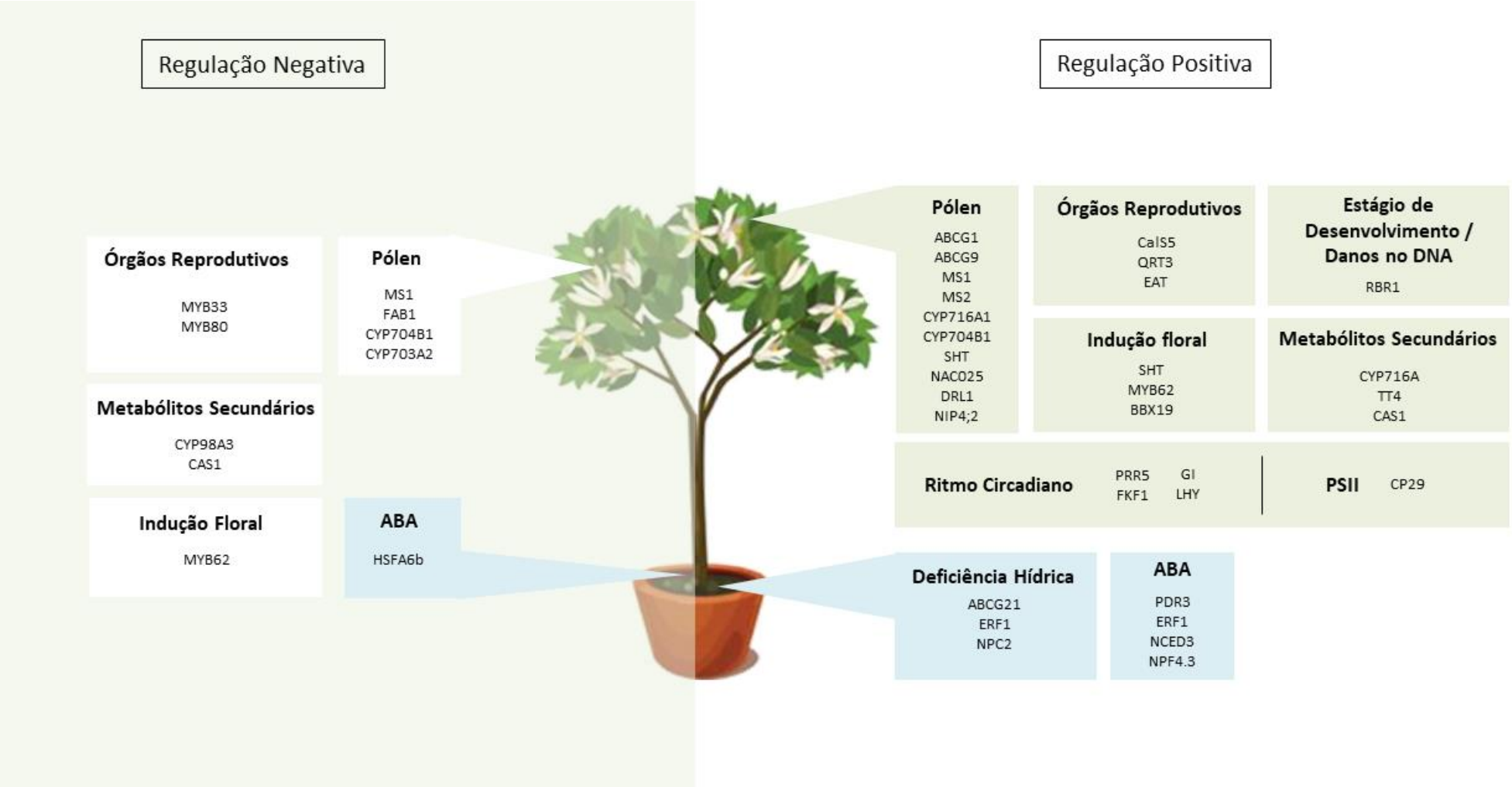


Figura 8. Visão geral da regulação dos principais genes dos botões florais da tangerineira 'Fortune' submetida a diferentes tratamentos hídricos.

7. CONCLUSÃO

O perfil transcriptômico analisado eleva a compreensão da base molecular da fase reprodutiva da tangerineira ‘Fortune’ em condições de déficit hídrico, que com base em nossos resultados, podem assumir diferentes comportamentos a depender da intensidade do estresse, induzindo ou reprimido genes relacionados ao desenvolvimento floral como resposta ao estresse hídrico. Esse trabalho abre caminho para investigações futuras de genes ainda não identificados ou com comportamentos ainda não relatados na floração e na resposta ao estresse hídrico em plantas cítricas. É crucial explorar o papel de diversos genes aqui mostrados, uma vez que podem trazer contribuições para o entendimento do mecanismo regulador subjacente à floração, para o melhoramento genético na fase reprodutiva e na resposta ao estresse em citros, podendo levar futuramente uma variedade de alto rendimento para o campo.

8. REFERÊNCIAS

AARTS, M. G., HODGE, R.; KALANTIDIS, K. et al. The Arabidopsis MALE STERILITY 2 protein shares similarity with reductases in elongation/condensation complexes A. **Plant J.** v.12, n.3, p.615-23, 1997.

ABE, H.; URAO, T.; ITO, T. et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. **Plant Cell**, n.15, p.63–78, 2003.

ABOUZARI, A.; NEZHAD, N. M. The Investigation of Citrus Fruit Quality. Popular Characteristic and Breeding. **Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis**. v.64, p. 725-740, 2016.

AHSAN, M. U.; HAYWARD, A.; IRIHIMOVITCH, V. et al. Juvenility and Vegetative Phase Transition in Tropical/Subtropical Tree Crops. **Frontiers in Plant Science**, v.10, 2019.

ALBRECHT, S.; ANDRADE-NAVARRO, M. A.; FONTAINE, J. Quality control guidelines and machine learning predictions for next generation sequencing data. **bioRxiv** 768713, 2020. doi: https://doi.org/10.1101/768713.

AMBAVARAM, M. M.; BASU, S.; KRISHNAN, A. et al. Coordinated regulation of photosynthesis in rice increases yield and tolerance to environmental stress. **Nat Commun**. n.5, 2014.

ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**. v.31, n.15, p.166-169, 2015.

ALMEIDA, M. B.; PUGLIERO, V. S.; ZANETTI, M. R. et al. Espacialização de áreas aptas para a citricultura no Recôncavo da Bahia. Anais do XIX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. INPE, Santos-SP, Brasil, 2019. Disponível em: https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/197490/1/Espacializacao-de-areas-aptas-....pdf Acessado em 11 Nov 2019.

AMASINO, R. Seasonal and developmental timing of flowering. **Plant J.** n.61, p.1001-1013, 2010.

ARBONA, V.; DE OLLAS, C. J.; ARGAMASILLA, R. Hormone and metabolite traits related to abiotic stress tolerance in citrus. **Acta Hortic**., v.1065, p.1275–1281, 2015.

