



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DANUBIA RITA DE SÁ LEAL**

**ESTUDO DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, GENÉTICAS E BIOQUÍMICAS DE  
ESPÉCIES DE *Arachis* AO DÉFICIT HÍDRICO**

**Recife - PE**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDO DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, GENÉTICAS E BIOQUÍMICAS DE  
ESPÉCIES DE *Arachis* AO DÉFICIT HÍDRICO**

**DANUBIA RITA DE SÁ LEAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Área de Concentração:** Biotecnologia

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup>. Carolina V. Morgante

**Co-orientadoras:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana M<sup>a</sup> B. Iseppon

Dr<sup>a</sup>. Valesca Pandolfi

**Recife - PE**

**2017**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Leal, Danubia Rita de Sá**

**Estudo das respostas fisiológicas, genéticas e bioquímicas de espécies de *Arachis* ao déficit hídrico / Danubia Rita de Sá Leal- Recife: O Autor, 2017.**

**117 folhas: il., fig., tab.**

**Orientadora: Carolina V. Morgante**

**Coorientadoras: Ana Maria Benko Iseppon e Valeska Pandolfi**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Ciências Biológicas, 2017.**

**Inclui referências e anexos**

- 1. Amendoim 2. Plantas efeitos da seca 3. Melhoramento genético  
I. Morgante, Carolina V. (orientadora) II. Iseppon, Ana Maria Benko  
(coorientadora) III. Pandolfi, Valeska (coorientadora) IV. Título**

**583.74**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CB-2017-228**

## **DANUBIA RITA DE SÁ LEAL**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

**Área de Concentração:** Biotecnologia

**Data da aprovação:** 20 de fevereiro de 2017.

### **COMISSÃO EXAMINADORA**

#### **MEMBROS TITULARES**

---

Dra. Carolina Vianna Morgante  
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa)

---

Dr. Tercílio Calsa Junior  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

---

Dr. Mauro Guida dos Santos  
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

#### **SUPLENTE:**

Dra. Valesca Pandolfi (Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

Dr. João Pacífico Bezerra Neto (Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

*“A fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e  
a prova das coisas que não se veem.”*

*Hebreus 11:1*

*Aos meus pais, Manoel Fernando (in memoriam)  
e Rita Eloina, que me ensinaram as lições da  
humildade e da honestidade, e a acreditar na  
força transformadora da Educação. Ao meu  
esposo Edson e ao meu filho João Henrique que  
me motivaram a sorrir, mesmo nos momentos  
difíceis...*

**Dedico**

## AGRADECIMENTOS

### “Até aqui nos ajudou o Senhor”. I Samuel 7:12

Agradeço a Deus pela companhia diária, pois foi por Sua infinita bondade e misericórdia que cheguei até aqui.

Agradeço à minha família, especialmente à minha mãe Rita, minha irmã Deyna e meu esposo Edson, pelo apoio constante e por toda compreensão e preocupação. Ao meu pequeno João Henrique, que mesmo sem compreender enche a minha vida de alegria e me ensina a leveza de ser como criança. Vocês são um presente de Deus para mim!

Um agradecimento muito especial à Professora Jane Eyre Gabriel por ter me incentivado e me direcionado a buscar o crescimento profissional, além dos muros da graduação. Obrigada Professora por todas as palavras de incentivo e por me fazer acreditar que sou capaz!

Agradeço à todos os pesquisadores, analistas e técnicos de laboratório da Embrapa Semiárido que de alguma forma contribuíram para a execução desse trabalho, especialmente ao Dr. Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves, fisiologista vegetal, que me orientou nas atividades de fisiologia e bioquímica do trabalho e ao analista estatístico Raimundo Parente de Oliveira, por ter me ajudado com as análises estatísticas dos resultados.

Agradeço ao amigo, bioinformata, Dr. Luis Carlos Belarmino pela colaboração com as atividades de análise *in silico* contidas neste trabalho.

Agradeço aos amigos de bancada, Alison, Sávio, Ludimila e Benjamim, que ao longo desse tempo de convivência na Embrapa Semiárido dividiram comigo sorrisos, alegrias, frustrações, os cadernos de protocolos e conhecimentos diversos. Sem dúvidas o apoio de vocês foi fundamental para que eu concluísse esse trabalho.

Meus sinceros agradecimentos à Dra. Carolina Vianna Morgante, minha orientadora, que me acolheu e me introduziu no universo da pesquisa. Agradeço por todo o empenho e colaboração em prol da execução e conclusão desse trabalho e pelo incentivo à pesquisa. Agradeço às Professoras Dra. Ana Benko e Dra. Valesca Pandolfi pela co-orientação e acolhida no LGBV.

Por fim, agradeço à UFPE e ao PPGCB pela minha formação, à Embrapa Semiárido pela disponibilização de suas instalações e equipe de apoio e à CAPES pelo incentivo financeiro.

# ESTUDO DAS RESPOSTAS FISIOLÓGICAS, GENÉTICAS E BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE *Arachis* AO DÉFICIT HÍDRICO

## RESUMO

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) está entre as cinco oleaginosas mais cultivadas no mundo e apresenta importância econômica, sobretudo para a indústria alimentícia, devido a seu alto teor de óleos e proteínas. Sua produtividade é negativamente afetada pela seca. Espécies silvestres do gênero *Arachis* apresentam ampla variabilidade genética em caracteres de interesse agrônomo e são potenciais fontes de genes de resistência e adaptação a condições ambientais desfavoráveis. O presente trabalho objetivou caracterizar mecanismos fisiológicos, bioquímicos e genéticos de espécies de *Arachis*, em resposta à deficiência hídrica. Para a caracterização fisiológica, foram avaliados, em folhas, teor relativo de água (TRAf), trocas gasosas, extravasamento de eletrólitos (EL) e teores de aldeído malônico (MDA), de pigmentos fotossintéticos e de prolina, em plantas mantidas a 20%, 45% e 75% da capacidade de pote, por cinco dias. Foi possível constatar a sensibilidade de todos os parâmetros avaliados à deficiência hídrica em *Arachis* spp. pelas variações significativas dos resultados entre os níveis de hidratação impostos. O TRAf, o MDA e o EL não foram úteis como indicativos de tolerância. A análise conjunta dos dados de trocas gasosas e fluorescência da clorofila sugere limitações não estomáticas à fotossíntese, relacionadas negativamente ao aumento dos danos à integridade de membranas nas espécies analisadas, além de evidenciar susceptibilidade à seca em *Arachis duranensis* (Krapov. & W. C. Greg.). Valores superiores de condutância estomática e TRAf, sob déficit hídrico, sugerem a presença de mecanismo de aclimação particular em *Arachis triseminata* (Krapov. & W. C. Greg.). O maior valor de prolina observado em *A. hypogaea* cv. Havana sugere mecanismos diferentes de ajuste osmótico entre essa cultivar e as espécies silvestres analisadas. Para a caracterização genética, fatores de transcrição (FT) foram identificados, classificados em famílias e putativamente relacionados à resposta ao déficit hídrico, por meio de análises *in silico* do proteoma teórico de *A. duranensis* e de *Arachis ipaensis* e de sequências de aminoácidos geradas a partir de dados preliminares de sequenciamento de RNA de *A. hypogaea* e *Arachis stenosperma* (Krapov. & W. C. Greg.) sob déficit hídrico. Foi observada conservação dos tipos e frequências de famílias de FT, indicando semelhanças de vias regulatórias entre essas espécies. As análises de ortologia de genes responsivos ao déficit hídrico de *Arachis* spp. e *Arabidopsis* indicaram a conservação de vias reguladas por FT nessas duas espécies. Adicionalmente, a modulação da expressão de oito genes que codificam FT diferiu nas espécies de *Arachis* analisadas sob déficit hídrico, sugerindo diferenças na regulação transcricional de genes de FT, o que pode gerar mecanismos diversificados de aclimação a estresses abióticos.

**Palavras-chave:** Amendoim. Seca. Fatores de transcrição.



# A SURVEY OF PHYSIOLOGICAL, BIOCHEMICAL AND GENETIC RESPONSES OF *Arachis* SPECIES TO WATER DEFICIT

## ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is among the five most cultivated oilseed crops in the world, and is economically important, particularly for food industry, due to its high content of oils and proteins. Its productivity is affected by drought. Wild *Arachis* species show a wide variability for agronomic traits, and are potential sources of genes for breeding to resistance and adaptation of plants to environmental stresses. The present work aimed at characterizing physiological, biochemical and genetic mechanisms of *Arachis* species in response to water deficit. For physiological characterization, the parameters evaluated were leaf relative water content (RWC), gas exchanges, electrolytic leakage (EL), and its content of malondialdehyde (MDA), photosynthetic pigments and proline, in plants maintained at 20%, 45% and 75% of pot capacity, for five days. All these parameters were impacted by water deficit. RWC, EL, and MDA measures were not useful as indicators of drought tolerance in *Arachis* spp. Results of gas exchanges and chlorophyll fluorescence pointed to non-stomatic photosynthesis limitation, negatively related to the increasing of membrane integrity damage, in all species analyzed, and evidenced drought susceptibility in *Arachis duranensis* Krapov. & W. C. Greg. Higher values of stomatic conductance and leaf RWC suggested a unique mechanism of adaptation to drought stress in *Arachis triseminata* Krapov. & W. C. Greg. The higher proline content in *A. hypogaea* cv. Havana pointed to a different mechanism of osmotic adjustment in this cultivar, in comparison to the wild species analyzed. For genetic characterization, transcription factors (TF) were identified, characterized, and putatively related to water deficit response through in silico analyses of the theoretical proteomes of *A. duranensis* and *Arachis ipaensis* Krapov. & W. C. Greg., and amino acid sequences generated from preliminary RNA sequencing data of *A. hypogaea* and *Arachis stenosperma* Krapov. & W. C. Greg., under drought stress. The observed conservation of types and frequencies of TF families indicated similarities of regulatory pathways between these species. Orthology analyses of drought-responsive genes revealed the conservation of TF regulatory pathways between *Arachis* spp. and *Arabidopsis*. Additionally, the expression modulation of eight TF genes differed between the *Arachis* species analyzed under drought stress, suggesting differences in the transcriptional regulation of TF genes, which might lead to diverse acclimatization mechanisms to abiotic stress.

**Keywords:** Peanut. Drought. transcription factor

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

### CAPÍTULO II

#### RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE *Arachis* SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

- Figura 1.** Umidade do solo (%), medida pelo método gravimétrico, das amostras submetidas a 20, 45 e 75% da capacidade de pote. 39
- Figura 2.** Teor Relativo de Água foliar (TRAf %) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 40
- Figura 3.** Fenótipo de espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 75 (controle), 45 e 20% da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 41
- Figura 4.** Taxa de fotossíntese ( $A$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 43
- Figura 5.** Eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 44
- Figura 6.** Razão da Fluorescência variável e máxima na presença de luz ( $F'_v/F'_m$ ) ( $A$  e  $D$ ), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{FSII}$ ) ( $B$  e  $E$ ) e taxa de transporte de elétrons (TTE) ( $C$  e  $F$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 46
- Figura 7.** Teor de aldeído malônico (MDA) ( $A$  e  $C$ ) e extravasamento de eletrólitos (EL (%)) ( $B$  e  $D$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 48
- Figura 8.** Teor de clorofila total ( $A$  e  $E$ ), clorofila  $a$  ( $B$  e  $F$ ), clorofila  $b$  ( $C$  e  $G$ ) e carotenoides ( $D$  e  $H$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 50
- Figura 9.** Teor de prolina foliar em espécies de *Arachis* submetidas a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. 52

### CAPÍTULO III

#### IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM *Arachis* spp. E SUA MODULAÇÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO

- Figura 1.** Distribuição das frequências de domínios de ligação ao DNA (DLD) de fatores de transcrição (FT) em *Arachis* spp. 68

**Figura 2.** Distribuição das frequências de fatores de transcrição (FT) em famílias em *Arachis* spp. 70

**Figura 3.** Razão dos níveis de mRNA dos fatores de transcrição MADS (Aradu.G38ML), WRKY (comp69184\_c3), AP2 (comp69438\_c0), MYB-related (Aradu.B7RDX), NAC (comp64977), FAR1a (Aradu.B1C6F), FAR1b (Aradu.023N4) e FAR1c (Aradu.UXN6T) entre plantas submetidas ao déficit hídrico e controle, em quatro espécies silvestres de *Arachis*. 76

### **Material Suplementar**

**Figura S1** – Representação esquemática das etapas de identificação e classificação de FT em *Arachis* spp. sob déficit hídrico. 84

## LISTA DE TABELAS

Pág.

### CAPÍTULO III

#### IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM *Arachis* spp. E SUA MODULAÇÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO

**Tabela 1.** Ortólogos de *Arabidopsis* em *Arachis* spp. diferencialmente expressos sob déficit hídrico e sua classificação em famílias de Fatores de Transcrição (FT). 71

**Tabela 2.** Fatores de transcrição diferencialmente expressos sob estresse hídrico e com ortólogos em *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea*. 72

**Tabela 3.** Número total de ortólogos de FT em comum em quatro espécies de *Arachis* e aqueles diferencialmente expressos (entre parênteses). 73

#### Material Suplementar

**Tabela S1.** Classificação de fatores de transcrição baseada na presença/ausência de domínios de ligação ao DNA (DLD). 85

**Tabela S2.** Sequência de iniciadores utilizados para a análise da expressão de genes de FT e suas respectivas eficiências de amplificação 89

## LISTA DE ABREVIACES

<b>CP</b>	Capacidade de Pote
<b>A</b>	Fotossíntese
<b><math>g_s</math></b>	Condutância estomática
<b>E</b>	Transpiração foliar
<b><math>A/g_s</math></b>	Eficiência intrínseca do uso água
<b><math>F'_v/F'_m</math></b>	Razão da fluorescência variável e máxima
<b>IRGA</b>	Analisador de gases por infravermelho (Infra-Red Gas Analyser)
<b>TRAf</b>	Teor Relativo de água foliar
<b>MDA</b>	Aldedo malnico
<b>EL</b>	Extravasamento de eletrólitos
<b>TBA</b>	cido 2-tiobarbitúrico
<b>TCA</b>	cido tricloroactico
<b>MS</b>	Massa Seca
<b>ANOVA</b>	Análise de Varincia
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PSII</b>	Fotossistema II
<b>SFI</b>	ndice de "structure function"
<b>EROs</b>	Espécies Reativas de Oxignio
<b>ET</b>	Eficincia de Transpiração
<b>TTE</b>	Taxa de Transporte de Eltrons
<b><math>\Phi</math>FSII</b>	Rendimento quntico de transporte de eltrons
<b>Rubisco</b>	Ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleotdeo de adenina e nicotinamida
<b>DPV</b>	Dficit de Presso de Vapor folha-atmosfera
<b>ABA</b>	cido abscísico
<b>LEA</b>	Late Embryogenesis Abundant
<b>FT</b>	Fatores de transcrição
<b>STIFDB</b>	Arabidopsis Stress Responsive Transcription Factor DataBase
<b>RT-qPCR</b>	Reao Reversa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
<b>HMM</b>	Modelos Ocultos de Markov
<b>Cq</b>	Ciclo timo de quantificação
<b>ACT1</b>	<i>Actina</i>
<b>GAPDH</b>	Gliceraldedo 3-fosfato desidrogenase
<b>UBI1</b>	<i>Poliubiquitina</i>
<b>cDNA</b>	DNA complementar
<b>60S</b>	<i>Proteína ribossomal 60S</i>
<b>DLD</b>	Domínios de Ligação ao DNA

## SUMÁRIO

	<b>Pág.</b>
INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO I	
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
O gênero <i>Arachis</i>	16
Classificação botânica, distribuição geográfica e características gerais	16
Importância econômica de <i>Arachis hypogaea</i>	17
Espécies silvestres e melhoramento genético	18
Déficit hídrico e consequências para as plantas	20
Mecanismos fisiológicos e bioquímicos em resposta à seca	20
Processos genéticos de tolerância à seca e a identificação de genes responsivos ao déficit hídrico	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
CAPÍTULO II	
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE <i>Arachis</i> SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO	
Resumo	33
1. Introdução	34
2. Material e métodos	36
Material vegetal	36
Desenho experimental e imposição do déficit hídrico	36
Avaliações fisiológicas e bioquímicas	37
Trocas gasosas, fluorescência e estado hídrico da planta	37
Avaliação de dano a membranas	37
Quantificação de pigmentos fotossintéticos	37
Quantificação de prolina livre	38
2.4. Análises estatísticas	38
3. Resultados e discussão	39
Estado hídrico foliar e do solo	39
Trocas gasosas e fluorescência	41
Danos em membranas	46
Pigmentos fotossintéticos	48
Prolina livre	51
4. Referências bibliográficas	53
CAPÍTULO III	
IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM <i>Arachis</i> spp. E SUA MODULAÇÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO	
Resumo	59
Introdução	60

	<b>SUMÁRIO</b>	
Material e métodos		63
Material vegetal		63
Imposição do déficit hídrico		63
Identificação de famílias de FT em <i>Arachis</i>		64
Identificação de FT de <i>Arachis</i> putativamente responsivos à seca		64
Análise da expressão gênica		65
Resultados e discussão		66
Classificação e distribuição de FT de <i>Arachis</i> em famílias		66
Ortologia de FT responsivos ao déficit hídrico entre <i>Arachis</i> spp. e <i>Arabidopsis</i>		70
Ortologia de FT entre espécies de <i>Arachis</i> e a modulação de sua expressão sob estresse hídrico		71
Análise da expressão de genes de FT em plantas sob déficit hídrico		73
Agradecimentos		77
Referências bibliográficas		78
Material Suplementar		84
CONSIDERAÇÕES FINAIS		90
ANEXO I – NORMAS DAS REVISTAS		91
ANEXO II – DETALHES DA METODOLOGIA		112

## INTRODUÇÃO

Pertencente à família *Fabaceae*, o amendoim (*A. hypogaea*) é uma cultura importante tanto para a produção de óleo, como para o uso na indústria de alimentos e consumo *in natura*. É uma oleaginosa pertencente ao gênero *Arachis*, que é composto por 80 espécies, divididas em nove seções. A ocorrência natural de espécies desse gênero restringe-se à América do Sul, tendo como centro de diversidade o bioma Cerrado, e a sua ampla distribuição reflete a adaptação desse gênero à sobrevivência em diferentes habitats (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005).

O amendoim, assim como qualquer outra planta, está exposto a diversos estresses ambientais tais como seca, salinidade e temperaturas extremas, o que pode comprometer o crescimento e a produtividade vegetal em áreas cultivadas. Destes, a seca é o fator mais limitante da produtividade agrícola. Nesse contexto, a seca é definida como um período prolongado e anormalmente seco, no qual os recursos hídricos são insuficientes para as necessidades agrícolas (AUSTRALIAN BUREAU OF AGRICULTURAL AND RESOURCE ECONOMICS AND SCIENCES – ABARES, 2012).

No Brasil, a produção de amendoim estimada para safra 2015/16 foi de 406,1 mil toneladas. Deste total, a maior produção concentrou-se na região Sudeste do país com cerca de 94,83% e produtividade equivalente a 3.394 kg/ha, se destacando o estado de São Paulo como o maior produtor nacional, respondendo por cerca de 92,96% da produção. Em contraste, na região Nordeste, onde predomina o clima semiárido, a área cultivada nesta safra foi de aproximadamente 3,4 mil hectares com produtividade de 989 kg/ha e a produção estimada não ultrapassou 1% da produção nacional (CONAB, 2016), o que reflete os efeitos da seca sobre essa cultura.

A seca é vista como um problema para o cultivo de amendoim nesta região. Por este motivo, um dos principais objetivos dos programas de melhoramento é a introdução de características de resistência ou tolerância à seca em novas cultivares, de forma a aumentar o rendimento da cultura na região (SANTOS; GODOY; FÁVERO, 2005). Neste sentido, o uso de espécies silvestres de *Arachis* em programas de melhoramento vem sendo uma atraente perspectiva para gerar variabilidade genética para fatores de estresses bióticos e abióticos (BERTIOLI et al., 2011).

Dessa forma, o conhecimento das características fisiológicas e bioquímicas e a identificação de genes envolvidos na resposta a tolerância aos estresses abióticos torna-se de fundamental importância para o estabelecimento de estratégias de melhoramento para obtenção de cultivares adaptadas aos diferentes tipos de estresse, assim como para a compreensão dos mecanismos de respostas à tolerância ao déficit hídrico.

Assim, tendo em vista o potencial econômico do amendoim e os prejuízos decorrentes de redução ou perdas de produção em períodos de seca, este estudo visou caracterizar e comparar os



mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à resposta à deficiência hídrica entre espécies do gênero *Arachis* (*A. magna*, *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. triseminata* e *A. hypogaea*) e selecionar no banco de dados de *Arachis*, genes presumivelmente relacionados à resposta ao déficit hídrico para a análise de expressão diferencial, utilizando-se a técnica de RT-qPCR (Reação Reversa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real), nas espécies silvestres, avaliando-as como potenciais fornecedoras de genes de resistência à seca para o melhoramento genético.

## CAPÍTULO I

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### O gênero *Arachis*

#### Classificação botânica, distribuição geográfica e características gerais

O gênero *Arachis L.* pertence a família *Fabaceae*, subfamília *Faboideae*, tendo sido o amendoim (*Arachis hypogaea L.*), a espécie cultivada, a primeira descrita, em 1753. Esse gênero é composto por 80 espécies, descritas e publicadas, distribuídas em nove secções taxonômicas distintas, com base na similaridade de aspectos morfológicos e citogenéticos e nas informações sobre a viabilidade do grão de pólen de híbridos intra e interespecíficos (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005).

As secções propostas, *Trirectoides*, *Erectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis* demonstram a grande diversidade do gênero e a influência dos diferentes ambientes e de suas condições edáficas e climáticas para a sua evolução morfológica (CARPES, 2010).

*Arachis* é um gênero nativo da América do Sul, tendo o centro de origem no Brasil Central e Paraguai (GREGORY; A KRAPOVICKAS; GREGORY, 1980) e centro de diversidade o bioma Cerrado, localizado no Planalto Central Brasileiro (GREGORY; A KRAPOVICKAS; GREGORY, 1980; HAMMONS, 1994). A ocorrência natural das espécies do gênero se estende do sopé das montanhas dos Andes na Bolívia até a costa do Oceano Atlântico, e do limite sul da Floresta Amazônica até o Rio da Prata, no Uruguai (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994; VALLS; SIMPSON, 2005), refletindo a adaptação do gênero à sobrevivência em diferentes habitats. Das 80 espécies descritas, 65 ocorrem no Brasil, sendo 46 exclusivas, o que demonstra a sua importância ecológica para a biodiversidade do país (VALLS, 2005, 2006).