BABICHUCK, E.; BOUVIER-NAVÉ, P.; COMPAGNON, V. et al. Allelic mutant series reveal distinct functions for Arabidopsis cycloartenol synthase 1 in cell viability and plastid biogenesis. **PNAS**. v.15, n.8, p.3163-3168, 2008.

BASTOS D. C.; FERREIRA, E. A.; PASSOS, O. S. et al. Cultivares copa e porta-enxertos para a citricultura brasileira. **Informe Agropecuário**, v.35, n.281, p. 36-45, 2014.

BASU, S.; RAMEGOWDA, V.; KUMAR, A. & PEREIRA, A. Plant adaptation to drought stress. **F1000 Research**, v.5, 2016.

BAURLE, I.; DEAN, C. The timing of developmental transitions in plants. **Cell.** v.19, n125, p.655-664, 2006.

BENNICI, S.; LAS CASAS, G.; DISTEFANO, G. Rootstock Affects Floral Induction in Citrus Engaging the Expression of the FLOWERING LOCUS T (CiFT). **Agriculture**, v.11, p.140, 2021.

BIEDERMANN, S.; HARASHIMA, H.; CHEN, P. et al. The retinoblastoma homolog RBR1 mediates localization of the repair protein RAD51 to DNA lesions in Arabidopsis. **EMBO J.** v.36, n.9, p.1279-1297, 2017.

BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Epigenetic control of plant stress response. **Environ Mol Mutagen**. v.49, p.61–72, 2008.

BUSCAILL, P.; RIVAS, S. Transcriptional control of plant defense responses. **Curr Opin Plant Biol**. v.20, p.35-46, 2014.

BUTELLI, E.; TITTA, L.; GIORGIO, M.; et al. Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors. **Nat. Biotechnol**. v.26, n.1301, 2008.

CAMARGO, F. P.; FRANCISCO, V. L. F. S.; MARTELLO, V. P.; BRITO, P. F. **Citricultura: alterações nos pomares em 2012**. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Instituto de Economia Agrícola (IEA). 2013.

CARVALHO A. S.; SILVA J. A. A.; SEMPIONATO, O. R. **Produção de borbulhas de citros não certificadas.** Estado de São Paulo. Editora FUNEP. Jaboticabal 26p., 2000.

CARVALHO, S. A.; GIRARDI, E. A.; MOURÃO FILHO, F. A. A. et al. **Advances in citrus propagation in Brazil**. Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal. v.41, n.6, 2019.

CASSIN, J.; BOURDEAUT, J.; FOUGUE, A.; et al. The influence of climate upon the blooming of citrus in tropical areas. In: INTERNATIONAL CITRUS

SYMPOSIUM,1. **Riverside**. Proceedings... Riverside, 1969. v.1, p.315-23, 1969.

CERQUEIRA, E. C.; CASTRO NETO, M. T.; PEIXOTO, C. P. Resposta de porta-enxertos de citros ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v.26, n.3, p.515-519, 2004.

CHOI, H.; OHYAMA, K.; KIM, Y. et al. The Role of Arabidopsis ABCG9 and ABCG31 ATP Binding Cassette Transporters in Pollen Fitness and the Deposition of Steryl Glycosides on the Pollen Coat. **Plant Cell**. 2014.

COELHO, E. F.; COELHO FILHO, M. A.; SIMÕES, W. L.; COELHO, Y. S. Irrigação em citros nas condições do nordeste do Brasil. **Laranja**, v.27, p.297-320, 2006.

CORSON, G. E. JR. Cell division studies of the shoot apex of Datura stramonium during transition to flowering. American **Journal of Botany**, v.56, p.1127–1134, 1969.

COSTA-SILVA, J.; DOMINGUES, D.; LOPES, F. M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **PLoS One**, v.12, 2017.

COSTA, S. N. **Caracterização estrutural e aspectos reprodutivos de tangerineiras 'Fortune' submetidas ao déficit hídrico**. Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Área de Concentração: Genética e Melhoramento Vegetal - Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus/BA. 75p. 2017.

COSTA, D. P.; STUCHI, E. S.; GIRARDI, E. A.; GESTEIRA, A. S. et al. Hybrid Rootstocks for Valencia Sweet Orange in Rainfed Cultivation Under Tropical Savannah Climate. **Journal of Agricultural Science**. v.12, n.11, 2020.

COKUS, S. J.; FENG, S. F.; ZHANG, X.; et al. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. **Nature**. v.452, p.215-219, 2008.

DAO, T. T.; LINTHORST, H. J.; VERPOORTE, R.. Chalcone synthase and its functions in plant resistance. **Phytochemistry Reviews**, 10, 397–412, 2011.

DAVENPORT, T. L. **Citrus Flowering**. Agricultural Experiment Stations Journal Series. Capítulo 8. Ed. Jules Janick. 1990.

DESVOYES, B.; GUTIERREZ, C. Roles of plant retinoblastoma protein: cell cycle and beyond. The EMBO Journal. v.39, n.19, 2020.

DEVAIAH, B. N.; MADHUVANTHI, R.; KARTHIKEYAN, A. S.; RAGHOTHAMA, K. G. Phosphate Starvation Responses and Gibberellic Acid Biosynthesis are Regulated by the MYB62 Transcription Factor in Arabidopsis**. Molecular Plant**. v.2, n.1, p.43-58, 2009.

DIOGO, F. T. V. maser: Mapping Alternative Splicing Events to pRoteins. R package version 1.7.0, 2020. Disponível em: https://github.com/DiogoVeiga/maser.

DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**. v.29, n.1, p.15-21, 2013.

DOBIN, A.; GINGERAS, T. R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. **Curr Protoc Bioinformatics**. v.51, p.1-11, 2015

DOBRITSA, A. A.; SHRESTHA, J.; MORANT, M.; et al. CYP704B1 Is a Long-Chain Fatty Acid ω-Hydroxylase Essential for Sporopollenin Synthesis in Pollen of Arabidopsis, **Plant Physiology**, v.151, n.2, p.574–589, 2009.

DOORENBOS, J.; KASSAM, A. H. Yield response to water. FAD Irrigation and Drainage Paper, n.33, p.81-7, 1979.

DONATO, S. L. R. et al. Respostas de combinações de variedades copa e porta-enxerto de citros à deficiência hídrica. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, n.10, p.1507-1510, 2007.

DONG, X. et al. Callose synthase (CalS5) is required for exine formation during microgametogenesis and for pollen viability in Arabidopsis. **The Plant Journal**, v.42, n.3, p.315-328, 2005.

DORNELAS, M. C.; CAMARGO, R. L. B.; FIGUEIREDO, L. H. M.; TAKITA, M. A. Um arcabouço genético para as vias de florescimento em *Citrus* spp. Genet. Mol. Biol. v.30, n., 2007.

ENDO, T.; SHIMADA, T.; FUJII, H. et al. Ectopic expression. Of na FT homolog from citrus confers na early flowering phenotype on trifoliate Orange (Poncirus trifoliata L. Raf.). **Transgenic Res**. v.14, n.15, p.703-7012, 2005.

ERICKSON, L. E. The general physiology of citrus. In: REUTHER, W.; BATCHELOR, L.D.; WEBBER, H.J. (Eds). **The citrus industry**. Riverside: University of California. v.2. p.86-122, 1968.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2016. Disponível em: http://www.fao.org/3/a-i8092e.pdf. Acessado em 11 Nov 2019.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. Statistical Databases. 2018. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acessado em: 22 de set. de 2020.

FANG, D. Q.; ROOSE, M. L. Identification of closely related citrus cultivars with inter- simple sequence repeat markers. Theoretical and Applied Genetics, Amsterdam, v.95, p 408-417, 1997.

FUJITA, M.; FUJITA, Y.; NOUTOSHI, Y. et al. Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. **Current Opinion in Plant Biology**. v.9, p.436-442, 2006.

FUKUSHIMA, E. O., SEKI, H.; OHYAMA K.; et al. CYP716A Subfamily Members are Multifunctional Oxidases in Triterpenoid Biosynthesis, **Plant and Cell Physiology**. v.52, n.12, p.2050–2061, 2011.

GARCÍA-TEJERO, I.; JIMENEZ-BOCANEGRA, J. A.; MARTÍNEZ, G. et al. Positive impact of regulated deficit irrigation on yield and fruit quality in a commercial citrus orchard [Citrus sinensis (L.) Osbeck, cv. salustiano]. **Agricultural Water Management**, v.97, p.614–622, 2010.

GALBIATI, M.; SIMONI, L.; PAVESI, G.; COMINELLI, E. Gene trap lines identify Arabidopsis genes expressed in stomatal guard cells. **The Plant Journal**. v.53, n.5, p.750-762, 2008.

GARMENDIA, A.; BELTRAN, R.; ZORNOZA, C.; et al.. Forced Flowering in Mandarin Trees under Phytotron Conditions. **Journal of visualized experiments: JoVE**. 2019.

GENTILE, A. et al. (eds.). The Citrus Genome, Compendium of Plant Genomes. ZONG, G.; NICOLOSI, E. Citrus Origin, Diffusion, and Economic Importance. p.17-33, 2020.

DI GIORGIO, J. A. P.; BIENERT, G. P.; AYUB, N. D. et al. Pollen-Specific Aquaporins NIP4;1 and NIP4;2 Are Required for Pollen Development and Pollination in *Arabidopsis thaliana*, **The Plant Cell**, v.28, n.5, p.1053–1077, 2016.

GOCAL, G. F.; SHELDON, C. C.; GUBLER, F.; et al. GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in Arabidopsis. **Plant Physiol**. v.127, n.4, p.1682-93, 2001.

GOLDBERG-MOELLER, R.; SHALOM, L.; SHLIZERMAN, L.; et al. Effects of gibberellin treatment during flowering induction period on global gene

expression and the transcription of flowering-control genes in Citrus buds. **Plant Science**, v.198, p.46–57, 2013.

GONÇALVES, L. P.; CAMARGO, R. L.; TAKITA, M. A. et al. Rootstock-induced molecular responses associated with drought tolerance in sweet orange as revealed by RNA-Seq. **BMC Genomics**, v.20, n.110, 2019.

GRIENENBERGER, E.; BESSEAU, S.; GEOFFROY, P.; et al. A BAHD acyltransferase is expressed in the tapetum of Arabidopsis anthers and is involved in the synthesis of hydroxycinnamoyl spermidines. **Plant J.** v.58, v.2, p.246, 259, 2009.

GROPPO, M.; SALATINO, M. L. F.; PIRANI, J. R. Phylogeny of Rutaceae based on two noncoding regions from cpDNA. **American Journal of Botany**, 2008.

GUO, C.; XU, Y.; SHI, M.; LAI, Y. et al. Repression of miR156 by miR159 regulates the timing of the juvenile-to-adult transition in Arabidopsis. **Plant Cell** n.29, p.1293–1304, 2017.

GUZEL DEGER, A.; SCHERZER, S.; NUHKAT, M. et al. Guard cell SLAC1-type anion channels mediate flagellin-induced stomatal closure. **New Phytol**. v.208, n.1, p.162–173, 2015.

HANANO, S.; GOTO, K. *Arabidopsis TERMINAL FLOWER1* is involved in the regulation of flowering time and inflorescence development through transcriptional repression. **Plant Cell**, v.23, p.3172–3184, 2011.

HASSE, G. **A laranja no Brasil: 1500-1987**. São Paulo (SP) Duprat e Iobe Propaganda, 1987.

HIGGINSON, T.; LI, S. F. AtMYB103 regulates tapetum and trichome development in Arabidopsis thaliana. Plant J. v.35, p.177-192. 2003.

HU, R.; QI, G.; KONG, Y.; et al. Comprehensive analysis of NAC domain transcription factor gene family in Populus trichocarpa BMC Plant Biol. v.10 p.145, 2010.

HUANG, N. C., JANE, W. N., CHEN, J.; YU, T. S. *Arabidopsis thaliana* CENTRORADIALIS homologue (ATC) acts systemically to inhibit floral initiation in Arabidopsis. **Plant J.** v.72, p.175–184, 2012.

HUANG, Y.; NIU, C.; YANG, C.; JINN, T. The Heat Stress Factor HSFA6b Connects ABA Signaling and ABA-Mediated Heat Responses. V.172, n.2, p.1182-1199, 2016.

HUBER, A. E.; BAUERLE, T. L. Long-distance plant signaling pathways in response to multiple stressors: the gap in knowledge. Journal of Experimental Botany. v.67, n.7, p.2063-2079, 2016.

HUERTA-CEPAS, J.; FORSLUND, K.; COELHO, L. P. et al. Fast Genome-Wide Functional Annotation through Orthology Assignment by eggNOG-Mapper. **Mol Biol Evol**. v.34, n.8, p.2115-2122, 2017.

HUIJSER, P.; SCHMID, M. The control of developmental phase transitions in plants. **Development**. v.138, n.19, p.4117-29, 2011.

IMADI, S. R.; GUL, A.; DIKILITAS, M.; KARAKAS, S. Water stress: Types, causes, and impact on plant growth and development. Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach, v.2, 1ª. ed. 2016.

IBGE. SIDRA (Sistema IBGE de Recuperação Automática) Banco de Dados Agregados 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/pam/tabelas>. Acesso em: 11 Nov 2019.