As espécies do gênero *Arachis* apresentam como características morfológicas comuns, porte herbáceo, ereto ou rasteiro, folhas compostas, com dois pares de folíolos, com exceção das espécies da seção *Trirectoides* com três folíolos (KRAPOVICKAS; GREGORY, 1994), e formação de frutos por geocarpiá, em que a flor aérea, ao ser fecundada, produz um fruto subterrâneo por meio do ginóforo.

No aspecto citogenético, a maioria das espécies pertencentes ao gênero *Arachis* é diploide ( $2n=2x=20$  ou  $2n=2x=18$ ) e somente *A. hypogaea* e *A. monticola* (secção *Arachis*), *A. glabrata*, *A. pseudovillosa* e *A. nítida* (secção *Rhizomatosae*) são tetraploides ( $2n=4x=40$ ) (FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994; LAVIA, 1998; PEÑALOZA; VALLS, 2005). Além disso, foram

identificados três tipos distintos de genoma: “AA”, caracterizado pela presença de um par de cromossomos “AA” de tamanho reduzido e menor nível de condensação da eucromatina; “BB”, representado pelas espécies que não apresentam o par de cromossomos “AA”, como por exemplo, *A. magna* e *A. ipaensis*; o genoma “DD”, é caracterizado pela presença de seis pares de cromossomos subtelocêntricos, encontrados apenas em *Arachis glandulifera* (HUSTED, 1936; MILLA; ISLEIB; STALKER, 2005; SEJO et al., 2004; STALKER, 1991).

As espécies tetraploides, *A. hypogaea* e *A. monticola*, apresentam simultaneamente os dois genomas, “AA” e “BB”, que ocorrem separadamente em espécies diploides da secção *Arachis* (FERNÁNDEZ; KRAPOVICKAS, 1994). A alotetraploidização observada nessas espécies, corroborou para uma possível explicação da origem do amendoim (*A. hypogaea* L.), o qual teria se originado por processos de domesticação da espécie *A. monticola*, que por sua vez, teria surgido a partir do cruzamento entre duas espécies silvestres diploides, *A. duranensis* (portadora de “AA”) e *A. ipaensis* (portadora de “BB”), resultando em um híbrido estéril, cujos cromossomos foram duplicados, levando a restauração da fertilidade e provável seleção de controle genético da meiose (GREGORY; GREGORY, 1976, 1979; HILU; STALKER, 1995; KOCHERT et al., 1991; SIMPSON et al., 2001).

Bertioli et al. (2016) sequenciaram e analisaram os genomas de *A. duranensis* e *A. ipaensis*, comparando-os entre si e depois com *A. hypogaea*, e verificaram alta identidade de sequências do DNA do genoma de *A. ipaensis* e do subgênero B do amendoim, o que associado às evidências biogeográficas, concluíram que *A. ipaensis* pode ser um descendente direto da mesma população que contribuiu com o subgênero B para o amendoim.

As secções *Heteranthae*, representada pelas espécies *A. dardani*, *A. giacomettii*, *A. interrupta*, *A. pusilla*, *A. seridoënsis* e *A. sylvestris*, e *Triseminatae*, representada pela espécie *A. triseminata*, são encontradas na região Nordeste do país, onde predomina o bioma Caatinga, sendo que algumas espécies avançam sobre o Cerrado nordestino e áreas de transição destes biomas com a Mata Atlântica (SCHÄFFER, 2012). Entre estas, *A. triseminata* chama a atenção por ser endêmica da Caatinga. É uma espécie perene, diploide ( $2n = 20$ ) e que ocorre em grandes adensamentos. No período de seca, é observada redução da biomassa de suas folhas, as quais permanecem verdes durante o ano inteiro (WANG et al., 2011).

### **Importância econômica de *Arachis hypogaea***

O gênero *Arachis* apresenta grande potencial econômico, tanto na produção de grãos, com o amendoim representando a única espécie cultivada, quanto no uso de espécies silvestres para

formação de pastagens, ornamentação, controle de erosão e fixação de nitrogênio (RODRIGUES, 2006; VALLS, 2005).

A espécie *Arachis hypogaea* é uma oleaginosa muito cultivada em várias regiões do mundo devido ao seu alto teor de óleo e proteínas essenciais à nutrição, tornando-a importante para a utilização na alimentação humana, tanto pelo consumo direto quanto pelo uso na indústria alimentícia e confeitaria, além da produção de óleo.

No Brasil, a produção de amendoim estimada para safra 2015/16 foi de 406,1 mil toneladas. Deste total, a maior produção concentrou-se na região Sudeste do país com cerca de 94,83% e produtividade equivalente a 3.394 kg/ha, se destacando o estado de São Paulo como o maior produtor nacional, respondendo por cerca de 92,96% da produção (CONAB, 2016).

Na região Nordeste, o amendoim é cultivado por pequenos e médios produtores e a área cultivada na safra de 2015/16 foi de aproximadamente 3,4 mil hectares com produtividade de 989 kg/ha. A produção estimada para a região não ultrapassou 1% da produção nacional (CONAB, 2016), refletindo os efeitos da seca sobre essa cultura.

Nogueira e Távora (2005) relataram que a cultura do amendoim é adaptada às condições extremas de disponibilidade hídrica, sendo cultivada tanto em ambientes úmidos como no semiárido. Porém, a seca representa um dos principais fatores limitantes, responsável por perdas ou redução da produtividade no semiárido nordestino. Segundo Santos, Godoy e Fávero (2005), um dos principais objetivos dos programas de melhoramento é a introdução de características de resistência ou tolerância à seca em novas cultivares, de forma a aumentar o rendimento da cultura na região.

Entre as cultivares adaptadas a região semiárida, a BRS Havana que se originou a partir do acesso CNPA 75 AM, através de diversos ciclos de seleção com pressão para forma e tamanho dos grãos e adaptação ao clima semiárido, apresenta baixo teor de óleo (43%), sendo indicada para o mercado de alimentos, e é recomendada para produtores das regiões da Zona da Mata, Agreste e Sertão nordestino (DOS SANTOS et al., 2006).

### **Espécies silvestres e melhoramento genético**

A produção de *Arachis hypogaea* muitas vezes é afetada por situações de seca e devido as poucas informações disponíveis a respeito do seu genoma, pouco se sabe sobre a base molecular da sua resposta ao estresse de seca (LI et al., 2014). No entanto, tendo em vista o interesse agrícola que o amendoim exerce na economia, a comunidade científica tem intensificado as atividades de melhoramento genético, buscando nas espécies silvestres, potenciais fornecedoras de genes de resistência à doenças e outros fatores de impacto ambiental, como a seca (FÁVERO, 2004; FÁVERO et al. 2006).

Espécies silvestres de *Arachis* apresentam-se como fonte de variabilidade genética para fatores de estresses bióticos e abióticos a qual poderá ser eficientemente utilizada no melhoramento genético de *A. hypogaea* (BERTIOLI et al., 2011). A resistência a doenças, por exemplo, já foi identificada em acessos silvestres de *Arachis*, como em *A. stenosperma*, resistente à infecção por *Cercosporidium personatum*, agente causador da mancha preta, e pelo nematoide *Meloidogyne arenaria* raça 1 (LEAL-BERTIOLI et al., 2010; PROITE et al., 2008). A resistência à *M. arenaria* também foi identificada em *A. cardenasi*, tendo sido introgridida para *A. hypogaea* (BUROW et al., 1996; SIMPSON et al., 2003).

Já a tolerância à seca foi identificada em *A. magna* e *A. duranensis* (LEAL-BERTIOLI et al., 2007), sendo que para essas espécies, foi realizada a análise do transcrito de plantas sob condição de deficiência hídrica, resultando na formação de um extenso banco de sequências de *Arachis* silvestre, útil para a identificação de vias metabólicas e genes associados à tolerância à seca (BRASILEIRO et al., 2015; GUIMARÃES et al., 2012). Por outro lado, a transferência de genes de tolerância de espécies silvestres para o amendoim é muito difícil pela diferença de ploidia, e consequente barreira de fertilidade. Leal-Bertioli et al. (2012) em investigação de caracteres morfofisiológicos relacionados à seca nas espécies silvestres *A. duranensis* e *A. ipaensis* e em um alotetraplóide sintético resultante do cruzamento entre as referidas espécies silvestres, comparando-as à *A. hypogaea*, verificaram até que ponto as avaliações diretas de espécies diploides silvestres podem ser úteis para identificar traços desejáveis que pudessem ser introgrididos no amendoim para melhorar sua tolerância à seca. Os autores concluíram que apesar das avaliações diretas de traços relacionados à seca em diploides silvestres serem úteis para a avaliação de espécies silvestres a serem usadas na introgressão, a maioria dos caracteres relacionados à seca tinham sido alterados pela hibridização e tetraploidização dos diploides, tornando as avaliações sobre tetraplóides sintéticos de origem silvestre provavelmente mais informativas para orientar o processo de introgressão.

Nesse contexto, a transgenia apresenta-se como uma alternativa promissora para o melhoramento genético do amendoim. Sharma e Anjiah (2000), descreveram um protocolo para a regeneração eficiente de gemas adventícias múltiplas de explantes de cotilédones maduros de amendoim e a produção de plantas transgênicas férteis pela transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Esse método proporciona novas oportunidades para a melhoria da cultura de amendoim através de transformação genética. Bhatnagar-Mathur et al. (2007), desenvolveram plantas de amendoim transgênicas, através de transferência de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, expressando DREB1A (fator de transcrição da família AP2 / EREBP) impulsionado pelo promotor rd29A de *A. thaliana* para melhorar a tolerância à seca. Essas plantas transgênicas obtiveram maior eficiência de transpiração (ET) em relação aos controles bem irrigados.

Os estudos realizados até o momento com a espécie *A. triseminata* concentram-se em aspectos botânicos e filogenéticos (CARPES, 2010; WANG et al., 2011), sendo que não há registros na literatura da avaliação da fisiologia e da biologia molecular dessa espécie. No entanto, por se tratar de uma espécie endêmica do bioma Caatinga, torna-se interessante avaliar o seu potencial como fornecedora de genes de resistência à seca para o melhoramento genético.

### **Déficit hídrico e consequências para as plantas**

As plantas, em habitats agrícolas ou naturais, podem ter o seu desenvolvimento afetado por variados tipos de estresses, sejam bióticos ou abióticos. As oscilações dos fatores ambientais (abióticos), tais como seca, frio e condições de salinidade, fora dos seus limites normais, resultam em consequências bioquímicas e fisiológicas negativas para os vegetais, podendo comprometer irreversivelmente sua produtividade.

Essas consequências abrangem desde efeitos primários, como a redução do potencial hídrico e a desidratação celular, alterando propriedades físicas e bioquímicas das células, até os seus efeitos secundários, como a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), redução na estabilidade de membranas, aumento da desnaturação proteica, alteração no balanço iônico, distúrbio metabólico e morte celular (GILL; TUTEJA, 2010).

O déficit hídrico ou disponibilidade de água insuficiente no solo, causado geralmente por períodos alternados ou contínuos sem precipitação, ocorre na maioria dos ambientes, agrícolas ou naturais, e se constitui como um dos fatores ambientais mais severos, causando danos e limitando a produtividade de culturas em todo o mundo (CHAVES; OLIVEIRA, 2004). Para o entendimento dos mecanismos relacionados à resposta de plantas ao déficit hídrico, tornam-se necessários estudos coordenados dos aspectos fisiológicos, bioquímicos e genéticos envolvidos.

### **Mecanismos fisiológicos e bioquímicos em resposta à seca**

Durante períodos de seca, as plantas estão expostas a condições de déficit hídrico que podem levar a uma série de danos fisiológicos irreversíveis. A sensibilidade de alguns processos fisiológicos ao déficit hídrico demonstra uma estratégia da planta em lidar com as variações na disponibilidade de água (SANTOS; CARLESSO, 1998). Isso pode ser evidenciado pelo desenvolvimento de mecanismos adaptativos e/ou respostas que permitem às plantas sobreviverem sob essas condições, seja com um desenvolvimento acelerado no período chuvoso, pelo controle do fechamento estomático para reduzir a perda de água, pelo aprofundamento das raízes para aumentar a absorção ou pelo ajuste osmótico para manter a turgescência.

A perda da capacidade de absorção de água pelas raízes provoca reduções na turgescência como resultado da desidratação celular, decorrente da perda de água do citosol e vacúolos para o apoplasto, e conseqüentemente, paralisação do processo de crescimento pela redução da expansão foliar e do alongamento da raiz. Quando a expansão foliar é inibida pela limitação no suprimento de água, ocorre redução da área foliar, podendo ser considerado uma forma de defesa, já que com uma área menor haverá menos transpiração e conseqüentemente, uma menor demanda por água do solo. Além disso, o consumo de carbono e energia reduz e uma quantidade maior de assimilados da fotossíntese pode ser alocada para o sistema radicular afim de promover o crescimento das raízes para aumentar a absorção de água. Por outro lado, ocorre uma queda na absorção de CO<sub>2</sub> e na interceptação de luz, limitando a produtividade (PIMENTEL, 2004).

Para avaliar a intensidade da deficiência hídrica em uma planta, é comum utilizar variáveis como o potencial hídrico da planta e o Teor Relativo de Água foliar (TRAf), expresso como porcentagem do seu conteúdo de água em turgor pleno, as quais são medidas em folhas e dependentes do conteúdo hídrico do solo, da capacidade de absorção de água pelas raízes e da condutividade hidráulica dos tecidos da planta. Geralmente o TRAf é menor que 100%, mesmo quando a absorção de água pelas raízes e a perda de água por transpiração se igualam, aproximando-se desse valor apenas à noite, quando o DPV (Déficit de Pressão de Vapor folha-atmosfera) e a taxa de transpiração foliar (*E*) são baixos e o solo aproxima-se da capacidade de campo (PIMENTEL, 2004). Dessa forma, o TRAf constitui um método básico na avaliação do estado hídrico da planta em estudos que envolvem redução no conteúdo hídrico do solo, podendo indicar tolerância a dessecação em plantas.

Sabe-se que aproximadamente 98% da água absorvida pela planta é perdida por meio do processo de transpiração. Entretanto, as plantas podem responder às variações na disponibilidade de água pela sua capacidade de controlar a abertura estomática, evitando assim, a perda excessiva de água pelos estômatos em consequência da transpiração. Esse controle é mantido pela absorção e perda de água nas células-guarda, pelas alterações na sua pressão de turgor. Outra resposta é a biossíntese e/ou redistribuição de ácido abscísico (ABA) para indução do fechamento estomático e inibição da expansão foliar (ZHANG et al., 2006). O ABA atua como mediador nesse processo, sendo sintetizado em maior quantidade quando as folhas são desidratadas.

A redução da abertura estomática causa diminuição da transpiração e também redução da absorção de CO<sub>2</sub> necessário para a produção de biomassa pela fotossíntese. Por outro lado, a condutância estomática em níveis mais elevados promove o resfriamento foliar, via transpiração, reduzindo a diferença entre a temperatura do ar e as temperaturas consideradas ótimas para a manutenção da fotossíntese (NOGUEIRA et al., 1998).

Quando a limitação estomática da fotossíntese, em plantas sob déficit hídrico, é alta, resulta em limitação fotoquímica por baixa assimilação de CO<sub>2</sub>. Além disso, no processo fotossintético, após

a absorção da luz pelos pigmentos, ocorre a transferência de energia luminosa, desencadeando os eventos químicos da fotossíntese, como fixação do CO<sub>2</sub> e produção de carboidratos. Assim, qualquer fator que influencie ou cause danos à estrutura dos pigmentos pode resultar em danos para o processo fotossintético (SLATTERY et al., 2016). Ademais, a concentração desses pigmentos na folha pode ser utilizada como um indicador de estresse em plantas, devido ao fato de ser neste local onde a maquinaria fotossintética se encontra.

Dessa forma, os parâmetros relacionados aos mecanismos de trocas gasosas e fotossíntese podem ser usados como indicadores de deficiência hídrica, tornando-se essencial a avaliação dos mesmos em estudos sobre efeitos do déficit de água em plantas.

A resposta de plantas ao estresse hídrico inclui também o ajuste osmótico pelo acúmulo de osmólitos. As plantas acumulam solutos para diminuir o potencial hídrico do citosol e do vacúolo, de forma a permitir a absorção de água e garantir a manutenção da pressão de turgor da célula, possibilitando a manutenção de processos fisiológicos, tais como, abertura estomática, fotossíntese, alongamento e divisão celular (SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

No processo de ajuste osmótico, o acúmulo de íons se restringe aos vacúolos, impedindo o contato com enzimas citosólicas ou organelas, afim de evitar danos ao metabolismo celular e o rompimento de membranas e proteínas celulares, visto que alguns íons, como sódio e cloreto, quando em concentrações elevadas podem ter efeitos nocivos sobre a planta (MAJUMDER; SENGUPTA; GOSWAMI, 2010). Dessa forma, para manter o equilíbrio do potencial hídrico dentro da célula, outros solutos denominados osmólitos compatíveis, são acumulados no citoplasma. Esses solutos são compostos orgânicos osmoticamente ativos na célula que, mesmo em concentrações elevadas, não desestabilizam a membrana ou interferem na função enzimática, como fariam as altas concentrações de íons. Entre os solutos compatíveis mais comuns, podem ser citados os açúcares solúveis e aminoácidos como a prolina (MAJUMDER; SENGUPTA; GOSWAMI, 2010).

Em condições estressantes, como por exemplo na deficiência hídrica, estes solutos compatíveis apresentam importantes funções de manter a integridade estrutural de enzimas, membranas, hormônio e outros componentes celulares (BRAY; BAILEY-SERRES; WERETILNYK, 2000; MAJUMDER; SENGUPTA; GOSWAMI, 2010). No entanto, a capacidade de ajustamento osmótico é muito variável entre espécies e entre acessos diferentes de uma mesma espécie.

Em plantas, a prolina apresenta uma função osmoprotetora, atuando no ajuste osmótico e protegendo as estruturas de biomoléculas e membranas pela detoxificação de radicais livres formados durante períodos de escassez de água e proporcionando uma fonte de carbono e nitrogênio para ser utilizado pela célula durante a recuperação do estresse (ASHRAF; FOOLAD, 2007; HARE; CRESS; VAN STADEN, 1998).



Em situação de estresse hídrico, a produção de EROs é aumentada por meio da inibição da regeneração de NADP<sup>+</sup>. Nesta condição, o acúmulo de ABA induz a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio por meio da inibição da captação de CO<sub>2</sub> e alteração na cadeia de transporte de elétrons nos cloroplastos. O sistema antioxidante da célula é capaz de detoxificar EROs sob estresse, porém, em situação extrema, inicia-se um processo de estresse oxidativo, expresso pela peroxidação de lipídeos e dano oxidativo de DNA e proteínas (DEMIDCHIK, 2015).

A peroxidação de lipídios leva à destruição da membrana plasmática, falência dos mecanismos de trocas de metabólitos e, em situação extrema, a morte celular (BENZIE, 1996). Uma das técnicas utilizadas para avaliar a peroxidação de lipídios é o teste de aldeído malônico (MDA) que é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados. O MDA é considerado como um marcador bioquímico de estresse oxidativo (SHULAEV; OLIVER, 2006).

A integridade das estruturas bioquímicas da membrana plasmática também pode ser perturbada pelo estresse oxidativo, decorrente da deficiência hídrica ou de outros fatores abióticos, levando a mudanças na permeabilidade das membranas, a qual tem sido considerada como um indicador de tolerância ao déficit hídrico (BAJJI; KINET; LUTTS, 2001). Uma das técnicas mais simples de estudo da integridade de membranas consiste na leitura da condutividade elétrica de solutos extravasados de discos foliares imersos em um volume conhecido de água, antes e após aquecimento (LUTTS; KINET; BOUHARMONT, 1996).

### **Processos genéticos de tolerância à seca e identificação de genes responsivos ao déficit hídrico**

A regulação genética em situações de estresse vem sendo muito estudada pela análise global da expressão diferencial de genes e acúmulo ou produção de proteínas. O avanço das técnicas de biologia molecular permitiu a geração de um grande volume de informação e genes responsivos ao estresse hídrico, os quais podem ser divididos em: (i) os que codificam proteínas que conferem diretamente tolerância à seca, como as proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), osmorreguladoras, aquaporinas, transportadores de sódio, entre outras, e; (ii) aqueles que codificam proteínas que desempenham função na regulação da expressão de outros genes e na transdução de sinais, como os fatores de transcrição e as proteínas quinase (HU; XIONG, 2014).

Vários autores têm identificado genes envolvidos nas rotas de tolerância ao déficit hídrico. Genes que codificam proteínas LEA, em resposta de plantas ao déficit hídrico, foram associados à adaptação à seca com função relacionada à proteção de membranas e conformação funcional de chaperonas (DURE, 1993; BRAY, 1993). Acúmulo dessas proteínas em folhas de um genótipo de

amendoim tolerante à seca, sugeriu seu envolvimento na tolerância ao déficit hídrico para o amendoim (DRAMÉ *et al.* 2007).

Os fatores de transcrição são proteínas, presentes em todos os organismos eucariotos, que se ligam a sequências específicas na região promotora do DNA genômico e possuem a capacidade de ativar ou desativar a expressão de outros genes (Libault *et al.*, 2009), atuando assim, como reguladores da expressão gênica. Conforme o domínio e/ou domínios presentes na proteína, os genes de fatores de transcrição foram classificados e agrupados em numerosas famílias gênicas (PEREZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2010), sendo que algumas delas, são exclusivas de plantas e desempenham papel fundamental no desenvolvimento vegetal e em respostas de aclimação e adaptação às condições ambientais desfavoráveis.

Estudos relataram a atividade de proteínas DREB, FT que se ligam a sequências de DNA presentes em regiões promotoras de genes expressos durante a desidratação (KASUGA *et al.* 1999). Chen *et al.* (2007) observaram que o FT GmDREB2 de soja foi isolado e superexpresso em *Arabidopsis* e tabaco, sob tratamentos de seca, alta concentração salina, baixas temperaturas e ABA. Além disso, os autores observaram que o aumento em sua expressão levou ao aumento da expressão de genes já descritos como “downstreams” para o gene *AtDREB1* em *Arabidopsis* e que ocorreu o acúmulo de altos níveis de prolina livre, sugerindo que o gene GmDREB2 ativa a expressão de genes envolvidos na síntese de prolina.

Shameer *et al.* (2009) e Lindemose *et al.* (2013) apontaram igualmente, as famílias bZIP, AP2/ERF, NAC, WRKY, MYB e bHLH como famílias gênicas de FT que respondem a estresses abióticos em plantas, sugerindo que as mesmas, atuando isoladas ou em diversas cascatas de sinalização, desempenham papéis funcionais importantes em resposta a tensões ambientais como seca, temperaturas extremas, salinidade elevada, alta osmolaridade e ABA. Shameer *et al.* (2009) ainda incluiu as famílias ABI3 / VP1, ARF, HB e HSF, enquanto Lindemose *et al.* (2013) apontou a família C2H2 ZF em seus respectivos estudos.