IGLESIAS, D. J.; CERCÓS, M.; COLMENERO-FLORES, J. M. et al. Physiology of citrus fruiting. Braz. J. **Plant Physiol**. n.19, v.4, p.333-362, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal. 2017. Disponível em: >https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2017_v44_br_informativo.pdf< Acesso em: 24 set. de 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal. 2018. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2018_v45_br_informativo.pdf>. Acesso em: 24 set. de 2020.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Produção Agrícola Municipal. 2019. < https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1618#resultado>

ITO, T.; NAGATA, N.; YOSHIBA, Y. et al. Arabidopsis MALE STERILITY1 encodes a PHD-type transcription factor and regulates pollen and tapetum development. **Plant Cell**. n.19, p.3549–3562, 2007.

JENSEN, M. K.; KJAERSGAARD, T.; PETERSEN, K. et al. NAC genes: time-specific regulators of hormonal signaling in Arabidopsis. v.5, n.7, p.07-10, 2010.

JIA, X. L.; CHEN, Y. K.; XU, X. Z. et al. miR156 switches on vegetative phase change under the regulation of redox signals in apple seedlings. **Scientifics Report**, n.14223, 2017.

KAMIOKA, M.; TAKAO, S.; SUZUKI, T. et al. Direct repression of evening genes by CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 in the Arabidopsis circadian clock. **Plant Cell**. v.28, p.696–711, 2016.

KAUR-SAWHNEY, R.; TIBURCIO, A. F.; GALSTON, A. W. Spermidine and flower-bud differentiation in thin-layer explants of tobacco. **Planta**, v.173, n.2, p.282–284, 1988.

KELLING, C. R. S. Efeito da disponibilidade de água no solo sobre os componentes do balanço hídrico e o rendimento do feijoeiro. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria/RS, 91p. 1995.

KHALID, M. F.; HUSSAIN, S.; ANJUM, M. A. et al. Better salinity tolerance in tetraploid vs diploid volkamer lemon seedlings is associated with robust antioxidant and osmotic adjustment mechanisms, **Journal of Plant Physiology**, p.1-36, 2019.

KLEPIKOVA, A. V.; KASIANOV, A. S.; GERASIMOV, E. S. et al. A high resolution map of the *Arabidopsis thaliana* developmental transcriptome based on RNA-seq profiling. **The Plant Journal**. v. 88, p.1058-1070, 2016.

KRAJEWSKI, A. J & RABE, E. Citrus flowering: a critical evaluation. **Journal of Horticultural Science**, v.70, p.357-374, 1995.

KUMORI, T; SUGIMOTO, R.; OHIRAKI et al. Functional relationship of AtABCG21 and AtABCG22 in stomatal regulation. **Sci. Rep**. V.7, 2017.

LAWLOR, D. W. & CORNIC, G. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. **Plant Cell** Environ. v.25, n.2, p.275-94, 2002.

LEI, Y.; YIN, C.; LI, C. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of Populus przewalskii. **Physiol. Plant**. v.127, p.182–191, 2006.

LÉRAN, S.; NOGUERO, M.; CORRATGÉ-FAILLIE, C.; BOURSIAC, Y. Functional Characterization of the Arabidopsis Abscisic Acid Transporters NPF4.5 and NPF4.6 in Xenopus Oocytes. **Front. Plant. Sci.** 2020.

LI, Z.; ZHANG, J.; MEI, L.; DENG, X. et al. *PtSVP*, na *SVP* homolog from trifoliate Orange (*Poncirus trifoliata* L. Raf.), shows seasonal periodicity of meristema determination and affects flower development in transgenic *Arabidopsis* and tobaco plants. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v.74, p.129-142, 2010.

LI, G.; QUAN, R.; YAN, C. et al. Effects of Grape NAC Transcription Factor DRL1 on Floral Organogenesis in Tobacco. **Journal of the American Society for Horticultural Science**. v.146, n.1, p.33-39, 2020.

LIU, W.; CHEN, Y.; TIAN, W. et al. Dephosphorylation of photosystem II proteins and phosphorylation of CP29 in barley photosynthetic membranes as a response to water stress**. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics. v.1787, n.10, p.1238-1245, 2009.**

LIU, Y.; HEYING, E.; TANUMIHARDJO, S. A. History, global distribution, and nutritional importance of citrus fruits. **Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.** v.11, p.530–545, 2012.

LIU, XU; HOU, XINGLIANG. Antagonistic Regulation of ABA and GA in Metabolism and Signaling Pathways. **Front. Plant. Sci.** v.9, p.251, 2018.

LIOTENBERG, S.; NORTH, H.; MARION-POLL, A. Molecular biology and regulation of abscisic acid biosynthesis in plants. **Plant Physiology and Biochemistry**. v.37, p.1-11, 1999.

LOURKISTI, R.; FROELICHER, Y.; HERBETTE, S. et al. Triploidy in Citrus Genotypes Improves Leaf Gas Exchange and Antioxidant Recovery From Water Deficit. **Frontiers in Plant Science**, v.11, 2021.

LUCAS-REINA, E.; ROMERO-CAMPERO, F. J.; ROMERO, J. M.; VALVERDE F. An evolutionarily conserved DOF-CONSTANS module controls plant photoperiodic signaling. **Plant Physiol**. v.68, p.561–574, 2015.

MAERE, S.; HEYMANS, K.; KUIPER, M. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in biological networks. **Bioinformatics**. v.21, p.3448-3449, 2005.

MAO, Y.; LIU, W.; CHEN, X.; et al. Flower Development and Sex Determination between Male and Female Flowers in Vernicia fordii. **Front Plant Sci.** v.8, 2017.

MATSOUKAS, I. G. Attainment of reproductive competence, phase transition, and quantification of juvenility in mutant genetic screens. **Front. Plant. Sci**. 2014.

MATTOS JUNIOR, D.; NEGRI, J. D.; FIGUEIREDO, J. O.; POMPEU JUNIOR J. CITROS: principais informações e recomendações de cultivo. Versão eletrônica do Boletim Técnico 200 (IAC), 2005.

MERINO, G. A.; FRESNO, C.; NETTO, F. et al. The impact of quality control in RNA-seq experiments. **Journal of Physics**. v.705, n.1, p.12003, 2016.

MILLAR, A. A.; GUBLER, F. The Arabidopsis GAMYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. **Plant Cell**. v.15, n.3, p.705-721, 2005.

MOHAWESH, O. Utilizing deficit irrigation to enhance growth performance and water-use efficiency of eggplant in arid environments. **J. Agric. Sci. Technol**. v.18, p.265–276, 2018.

MONSELISE, S. P. Citrus and related species. In: Halevy AH (ed), CRC Handbook of Flowering, v. 2, p.275-294, 1985.

NGO, A. H.; LIN, Y.; LIU, Y.; et al. A pair of nonspecific phospholipases C, NPC2 and NPC6, are involved in gametophyte development and glycerolipid metabolism in Arabidopsis. **New Phytologist**. v.219, n.1, p.163-175, 2018.

NAKABAYASHI, R.; YONEKURA-SAKAKIBARA, K.; URANO, K.; et al. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by over accumulation of antioxidant flavonoids. **Plant J.** v.77, p.367–379, 2014.

NEVES, M. F.; TROMBIN, V. G.; MILAN, P.; LOPES, F. F.; CRESSONI,F.; KALAKI, R. **O retrato da citricultura brasileira**, São Paulo:CitrusBR, 138p., 2010.

NEVES, D. M. Mecanismos fisiológicos e expressão gênica relacionado à tolerância à seca em portaenxertos de citros. Dissertação. Universidade Estadual de Santa Cruz. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Ilhéus/BA. 77p. 2011.

NIR, I.; GOREN, R. & LESHEM, B. Effects of water stress, gibberellic acid and 2-chloroethyltrimethyl-ammonium chloride (Ccq on flower differentiation in 'Eureka' lemon trees. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, 97, 774-8, 1972.

NISHIKAWA, F; ENDO, T.; SHIMADA, T. et al. Increased *CiFT* abundance in the stem correlates with floral induction by low temperature in *Satsuma mandarin* (*Citrus unshiu* Marc.). **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v.58, p.3915-3927, 2007.

NIU, N.; LIANG, W.; YANG, X. et al. EAT1 promotes tapetal cell death by regulating aspartic proteases during male reproductive development in rice. **Nat Commun**, v.4, n.1445, 2013.

NURUZZAMAN, M.; MANIMEKALAI, R.; SHARONI, A. M., et al. Genome-wide analysis of NAC transcription factor family in rice. **Gene**. v.465, p.30-44, 2010.

OKAZAKI, Y.; FURUNO, M.; KASUKAWA, T. et al. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. **Nature** 420, 563–573, 2002.

OKUBO, K.; YOSHIKI, Y. The role of triterpenoid on reactive oxygen scavenging system: approach from the new chemiluminescence system (XYZ system) **BioFactors.** v.13, p.219–223, 2000.

ONO, S.; LIU, H.; TSUDA, K. et al. EAT1 transcription factor, a non-cell-autonomous regulator of pollen production, activates meiotic small RNA biogenesis in rice anther tapetum. **PLOS Genetics**. v.15, n.3, 2019.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, n.220, 2010.

PASSOS, O. S. **A citricultura no mundo e no Brasil.** Cruz das Almas, BA, EMBRAPA – CNPMF, 43p., 1990.

PATIL, B. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; MURTHY, K. N. C. Beyond vitamin C: the diverse, complex health-promoting properties of citrus fruits. **Citrus Research & Technology**, v.38, n.1, 2017.

PEI, H.; MA, N.; TIAN, J. et al. An NAC Transcription Factor Controls Ethylene-Regulated Cell Expansion in Flower Petals. **Plant Physiology**, v.163, n.2, p.775-791, 2013.

PEIXOTO, C. P.; CERQUEIRA, E. C.; SOARES FILHO, W. S. et al. Growth analysis of different citrus genotypes cultivated under water deficit. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.439-443, 2006.

PELAZ, S; GUSTAFSON-BROWN, C.; KOHALMI, S. E. *APETALA1* and *SEPALLATA3* interact to promote flower development. **Plant J.** v.26, p.385–394, 2001.

PEREIRA, A. B.; NOVA, N. A. V.; ALFARO, A. T. Necessidades hídricas de citros e macieiras a partir da área foliar e da energia solar. **Rev. Bras. Frutic.** v.31, n.3, p.671-679, 2009.

PETTIGREW, W. T. Moisture deficit effects on cotton lint yield, yield components, and boll distribution. **Agronomy Journal**. v.96, p.377-383, 2004.

PILLITTERI, L. J.; LOVATT, C. J.; WALLING, L. L.. Isolation and characterization of a *TERMINAL FLOWER* homolog and its correlation with juvenility in citrus. **Plant Physiology**, Rockville, v.135, p.1-12, 2004.

PILLITTERI, L. J.; LOVATT, C. J.; WALLING, L. L.. Isolation and characterization of *LEAFY* and *APETALA1* homologues from *Citrus sinensis* L.

Osbeck ‘Washington’. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, Geneva, v.129, n.6, p.846-856, 2004.

PINGPING, W.; CHUBIN, W.; ZHOU, B. Drought Stress Induces Flowering and Enhances Carbohydrate Accumulation in Averrhoa Carambola. **Horticultural Plant Journal**. v.3, n.2. 2017.

PIRANI, J. R.; GROPPO, M. *Rutaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB212>. Acesso em: 29 de set. de 2020.

POETHIG, R. S. Phase Change and the Regulation of Shoot Morphogenesis in Plants. **Science**, 250(4983), p.923–930, 1990.

QIAN, X.; BA, Y.; ZHUANG, Q. RNA-Seq Technology and Its Application in Fish Transcriptomics. **A Journal of Integrative Biology**, v.18, n.2, 2014.

QIANG, X.; CHEN, L.; RUAN, Y. et al. The draft genome of sweet Orange (Citrus sinensis). Nature Genetics. n.45, p.59-66, 2013.

RAMOS, Y. C.; PASSOS, O. S.; BRANDÃO, L. S. A citricultura no Estado da Bahia: produção e comercialização no período de 1999 a 2011. Dados Eletrônicos - Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 25p, 2014.

RAO, M. J.; XU, Y.; TANG, X. et al. CsCYT75B1, a Citrus CYTOCHROME P450 Gene, Is Involved in Accumulation of Antioxidant Flavonoids and Induces Drought Tolerance in Transgenic Arabidopsis. **Journals Antioxidants**. v.9, n.2, 2020.

REIMEGÅRD, J.; KUNDU, S.; PENDLE, A.; IRISH, V. F. et al. Genome-wide identification of physically clustered genes suggests chromatin-level co-regulation in male reproductive development in Arabidopsis thaliana**. Nucleic Acids Research**, n.45, p.3253–3265, 2017.

RHEE, S. Y.; OSBORNE, E.; POINDEXTER, P. D.; SOMERVILLE, C. R. Microspore Separation in the quartet 3 Mutants of Arabidopsis Is Impaired by a Defect in a Developmentally Regulated Polygalacturonase Required for Pollen Mother Cell Wall Degradation. **Plant Physiol**. v.133, n.3, p.1170-1180, 2003.

RODRIGO, M-J.; ALQUEZAR, B.; ZACARIAS, L. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from Orange (Citrus sinensis L. Osbeck). **Journal of Experimental Botany**. v.57, n.3, p. 633-643, 2006.

ROSALES, M. A.; MAUREL, C.; NACRY, P. Abscisic Acid Coordinates Dose-Dependent Developmental and Hydraulic Responses of Roots to Water Deficit. **Plant Physiol**, v.180, p.2198-2211, 2019.

RUTTER, L.; LAUTER, A. N. M.; GRAHAM, M. A.; COOK, D. Visualization methods for differential expression analysis. **BMC Bioinformatics**, n.458, 2019.

SPIEGEL-ROY, P. & GOLDSCHMIDT, E. E. (n.d.). Reproductive physiology: flowering and fruiting. Biology of Citrus. **Agricultural Research Organization**, p.70–125, 1996.