Apesar do avanço destes estudos, uma preocupação pertinente ainda se refere à fonte de recursos genéticos para a tolerância a estresses abióticos, já que o próprio processo de melhoramento genético pode causar um estreitamento da diversidade genética para caracteres agronômicos (PRATAP; KUMAR, 2014). Etnovariiedades, espécies silvestres ou progenitores de espécies cultivadas podem constituir rica fonte de variabilidade genética ao melhoramento genético de plantas, seja pela transferência vertical, através da hibridização interespecífica, ou por métodos de transferência horizontal, como a transformação genética ou a hibridização somática (BLUM, 2011; PRATAP; KUMAR, 2014).

A análise de perfis de expressão gênica tem se tornado uma ferramenta útil para a investigação de respostas a estresses ambientais (RODRIGUEZ; CANALES; BORRÁS-HIDALGO, 2005),

podendo ser utilizada na identificação de genótipos tolerantes e susceptíveis a um dado estresse. Genótipos que diferem em tolerância ao déficit hídrico devem apresentar diferenças qualitativas e quantitativas em expressão gênica (PIMENTEL et al., 1990), podendo aumentar ou reprimir a expressão de genes, em resposta ao estresse.

Avanços na área da genômica funcional possibilitaram o estudo de respostas de plantas em todos os níveis do transcrito, isto é, um conjunto de transcritos em uma célula para um estágio de desenvolvimento específico ou condição fisiológica, revelando a natureza complexa das respostas multigênicas em plantas (PAYTON et al., 2009; MARTINS, 2011), o que vem contribuindo para o entendimento dos mecanismos moleculares de tolerância em plantas. Diferentes técnicas de análise de expressão gênica a partir de cDNA (DNA complementar) tem sido utilizadas para identificar genes diferencialmente expressos durante períodos de déficit hídrico.

Estudos de análise de expressão gênica podem ser realizados por meio do método de RT-qPCR. O desenvolvimento de RT-qPCR facilitou a detecção de transcritos por ser mais sensível, preciso, de boa reprodutibilidade, necessitando de uma quantidade menor de RNA e por apresentar resultados mais rápidos, funcionando da mesma maneira que uma PCR convencional, mas com métodos de quantificação por meio de medidas, em tempo real, da fluorescência associada à síntese de amplicons ao longo dos ciclos da PCR. A fluorescência utilizada é o SYBR® Green I, que se incorpora a qualquer DNA de fita dupla emitindo um sinal fluorescente captado pelo equipamento de RT-qPCR. O aumento desse sinal é captado até atingir um limiar, e o ponto que detecta o ciclo que a reação atingiu o limiar é chamado de Ct (Cycle threshold) ou Cq (Ciclo de quantificação). O valor de Cq é utilizado para quantificar montantes iniciais de DNA/cDNA ou para estabelecer uma curva padrão para estudos de expressão gênica ou análises comparativas (MARTINS, 2011).

Na RT-qPCR é necessária à utilização de um ou mais genes de referência para o controle dos parâmetros experimentais e avaliação da estabilidade de expressão dos genes-candidatos sob condições adversas (GUTIERREZ et al., 2008). De acordo com Morgante et al. (2011), *Actina* (ACT1), *Proteína ribossomal 60S* (60S) e duas *Ubiquitinas* (UBI1 e UBI2) foram os mais adequados como genes de referência universal inter-espécies de *Arachis* por apresentarem expressão constitutiva entre as espécies.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental of Experimental Botany**, Elmsford, v. 59, n. 2, p. 206-216, 2007.
- AUSTRALIAN BUREAU OF AGRICULTURAL AND RESOURCE ECONOMICS AND SCIENCES – ABARES. Drought in Australia: Context, policy and management. Australia China Environment Development Partnership, Canberra, 2012. Disponível em: <[http://www.droughtmanagement.info/literature/GovAustr\\_drought\\_in\\_australia\\_2012.pdf](http://www.droughtmanagement.info/literature/GovAustr_drought_in_australia_2012.pdf)>, Acesso em: fev. 2017.
- BAJJI, M.; KINET, J. M.; LUTTS, S. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerant test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, Netherlands, v. 56702, p. 1-10, 2001.
- BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **International Journal of Food Science Nutrition**, v. 47, n. 3, p. 233-261, 1996.
- BERTIOLI, D. J. et al. An overview of peanut and its wild relatives. **Plant Genetic Resources**, v. 9, n. 1, p. 134-149, 2011.
- BERTIOLI, D. J. et al. The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. **Nature Genetics**, v. 48, n. 2, p. 438-446, 2016.
- BHATNAGAR-MATHUR, P. et al. Stress-inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. **Plant cell reports**, v. 26, n. 12, p. 2071-2082, 2007.
- BLUM, A. Genetic Resources for Drought Resistance. In: \_\_\_\_\_. **Plant Breeding for Water-Limited Environments**. New York: Springer Science+Business Media, 2011. p. 217-234.
- BRASILEIRO, A. C. M. et al. Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. **Plant molecular biology reporter**, v. 33, n. 6, p. 1876-1892, 2015.
- BRAY, E. A.; BAILEY-SERRES, J.; WERETILNYK, E. Response to abiotic stress. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. (Ed.). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. United States of America: American Society of Plant Physiologist, 2000. cap. 22, p. 1158-1203.
- BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant physiology**, v. 103, n. 4, p. 1035-1040, 1993.
- BUROW, M. D. et al. Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. **Molecular Breeding**, v. 2, n. 4, p. 369-379, 1996.
- CARPES, G. M. **Morfologia da germinação das espécies de *Arachis* (Fabaceae)**. 2010. 90 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

- CHAVES, M. M.; OLIVEIRA, M. M. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. **Journal of experimental botany**, v. 55, n. 407, p. 2365-2384, 2004.
- CHEN, M. et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 353, n. 2, p. 299-305, 2007.
- CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (Brasil). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: Safra 2015/16**, n. 12 – Décimo Segundo Levantamento, set 2016. Brasília: Issn 2318-6852, 2016. 180 p. 3 v.
- DEMIDCHIK, V. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 109, p. 212-228, 2015.
- DOS SANTOS, R. C. et al. Novas Cultivares BRS Havana: nova cultivar de amendoim de pele clara. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 41, n. 8, p. 1337-1339, 2006.
- DRAMÉ, K. N. et al. Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 3, p. 236-243, 2007.
- DURE, L. I. Structural motifs in Lea proteins. In: CLOSE, T. J.; BRAY, E. A. (Ed.) **Plant responses to cellular dehydration during environmental stress**. Plant Physiology, 1993. p. 91-103.
- FÁVERO, A. P. **Cruzabilidade entre espécies silvestres de *Arachis* visando à introgressão de genes de resistência a doenças no amendoim cultivado**. 2004. 165 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- FÁVERO, A. P. et al. Study of the Evolution of Cultivated Peanut through Crossability Studies among *Arachis ipaensis*, *A. duranensis*, and *A. hypogaea*. **Crop Science**, v. 46, n. 4, p. 1546-1552, 2006.
- FERNÁNDEZ, A.; KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolution en *Arachis* (*Leguminosae*). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, n. 1/4, p.187-220, 1994.
- GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.
- GREGORY, M. P.; GREGORY, W. C. Exotic germ plasm of *Arachis* L. interspecific hybrids. **Journal of Heredity**, v. 70, n. 3, p. 185-193, 1979.
- GREGORY, W. C.; GREGORY, M. P. Groundnut: *Arachis hypogaea* (*Leguminosae-Papilionatae*). In: SIMMONDS, N. W. (Ed.). **Evolution of Crop Plants**. London: Longman, 1976. p. 151-154.
- GREGORY, W. C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M. P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H. (Ed.). **Advances in Legume Science**. Kew: Royal Botanical Gardens, 1980, p. 469-481.
- GUIMARÃES, P. M. et al. Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 387, 2012.

- GUTIERREZ, L. et al. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. **The Plant Cell**, v. 20, n. 7, p. 1734-1735, 2008.
- HAMMONS, R. O. The origin and history of the groundnut. In: SMARTT, J. (Ed.) **The Groundnut Crop: A scientific basis for improvement**. London: Chapman & Hall, 1994, p. 24-42.
- HARE, P. D.; CRESS, W. A.; VAN STADEN, J. Dissecting the roles osmolytes accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, Weinheim, v. 21, n. 6, p. 535-553, 1998.
- HILU, K. W.; STALKER, H. T. Genetic relationships between peanut and wild species of *Arachis* sect. *Arachis* (*Fabaceae*): Evidence from RAPDs. **Plant Systematics and Evolution**, v. 198, n. 3, p. 167-178, 1995.
- HU, H.; XIONG, L. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 715-741, 2014.
- HUSTED, L. Cytological Studies an the Peanut, *Arachis*. II. **Cytologia**, v. 7, n. 3, p. 396-423, 1936.
- KASUGA, M. et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. **Nature biotechnology**, Lodon, v. 17, n. 3, p. 287-291, 1999.
- KOCHERT, G. et al. RFLP variability in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars and wild species. **Theoretical and Applied genetics**, v. 81, n. 5, p. 565-570, 1991.
- KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W. C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v. 8, n. 1/4, p. 1-186, 1994.
- LAVIA, G. I. Karyotypes of *Arachis palustris* and *A. praecox* (section *Arachis*), two species with basic chromosome number  $x=9$ . **Cytologia**, v. 63, n. 2, p. 177-181, 1998.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. **Avaliação de espécies silvestres de *Arachis*, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico**. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. 2007. 16 p. Boletim de pesquisa e desenvolvimento / Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1676 - 1340; 166.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. **Environmental and Experimental Botany**, v. 84, p. 17-24, 2012.
- LEAL-BERTIOLI, S. C. M. et al. Ultrastructure of the initial interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, n. 11-12, p. 792–796, 2010.
- LIBAULT, M. et al. Legume transcription factor genes: what makes legumes so special?. **Plant Physiology**, v. 151, n. 3, p. 991-1001, 2009.
- LINDEMOSE, S. et al. Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 3, p. 5842-5878, 2013.
- LI, X. et al. Identification of rapidly induced genes in the response of peanut (*Arachis hypogaea*) to water deficit and abscisic acid. **BMC biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 58, 2014.
- LUTTS, S.; KINET, J. M.; BOUHARMONT, J. NaCl induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. **Annals of Botany**, v. 78, n. 3, p. 389-398, 1996.

MAJUMDER, A. L.; SENGUPTA, S.; GOSWAMI, L. Osmolyte regulation in abiotic stress. In: PAREEK, A. et al. (Ed.). **Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation**. Netherlands: Springer Science, 2010. cap. 16, p.349-370.

MARTINS, A.C.Q. **Prospecção e validação de genes-candidatos envolvidos na resistência de amendoim silvestre (*Arachis stenosperma*) ao *Passalora personata*, o agente causal da mancha preta do amendoim**. 2011. 132 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Departamento de Pós-graduação em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MILLA, S. R.; ISLEIB, T. G.; STALKER, H. T. Taxonomic relationships among *Arachis* sect. *Arachis* species as revealed by AFLP markers. **Genome**, v. 48, n. 1, p. 1-11, 2005.

MORGANTE, C. V. et al. Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. **BMC Research Notes**, v. 4, n. 1, p. 339, 2011.

NOGUEIRA, R. J. M. C. et al. Comportamento fisiológico de duas cultivares de amendoim submetidas a diferentes regimes hídricos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 33, n. 12, p. 1963-1969, 1998.

NOGUEIRA, R. J. M. C.; TÁVORA, F. J. A. F. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). In: SANTOS, R. C. dos (Ed.) **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande – PB: EMBRAPA, 2005, p. 16-44.

PAYTON, P. et al. Gene expression profiling in peanut using high density oligonucleotide microarrays. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 265, 2009.

PEÑALOZA, A. P. S.; VALLS, J. F. M. Chromosome number and satellite chromosome morphology of eleven species of *Arachis* (*Leguminosae*). **Bonplandia**, Corrientes, v. 14, n. 1/2, p. 65-72, 2005.

PEREZ-RODRIGUEZ, P. et al. PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. **Nucleic Acids Research**, v. 38, p. 822-827, 2010.

PIMENTEL, C. A perda de água pelas plantas e o seu controle. In: \_\_\_\_\_. **A relação da planta com a água**. Rio de Janeiro: Seropédica: Edur, 2004, p. 92-117.

PIMENTEL, C. A Água no Sistema Solo-Planta-Atmosfera (SSPA). In: \_\_\_\_\_. **A relação da planta com a água**. Rio de Janeiro: Seropédica: Edur, 2004, p. 65-90.

PIMENTEL, C. et al. Estresse hídrico em cultivares de *Phaseolus vulgaris* L. em simbiose com o *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. **Turrialba**, San José, v. 40, p. 520-526, 1990.

PRATAP, A.; KUMAR, J. Alien Gene Transfer in Crop Plants: An Introduction. In: \_\_\_\_\_. (Ed.). **Alien Gene Transfer in Crop Plants, Volume 1: Innovations, Methods and Risk Assessment**. New York: Springer Science+Business Media, 2014. p. 1-23.

PROITE, K. et al. Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. **Plant Pathology**, v. 57, n. 5, p. 974-980, 2008.

RODRIGUES, L. S. **Análise das relações de cruzabilidade interespecífica e interseccional no gênero *Arachis***. 2006. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Julio Mesquita Filho, Botucatu. 2006.

- RODRÍGUEZ, M.; CANALES, E.; BORRÁS-HIDALGO, O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. **Biotecnología Aplicada**, v. 22, n. 1, p. 1-10, 2005.
- SANTOS, R. C. dos; GODOY, J. I.; FÁVERO, A. P. Melhoramento do amendoim. In: SANTOS, R. C. dos (Ed.) **O Agronegócio do Amendoim no Brasil**. Campina Grande – PB: EMBRAPA, 2005, p. 123-192.
- 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, p. 287-294, 1998.
- SCHÄFFER, C. C. **Mapeamento espacial e modelagem da distribuição potencial do gênero *Arachis* (Fabaceae) no Brasil e análise da ocorrência em unidades de conservação**. 2012. 160 f. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Botânica, Universidade de Brasília, Brasília, 2012.
- SHAMEER, K. et al. STIFDB—Arabidopsis stress responsive transcription factor dataBase. **International journal of plant genomics**, v. 2009, 1-8, 2009.
- SHARMA, K. K.; ANJIAH, V. An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation. **Plant Science**, v. 159, n. 1, p. 7-19, 2000.
- SEIJO, J. G. et al. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). **American Journal of Botany**, v. 91, n. 9, p. 1294-1303, 2004.
- SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions? **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 333-341, 2002.
- SHULAEV, V.; OLIVER, D. J. Metabolic and proteomic markers for oxidative stress new tools for reactive oxygen species research. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 141, n. 2, p. 367-372, 2006.
- SIMPSON, C. E. et al. Registration of 'NemaTAM' peanut. (Registrations Of Cultivars). **Crop Science**, v. 43, n. 4, p. 1561-1562, 2003.
- SIMPSON, C. E. Use of wild *Arachis* species/introgression of genes into *A. hypogaea* L. **Peanut Science**, v. 28, n. 2, p. 114-116, 2001.
- SLATTERY, R. A. et al. Light sheet microscopy reveals more gradual light attenuation in light-green versus dark-green soybean leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 67, n. 15, p. 4697-4709, 2016.
- STALKER, H. T. A new species in section *Arachis* of peanuts with a D genome. **American Journal of Botany**, v. 78, n. 5, p. 630-637, 1991.
- VALLS, J. F. M. Recursos genéticos de *Arachis*: avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. **Agrociencia**, Montevideo, v. 9, n. 1-2, p. 123-132, 2005.
- VALLS, J. F. M. Taxonomia do gênero *Arachis* à luz das investigações mais recentes. In: ENCUESTRO INTERNACIONAL DE ESPECIALISTAS EN *ARACHIS*, 5., 2006, Córdoba, Argentina. Conferencias y poster. Córdoba: Fundacion Mani Argentino, 2006.
- VALLS, J. F. M.; SIMPSON, C. E. New species of *Arachis* L. (Leguminosae) from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, Corrientes, v.14, n. 1/2, p.35-63, 2005.



WANG, C. T. et al. Phylogeny of *Arachis* based on internal transcribed spacer sequences. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 58, n. 2, p. 311-319, 2011.

ZHANG, J. et al. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. **Field Crops Research**, v. 97, n. 1, p. 111-119, 2006.

## CAPÍTULO II

### RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE *Arachis* SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

## RESPOSTAS FISIOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS DE ESPÉCIES DE *Arachis* SUBMETIDAS AO DÉFICIT HÍDRICO

Danubia Rita de Sá Leal<sup>a, b</sup>; Agnaldo Rodrigues de Melo Chaves<sup>b</sup>; Raimundo Parente de Oliveira<sup>b</sup>;  
Carolina Vianna Morgante<sup>b, \*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>b</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, Petrolina, PE, Brasil.

\*e-mail: carolina.morgante@embrapa.br

### Resumo

Este estudo visou caracterizar e comparar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à resposta à deficiência hídrica entre espécies do gênero *Arachis*. Cinco espécies de *Arachis* (*A. magna*, *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. triseminata* e *A. hypogaea*) foram submetidas a três níveis de hidratação do solo (20, 45 e 75% da Capacidade de Pote – CP) em casa de vegetação. Após cinco dias, foram avaliados em folhas, o teor relativo de água (TRAf), trocas gasosas e fluorescência da clorofila, o teor de pigmentos fotossintéticos, o extravasamento de eletrólitos (EL), a concentração de aldeído malônico (MDA) e de prolina. O TRAf reduziu e o MDA e EL aumentaram em função da severidade do déficit hídrico em todas as espécies, porém, não foram úteis como indicativo de tolerância. Reduções observadas nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência, sugerem que reduções em *A* podem ter sido resultantes de limitações não estomáticas. *A. triseminata* apresentou valores superiores de  $g_s$ . A sensibilidade do aparato fotossintético ao estresse a 20% da CP foi observada pelas reduções nos teores de clorofila *a* e carotenoides. O maior valor de prolina observado em *A. hypogaea* BRS Havana sugere que esta variedade pode ter sido favorecida por seleção indireta com plantas de maior teor de prolina sob déficit hídrico durante o seu desenvolvimento e que podem haver mecanismos diferenciados de ajuste osmótico entre a espécie cultivada e as silvestres. Os resultados apontam a sensibilidade dos parâmetros avaliados à deficiência hídrica em *Arachis* spp., no entanto, para a avaliação de tolerância à seca mostraram-se inconsistentes, tornando-se necessário a avaliação de outros parâmetros bioquímicos e dos aspectos genéticos para a definição das vias de tolerância envolvidas.

Palavras-chave: amendoim, seca, espécies silvestres, tolerância, ajuste osmótico.

## 1. Introdução

As plantas, em habitats agrícolas ou naturais, podem ter o seu desenvolvimento afetado por variados tipos de estresses, sejam bióticos ou abióticos. Entre estes, o déficit hídrico, causado geralmente por períodos alternados ou contínuos sem precipitação, ocorre na maioria dos ambientes, e constituiu-se como um dos fatores ambientais mais severos, causando danos e limitando a produtividade de culturas em todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais, áridas e semiáridas (Chaves e Oliveira, 2004; Rao et al., 2006).

Para se adaptar e sobreviver à deficiência hídrica, as plantas são induzidas a produzir uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas, sendo que o impedimento da absorção de água pelas raízes provoca a paralisação do crescimento e o fechamento estomático, causando diminuição da transpiração e redução da absorção de dióxido de carbono necessário para a produção de biomassa pela fotossíntese (Pimentel, 2004). A desidratação celular resulta em perda de água do citosol e vacúolos para o apoplasto; o ajuste osmótico ocorre pelo acúmulo de osmólitos compatíveis, como a prolina, carboidratos e proteínas solúveis. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) resulta no processo de estresse oxidativo, expresso pela peroxidação de lipídeos e dano oxidativo de DNA e proteínas (Demidchik, 2015). No entanto, para o entendimento desses mecanismos relacionados à resposta de plantas ao déficit hídrico, tornam-se necessários estudos coordenados dos aspectos fisiológicos e bioquímicos envolvidos.

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.), uma oleaginosa de potencial econômico pelo seu alto teor de óleo e proteínas essenciais à nutrição, é cultivado em regiões com variadas condições de disponibilidade hídrica, sendo encontrado tanto em ambientes úmidos como no semiárido (Nogueira e Távora, 2005). Porém, a seca é apontada como um dos principais fatores limitantes, responsável por perdas ou redução da produtividade no semiárido. No Brasil, a produção de amendoim estimada para safra 2015/16 foi de 406,1 mil toneladas. Deste total, a maior produção concentrou-se na região Sudeste do país com cerca de 90% e produtividade equivalente a 3.394 kg/ha. Ao passo que, na região Nordeste, onde predomina o clima semiárido, a produtividade foi de 989 kg/ha e a produção estimada não ultrapassou 1% da produção nacional (Conab, 2016), o que evidencia os efeitos da seca sobre essa cultura.

Santos et al. (2005), ressaltam a introdução de características de resistência ou tolerância à seca em novas cultivares como um dos principais objetivos dos programas de melhoramento do amendoim, de forma a aumentar o rendimento da cultura no Nordeste brasileiro. Espécies silvestres de *Arachis* apresentam-se como fonte de variabilidade genética para fatores de estresses abióticos, de modo que, poderão ser eficientemente utilizadas no melhoramento genético de *A. hypogaea* (Bertioli

et al., 2011). No entanto, o entendimento dos mecanismos fisiológicos e bioquímicos é essencial para o planejamento da utilização dessas espécies em programas de melhoramento.

Assim, tendo em vista o potencial econômico do amendoim e os prejuízos decorrentes de redução ou perdas de produção em períodos de seca, este estudo visou caracterizar e comparar os mecanismos fisiológicos e bioquímicos associados à resposta à deficiência hídrica entre espécies do gênero *Arachis* (*A. magna*, *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. triseminata* e *A. hypogaea*), por meio da análise do comportamento do balanço hídrico, de trocas gasosas e bioquímica.

## 2. Material e métodos

### Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, localizada na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, no período compreendido entre julho e agosto de 2016. Sementes de *A. duranensis* (K7988), *A. magna* (KG30097) e *A. ipaensis* (KG30076), foram fornecidas pelo Banco Ativo de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis*, localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF. Sementes de *A. hypogaea*, variedade BRS Havana, são comercialmente adquiridas. As sementes de *A. triseminata* foram coletadas em região da Caatinga, no Campo Experimental de Mandacaru da Embrapa Semiárido, em Juazeiro, BA.

Sementes das cinco espécies avaliadas foram tratadas com fungicida Captan SC (Milenia) 0,3% por um min, secadas e germinadas em papel de germinação umedecido com Ethrel 720 (Bayer) 0,6% por três dias em caixas do tipo gerbox a 28 °C. As plântulas foram transplantadas individualmente para vasos de 1,2 L, contendo uma mistura de areia, barro vermelho e húmus de minhoca na proporção de 1:1:1. Para cada 50 L do referido substrato, foram adicionados 375 g de adubo NPK 6/24/12. As plantas foram mantidas em telado e regada a cada dois dias. O controle de ataque de insetos e fungos foi realizado por meio da pulverização quinzenal de Actara (Syngenta) 0,7% e Amistar Top (Syngenta) 0,1%, respectivamente.

### Desenho experimental e imposição do déficit hídrico

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso, com três repetições, em esquema fatorial 5x3, com cinco espécies e três níveis de hidratação do solo. Cada parcela foi composta por três plantas com 60 dias de idade para as espécies silvestres e com 30 dias para *A. hypogaea*, totalizando 45 plantas por bloco. A imposição do déficit hídrico foi conduzida, utilizando o método descrito por Ding et al. (2014), no qual a quantidade máxima de água retida pelo solo no vaso, expressa em porcentagem de massa, é considerada como 100% de capacidade de pote (CP) e, os três níveis de hidratação do solo definidos foram: 75% da CP (controle), 45% da CP (estresse moderado) e 20% da CP (estresse severo), durante cinco dias. A manutenção dos tratamentos hídricos foi monitorizada gravimetricamente pela pesagem diária dos vasos para a determinação da umidade do solo e da CP diária. A quantidade de água repostada correspondeu à diferença entre o volume máximo de água que o solo deveria ter e o volume de água presente no solo para cada nível de estresse.

## Avaliações fisiológicas e bioquímicas

### 2.3.1 Trocas gasosas, fluorescência e estado hídrico da planta

No último dia de imposição do déficit hídrico, no intervalo entre 8:00 e 11:00 h, folíolos completamente expandidos foram utilizados para realizar avaliações de trocas gasosas (fotossíntese –  $A$ , condutância estomática –  $g_s$  e eficiência intrínseca do uso água –  $A/g_s$ ) e fluorescência (razão da fluorescência variável/máxima –  $F_v'/F_m'$  na presença de luz, taxa de transporte de elétrons – TTE e rendimento quântico de transporte de elétrons –  $\Phi_{FSII}$ ), utilizando-se o analisador de gases por infravermelho (Infra-Red Gas Analyser – IRGA, LI-6400XT, Licor). O teor relativo de água foliar (TRAf) foi mensurado conforme descrito por Barr e Weatherley (1962), utilizando a fórmula:

$$\text{TRAf (\%)} = \left( \frac{PF - PS}{PT - PS} \right) \times 100$$

onde, PF é o peso fresco; PS, peso seco e PT, peso túrgido. Folhas frescas, para cada ponto de análise, foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  para análises bioquímicas.

### Avaliação de dano a membranas

A avaliação de dano a membranas foi realizada por duas metodologias: quantificação de aldeído malônico (MDA) e determinação de Extravazamento de eletrólitos (EL). A quantificação de MDA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cakmak e Horst (1991), medindo-se as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em  $\mu\text{ mol de MDA g}^{-1}\text{ MS}$  (Massa Seca). O EL foi determinado a partir de seis discos foliares de 1 cm de diâmetro acondicionados em tubos do tipo Falcon contendo 10 mL de água deionizada, mantidos por 2 h à temperatura ambiente para a leitura da condutividade elétrica da solução (C1). Em seguida, os tubos de ensaio foram incubados a  $90\text{ }^\circ\text{C}$  por 30 min e, após entrarem em equilíbrio térmico com o ambiente, procedeu-se nova leitura (C2) da condutividade elétrica da solução. O EL foi calculado conforme a fórmula (Lutts et al., 1996):

$$\text{EL (\%)} = \left( \frac{C1}{C2} \right) \times 100$$

### Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Carotenoides totais, clorofilas *a* e *b* e clorofila total foram extraídos em acetona 80% e quantificados por espectrofotometria, de acordo com Lichtenthaler (1987). Os resultados foram expressos em  $\mu\text{g/g de MS}$ .

### **Quantificação de prolina livre**

A concentração de prolina livre, extraída a partir de folhas maceradas em ácido sulfossalicílico 3%, foi quantificada seguindo a metodologia descrita por Bates et al. (1973). O teor de prolina foi determinado a partir de uma curva padrão e expresso em  $\mu$  mol/g de MS.

### **2.4. Análises estatísticas**

A análise estatística dos dados fisiológicos e bioquímicos foi realizada utilizando-se o software SAS (SAS Institute, versão 9.2, 2002-2008). Os dados médios por parcela foram submetidos ao Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal, foi realizada a análise de variância (ANOVA) pelo Teste “F”, seguido do Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para a variável TRAf, que não apresentou distribuição normal, foi realizada a análise não paramétrica pelo Teste de Kruskal-Wallis, seguido do Teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ).

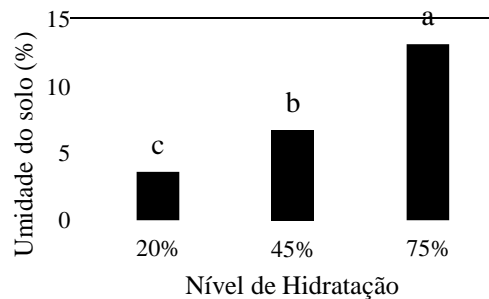


### 3. Resultados e discussão

Para todas as variáveis analisadas estatisticamente, não houve variação significativa da interação espécie x tratamento, com exceção daquela relacionada à eficiência do uso da água, evidenciando que as cinco espécies analisadas respondem de forma semelhante ao déficit hídrico.

#### Estado hídrico foliar e do solo

Os dados de umidade do solo, medido pelo método gravimétrico, suportam a metodologia utilizada para a imposição do déficit hídrico pela medida de CP, uma vez que foram observados valores significativamente diferentes de umidade de solo nos três níveis de hidratação analisados (Figura 1).



**Figura 1.** Umidade do solo (%), medida pelo método gravimétrico, das amostras submetidas a 20, 45 e 75% da capacidade de pote. Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

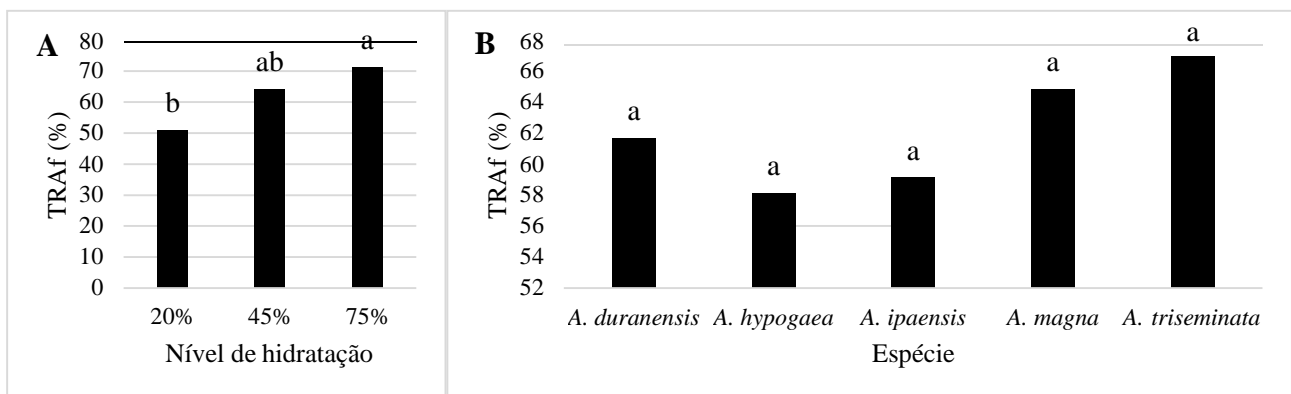
O TRAf seguiu tendência a redução em função do aumento da severidade do déficit hídrico. Verificou-se redução significativa no conteúdo de água das folhas em plantas a 20% de CP, com declínio de 28,37% em relação às plantas controle (Figura 2A). Não foi observada variação significativa do TRAf entre espécies, no entanto, *A. triseminata* e *A. magna* apresentaram as maiores médias de TRAf (Figura 2B). Curiosamente, estas foram as plantas que, em análise visual simples de murcha foliar e fechamento de folíolos, mostraram-se menos sensíveis ao déficit hídrico (Figura 3).

O TRAf é citado em algumas literaturas como uma variável que determina a capacidade de uma planta absorver água sob condições de estresse hídrico, podendo ser usado na determinação de tolerância à seca para algumas culturas. Em *Arachis hypogaea* foi documentada, de forma geral, redução do TRAf em função do aumento da intensidade do déficit hídrico (Reddy et al., 2003). Na comparação entre variedades tolerantes e susceptíveis em experimentos em vasos, parece não haver um consenso sobre a relação entre o TRAf e a tolerância à deficiência hídrica. Lauriano et al. (2004) não observaram variações significativas de TRAf entre duas cultivares tolerantes e uma suscetível, após suspensão da rega durante nove dias. Resultados similares foram reportados por Jeyaramraja e

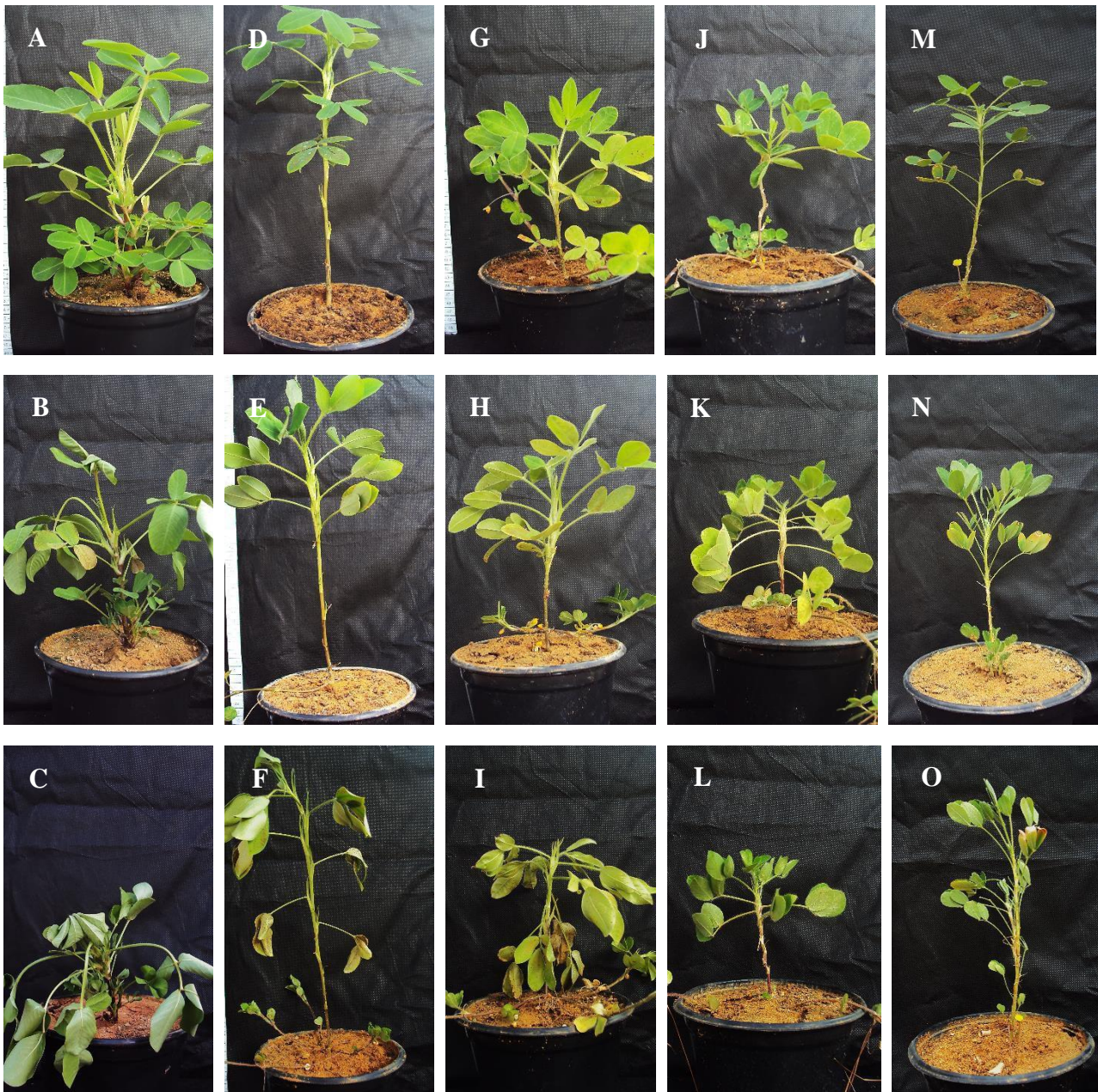
Thushara (2013), ao analisarem nove variedades, tolerantes e susceptíveis, submetidas à suspensão de rega durante duas semanas. Já Ranganayakulu et al. (2012, 2015) demonstraram que, apesar de ocorrer redução do TRAf em cultivares suscetível e tolerante mantidas a 25% da CP durante três dias, os valores de TRAf nesta última foram significativamente maiores.

Já em relação às espécies silvestres do gênero *Arachis*, não há descrita na literatura a avaliação da variável TRAf em plantas submetidas à deficiência hídrica em vasos. Azevedo Neto et al. (2010) avaliaram o potencial hídrico foliar, variável com alta correlação negativa ao TRAf (Ramesh Babu e Rao, 1983), em plantas submetidas a 20 dias de suspensão da rega, das espécies silvestres *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. stenosperma* e da espécie cultivada, *A. hypogaea*, e conforme esperado, foram observadas diferenças significativas entre os valores obtidos para plantas controle e tratamento. Os autores registraram redução mais acentuada para *A. hypogaea*, sendo que entre as espécies silvestres, a redução dos valores de potencial hídrico foliar foi similar.

Os dados aqui apresentados estão de acordo com aqueles da literatura que demonstram que o estado hídrico foliar de plantas de *Arachis* spp., tanto de espécies silvestres como de cultivadas, é sensível à desidratação do solo. No entanto, esta característica em *Arachis* spp. não é útil como um indicativo de tolerância ao déficit hídrico. Plantas de *Arachis hypogaea*, cultivadas em solo e mantidas em estado severo de desidratação apresentaram valores de TRAf variando entre 80 a 20% (Jeyaramraja e Thushara, 2013; Pruthvi et al., 2013), o que sugere a sensibilidade à variação dessa medida a fatores como a metodologia, intensidade e duração do déficit hídrico imposto, condições de temperatura e umidade relativa do ar e material vegetal. Padmavathi e Rao (2013), por exemplo, constatarem a redução de valores de TRAf em função da idade de plantas de *A. hypogaea* mantidas sob hidratação.



**Figura 2.** Teor Relativo de Água foliar (TRAf %) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias por (A) nível de hidratação e (B) por espécie seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Dunn ( $p \leq 0,05$ ).



**Figura 3.** Fenótipo de espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 75 (controle), 45 e 20% da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. A. *hypogaea* (A, B e C) sob 75, 45 e 20%, respectivamente; *A. magna* (D, E e F) sob 75, 45 e 20%, respectivamente; *A. ipaensis* (G, H e I) sob 75, 45 e 20%, respectivamente; *A. duranensis* (J, K e L) sob 75, 45 e 20%, respectivamente; *A. triseminata* (M, N e O) sob 75, 45 e 20%, respectivamente.

### Trocas gasosas e fluorescência

A deficiência hídrica reduziu significativamente as taxas de  $A$  e  $g_s$  nas cinco espécies analisadas. Essas variáveis seguiram comportamento semelhante, com valores intermediários em plantas sob déficit hídrico moderado, a 45% da CP (Figura 4A e B). Em todas as espécies analisadas, a restrição de água no solo induziu o fechamento estomático, como estratégia para redução de perda de água por transpiração, e consequentemente, redução da fixação de  $CO_2$ . As taxas fotossintéticas não diferiram significativamente entre espécies (Figura 4C), no entanto, *A. triseminata* apresentou

valores superiores de  $g_s$  (Figura 4D). Nas outras espécies analisadas, não houve diferença significativa entre os valores de  $g_s$  (Figura 4D).

Não há na literatura relato da avaliação de trocas gasosas por meio de medidas com o analisador de gases por infravermelho em espécies silvestres do gênero *Arachis*. No entanto, Azevedo Neto et al. (2010) na avaliação de  $E$  e  $g_s$  utilizando um porômetro, observaram que plantas de *A. ipaensis* mantidas em vasos, após 20 dias de suspensão da rega, apresentaram os maiores valores de  $E$  e  $g_s$ , em contraste com plantas das espécies *A. duranensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea*, submetidas ao mesmo tratamento. Os autores ainda constataram que *A. ipaensis* apresentou a menor redução de crescimento, determinada pela massa seca de parte aérea, e concluíram a superioridade desta espécie quanto à tolerância à seca. Em concordância com esses dados, Leal-Bertioli et al. (2012) registraram altas taxas de  $E$  e de perda de água por unidade de área foliar para *A. ipaensis*, em experimento do tipo *dry-down*. Esses resultados corroboram os dados aqui apresentados, os quais indicam a tendência de *A. ipaensis* a manter  $g_s$  superior sob déficit hídrico, o que justificaria a observação fenotípica de que essas plantas apresentaram sintomas de murcha foliar e fechamento de folíolos mais acentuados, em comparação às outras espécies silvestres (Figura 3).

Na comparação entre variedades de *A. hypogaea* tolerantes e susceptíveis à seca, Jeyaramraja e Thushara (2013) observaram, em plantas mantidas em vasos, 14 dias após a suspensão da rega, redução significativa de  $g_s$  e  $A$  entre plantas controle e tratamento. Plantas consideradas tolerantes apresentaram valores superiores de  $A$ , em comparação a susceptíveis, sob déficit hídrico. No entanto, nesta condição, não foram observadas diferenças significativas entre os valores de  $g_s$  e de massa seca de parte aérea e raiz, de plantas tolerantes e susceptíveis. Além disso, de Lima Pereira et al. (2015) não observaram diferenças significativas, entre plantas controle e submetidas a 10 dias de suspensão da rega, nos parâmetros de  $A$ ,  $E$  e  $g_s$ , de três genótipos de *A. hypogaea* apresentando tolerância diferenciada ao déficit hídrico.

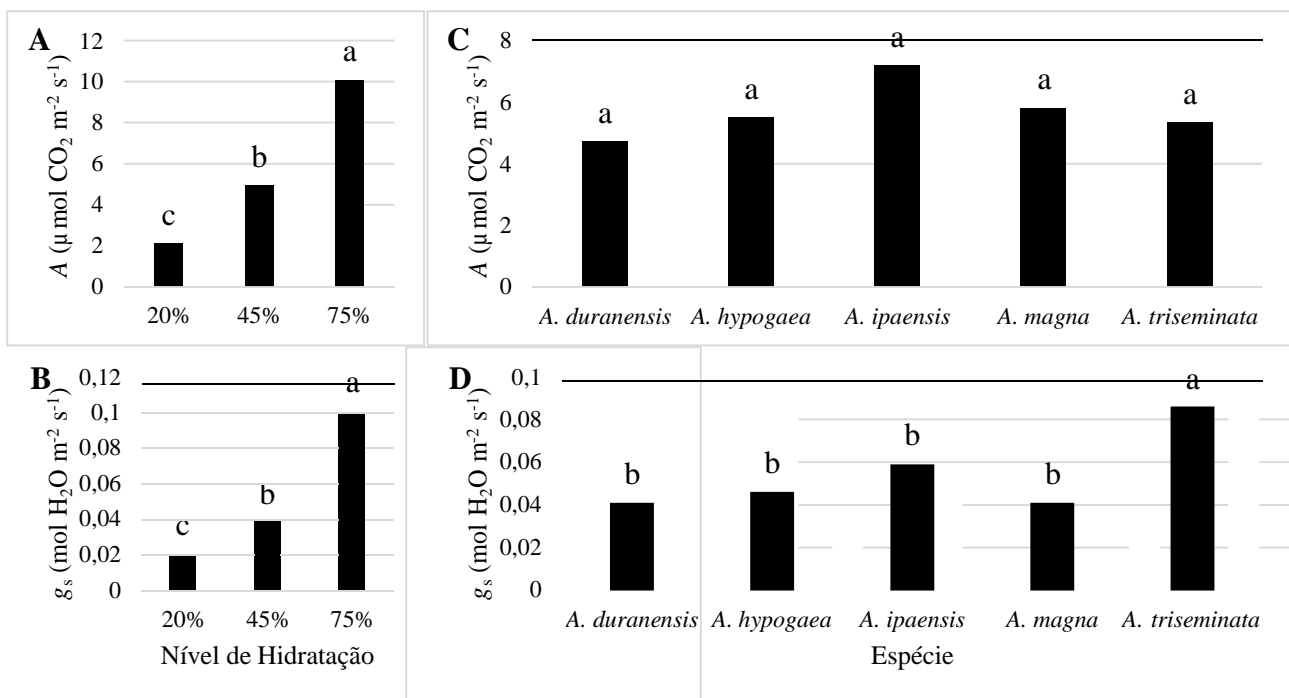
Desta forma, pode-se considerar prematuro o estabelecimento de uma correlação entre medidas de  $g_s$  e a tolerância ao déficit hídrico em *Arachis* spp. Quanto aos valores de  $A$ , especula-se que variações entre variedades/espécies tolerantes e susceptíveis possam ser observadas somente após a exposição ao déficit hídrico prolongado. Isso explicaria o fato de não terem sido observadas diferenças significativas nos valores de  $A$  entre as cinco espécies aqui analisadas e também entre os genótipos de *A. hypogaea* analisados por de Lima Pereira et al. (2015).

O fato de *A. triseminata* ter apresentado valor superior de  $g_s$  e a tendência a manutenção de um maior TRAf sob déficit hídrico, em comparação às outras espécies analisadas, sugere a presença de um possível mecanismo de aclimação diferenciado nesta espécie para retardar ou minimizar os efeitos causados pela exposição ao estresse, o que pode ser reforçado por essa espécie ser endêmica

da Caatinga, bioma localizado na região semiárida brasileira, com estação de seca bem demarcada. Outras avaliações seriam necessárias para constatar e explicar essa observação.