SAMPAIO, A. H. R.; SILVA, R. O.; BRITO, R. B. F.; SOARES FILHO, W. S. Sweet orange acclimatisation to water stress: a rootstock dependency. **Scientia** Horticulturae, v. 276, 2021.

SANTANA-VIEIRA, D. D. S.; FRESCHI, L.; ALMEIDA, L. A. H.; et al. Survival strategies of citrus rootstocks subjected to drought. **Scientific Reports**. v.6, p.1-12, 2016.

SANTOS, R. F.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 2, n.3, 287- 294, 1998.

SANTOS, D. N.; SILVA, V. P. R.; SOUSA, F. A. R. et al. Estudo de alguns cenários climáticos para o Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.14, n.5, p.492-500, 2010.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. M.; SOUSA, A. R. O. et al. Transcriptome profile of drought responsive candidate genes in varieties of citrus rootstocks with different tolerance strategies. **Scientia Horticulturae**. v.277, 2021.

SANTOS, I. C.; ALMEIDA, A. F.; PIROVANI, C. P. et al. Physiological, biochemical and molecular responses to drought conditions in field-grown grafted and ungrafted citrus plants. **Environmental and Experimental Botany**. v.162, p.406-420, 2019.

SARADADEVI, R.; PALTA, J. A.; SIDDIQUE, K. H. M. ABA-Mediated Stomatal Response in Regulating Water Use during the Development of Terminal Drought in Wheat. **Front. Plant Sci**. 2017.

SAUNT, J. **Citrus varieties of the world**. Norwich: Sinclair International, 128 p., 1990.

SAUNT, J. **Variedades de cítricos del mundo: guia ilustrado**. Valência: Sinclair Internacional, 128p., 1992.

SAVÉ, R.; BIEL, C.; DOMINGO, R. et al. Some physiological and morphological characteristics of citrus plants for drought resistance. **Plant Science**. v.110, p.167-172, 1995.

SAWA, M.; NUSINOW, D.; KAY, S. A.; IMAIZUMI, T. FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis. v.318, p.261-265, 2007.

SELMAR, D.; KLEINWÄCHTER, M. Influencing the product quality by deliberately applying drought stress during the cultivation of medicinal plants. **Ind. Crops Prod.** v.42, p.558–566, 2013.

SCHAFER, G.; BASTIANEL, M.; DORNELLES, A.L.C. Porta-enxertos utilizados na citricultura. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 4, p. 723-733, 2001.

SCHMID, M.; DAVISON, T.; HENZ, S. et al. Um mapa de expressão gênica do desenvolvimento de *Arabidopsis thaliana*. **Nat Genet**, v.37, p.501–506, 2005.

SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, Washington, v.270, p.467-470, 1995.

SHANNON, S.; MEEKS-WAGNER, R. Genetic Interactions That Regulate Inflorescence Development in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.5, p.639-655, 1993.

SHARP, R. E.; LENOBLE, M. E.; ELSE, M. A.; et al. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. Exp Bot. v.51, n.350, p.1575-84, 2000.

SHARP, R. E.; LENOBLE, M. E. ABA, ethylene and the control of shoot and root growth under water stress. **Journal of Experimental Botany**. v.53, n.366, p.33-37, 2002.

SHARP, R. E.; POROYKO, V.; HEJLEK, L. G. et al. Root growth maintenance during water deficits: physiology to functional genomics. **J Exp Bot.** v.55, p.2343–2351, 2004.

SIEBER, P.; WELLMER, F.; GHEYSELINCK, J. et al. Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. Development. v.134, n.6, p.1051-60, 2007.

SILVA, M. C., SOUSA, A.R.O., CRUZ, E.S. et al. Phenotyping of new hybrid citrus rootstocks under water deficit reveals conserved and novel physiological attributes of drought tolerance. **Acta Physiol Plant**, v.41, n.105, 2019.

SONG, J.; ZHOU, Y.; ZHANG, J. et al. Structural, expression and evolutionary analysis of the non-specific phospholipase C gene family in Gossypium hirsutum. **BMC Genomics**, v.18, n.979, 2017.

SOUTHWICK, S. M.; DAVENPORT, T. L. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in Citrus. Plant. Physiol. v.81, p.26–29, 1986.

SOUZA, D. T.; NEVES, D. M.; COELHO FILHO, M. A. et al. **Avaliação da tolerância à seca em citros: análise de expressão gênica induzida por ácido abscísico.** In: JORNADA CIENTÍFICA EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA, 4., 2010, Cruz das Almas. [Anais...] Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2010. (Embrapa Mandioca e Fruticultura. Documentos, 190). 1 CD-ROM.
SOUZA, L. A.; MOURÃO, K. S. M.; MOSCHETA, I. S.; ROSA, S. M. Morfologia e anatomia da flor e antese de Pilocarpus pennatifolius Lem. (Rutaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v.26, p.175-184. 2003.

SOUZA, A. A.; TAKITA, M. A.; COLETTA-FILHO, H. D. et al. Analysis of expressed sequence tags from Citrus sinensis L. Osbeck infected with Xylella fastidiosa. **Genet. Mol. Biol.** v.30, n.3, 2007.

SOUTHWICK, S. M.; DAVENPORT, T. L. Characterization of water stress and low temperature effects on flower induction in Citrus. **Plant. Physiol.** v.81, p.26–29, 1986.

SOTO, G.; ALLEVA, K.; MAZZELA, M. A. et al. AtTIP1;3 and AtTIP5;1, the only highly expressed Arabidopsis pollen-specific aquaporins, transport water and urea. **FEBS Lett**. v.582, p.4077-4082, 2008.

SOTELO-SILVEIRA, M.; CUCINOTTA, M.; CHAUVIN, A. et al. Cytochrome P450 CYP78A9 Is Involved in Arabidopsis Reproductive Development. **Plant Phisiology**, 2013.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen: Biology, Biochemistry. **Springer**. p.13–28, 1974.

SUDAN, J.; RAINA, M.; & SINGH, R. Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability. **3 Biotech**, v.8, n.3, 2018.

STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. v.20, p.631-565, 2019.

SWINGLE, W. T.; REECE, P. C. **The botany of Citrus and its wild relatives**. In: W. Reuther, H. J. Webber, and L. D. Batchelor [eds.], The Citrus Industry, University of California Press, v.1, p.190–430, 1967.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia Vegetal**. 6. ed. Artmed: Porto Alegre, 2017.

TAMIRU, M.; UNDAN, J.R.; TAKAGI, H. et al. A cytochrome P450, OsDSS1, is involved in growth and drought stress responses in rice (Oryza sativa L.). **Plant Mol. Biol.** v.88, p.85–99, 2015.

TAN, F. C.; SWAINS, S. M. Functional characterization of *AP3, SOC1* and *WUS* homologues from citrus (*Citrus sinensis*). **Physiologia Plantarum**, Kobenhavn, v.131, p.481-495, 2007.