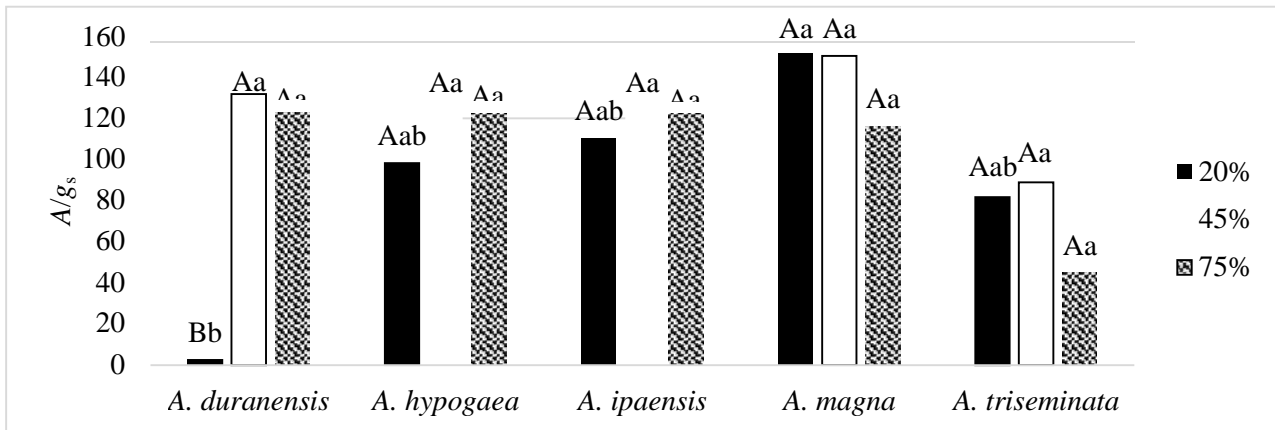
Quanto à eficiência do uso da água, medida pela razão  $A/g_s$  (intrínseca), foram observadas reduções significativas em resposta ao tratamento somente em *A. duranensis* a 20% da CP (Figura 5), apontando uma possível susceptibilidade dessa espécie ao déficit hídrico, visto que, a esse nível de hidratação não houve perda de água por transpiração, mas também não houve incorporação de  $\text{CO}_2$ , evidenciando a ineficiência do uso da água e iniciando uma possível limitação bioquímica da fotossíntese. Lauriano et al. (2004) e Jeyaramraja e Thushara (2013) observaram redução dos valores de eficiência do uso da água em plantas de *A. hypogaea* submetidas ao déficit hídrico. Apesar de estes últimos autores terem associado à tolerância ao déficit hídrico a valores mais elevados de eficiência do uso da água em plantas sob estresse, esta relação não foi observada por Lauriano et al. (2004).

As reduções de  $A$  a 20 e 45% da CP podem ter sido resultantes de limitações não estomáticas. Lauriano et al. (2004) relataram resultados similares em *A. hypogaea* submetida ao déficit hídrico e ainda observaram uma diminuição da atividade da enzima ribulose 1,5 bifosfato carboxilase/oxigenase (Rubisco), reforçando a hipótese de que os efeitos da redução em  $A$  são devido a fatores não estomáticos, possivelmente pela inibição do transporte de elétrons nos tilacoides.



**Figura 4.** Taxa de fotossíntese ( $A$ ) e condutância estomática ( $g_s$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias por nível de hidratação (A a D) e por espécie (D a H) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).





**Figura 5.** Eficiência intrínseca do uso da água ( $A/g_s$ ) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias seguidas pela mesma letra maiúscula (nível de hidratação) e seguidas pela mesma letra minúscula (espécie) não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As limitações não estomáticas em *A* podem ser relacionadas à inibição ou redução de  $F'_v/F'_m$ ,  $\Phi$ FSII e TTE resultantes de danos a integridade das membranas, visto que, isso implicaria na inibição da síntese de Adenosina trifosfato (ATP) e na produção de Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH), que são utilizados como substratos na fase bioquímica da fotossíntese.

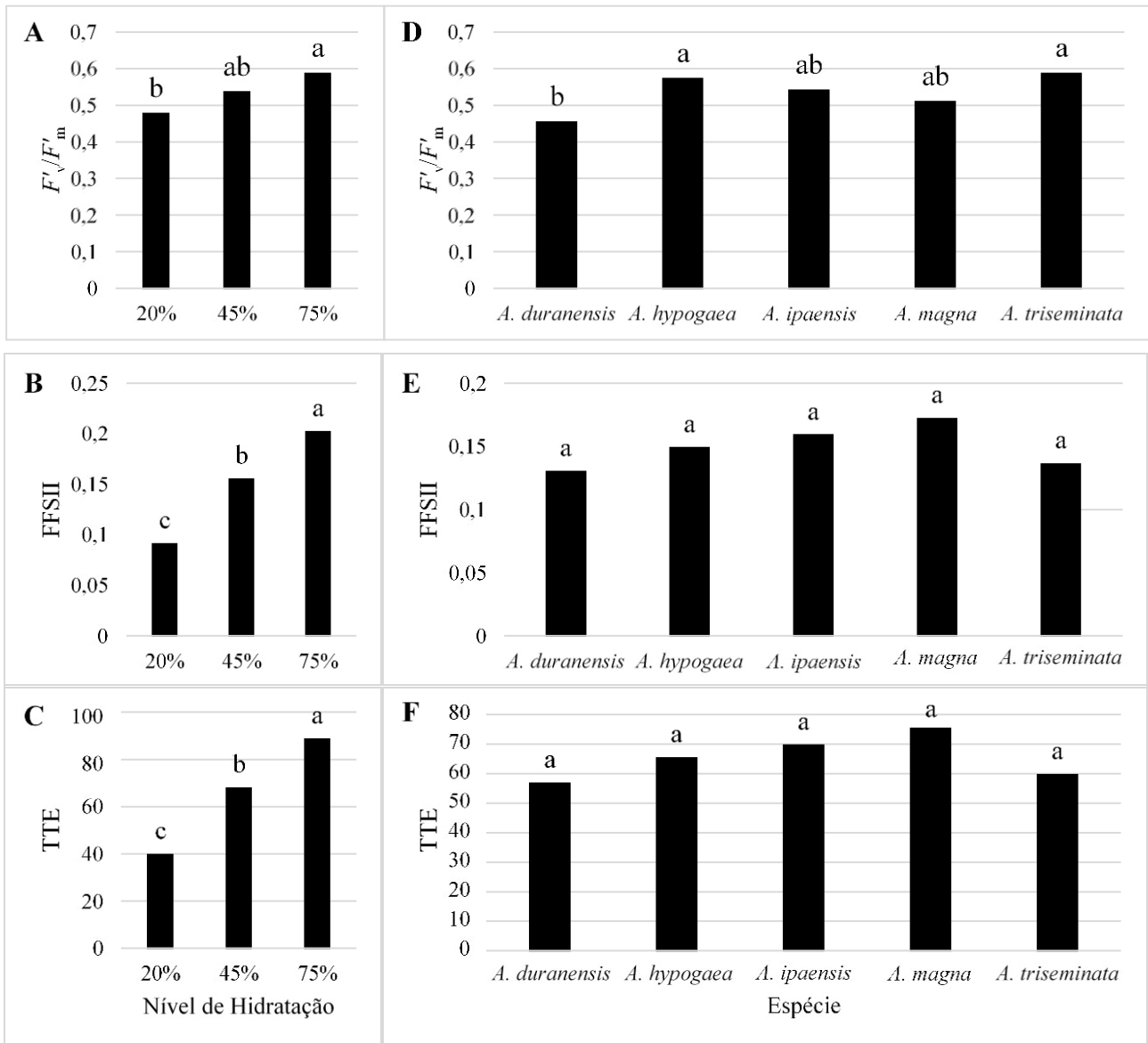
No presente estudo, os valores de  $F'_v/F'_m$  obtidos em plantas sob déficit hídrico revelaram que o rendimento fotoquímico máximo do fotossistema II (PSII), obtidos na presença de luz foi significativamente afetado somente em plantas a 20% da CP, em comparação ao controle, em todas as espécies analisadas. *A. duranensis* apresentou o menor valor de  $F'_v/F'_m$ , em comparação a *A. hypogaea* e *A. triseminata* (Figura 6A e D). Reduções significativas no  $\Phi$ FSII e na TTE foram observadas em plantas a 20 e 45% da CP, em todas as espécies analisadas (Figura 6B e C). *A. duranensis* apresentou os menores valores de  $\Phi$ FSII e TTE, apesar de não terem diferido significativamente em relação as demais espécies (Figura 6E e F).

A fluorescência da clorofila é considerada uma medida indireta da eficiência dos processos fotoquímicos da fotossíntese, uma vez que a energia dissipada por fluorescência é inversamente proporcional à conversão em energia química. Valores de fluorescência podem ser relacionados à eficiência do PSII, o mais sensível ao déficit hídrico.

Não foram encontrados na literatura estudos com relato de  $F'_v/F'_m$  sob luz. Em concordância com os dados aqui apresentados, Clavel et al. (2006) observaram que plantas de *A. hypogaea* mantidas em campo com suspensão da irrigação apresentaram redução dos valores de  $F_v/F_m$  em folhas na ausência de luz, em comparação com plantas irrigadas. Os autores ainda estabeleceram correlação positiva entre valores de  $F_v/F_m$  e o índice de “structure function” (SFI) ou índice de vitalidade da membrana celular, o qual reflete a fração de fenômenos não fotoquímicos quando a maioria dos

centros de reação do PSII estão abertos para a máxima absorção de fótons. Kalariya et al. (2013) também observaram que plantas de *A. hypogaea* mantidas em campo com suspensão da irrigação nos períodos de floração e de desenvolvimento de vagens apresentaram redução significativa de  $F_v/F_m$  sob escuro, em condições de déficit hídrico em relação aos controles. Estes autores observaram também, reduções significativas no  $\Phi_{FSII}$  nas plantas sob déficit hídrico, corroborando com os resultados apresentados neste estudo, porém, com diferenças significativas entre variedades e interação de variedades e tratamento, o que diferiu deste estudo. Diferentemente, Akcay et al. (2010) não observaram diferenças nos valores de  $F_v/F_m$  de plântulas adaptadas ao escuro induzidas ao déficit hídrico por meio do tratamento com PEG (polietilenoglicol) 6000 e atribuíram o resultado à intensidade do estresse imposto.

Os resultados de  $F'_v/F'_m$ ,  $\Phi_{FSII}$  e TTE observados neste estudo, corroboram a hipótese de limitações não estomáticas em *A* nas espécies analisadas, além de reforçar a ideia de susceptibilidade à seca em *A. duranensis* pela associação com os dados de eficiência no uso da água.



**Figura 6.** Razão da Fluorescência variável e máxima na presença de luz ( $F'_v/F'_m$ ) (A e D), rendimento quântico do transporte de elétrons ( $\Phi_{FSII}$ ) (B e E) e taxa de transporte de elétrons (TTE) (C e F) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias por nível de hidratação (A a C) e por espécie (D a F) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### Danos em membranas

Os efeitos do déficit hídrico sobre os danos de membrana foram avaliados pela concentração de MDA e pelo percentual de EL em folhas, visto que a deficiência hídrica em plantas pode causar aumento na produção de EROs e consequentemente, aumento na peroxidação de lipídios e alterações na estabilidade das membranas.

No presente estudo, foi observada a tendência a um aumento da concentração de MDA e do EL em decorrência do aumento da intensidade do déficit hídrico, sendo os efeitos mais pronunciados registrados em plantas a 20% da CP (Figura 7A e B). Ao comparar as médias de teor de MDA obtidas por espécie, observaram-se os menores valores para *A. duranensis*, *A. magna* e *A. ipaensis*. O maior



acúmulo de MDA foi registrado para *A. triseminata*, seguida por *A. hypogaea* (Figura 7C). Para a análise dos dados de EL por espécie, foram utilizadas somente as médias referentes aos níveis de hidratação a 45 e 75% de CP. Dessa forma, não foram observadas diferenças significativas entre espécies para danos de membrana decorrentes de alterações na estabilidade de membranas (Figura 7D).

Ranganayakulu et al. (2012) demonstraram, por meio da análise de EL, a tendência de variedades tolerantes de amendoim serem menos sensíveis ao dano de membranas em relação às suscetíveis, em estado de déficit hídrico. Em concordância com esses dados, Lauriano et al. (2000) também demonstraram o efeito do déficit hídrico, induzido por PEG 6000, no aumento do EL em folhas de cultivares de amendoim e observaram a menor sensibilidade daquelas consideradas tolerantes. Os autores ainda estabeleceram uma relação positiva entre a concentração de acil-lipídios, principais componentes de membranas de células vegetais, e a integridade de membranas, o que valida o método como indicativo de ocorrência de dano de membrana em *Arachis* spp.

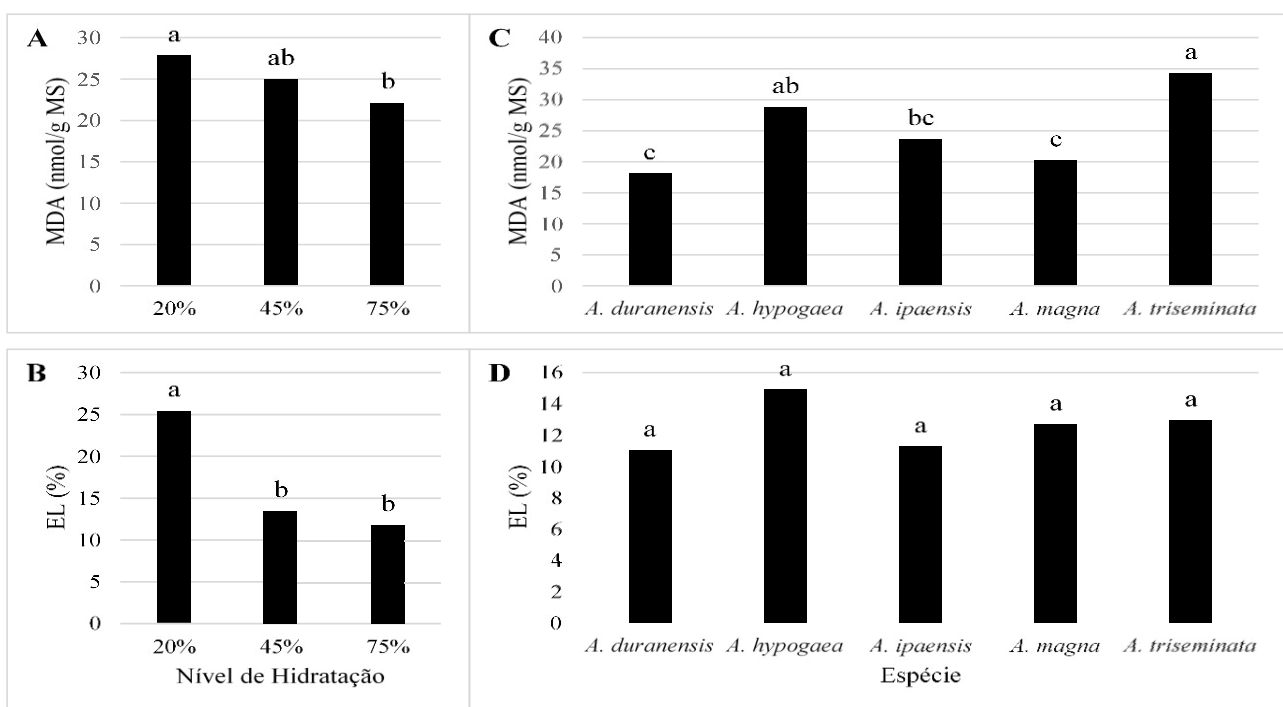
O teor de MDA foi avaliado em duas cultivares de amendoim consideradas tolerante e suscetível ao déficit hídrico induzido pelo tratamento de plântulas com PEG 6000 (Akçay et al., 2010). Os autores observaram aumento significativo no teor de MDA somente na cultivar tolerante submetida ao estresse, em comparação ao controle. Já para a cultivar suscetível, não foi detectada diferença significativa entre plantas controle e tratamento. Neste mesmo estudo, não foram observadas diferenças no extravasamento de eletrólitos entre plantas controle e tratamento, de ambas cultivares. Os autores sugeriram a presença de um mecanismo de rápida reposição de fosfolipídios para a proteção da integridade de membranas, especialmente na cultivar tolerante.

Também não foi observada variação significativa dos teores de MDA em plantas de amendoim superexpressando *AtDREB1A*, com Eficiência de Transpiração (ET) superior, quando submetidas ao déficit hídrico, em relação ao controle. Já em plantas selvagens, o acúmulo de MDA foi detectado em função do aumento da severidade do estresse. Interessantemente, os autores não encontraram uma correlação entre os níveis de MDA e a ET em plantas transgênicas (Bhatnagar-Mathur et al., 2009).

Os dados descritos na literatura estão de acordo com aqueles aqui observados e reforçam o efeito negativo do déficit hídrico sobre a integridade de membranas, especialmente em plantas submetidas ao estresse severo, tanto em *A. hypogaea* como nas quatro espécies silvestres analisadas. Os dois métodos utilizados foram eficientes para a detecção dos efeitos do déficit em plantas em diferentes graus de hidratação (Figura 7A e B), porém foram contraditórios na análise por espécie (Figura 7C e D). Essa divergência pode ter sido ocasionada por diferenças na sensibilidade entre os métodos. Observou-se que a análise por determinação do EL gerou dados com alta variância e pequenas diferenças reais existentes entre as espécies podem ter sido interpretadas como não

significativas pelo teste estatístico aplicado. Fenômeno semelhante foi evidenciado por Ranganayakulu et al. (2012).

Quanto às diferenças entre as espécies, é surpreendente o fato de *A. triseminata* ter apresentado as maiores médias de teor de MDA sob déficit hídrico, resposta similar a *A. hypogaea*, a espécie cultivada. Esta, por sua vez, apresentou comportamento similar ao seu parental *A. ipaensis*. Os dados da literatura sugerem uma possível relação entre a sensibilidade a danos de membrana e tolerância ao déficit hídrico em *Arachis*, porém ainda não diretamente comprovada. Seguindo essa tendência, pode ser sugerida a tolerância superior da espécie silvestre *A. magna*, em comparação à espécie cultivada. Essa tolerância não pode ser sugerida para *A. duranensis*, apesar do menor dano a membrana observado, em virtude dos resultados indicativos de susceptibilidade verificados nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência da clorofila. O fato de terem sido registrados para *A. triseminata* os maiores valores de teor de MDA sugere que possa haver nessa espécie um mecanismo compensatório para reposição de fosfolipídios de membrana, conforme proposto por Akcay et al. (2010), hipótese a ser confirmada em ensaios futuros.



**Figura 7.** Teor de aldeído malônico (MDA) (A e C) e extravasamento de eletrólitos (EL (%)) (B e D) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias por nível de hidratação (A e B) e por espécie (C e D) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

### Pigmentos fotossintéticos

Na quantificação do teor de clorofila, verificou-se uma redução significativa nos conteúdos de clorofila *a* a 20% da CP. Já as reduções observadas nos teores de clorofila *b* e total não foram

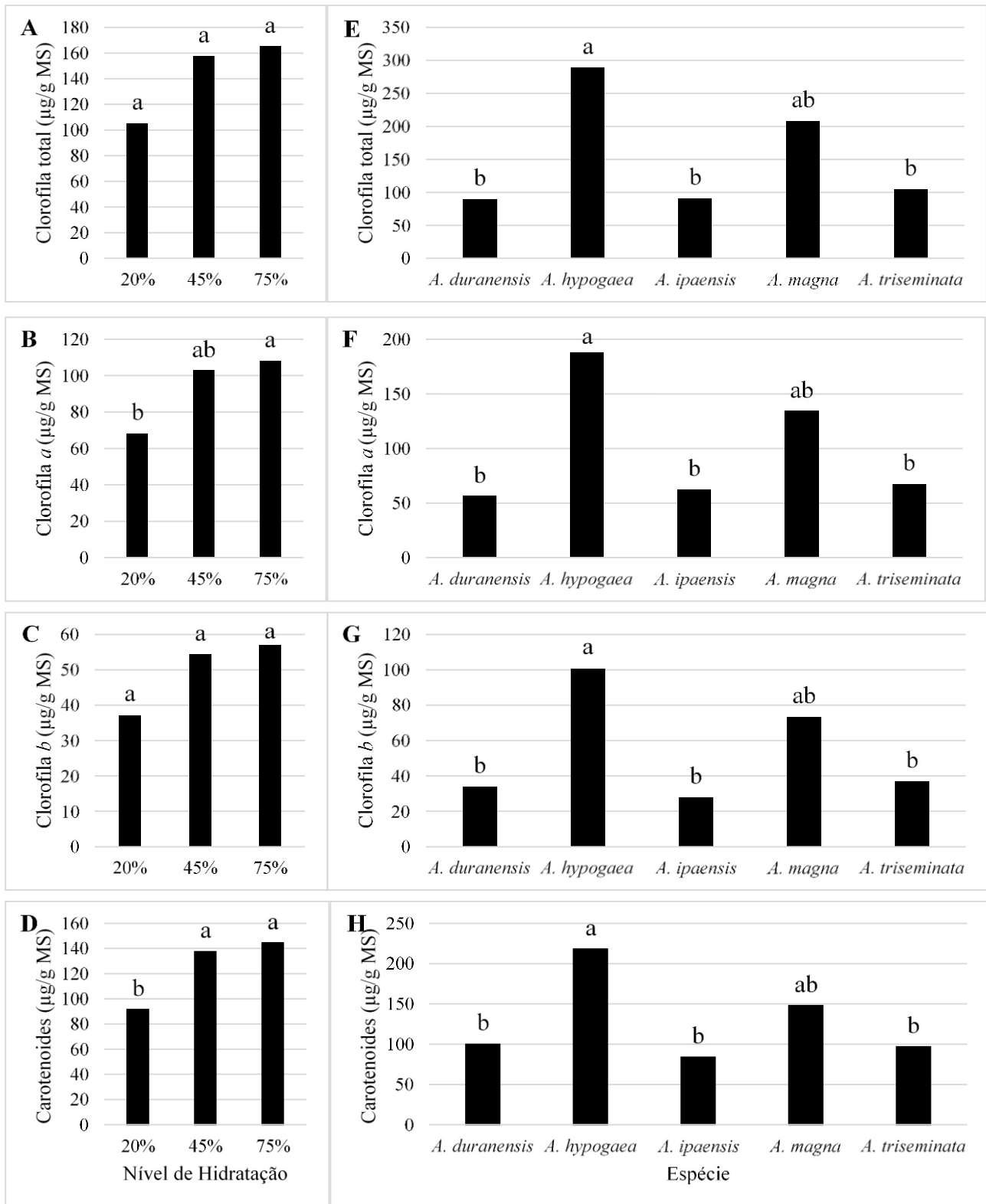
significativas entre os níveis de irrigação (Figura 8A a C). Entre espécies, notou-se um mesmo padrão nos resultados obtidos para todos os pigmentos: *A. hypogaea* concentrou os maiores teores, seguida de *A. magna* que não diferiu entre os maiores e os menores valores; *A. triseminata*, *A. ipaensis* e *A. duranensis* concentraram os menores teores de pigmentos fotossintéticos (Figura 8E a G).