TAKENO, K. Stress-induced flowering: the third category of flowering response. **Journal of Experimental Botany**. v.67, p.4925-4934, 2016.

TORONEN, P.; MEDLAR, A.; HOLM, L. PANNZER2: a rapid functional annotation web server. **Nucleic Acids Res**. v.2, p.W84-W88, 2018.

TRAPNELL, C.; WILLIAMS, B. A.; PERTEA, G. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nat Biotechnol**. v.28, p.511-515, 2010.

VAUX , H. J.; PRUITT, W. O. Crop-water production functions. **Advances in Irrigation**, v.2, p.61-99, 1983.

VOIG, V. **Caracterização fenotípica e avaliação da expressão de genes envolvidos na indução e no florescimento da laranjeira 'x11'**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente - Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. Piracicaba/SP. 109p. 2013.

XU, Z. S.; CHEN, M.; LI, L. C.; MA, Y. Z. Functions and application of the AP2/ERF transcription factor family in crop improvement. **J Integr Plant Biol.** v.53, p.570–85, 2011.

XU, P.; CAI, W. Functional characterization of the BnNCED3 gene in Brassica napus. Plant Sci. v.256, p.16-24, 2017.

XUEMEI, J.; SHIRAN, B.; JIANLIN, W.; WAN, J. et al. Importance of pre-anthesis anther sink strength for maintenance of grain number during reproductive stage water stress in wheat. **Plant, Cell & Environment**, v.33, n.6, 2010.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Ver Genet**. v.10, n.1, p.57-63, 2009.

WANG, J. W.; CZECH, B.; WEIGEL, D. miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in Arabidopsis thaliana. **Cell**, n.138, p.738–749, 2009.

WANG, L.; XI, Y.; YU, J. A statistical method for the detection of alternative splicing using RNA-seq. **PLoS One**. v.5, 2010.

WANG, J.; PARK, Y.; WANG, L. et al. MiRNA control of vegetative phase change in trees. **PLoS Genet**. n.7, 2011.

WANG, C.; GUTHRIE, C.; SARMAST, M. K.; DEHESH, K. BBX19 Interacts with CONSTANS to Repress FLOWERING LOCUS T Transcription, Defining a Flowering Time Checkpoint in Arabidopsis. v.26, n.9, p.3589-3602, 2014.

WANG, H.; WANG, H. The miR156/SPL Module, a Regulatory Hub and Versatile Toolbox, Gears up Crops for Enhanced Agronomic Traits. **Mol. Plant**, v.8, p.677–688, 2015.

WANG, Y.; ZHOU L, Y. U. X.; STOVER, E.; et al. Transcriptome Profiling of Huanglongbing (HLB) Tolerant and Susceptible Citrus Plants Reveals the Role of Basal Resistance in HLB Tolerance. **Front Plant Sci**. v.7, 2016.

WAKCHAURE, G.; MINHAS, P.; MEENA, K. K. Growth, bulb yield, water productivity and quality of onion (Allium cepa L.) as affected by deficit irrigation regimes and exogenous application of plant bio–regulators. **Agric. Water Manag**. v.199, p.1–10, 2018.

WHITLEY, P.; HINZ, S.; DOUGHTY, J. Arabidopsis FAB1/PIKfyve Proteins Are Essential for Development of Viable Pollen. **Plant Physiology**. 2009.

WICKHAM, H.; CHANG, W.; HENRY, L. et al. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. 2020.

WOLFF, A.; BAYERLOVÁ, M.; GAEDCKE, J. et al. A comparative study of RNA-Seq and microarray data analysis on the two examples of rectal-cancer patients and Burkitt Lymphoma cells. **PLos One**. 2018.

WU, G. A.; TEROL, J.; IBANEZ, V. et al. Genomics of the origin and evolution of Citrus. **Nature**. v.554, p.311-317, 2018.

WUDICK, M. M.; LUU, D. T.; TOURNAURE-ROUX, C. et al. Vegetative and sperm cell-specific aquaporins of Arabidopsis highlight the vacuolar equipment of pollen and contribute to plant reproduction. **Plant Physiol**. v.164, p.1697-1706, 2014.

YANG, C.; VIZXAY-BARRENA, G,; CONNER, K. MALE STERILITY1 Is Required for Tapetal Development and Pollen Wall Biosynthesis. **Plant Cell**. v.19, n.11, p.3530-3548, 2007.

YADAV, V.; MOLINA, I.; RANATHUNGE, K. ABCG Transporters Are Required for Suberin and Pollen Wall Extracellular Barriers in Arabidopsis. **Plant Cell**, 2014.

YAN, Q.; CUI, X.; LIN, S. et al. GmCYP82A3, a soybean cytochrome P450 family gene involved in the jasmonic acid and ethylene signaling pathway, enhances plant resistance to biotic and abiotic stresses. PLoS ONE, v.11, 2016.

YU, T.; MU, Z.; FANG, Z. et al. TransBorrow: genome-guided transcriptome assembly by borrowing assemblies from different assemblers. **Genome Res.** 2019.

ZAHER-ARA, T.; BOROOMAND, N. Physiological and morphological response to drought stress in seedlings of ten citrus. **Trees**. v.30, p.985-993, 2016.

ZHICHENG, D.; YAN, C. Transcriptomics: Advances and approaches. v.56, n.10, p.960-967, 2013.

ZHANG, J.; LI, Z.; MEI, L. et al. PtFLC homolog from trifoliate Orange (Poncirus trifoliata) is regulated by alternative splicing and experiences seasonal fluctuation in expression. Level. **Plant**, v.229, p.847-859, 2009.

ZHANG, J.; LI, Z.; YAO, J.; HU, C. Identification of flowering-related genes between early flowering trifoliate Orange mutante and wild-type trifoliate Orange (Poncirus trifoliata L. Raf.) by suppression subtraction hybridization (SSH) and macroarray. **Gene**, v.430, p.95-104, 2009.