A redução do conteúdo de clorofila em plantas sob déficit hídrico é reportada na literatura em diversas culturas. Esse tipo de estresse promove a degradação e inibe a síntese desse pigmento. Pode ser interpretado como um mecanismo de proteção dos fotossistemas, prevenindo a absorção de energia luminosa. Por outro lado, a capacidade de manutenção de níveis elevados de clorofila sob estresse hídrico já foi relacionado à capacidade fotossintética em diversas culturas. Em estudos com *A. hypogaea*, foi observada diminuição no teor de clorofila total com o aumento da severidade e duração do déficit hídrico, com efeitos mais pronunciados na cultivar suscetível quando comparada à tolerante (Padmavathi e Rao, 2013; Ranganayakulu et al., 2012, 2015). Já Jeyaramraja e Thushara (2013), apesar de documentarem redução do teor de clorofila em resposta ao déficit hídrico, não observaram diferenças entre plantas suscetíveis e tolerantes. No entanto, Sales et al. (2013) não verificaram redução nos conteúdos de clorofila *a*, *b* e total em folhas de *Arachis pintoi*, em condições de déficit hídrico por 15 dias. Os autores atribuíram o resultado ao fato de que a 25% da CP, apesar de as folhas terem sinais de desidratação, não apresentaram sintomas de clorose. Essa observação também pode ser estendida para este estudo.

De forma geral, no presente estudo, os efeitos do déficit hídrico foram observados no teor de clorofila *a*, evidenciando a sensibilidade do aparato fotossintético ao estresse a 20% da CP, o que está de acordo com os dados obtidos em  $F'_v/F'_m$ . As reduções observadas no teor de clorofila *a* não refletiram alterações significativas no teor de clorofila total, ressaltando a importância de se quantificar separadamente os teores de clorofila *a* e *b*, visto que a clorofila *a* é naturalmente encontrada em concentração superior a clorofila *b*, que é considerado um pigmento acessório. As diferenças observadas entre espécies não podem ser atribuídas ao tratamento e são intrínsecas aos materiais vegetais utilizados neste estudo.

Quanto à quantificação de carotenoides, foi observada redução no teor deste pigmento em plantas submetidas ao déficit hídrico na CP de 20% (Figura 8D). Resultados similares foram observados em *Vigna unguiculata* submetida ao déficit hídrico (Singh e Reddy, 2011). Os autores atribuíram a redução nos teores de carotenoides à foto-oxidação deste pigmento como forma de minimizar a absorção de luz pelos cloroplastos e reduzir os efeitos celulares do acúmulo de EROs. Assim como para o teor de clorofilas, foram identificadas diferenças entre espécies, porém não atribuídas ao tratamento (Figura 8H). A redução no teor de carotenoides observada a 20% da CP pode ser associada negativamente às reduções observadas no teor de clorofila *a* e na taxa de *A* e ao aumento

nos teores de MDA e EL, evidenciando a sensibilidade desse pigmento a esse nível de hidratação do solo, o que inibiu a sua atuação fotoprotetora.



**Figura 8.** Teor de clorofila total (A e E), clorofila *a* (B e F), clorofila *b* (C e G) e carotenoides (D e H) em espécies de *Arachis* sob déficit hídrico a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias por nível de hidratação (A a D) e por espécie (E a H) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## Prolina livre

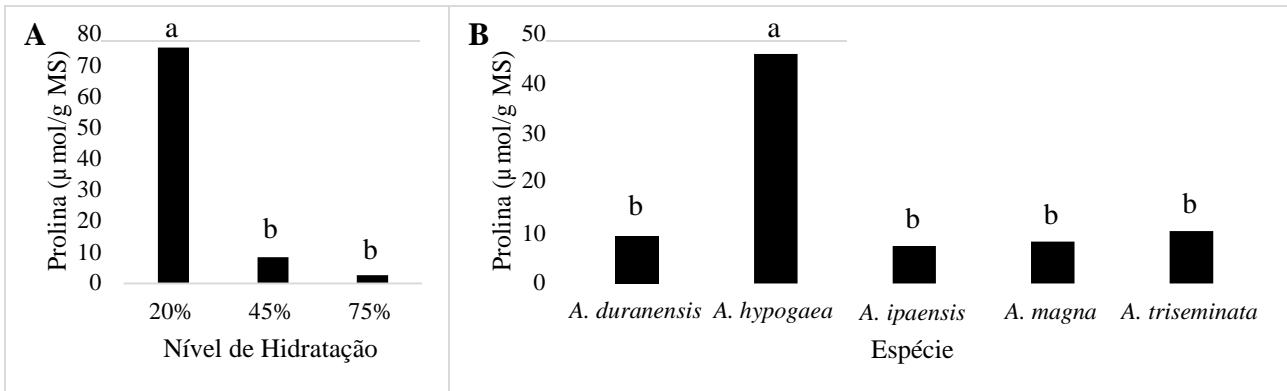
Ao analisar o teor de prolina livre em amostras foliares, constatou-se um aumento expressivo em sua concentração em plantas submetidas a 20% da CP (Figura 9A). O maior teor foi observado em *A. hypogaea*. Entre as quatro espécies silvestres analisadas, não houve diferenças no acúmulo de prolina (Figura 9B).

Apesar de estar bem documentado na literatura o acúmulo de prolina em resposta ao déficit hídrico em *Arachis*, tanto na espécie cultivada como em silvestres, Ranganayakulu et al. (2012) mencionam ainda não existirem evidências claras de como o acúmulo de prolina proporciona adaptação bioquímica às plantas durante o estresse. No entanto, diversos relatos na literatura confirmam que cultivares ou linhagens de *A. hypogaea* consideradas tolerantes ao déficit hídrico apresentam níveis mais elevados de prolina, em comparação às suscetíveis (Padmavathi e Rao, 2013; de Lima Pereira et al., 2015; Ranganayakulu et al., 2012, 2015).

Ainda reforçando a relação positiva entre acúmulo de prolina e tolerância ao déficit hídrico, Bhatnagar-Mathur et al. (2009) relataram o maior acúmulo deste osmólito em plantas de amendoim consideradas tolerantes, superexpressando *AtDREB1A*, sob estresse hídrico, em comparação a plantas selvagens. Além disso, a superexpressão de uma proteína vacuolar do tipo  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporte em *A. hypogaea* também promoveu a tolerância ao déficit hídrico e maior acúmulo de prolina em plantas transgênicas em comparação às selvagens (Asif et al., 2011).

Azevedo Neto et al. (2010) também relataram o aumento do teor de prolina como resultado do estresse hídrico em espécies silvestres do gênero *Arachis*. Diferentemente do observado neste trabalho, esses autores identificaram diferenças significativas no teor de prolina de folhas de plantas submetidas a 20 dias de privação de água, entre as espécies analisadas. *A. stenosperma* (SV2411) e *A. duranensis* (K7988), o mesmo acesso analisado neste estudo, apresentaram valores superiores de teor de prolina sob déficit hídrico, ao passo que *A. ipaensis* e *A. duranensis* (V14167) registraram valores similares ao de *A. hypogaea* (55437). A inconsistência entre os dados aqui obtidos e aqueles relatados por Azevedo Neto et al. (2010) podem ser devido a diferenças na intensidade e duração do déficit hídrico imposto. Além disso, no presente estudo, foi utilizada *A. hypogaea* cv. Havana, obtida após diversos ciclos com pressão de seleção para tamanho e forma de grãos, em clima semiárido (dos Santos et al., 2006), o que pode ter favorecido seleção indireta de plantas com maior teor de prolina sob déficit hídrico. Isso poderia explicar o resultado aqui obtido: *A. hypogaea* cv. Havana apresentou teor superior de prolina em folhas, quando comparada a espécies silvestres. Além disso, espécies silvestres podem apresentar mecanismos diferenciados de ajuste osmótico. Azevedo Neto et al. (2010) demonstraram o acúmulo superior de carboidratos solúveis, aminoácidos livres e proteínas solúveis em folhas de espécies de *Arachis* silvestre, em comparação à espécie cultivada.

Os resultados apresentados refletem a importância de se avaliar diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos na resposta de plantas ao déficit hídrico. A sensibilidade dos parâmetros avaliados à deficiência hídrica foi evidenciada em *Arachis* spp., porém, foram inconsistentes como indicativos de tolerância. Portanto, para uma melhor análise da tolerância à seca em *Arachis* spp., ensaios futuros para avaliação da atividade das enzimas superóxido dismutase, catalase e ascorbato peroxidase e de outros mecanismos de ajuste osmótico por acúmulo de osmólitos compatíveis são sugeridos. Além disso, a avaliação dos aspectos genéticos é necessária para a definição das vias de tolerância envolvidas.



**Figura 9.** Teor de prolina foliar em espécies de *Arachis* submetidas a 20, 45 e 75% (controle) da capacidade de pote no 5º dia de imposição do estresse. Médias por nível de hidratação (A) e por espécie (B) seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

## 5. Referências bibliográficas

- Akçay, U. C., Ercan, O., Kavas, M., Yildiz, L., Yilmaz, C., Oktem, H. A., Yucel, M. 2010. Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings. *Plant Growth Regulation*, 61(1), 21-28.
- Asif, M. A., Zafar, Y., Iqbal, J., Iqbal, M. M., Rashid, U., Ali, G. M., Nazir, F. 2011. Enhanced expression of AtNHX1, in transgenic groundnut (*Arachis hypogaea* L.) improves salt and drought tolerance. *Molecular biotechnology*, 49(3), 250-256.
- Azevedo Neto, A. D., Nogueira, R. J., Melo Filho, P. A., Santos, R. C. 2010. Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. *Journal of Plant Interactions*, 5(1), 1-10.
- Barrs, H. D., Weatherley, P. E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Sciences*, 15(3), 413-428.
- Bates, L. S., Waldren, R. P., Teare, I. D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and soil*, 39(1), 205-207.
- Bertioli, D. J., Seijo, G., Freitas, F. O., Valls, J. F., Leal-Bertioli, S. C., Moretzsohn, M. C. 2011. An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources*, 9(01), 134-149.
- Bhatnagar-Mathur, P., Devi, M. J., Vadez, V., Sharma, K. K. 2009. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress. *Journal of plant physiology*, 166(11), 1207-1217.
- Cakmak, I., Horst, W. J. 1991. Effect of aluminium on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxidase activities in root tips of soybean (*Glycine max*). *Physiologia Plantarum*, 83(3), 463-468.
- Chaves, M. M., Oliveira, M. M. 2004. Mechanisms underlying plant resilience to water deficits: prospects for water-saving agriculture. *Journal of experimental botany*, 55(407), 2365-2384.
- Clavel, D., Diouf, O., Khalfaoui, J. L., Braconnier, S. 2006. Genotypes variations in fluorescence parameters among closely related groundnut (*Arachis hypogaea* L.) lines and their potential for drought screening programs. *Field crops research*, 96(2), 296-306.

- Conab – Companhia Nacional de Abastecimento. 2016. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v. 3 – Safra 2015/16, n. 12 – Décimo Segundo Levantamento/set 2016. [http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16\\_09\\_06\\_09\\_03\\_20\\_boletim\\_12\\_setembro.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/16_09_06_09_03_20_boletim_12_setembro.pdf) (acessado em 02.02.17).
- de Lima Pereira, J. W., da Silva, E. C. A., da Luz, L. N., Nogueira, R. J. M. C., de Albuquerque Melo Filho, P., de Lima, L. M., dos Santos, R. C. 2015. Cluster analysis to select peanut drought tolerance lines. *Australian Journal of Crop Science*, 9(11), 1095-1105.
- Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environmental and Experimental Botany*, 109, 212-228.
- Ding, H., Zhang, Z. M., Qin, F. F., Dai, L. X., Li, C. J., Ci, D. W., Song, W. W. 2014. Isolation and characterization of drought-responsive genes from peanut roots by suppression subtractive hybridization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 17(6), 304-310.
- dos Santos, R. C., Freire, R. M. M., Suassuna, T. D. M. F., Rego, G. M. 2006. Novas Cultivares BRS Havana: nova cultivar de amendoim de pele clara. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, 41(8), 1337-1339.
- Jeyaramraja, P. R., Thushara, S. S. 2013. Sequence of physiological responses in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) subjected to soil moisture deficit. *Photosynthetica*, 51(3), 395-403.
- Kalariya, K. A., Singh, A. L., Chakraborty, K., Zala, P. V., Patel, C. B. 2013. Photosynthetic characteristics of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) under water deficit stress. *Indian Journal of Plant Physiology*, 18(2), 157-163.
- Lauriano, J. A., Lidon, F. C., Carvalho, C. A., Campos, P. S., do Céu Matos, M. 2000. Drought effects on membrane lipids and photosynthetic activity in different peanut cultivars. *Photosynthetica*, 38(1), 7-12.
- Lauriano, J. A., Ramalho, J. C., Lidon, F. C., do Céu Matos, M. 2004. Peanut photosynthesis under drought and re-watering. *Photosynthetica*, 42(1), 37-41.
- Leal-Bertioli, S. C., Bertioli, D. J., Guimarães, P. M., Pereira, T. D., Galhardo, I., Silva, J. P., Araujo, A. C. G. 2012. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environmental and Experimental Botany*, 84, 17-24.



- Lichtenthaler, H. K. 1987. [34] Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, 148, 350-382.
- Lutts, S., Kinet, J. M., Bouharmont, J. 1996. NaCl-induced senescence in leaves of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars differing in salinity resistance. *Annals of Botany*, 78(3), 389-398.
- Nogueira, R. J. M. C., Távora, F. J. A. F. 2005. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.), in: Santos, R. D. (Ed), O agronegócio do amendoim no Brasil. EMBRAPA, Campina Grande, 16-44.
- Padmavathi, T. A., Rao, D. M. 2013. Differential accumulation of osmolytes in 4 cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought stress. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 16(2), 151-159.
- Pimentel, C. 2004. A perda de água pelas plantas e o seu controle, in: Pimentel, C. A relação da água com a planta. Seropédica: Edur, Rio de Janeiro, 92-117.
- Pruthvi, V., Rama, N., Govind, G., Nataraja, K. N. 2013. Expression analysis of drought stress specific genes in Peanut (*Arachis hypogaea*, L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 19(2), 277-281.
- Ramesh Babu, V., Rao, D. V. M. 1983. Water stress adaptations in the groundnut (*Arachis hypogaea* L): foliar characteristics and adaptations to moisture stress. *Plant physiology & biochemistry*.
- Ranganayakulu, G. S., Chandraobulreddy, P., Thippeswamy, M., Veeranagamallaiah, G., Sudhakar, C. 2012. Identification of drought stress-responsive genes from drought-tolerant groundnut cultivar (*Arachis hypogaea* L. cv K-134) through analysis of subtracted expressed sequence tags. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 361-377.
- Ranganayakulu, G. S., Sudhakar, C., Reddy, P. S. 2015. Effect of water stress on proline metabolism and leaf relative water content in two high yielding genotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting drought tolerance. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 3(1), 97-103.
- Rao, K. M. 2006. Introduction, in: Rao, K. M., Raghavendra, A. S., Reddy, K. J. (Eds), *Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants*. Springer Science & Business Media, 1-14.

- Reddy, T. Y., Reddy, V. R., Anbumozhi, V. 2003. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. *Plant growth regulation*, 41(1), 75-88.
- Sales, R. M. P., Fries, D. D., Pires, A. J. V., Bonomo, P., Santos, I. S., Campos, C. N., Brito, M. S. 2013. Chlorophyll and carbohydrates in *Arachis pintoi* plants under influence of water regimes and nitrogen fertilization. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 42(6), 388-394.
- Santos, R. D., Godoy, J. D., Fávero, A. P. 2005. Melhoramento do amendoim, in: Santos, R. D. (Ed), *O agronegócio do amendoim no Brasil*. EMBRAPA, Campina Grande, 123-192.
- SAS for windows, versão 9.2, 2002-2008, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA. Licenciado para Empresa Brasileira Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA, Executado na plataforma W32\_VSPRO.
- Singh, S. K., Reddy, K. R. 2011. Regulation of photosynthesis, fluorescence, stomatal conductance and water-use efficiency of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) under drought. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 105(1), 40-50.

## CAPÍTULO III

### IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM *Arachis* spp. E SUA MODULAÇÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO

## **IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO EM *Arachis* spp. E SUA MODULAÇÃO SOB ESTRESSE HÍDRICO**

Danubia Rita de Sá Leal<sup>1,2</sup>, Luis Carlos Belarmino<sup>1</sup>, Ana Maria Benko Iseppon<sup>1</sup> e Carolina Vianna Morgante<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Recife, PE, Brasil.

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa, Petrolina, PE, Brasil.

Palavras chave: Amendoim, Déficit hídrico, Espécies silvestres, Ortólogos, Genes candidatos.

## Resumo

Este estudo visou identificar e classificar, mediante análises *in silico*, FT em *Arachis*, determinar aqueles putativamente responsivos à seca e analisar a modulação de sua expressão gênica nas espécies silvestres *A. magna*, *A. duranensis*, *A. ipaensis* e *A. triseminata* sob déficit hídrico. Foram utilizadas sequências genômicas de *A. duranensis* e *A. ipaensis* e sequências previamente geradas via RNA-Seq de *A. stenosperma* e *A. hypogaea* sob déficit hídrico. A identificação de FTs e sua classificação em famílias foram embasadas na presença/ausência de Domínios de ligação ao DNA (DLD), domínios auxiliares e suas combinações. Foram identificados 71 domínios, classificados em 85 famílias. As famílias mais frequentes em *Arachis* foram FAR1, MYB-related, NAC e WRKY, as quais apresentaram maior número de ortólogos entre *Arachis* e *Arabidopsis*. Doze ortólogos apresentaram-se diferencialmente expressos em *Arachis* sob déficit hídrico. Foram selecionados oito genes que codificam FT para análise de expressão nas espécies silvestres. Resultados sugerem conservação de famílias, suas frequências e semelhanças entre vias regulatórias de FT entre espécies de *Arachis*. Adicionalmente, a modulação da expressão de genes que codificam FT difere entre espécies de *Arachis* sob déficit hídrico e os genes FAR1a e MYB-related mostraram-se bons candidatos para estudos de expressão gênica sob déficit hídrico.

## Introdução

As plantas podem ter o seu desenvolvimento afetado por vários tipos de estresses, sejam bióticos e/ou abióticos tais como seca, frio ou condições de salinidade elevada. Para se adaptar e sobreviver a essas variações ambientais, as plantas são induzidas a produzir uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas. Ao nível molecular, muitos genes, inclusive, genes que codificam fatores de transcrição têm sido identificados como sendo responsivos a estresses abióticos (Matsui *et al.*, 2008, Dietz *et al.*, 2010, Chen *et al.*, 2012), resultando em respostas de maior tolerância em plantas.

Os fatores de transcrição (FT) são proteínas, presentes em todos os organismos eucariotos, que se ligam a sequências específicas na região promotora do DNA genômico e possuem a capacidade de ativar ou desativar a expressão de outros genes (Libault *et al.*, 2009), atuando assim, como reguladores da expressão gênica. Conforme o domínio e/ou domínios presentes na proteína, os genes de fatores de transcrição foram classificados e agrupados em numerosas famílias gênicas (Perez-Rodriguez *et al.*, 2010), sendo algumas exclusivas de plantas e desempenham papel fundamental no desenvolvimento vegetal e em respostas de aclimatação e adaptação às condições ambientais desfavoráveis.

Através de buscas na literatura, Shameer *et al.* (2009) citam dez famílias gênicas de FT que respondem a estresses em plantas: ABI3 / VP1, AP2 / EREBP, ARF, bHLH, bZIP, HB, HSF, Myb, NAC, e WRKY. Esse estudo resultou na criação do STIFDB – Arabidopsis Stress Responsive Transcription Factor DataBase, um banco de dados de FT estresse/responsivos que utilizou a planta-modelo *Arabidopsis thaliana*, e que foi posteriormente atualizado para uma nova versão por Naika *et al.* (2013), com a inclusão das espécies *Oryza sativa* subsp. *japônica* e *Oryza sativa* subsp. *indica*.

As famílias bZIP, AP2/ERF, NAC, WRKY, MYB, C2H2 ZF e bHLH têm sido alvo de muitos estudos de resposta/defesa contra fatores de estresse abióticos, levando a concluir que as mesmas, atuando isoladas ou em diversas cascatas de sinalização, desempenham papéis funcionais importantes

em resposta a estresses ambientais como seca, temperaturas extremas, salinidade elevada, alta osmolaridade e ácido abscísico (ABA) (Lindemose *et al.*, 2013).

Em estudo com sobre-expressão de genes, um FT da família NF-YB (PwNF-YB3) de *Picea wilsonii* acelerou a floração e conferiu tolerância significativa em mudas de *Arabidopsis thaliana* transformada, sob condição de estresse por salinidade, seca e osmolaridade em comparação com plantas do tipo selvagem (Zhang *et al.*, 2015).

Muitos esforços têm sido feitos para compreender a função e os mecanismos moleculares de tolerância ao estresse dos FT em plantas, afim de poder utilizar esse conhecimento para aumentar a tolerância em plantas cultivadas, por meio de manipulação genética, visando melhorar a produtividade e qualidade agrícolas. Esse empenho em aumentar a produção agrícola, inclui o melhoramento genético de algumas leguminosas mundialmente importantes por compor a base da alimentação, tais como o feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), a soja (*Glicine max*) e o amendoim (*Arachis hypogaea*).

Apesar do avanço destes estudos, uma preocupação pertinente ainda se refere à fonte de recursos genéticos para a tolerância a estresses abióticos, já que o próprio processo de melhoramento genético pode causar um estreitamento da diversidade genética para caracteres agronômicos (Pratap e Kumar, 2014). Etnovarietades, espécies silvestres ou progenitores de espécies cultivadas podem constituir rica fonte de variabilidade genética ao melhoramento de plantas, seja pela transferência vertical, através da hibridização interespecífica, ou por métodos de transferência horizontal, como a transformação genética ou a hibridização somática (Blum, 2011; Pratap e Kumar, 2014).

O amendoim é uma das culturas mais importantes do mundo, sendo utilizada tanto para o consumo direto quanto para a produção de óleo. No entanto, a produção de *Arachis hypogaea* muitas vezes é afetada por situações de seca e devido as poucas informações disponíveis a respeito do seu genoma, pouco se sabe sobre a base molecular da sua resposta ao estresse de seca (LI *et al.*, 2014). No entanto, tendo em vista o interesse agrícola que o amendoim exerce na economia, a comunidade

científica tem intensificado as atividades de melhoramento genético, buscando nas espécies silvestres, potenciais fornecedoras de genes de resistência.

Espécies silvestres de *Arachis* apresentam-se como fonte de variabilidade genética para fatores de estresses bióticos e abióticos a qual poderá ser eficientemente utilizada no melhoramento genético de *A. hypogaea* (Bertioli et al., 2011). A resistência a doenças, por exemplo, já foi identificada em acessos silvestres de *Arachis*, como em *A. stenosperma*, resistente à infecção por *Cercosporidium personatum*, agente causador da mancha preta, e pelo nematoide *Meloidogyne arenaria* raça 1 (Proite et al., 2008; Leal-Bertioli et al., 2010). A resistência à *M. arenaria* também foi identificada em *A. cardenasi*, tendo sido introgridida para *A. hypogaea* (Burow et al., 1996; Simpson et al., 2003).

Já a tolerância à seca foi identificada em *A. magna* e *A. duranensis* (Leal-Bertioli et al., 2007), sendo que para essas espécies, foi realizada a análise do transcrito de plantas sob condição de deficiência hídrica, resultando na formação de um extenso banco de sequências de *Arachis* silvestre, útil para a identificação de vias metabólicas e genes associados à tolerância à seca (Guimarães et al., 2012; Brasileiro et al., 2015).

Tendo em vista o potencial econômico do amendoim e os prejuízos decorrentes de redução ou perdas de produção em períodos de seca, este estudo objetivou selecionar no banco de dados de *Arachis*, genes de FT presumivelmente relacionados à resposta ao déficit hídrico e analisar a expressão diferencial desses genes, utilizando-se a técnica de RT-qPCR (Reação Reversa em Cadeia da Polimerase em Tempo Real), em plantas submetidas ou não ao estresse hídrico, de espécies silvestres do gênero *Arachis* (*A. magna*, *A. duranensis*, *A. ipaensis* e *A. triseminata*), avaliando-as como potenciais fornecedoras de genes de resistência à seca para o melhoramento genético.



## Material e Métodos

### Material vegetal

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação localizada na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, entre julho e agosto de 2016. Sementes de *A. duranensis* (K7988), *A. magna* (KG30097) e *A. ipaensis* (KG30076), obtidas no Banco Ativo de Germoplasma de Espécies Silvestres de *Arachis*, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF e de *A. triseminata*, coletadas no município de Juazeiro, BA, foram tratadas com Captan SC (Milenia) 0,3% por 1 min, secadas e germinadas em papel de germinação umedecido com Ethrel 720 (Bayer) 0,6% por três dias em caixas do tipo gerbox a 28 °C. As plântulas foram transferidas para vasos de 1,2 L contendo areia, barro vermelho e húmus de minhoca em proporções iguais e 9 g NPK 6/24/12 e mantidas em telado sob rega a cada dois dias. O controle de insetos e fungos foi realizado por pulverização quinzenal de Actara (Syngenta) 0,7% e Amistar Top (Syngenta) 0,1%, respectivamente.

### Imposição do déficit hídrico

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso, com três repetições, em esquema fatorial 4x2: quatro espécies e dois níveis de hidratação do solo. Cada parcela foi composta por três plantas com 60 dias de idade. A imposição do déficit hídrico seguiu o método descrito por Ding et al. (2014), considerando a quantidade máxima de água retida pelo solo no vaso, expressa em porcentagem de massa, como 100% de capacidade de pote (CP). As plantas foram mantidas a 75% e a 20 % da CP, controle e tratamento, respectivamente, durante cinco dias. A água perdida por evapotranspiração foi estimada por pesagem dos vasos e repostada diariamente. As primeiras folhas completamente expandidas foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

### **Identificação de famílias de FT em *Arachis***

Foram analisadas sequências de quatro espécies do gênero *Arachis*. Para *A. ipaensis* e *A. duranensis*, foram utilizadas as sequências genômicas (Bertioli et al., 2016) e, para *A. stenosperma* e *A. hypogaea*, foram utilizadas as sequências previamente geradas pela análise do transcriptoma via RNA-Seq de plantas sob déficit hídrico (Guimarães et al., 2012; Li et al., 2014).

Para a identificação e classificação dos FT em *Arachis*, foram consideradas e compiladas as classificações propostas por Perez-Rodriguez et al. (2010) e Jin et al. (2014), ambas baseadas na presença/ausência de Domínios de Ligação ao DNA (DLD) específicos. A identificação de FT nas quatro espécies de *Arachis* foi realizada por meio do alinhamento e busca de similaridade de sequências de aminoácidos a sequências conservadas de DLD de FT de plantas, utilizando-se o método de Modelos Ocultos de Markov (HMM, “Hidden Markov Models”) (Figura S1). Em seguida, foi desenvolvido um roteiro para a classificação automatizada de FT em famílias.

### **Identificação de FT de *Arachis* putativamente responsivos à seca**

A partir dos dados disponíveis do banco “*Stress Responsive Transcription Factor Database*” (Naika et al., 2013), foram selecionados 816 genes de *Arabidopsis thaliana* que codificam FT responsivos à seca. Essas sequências foram utilizadas como referência para a busca de ortólogos em *Arachis*, a partir das sequências de aminoácidos correspondentes aos FT anotados de *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea*, utilizando o programa DODO (Chen et al., 2010). Dados de expressão diferencial sob estresse hídrico dos ortólogos em *Arachis* spp. foram obtidos a partir de resultados preliminares com *A. stenosperma*, *A. duranensis* e *A. hypogaea* e também utilizados para a busca de ortólogos presumivelmente responsivos à seca entre as espécies de *Arachis* (Guimarães et al., 2012; Li et al., 2014; Brasileiro et al., 2015) (Figura S1).

## **Análise da expressão gênica**

Para oito genes identificados como putativamente responsivos à seca foram desenhados iniciadores utilizando-se o programa Primer3Plus, de acordo com as configurações padrão para qPCR (Untergasser et al., 2012), utilizando sequências de *A. duranensis* e *A. ipaensis* disponíveis no PeanutBase (<http://www.peanutbase.org/>). Quando possível, os iniciadores foram desenhados flanqueando regiões intrônicas. A especificidade dos iniciadores ao gene alvo foi conferida por meio da ferramenta Primer-Blast (Ye et al., 2012).

O RNA total de folhas foi extraído conforme descrito por Zhao et al. (2011), tratado com DNase com o kit DNA-free AM 1906 (Ambion), seguindo instruções do fabricante, e quantificado com o kit Qubit RNA BR Assay Q10210, pelo fluorímetro Qubit 3.0 (Thermo Scientific). A síntese de cDNA foi realizada a partir de 2 µg de RNA total com a enzima M-MLV Reverse Transcriptase M1302 (Sigma-Aldrich), seguindo protocolo do fabricante. Para a quantificação da expressão gênica por qPCR, foi utilizado o kit Sybr Green qPCR mix (Ludwig Biotech), seguindo protocolo descrito por Morgante et al. (2011), no equipamento Step One Plus (Applied Biosystems) do Laboratório de Microbiologia do Solo da Embrapa Semiárido. As reações foram realizadas em triplicatas biológicas e técnicas. O cálculo das eficiências de reações e a definição do ciclo ótimo de quantificação (Cq) foram realizados por meio do programa “Real Time PCR Miner” (Zhao e Fernald, 2005). A razão entre os níveis de mRNA entre plantas tratamento e controle foi calculada estatisticamente por meio do programa REST 2009 versão 2.0.13 (Pfaffl et al., 2002), utilizando-se genes de referência desenvolvidos por Morgante et al. (2011). Para a normalização dos dados de *A. triseminata*, *A. duranensis* e *A. magna* foram utilizados os genes da actina (*ACT1*) e da gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*). Para *A. ipaensis*, foram utilizados os genes da actina (*ACT1*) e da poliubiquitina (*UBII*).

## Resultados e discussão

### Classificação e distribuição de FT de *Arachis* em famílias

Foram analisadas 41.840, 36.734, 39.055 e 50.141 sequências de aminoácidos das espécies *A. ipaensis*, *A. duranensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea*, respectivamente. Para *A. ipaensis* e *A. duranensis* foram identificados 2.510 e 2.329 FT, correspondendo a 5,99 e 6,34% do total de proteínas, respectivamente.

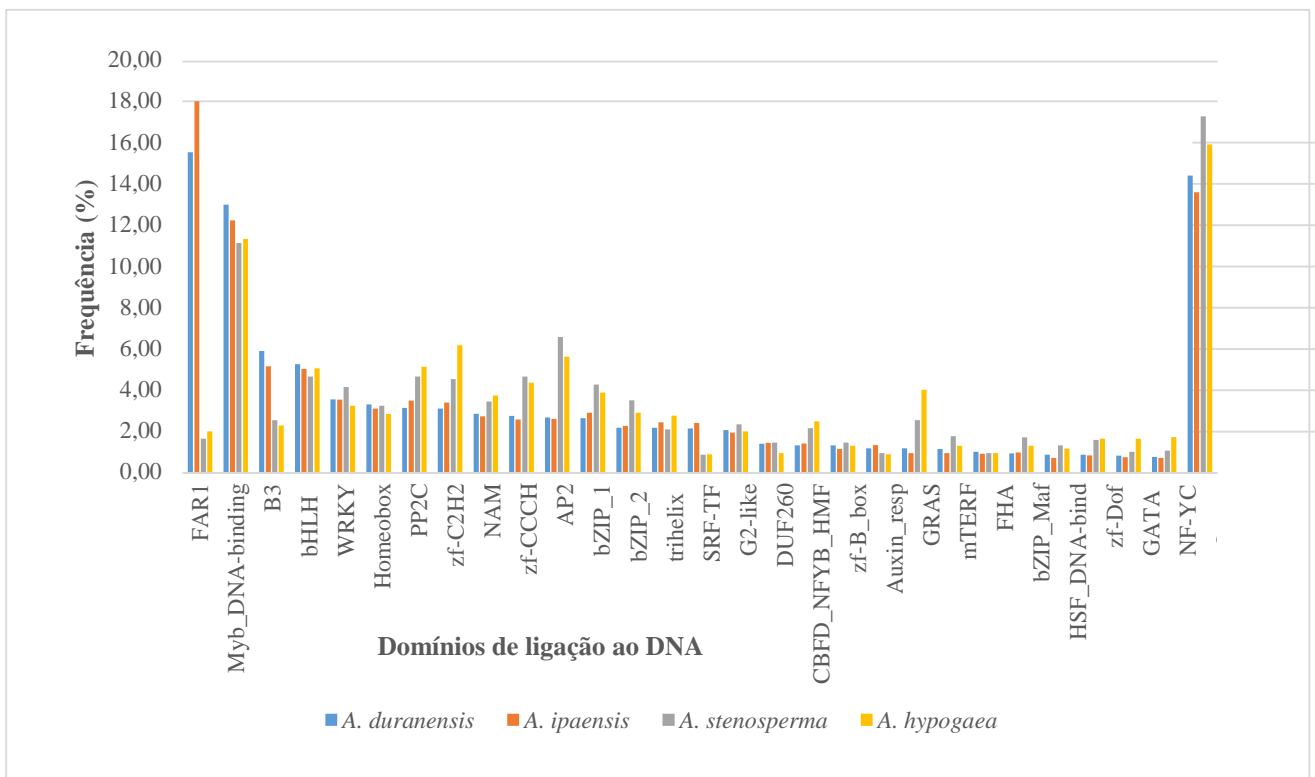
O número de FT varia muito entre espécies vegetais e está positivamente correlacionado ao seu número total de genes. Angiospermas, as quais sofreram pelo menos dois eventos de paleopoliploidização, apresentam mais fatores de transcrição, em comparação a outras espécies vegetais (Lehti-Shiu et al., 2017). Os valores observados para *A. ipaensis* e *A. duranensis* são intermediários aos preditos para outras leguminosas com genoma sequenciado, como *Lotus japonicus* e *Glycine max*, com 4,56 e 7,28 % de FT em relação ao número total de genes, respectivamente (Zhang et al., 2010). Já para *A. stenosperma* e *A. hypogaea*, apesar de ter sido analisado um número maior de sequências, foram identificados 1.262 e 1.198 FT, correspondendo a 3,23 e 2,39% do total de sequências analisadas, respectivamente. Interessantemente, Zhang et al. (2010) estimaram proporção semelhante de FT para *A. hypogaea*, 3,02%. O número menor de FT observado para essas espécies deve-se ao fato de as análises terem sido realizadas a partir de sequências geradas pela análise do transcriptoma via RNA-Seq de folhas sob déficit hídrico, o qual não contempla o total de proteínas das espécies, mas apresenta as sequências transcritas especificamente sob a condição de interesse do estudo (déficit hídrico).

A identificação de FTs e sua classificação em famílias foram embasadas na presença/ausência de DLD, domínios auxiliares e suas combinações, de acordo com uma compilação das classificações propostas por Perez-Rodriguez et al. (2010) e Jin et al. (2014), com modificações que resultaram no acréscimo de famílias (Tabela S1). Jin et al. (2014) consideraram 58 famílias de fatores de transcrição enquanto Perez-Rodriguez et al. (2010) reconheceram 63. 42 famílias são comuns às duas

classificações e foram mantidas na classificação proposta neste estudo, que totaliza 91 famílias de FT e 71 DLD. Foram sugeridas 21 novas famílias, a maioria como subdivisões de superfamílias, baseadas na presença de domínios auxiliares, com exceção a Meinox, a qual foi considerada como uma nova família definida pela presença dos domínios Knox1 e Knox2 e ausência dos domínios Homeobox e Glo\_EDI\_BRP\_like. Perez-Rodriguez et al. (2010) consideraram como membros da família HB FT com os DLD Homeobox, Knox1 e 2. No entanto, a ocorrência de FT de *Arachis* apresentando apenas os DLD Knox 1 e 2 tornou necessária a criação de uma nova família. Desta forma foi considerada para a classificação de membros da superfamília HB a presença do domínio Homeobox e suas subdivisões baseadas na presença de domínios auxiliares. A família CCAAT, contemplada apenas na classificação de Perez-Rodriguez et al. (2010), foi aqui considerada sem as subdivisões propostas por esses autores. Sequências proteicas contendo um ou mais domínios, cuja presença ou combinação não permitiu a sua classificação em qualquer uma das famílias definidas, foram categorizadas como “*Orphans*”, conforme proposto por Perez-Rodriguez et al. (2010).

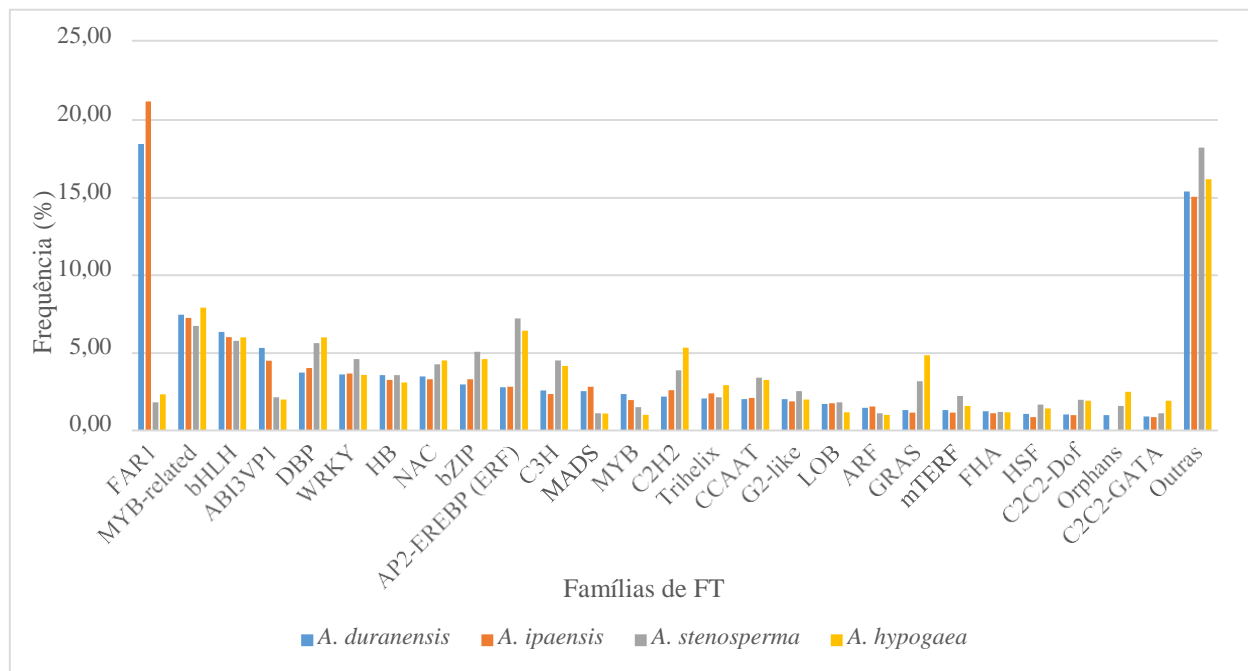
Nas quatro espécies de *Arachis* analisadas, foram identificados 71 domínios de ligação ao DNA, classificados e agrupados em 85 famílias. *A. ipaensis* e *A. duranensis* apresentaram 70 domínios diferentes de FT, ambas com ausência de Zn\_clus, encontrado apenas em *A. hypogaea*, a qual apresentou 70 domínios, estando ausente o FLO\_LFY. *A. stenosperma* apresentou 69 domínios, verificando-se a ausência de Zn\_clus e FLO\_LFY. Este último domínio, exclusivamente presente em plantas terrestres em baixas frequências (Lehti-Shiu et al., 2017), foi observado em *A. ipaensis* e *A. duranensis* a 0,07% do total de DLD e certamente não foi detectado em *A. stenosperma* e *A. hypogaea* pelo fato de que para essas espécies foram utilizadas sequências geradas pela análise do transcriptoma. Já o DLD Zn\_Clus, detectado em *A. hypogaea* a uma frequência de 0,21%, é frequente entre fungos e ausente entre membros do clado Viridiplantae (Lehti-Shiu et al., 2017). Possivelmente a presença deste domínio em *A. hypogaea* ocorreu por uma falha na identificação e classificação de DLD, pois para essa espécie foram analisadas sequências incompletas, ou por uma contaminação ou presença de endossimbiontes no material vegetal utilizado para a análise do transcriptoma.

Eventos de duplicação genômica bem como duplicações em tandem promoveram a expansão e divergência de famílias de FT. Em plantas, a taxa de retenção de duplicações de FT é superior à de outros genes, possivelmente pelas suas funções biológicas e bioquímicas, o que promoveu a neofuncionalização de FT seja pela diferenciação em seu perfil de expressão, sítos de ligação, afinidade a sítos de ligação ou interação com outras moléculas (Lehti-Shiu et al., 2017). Os dados aqui observados sugerem que o evento de poliploidização ocorrido em *A. hypogaea* não foi acompanhado pelo surgimento de novos DLD de FT, uma vez que esta espécie apresentou os mesmos DLD observados em seus parentais, *A. duranensis* e *A. ipaensis*. Os efeitos da poliploidização e domesticação de *A. hypogaea* podem ter sido mais proeminentes na expansão de famílias de FT e diferenciação do seu perfil de expressão, hipótese que poderia ser confirmada com o sequenciamento do genoma de *A. hypogaea*. Interessantemente, não foram observados DLD exclusivos do genoma A ou B do gênero *Arachis*, uma vez que *A. duranensis*, *A. stenosperma*, ambas com genoma A, e *A. ipaensis*, com genoma B, apresentaram os mesmos domínios em frequências similares (Figura 1).



**Figura 1** – Distribuição das frequências de domínios de ligação ao DNA (DLD) de fatores de transcrição (FT) em *Arachis* spp. Em “Outras” estão reunidos DLD com frequência inferior a 1% em todas as espécies.

Entre os dez DLD mais frequentes em *Arachis* spp. estão FAR1, Myb DNA binding, B3, bHLH, WRKY, Homeobox, PP2C, zf-C2H2, NAM e zf-CCCH, presentes nas famílias mais frequentes (Figura 2). De maneira geral, os DLD e famílias de FT ocorrem em proporções similares nas quatro espécies (Figuras 1 e 2), o que sugere semelhança entre vias regulatórias. As diferenças observadas devem-se possivelmente ao tipo de sequências analisadas. Os DLD observados em maior número em *Arachis* coincidem com aqueles apontados por Lehti-Shiu et al. (2017) como mais frequentes em plantas, com atenção à FAR1, o qual aparece em maior abundância em algumas espécies como *Glycine max*, *Medicago trunculata*, *Brachypodium distachyon* e *Oryza sativa*. Kalavacharla et al. (2011) observaram FAR1 entre as dez famílias mais frequentes em *Phaseolus vulgaris*. Ištvánék et al. (2014) identificaram FAR1 como a família de FT mais abundante em *Trifolium pratense*, em frequência similar à aqui encontrada para *A. duranensis* e *A. ipaensis*, em torno de 19% do total de famílias de FT, o que reforça a abundância de FAR1 entre leguminosas. Membros desta família originaram-se a partir de elementos de transposição e são componentes da via de transdução de sinal do fitocromo A, atuando na regulação do ciclo circadiano e da imunidade de plantas, por meio da integração da biossíntese de clorofila e a via de sinalização de ácido salicílico (Siddiqui et al., 2016; Wang et al., 2016). No entanto, até o momento, não há relatos na literatura do envolvimento funcional de membros desta família na resposta ao déficit hídrico em plantas.



**Figura 2** – Distribuição das frequências de fatores de transcrição (FT) em famílias em *Arachis* spp. Em “Outras” estão reunidas famílias de FT com frequência inferior a 1% em todas as espécies.

### Ortologia de FT responsivos ao déficit hídrico entre *Arachis* spp. e *Arabidopsis*

Dentre os 816 genes de *Arabidopsis* listados no banco “*Stress Responsive Transcription Factor Database*” como responsivos à seca (Naika et al., 2013), 94 apresentaram ortologia com genes de pelo menos uma das espécies de *Arachis* analisadas. Deste total, 52 foram comuns às quatro espécies. As famílias com o maior número de ortólogos foram FAR1, MYB-related, NAC e WRKY, as quais estão entre as mais frequentes em *Arachis*. Foram identificados 77, 73, 69 e 63 ortólogos em *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea*, respectivamente. Destes, 12 apresentaram-se como diferencialmente expressos em plantas de *Arachis* submetidas ao estresse hídrico, sendo cinco detectados em *A. duranensis*, três em *A. stenosperma* e quatro em *A. hypogaea*, pertencentes a dez famílias diferentes (Tabela 1), de acordo com resultados preliminares de análises do transcriptoma via RNAseq de plantas de *A. duranensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea* submetidas à seca (Guimarães et al., 2012; Li et al., 2014; Brasileiro et al., 2015).



**Tabela 1** - Ortólogos de Arabidopsis em *Arachis* spp. diferencialmente expressos sob déficit hídrico e sua classificação em famílias de Fatores de Transcrição (FT).