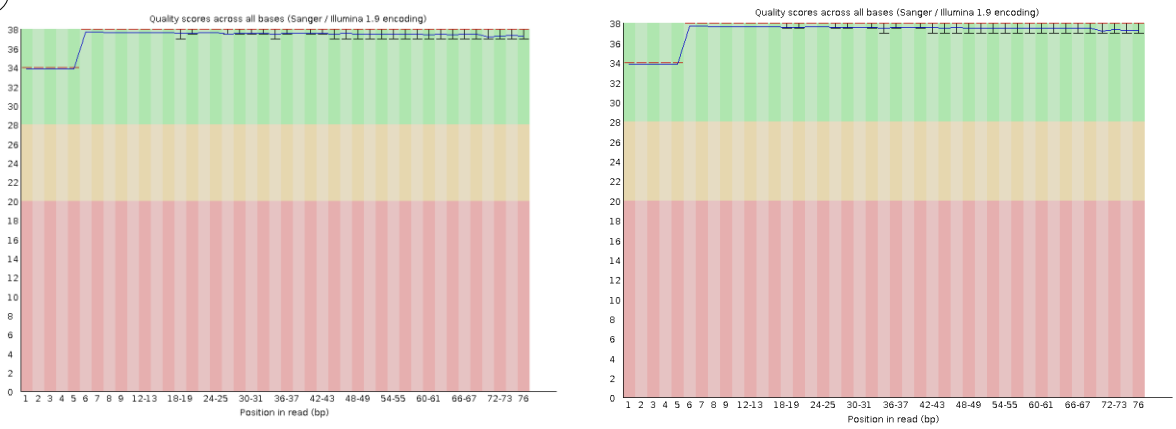
ZHANG, Z.; LI, F.; LI, D. et al. Expression of ethylene response factor JERF1 in rice improves tolerance to drought. **Plant**, v.232, p.765–774, 2010.

ZHANG, Z. H.; JHAVERI, D. J.; MARSHALL, V. M. et al. A Comparative Study of Techniques for Differential Expression Analysis on RNA-Seq Data. **PLOS One**, n.9, 2014.

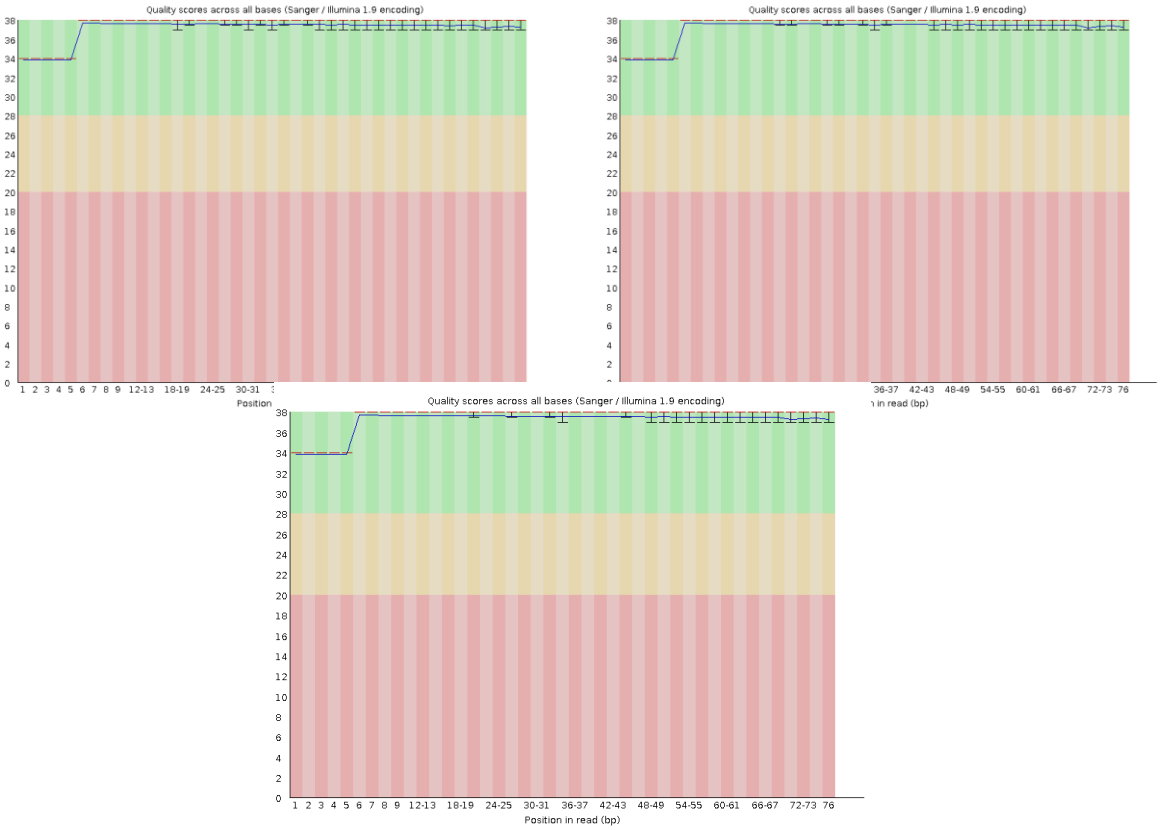
ZHU, J. K. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual Review of Plant Biology** v.53, p.247-273, 2002.

APÊNDICES

A



B



Apêndice A – Representação da qualidade gerados pelo FastQC das bibliotecas da amostra (A) DS20 e DL20; (B) DS40 e DL40; (C) DS100.

Apêndice B – Lista dos domínios ‘função molecular’ e ‘componente celular’ de cada tratamento.

TRATAMENTO	FUNÇÃO MOLECULAR	COMPONENTE CELULAR
GRUPO I		
DS40 x DS100	Atividade do transportador transmembrana de hexose Atividade do transportador transmembrana ativo Atividade de hidrolase, hidrolisando compostos de O-glicosil Atividade transportadora transmembrana ativa secundária Atividade do transportador Atividade do transportador transmembrana de glicose Atividade do transportador transmembrana de monossacarídeo Atividade da beta-amirina sintase Atividade de hidrolase, atuando nas ligações de glicosila Atividade da lanosterol sintase Atividade oxidosqualeno ciclase Atividade de asparagina sintase (hidrólise de glutamina) Atividade do transportador transmembrana Atividade oxidorredutase, atuando em doadores pareados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular	Capa de pólen Região extracelular Parte da matriz extracelular
	Atividade do transportador Atividade do transportador transmembrana Atividade transportadora	Região extracelular Vacúolo Estrutura de

DS20 x DS100	transmembrana de açúcar Atividade de hidrolase, hidrolisando compostos de O-glicosil Ligação de proteína não dobrada Atividade ativadora de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase Auto-associação de proteínas	encapsulamento externo Parede celular
GRUPO II		
DS20 x DS40	Atividade transportadora transmembrana de açúcar Ligação de lipídios Ligação de íon de ferro Atividade 2-alcenal redutase Atividade ativadora de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase / oxigenase Atividade monooxigenase Atividade oxidorredutase Atividade do transportador transmembrana de carboidratos Ligação de proteína não dobrada Atividade oxidorredutase, agindo no grupo de doadores ch-ch, nad ou nadp como aceitador Atividade do transportador transmembrana de glicose Ligação heme Ligação de ácido graxo Atividade oxidorredutase, atuando em doadores pareados, com incorporação ou redução de oxigênio molecular	Região extracelular Capa de pólen Estrutura de encapsulamento externa Parede celular Lúmen vacuolar Vacúolo Lúmen lisossomal Parte da matriz extracelular Parte da região extracelular Apoplasto

	Atividade oxidorredutase, atuando no grupo de doadores ch-ch	
DL20 x DL40	Ligação de proteína não dobrada	-