Gene em <i>Arachis</i>	Nível de expressão*	Família de FT	Espécie
Aradu.40GCA	5,69	C2H2	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.Q8Q5Z	4,76	HLH	<i>A. duranensis</i> <sup>1,2</sup>
Aradu.UXN6T	up	FAR1	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.6SC3T	up	EIL	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.G38ML	up	MADS	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Ast108706_6	3,82	CCAAT	<i>A. stenosperma</i> <sup>1</sup>
Ast108495_20	4,59	AP2-EREBP (ERF)	<i>A. stenosperma</i> <sup>1</sup>
Ast108294_6	6,39	AP2-EREBP (ERF)	<i>A. stenosperma</i> <sup>1</sup>
comp62412_c0	-2,95	Tify-IIa	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp64977_c0	2,45	NAC	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp62508_c0	-4,35	HB	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp67827_c1	-1,57	AP2-EREBP (ERF)	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>

\*Log2 do nível de expressão

<sup>1</sup> Brasileiro et al. (2015); <sup>2</sup>Guimarães et al. (2012); <sup>3</sup>Li et al. (2014)

### Ortologia de FT entre espécies de *Arachis* e a modulação de sua expressão sob estresse hídrico

Foram identificados 332 FT com ortólogos nas quatro espécies de *Arachis* analisadas. Destes, 27 foram diferencialmente expressos em plantas submetidas ao déficit hídrico das espécies *A. duranensis*, *A. hypogaea* ou *A. stenosperma*, de acordo com dados preliminares de expressão (Guimarães et al., 2012; Li et al., 2014; Brasileiro et al., 2015). Quatro apresentaram expressão diferencial confirmada em duas espécies, com nível de expressão similar, e três apresentaram ortólogos em Arabidopsis com expressão diferencial sob estresse hídrico (Naika et al., 2013) (Tabela 2).

**Tabela 2** - Fatores de transcrição diferencialmente expressos sob estresse hídrico e com ortólogos em *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. stenosperma* e *A. hypogaea*.

Gene	Nível de expressão*	Família de FT	Espécie**
comp65302_c0	-2,63	Tify-IIb	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp29919_c0/Aradu.023N4	5,05/up	HLH/FAR1	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup> / <i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
comp66892_c1	3,46	WRKY	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp69184_c3	2,47	WRKY	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp68950_c3	-1,65	HLH	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp56035_c0/Aradu.B1C6F	1,83/4,05	WRKY/FAR1	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup> / <i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
comp64977_c0***	2,45	NAC	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp62412_c0***	-2,95	Tify-IIa	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
comp69438_c0	-1,60	AP2-EREBP (ERF)	<i>A. hypogaea</i> <sup>3</sup>
Aradu.Z3DCJ	4,47	HLH	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.Q8Q5Z/Ast108299_26	4,75/5,97	HLH/HLH	<i>A. duranensis</i> / <i>A. stenosperma</i> <sup>1</sup>
Aradu.9T4H8	5,45	ABI3VP1	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.VZ4PC	4,96	MYB-related	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.M0G9T	4,33	HLH	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.X0QAS***	5,69	C2H2	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.ME4LN	5,31	FAR1	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.CM6S6	5,86	HLH	<i>A. duranensis</i> <sup>1</sup>
Aradu.C90G3	down	FAR1	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.I1HBD	down	ABI3VP1	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.S0KU9/Ast108283_7	up/6,12	C2H2/HLH	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup> / <i>A. stenosperma</i> <sup>1</sup>
Aradu.F19SY	down	MYB	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.G38ML	up	MADS	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.QW16A	up	C2H2	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.UV8L7	up	HB-ZIP	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.ROWSE	down	WRKY	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Aradu.V66GG	down	FAR1	<i>A. duranensis</i> <sup>2</sup>
Ast108354_9	5,18	WRKY	<i>A. stenosperma</i> <sup>1</sup>

\*Log2 do Fold Change

\*\*Espécie na qual foi detectada a expressão diferencial sob estresse hídrico

\*\*\*Ortólogo em Arabidopsis, com expressão diferencial sob estresse hídrico, segundo NAIKA et al. (2013)

<sup>1</sup> Brasileiro et al. (2015); <sup>2</sup> Guimarães et al. (2012); <sup>3</sup> Li et al. (2014)

Analisando-se a ortologia entre FT das espécies *A. duranensis* e *A. ipaensis*, foram identificados 1.334 ortólogos, o correspondente a 53% do total de FT. Destes, 73 foram diferencialmente expressos em *A. duranensis* sob déficit hídrico, sendo 52 superexpressos e 21 reprimidos. Para as outras espécies também foi realizada a análise de ortologia aos pares, sendo encontrados valores semelhantes, variando entre 676 e 816 ortólogos. Em todos os casos foram identificados ortólogos diferencialmente expressos em plantas sob déficit hídrico (Tabela 3).

**Tabela 3** – Número total de ortólogos de FT em comum em quatro espécies de *Arachis* e aqueles diferencialmente expressos (entre parênteses)

	<i>A. duranensis</i>	<i>A. ipaensis</i>	<i>A. stenosperma</i>	<i>A. hypogaea</i>
<i>A. duranensis</i>	-	1334 (73)	728 (49)	816 (45)
<i>A. ipaensis</i>		-	779 (6)	676 (17)
<i>A. stenosperma</i>			-	687 (23)
<i>A. hypogaea</i>				-

### Análise da expressão de genes de FT em plantas sob déficit hídrico

Foram selecionados oito genes que codificam FT, com expressão diferencial confirmada em *Arachis* spp. sob déficit hídrico, para a análise de sua expressão em plantas de quatro espécies silvestres do gênero *Arachis* submetidas ao déficit hídrico. Três desses genes, Aradu.UXN6T, Aradu.G38ML e comp64977\_c0, das famílias FAR1, MADS e NAC, respectivamente, foram identificados como tendo ortólogos nas quatro espécies de *Arachis* analisadas e com expressão diferencial sob déficit hídrico em *Arabidopsis* e *A. duranensis* ou *A. hypogaea* (Tabela 1). Outros dois genes, Aradu.B1C6F e Aradu.023N4, ambos da família FAR1, apresentaram ortólogos nas quatro espécies analisadas e expressão diferencial sob déficit hídrico em *A. duranensis* e *A. hypogaea* (Tabela 2). Os genes comp69438\_c0 e comp69184\_c3, das famílias AP2-EREBP (ERF) e WRKY, respectivamente, também com ortólogos nas quatro espécies analisadas, apresentaram expressão diferencial em *A. hypogaea* sob déficit hídrico (Tabela 2). Para o gene Aradu.B7RDX, da família MYB-related, foram identificados ortólogos em *A. ipaensis*, *A. duranensis* e *A. hypogaea*, sendo diferencialmente expresso em plantas sob déficit hídrico nas duas últimas espécies.

Os iniciadores para a análise da expressão dos genes selecionados por qPCR foram desenhados a partir de sequências de *A. ipaensis* e *A. duranensis*, espécies para as quais estão disponíveis as sequências genômicas e os modelos gênicos (Tabela S2). A amplificação dos genes entre as espécies ocorreu de forma específica, sem a formação de dímeros, o que indica a conservação dessas sequências nas espécies de *Arachis* analisadas. As eficiências de amplificação dos iniciadores desenhados, calculadas por meio do programa PCR Miner (Zhao e Fernald, 2005), foram semelhantes entre os genes analisados, variando entre 0,88 e 0,91 (Tabela S2). Para os genes de referência, *ACT1*,

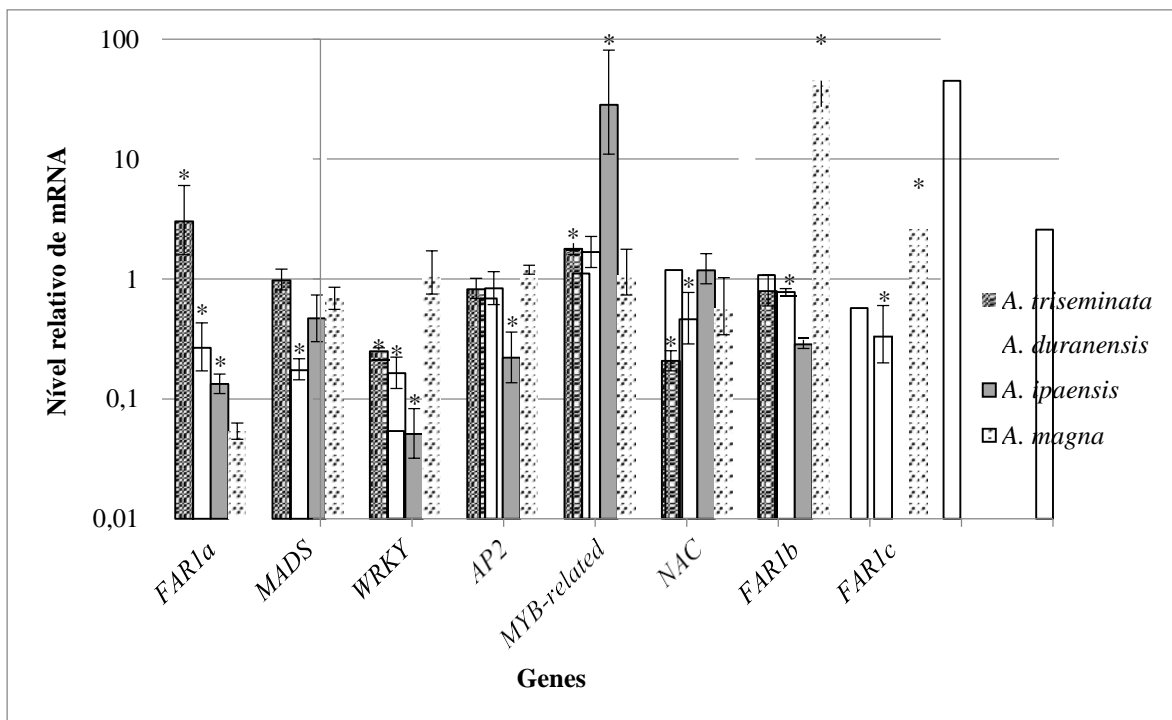
*GAPDH* e *UBI1* (Morgante et al., 2011), foram obtidas eficiências de amplificação de 0,93, 0,89 e 0,92, respectivamente.

A análise da expressão de genes de FT selecionados foi realizada em tecido foliar de plantas de quatro espécies silvestres de *Arachis* mantidas a 20% da CP durante cinco dias. Para os oito genes analisados, foi detectada a expressão diferencial em pelo menos uma das espécies, com destaque para *FAR1b* (Aradu.023N4), que, em *A. magna*, foi superexpresso 45 vezes em plantas sob déficit hídrico, em relação ao controle. Esse gene não sofreu modulação de sua expressão em função do tratamento em *A. triseminata* e *A. ipaensis* e, apesar de ter sido significativamente reprimido em *A. duranensis*, apresentou valor de expressão relativa próximo a 1 (0,78) (Figura 3). Estudos preliminares de análise do transcriptoma apontaram esse gene como superexpresso em resposta ao tratamento de déficit hídrico em *A. duranensis* e *A. hypogaea* (Guimarães et al., 2012; Li et al., 2014). Outro gene com alta superexpressão foi *MYB-related* (Aradu.B7RDX) que, em *A. ipaensis*, foi 28 vezes mais expresso em plantas sob estresse, em relação às hidratadas. Para esse gene foi observada leve tendência a superexpressão em *A. triseminata* e, em *A. duranensis* e *A. magna*, não houve alteração de sua expressão em plantas submetidas ao tratamento. Em estudos preliminares foi observada a repressão e a superexpressão desse gene em *A. hypogaea* e *A. duranensis*, respectivamente (Guimarães et al., 2012; Li et al., 2014). O padrão de expressão do gene *WRKY* (comp69184\_c3) em plantas sob déficit hídrico foi comum entre *A. triseminata*, *A. duranensis* e *A. ipaensis*, com tendência à repressão, e em *A. magna*, não houve variação de sua expressão em função do tratamento. Este gene foi superexpresso em *A. hypogaea* submetida ao déficit hídrico (Li et al., 2014). *NAC* (comp64977) também apresentou tendência à repressão em três espécies, apesar de ter sido predito como superexpresso sob déficit hídrico em *A. hypogaea*. *MADS* (Aradu.G38ML) e *AP2* (comp69438\_c0) tiveram expressão diferencial detectada em apenas uma espécie. Ambos sofreram repressão, o primeiro em *A. duranensis* e o segundo em *A. ipaensis*. Dados da literatura apontam a superexpressão de *MADS* e a repressão de *AP2* em *A. duranensis* e *A. hypogaea*, respectivamente, sob déficit hídrico. *FAR1a* apresentou expressão diferenciada em *A. triseminata*, quando comparada às outras espécies. Nesta

primeira, *FAR1a* foi superexpresso enquanto nas demais houve tendência à repressão. Já *FAR1c* foi superexpresso em *A. magna* e reprimido em *A. duranensis*. Para as outras espécies não foi possível a detecção da expressão pelo método utilizado. Dados da literatura indicam que ambos são superexpressos em *A. duranensis* sob déficit hídrico (Guimarães et al., 2012; Brasileiro et al., 2015) (Tabela 2). Os resultados demonstram que, apesar de haver uma tendência à conservação de tipos e abundâncias de famílias de FT entre espécies de *Arachis*, a modulação da expressão de genes que codificam FT difere entre espécies sob déficit hídrico, até mesmo entre membros de uma mesma família, como no caso de FAR1. Além disso, o padrão de expressão gênica parece ser influenciado pelo método e intensidade de imposição do estresse, bem como pelo método de detecção da expressão gênica, o que justifica as diferenças entre os dados aqui obtidos e aqueles reportados na literatura.

As espécies silvestres de *Arachis* aqui analisadas diferenciam-se no que se diz respeito ao seu centro de origem e tipo de genoma. *A. duranensis* e *A. magna*, com genoma AA e BB, respectivamente, são nativas de regiões de baixa precipitação pluviométrica da Bolívia e Argentina (Krapovickas et al., 2007). Essas espécies apresentaram um perfil conservativo de transpiração quando submetidas à privação de água, em comparação a outros genótipos silvestres (Leal-Bertioli et al., 2012). *A. triseminata*, endêmica da região de Caatinga, apresentou mecanismo diferenciado de aclimação à exposição ao déficit hídrico, por meio da manutenção do teor relativo de água foliar, mesmo com valor superior de condutância estomática ( $g_s$ ) (Capítulo II). Já Azevedo Neto et al. (2010) detectaram a superioridade de *A. ipaensis* quanto à tolerância à seca por meio da avaliação de E,  $g_s$  e redução da taxa de crescimento. Essas particularidades de cada espécie associadas à grande variabilidade genética presente em espécies silvestres, já bem relatada em outros estudos (Bertioli et al., 2011; Blum, 2011; Pratap e Kumar, 2014), tornam-nas uma interessante alternativa aos programas de melhoramento para gerar variabilidade para fatores de estresses bióticos e abióticos e ampliar a base genética das populações, o que justifica a importância de se avaliá-las como potenciais fornecedoras de genes de resistência à seca para o melhoramento do amendoim.

No presente trabalho foi proposta uma compilação de métodos para a identificação e classificação de famílias de FT em plantas. Os resultados sugerem a conservação dos tipos e frequências de famílias e semelhanças entre vias regulatórias de FT entre espécies do gênero *Arachis*. A família FAR1, encontrada em maior abundância em *A. duranensis* e *A. ipaensis*, é também observada com maior frequência em leguminosas e sua expansão pode estar relacionada à origem e diversificação da família Fabaceae. A análise de ortologia entre genes responsivos ao déficit hídrico de *Arachis* spp. e *Arabidopsis* indicou a conservação de vias reguladas por FT nessas duas espécies. Adicionalmente, a modulação da expressão de genes que codificam FT difere entre espécies de *Arachis* sob déficit hídrico e os genes FAR1a e MYB-related mostraram-se bons candidatos para futuros estudos de expressão gênica sob déficit hídrico.



**Figura 3** – Razão dos níveis de mRNA dos fatores de transcrição MADS (Aradu.G38ML), WRKY (comp69184\_c3), AP2 (comp69438\_c0), MYB-related (Aradu.B7RDX), NAC (comp64977), FAR1a (Aradu.B1C6F), FAR1b (Aradu.023N4) e FAR1c (Aradu.UXN6T) entre plantas submetidas ao déficit hídrico e controle, em quatro espécies silvestres de *Arachis*. Barras representam o erro padrão da média. Asteriscos indicam genes diferencialmente expressos ( $P < 0,005$ ).

**Agradecimentos**

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por fornecer subsídios e assistência financeira e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) pela disponibilização de suas instalações e equipe de apoio.

## Referências Bibliográficas

- Azevedo Neto AD, Nogueira RJ, Melo Filho PA e Santos RC (2010) Physiological and biochemical responses of peanut genotypes to water deficit. *Journal of Plant Interactions* 5:1-10.
- Bertioli DJ, Cannon SB, Lutz F, Huang G, Farmer AD, Cannon EKS, Liu X, Gao D, Clevenger J, Dash S et al. (2016) The genome sequences of *Arachis duranensis* and *Arachis ipaensis*, the diploid ancestors of cultivated peanut. *Nature Genetics* 48:438-446.
- Bertioli DJ, Seijo G, Freitas FO, Valls JFM, Leal-Bertioli SC e Moretzsohn MC (2011) An overview of peanut and its wild relatives. *Plant Genetic Resources* 9:134-149.
- Blum A (2011) Genetic Resources for Drought Resistance. In: Blum (ed) *A Plant Breeding for Water-Limited Environments*. Springer Science+Business Media, New York, pp 217-234.
- Brasileiro ACM, Morgante CV, Araujo ACG, Leal-Bertioli SCM, Silva AK, Martins ACQ, Santos CMR, Silva OB, Togawa R, Saraiva MA et al. (2015) Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. *Plant molecular biology reporter* 33:1876-1892.
- Burow MD, Simpson CE, Paterson AH e Starr JL (1996) Identification of peanut (*Arachis hypogaea* L.) RAPD markers diagnostic of root-knot nematode (*Meloidogyne arenaria* (Neal) Chitwood) resistance. *Molecular Breeding* 2:369-379.
- Carpes, GM (2010) Morfologia da germinação das espécies de *Arachis* (*Fabaceae*). Dissertação de mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 90p.
- Chen L, Song Y, Li S, Zhang L, Zou C e Yu D (2012) The role of WRKY transcription factors in plant abiotic stresses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819:120-128.



- Chen TW, Wu TH, Ng WV e Lin WC (2010) DODO: an efficient orthologous genes assignment tool based on domain architectures. Domain based ortholog detection. *BMC bioinformatics* 11:S6.
- Dietz KJ, Vogel MO e Viehhauser A (2010) AP2/EREBP transcription factors are part of gene regulatory networks and integrate metabolic, hormonal and environmental signals in stress acclimation and retrograde signalling. *Protoplasma* 245:3-14.
- Ding H, Zhang ZM, Qin FF, Dai LX, Li CJ, Ci DW e Song WW (2014) Isolation and characterization of drought-responsive genes from peanut roots by suppression subtractive hybridization. *Electronic Journal of Biotechnology* 17:304-310.
- Guimarães PM, Brasileiro AC, Morgante CV, Martins AC, Pappas G, Silva OB, Togawa R, Leal-Bertioli SC, Araujo ACG, Moretzsohn M et al. (2012) Global transcriptome analysis of two wild relatives of peanut under drought and fungi infection. *BMC genomics*, 13:387.
- Hu H e Xiong L (2014) Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Annual review of plant biology* 65:715-741.
- Ištvánek J, Jaroš M, Kšenek A e Aepková J (2014) Genome assembly and annotation for red clover (*Trifolium pratense*; Fabaceae). *American journal of botany* 101:327-337.
- Jin J, Zhang H, Kong L, Gao G e Luo J (2014) PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. *Nucleic acids research* 42:D1182-D1187.
- Kalavacharla V, Liu Z, Meyers BC, Thimmapuram J e Melmaiee K (2011) Identification and analysis of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) transcriptomes by massively parallel pyrosequencing. *BMC plant biology* 11:135.
- Krapovickas A, Gregory WC, Williams DE e Simpson CE (2007) Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 16:7-205.

- Leal-Bertioli SC, Bertioli DJ, Guimarães PM, Pereira TD, Galhardo I, Silva JP, Brasileiro ACM, Oliveira RS, Silva PÍT, Vadez V et al. (2012) The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environmental and Experimental Botany* 84:17-24.
- Leal-Bertioli SCM, De Farias MP, Silva PÍT, Guimarães PM, Brasileiro ACM, Bertioli DJ e De Araujo ACG (2010) Ultrastructure of the initial interaction of *Puccinia arachidis* and *Cercosporidium personatum* with leaves of *Arachis hypogaea* and *Arachis stenosperma*. *Journal of Phytopathology* 158:792-796.
- Leal-Bertioli SCM, Vadez V, Guimarães P, Silva P, Moraes L, Bertioli D e Araújo A (2007) Avaliação de espécies silvestres de *Arachis*, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 166.
- Lehti-Shiu MD, Panchy N, Wang P, Uygun S e Shiu SH (2017) Diversity, expansion, and evolutionary novelty of plant DNA-binding transcription factor families. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms* 1860:3-20.
- Libault M, Joshi T, Benedito VA, Xu D, Udvardi MK e Stacey G (2009) Legume transcription factor genes: what makes legumes so special?. *Plant Physiology* 151:991-1001.
- Li X, Lu J, Liu S, Liu X, Lin Y e Li L (2014) Identification of rapidly induced genes in the response of peanut (*Arachis hypogaea*) to water deficit and abscisic acid. *BMC biotechnology* 14:58.
- Lindemose S, O'Shea C, Jensen MK e Skriver K (2013) Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences* 14:5842-5878.

- Matsui A, Ishida J, Morosawa T, Mochizuki Y, Kaminuma E, Endo TA, Okamoto M, Nambara E, Nakajima M, Kawashima M et al. (2008) Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant and Cell Physiology* 49:1135-1149.
- Morgante CV, Guimarães PM, Martins AC, Araújo AC, Leal-Bertioli SC, Bertioli DJ e Brasileiro AC (2011) Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. *BMC Research Notes* 4:339.
- Naika M, Shameer K, Mathew OK, Gowda R e Sowdhamini R (2013) STIFDB2: an updated version of plant stress-responsive transcription factor database with additional stress signals, stress-responsive transcription factor binding sites and stress-responsive genes in Arabidopsis and rice. *Plant and Cell Physiology* 54:e8-e8.
- Pérez-Rodríguez P, Riano-Pachon DM, Corrêa LGG, Rensing SA, Kersten B e Mueller-Roeber B (2010) PlnTFDB: updated content and new features of the plant transcription factor database. *Nucleic acids research* 38:822-827.
- Pfaffl MW, Horgan GW e Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30:e36-e36.
- Pratap A e Kumar J (2014) Alien gene transfer in crop plants: an introduction. In: Pratap A e Kumar J (eds) Alien gene transfer in crop plants, volume 1: Innovations, Methods and Risk Assessment. Springer Science+Business Media, New York, pp 1-23.
- Proite K, Carneiro R, Falcao R, Gomes A, Leal-Bertioli S, Guimaraes P e Bertioli DJ (2008) Post-infection development and histopathology of *Meloidogyne arenaria* race 1 on *Arachis* spp. *Plant Pathology* 57:974-980.

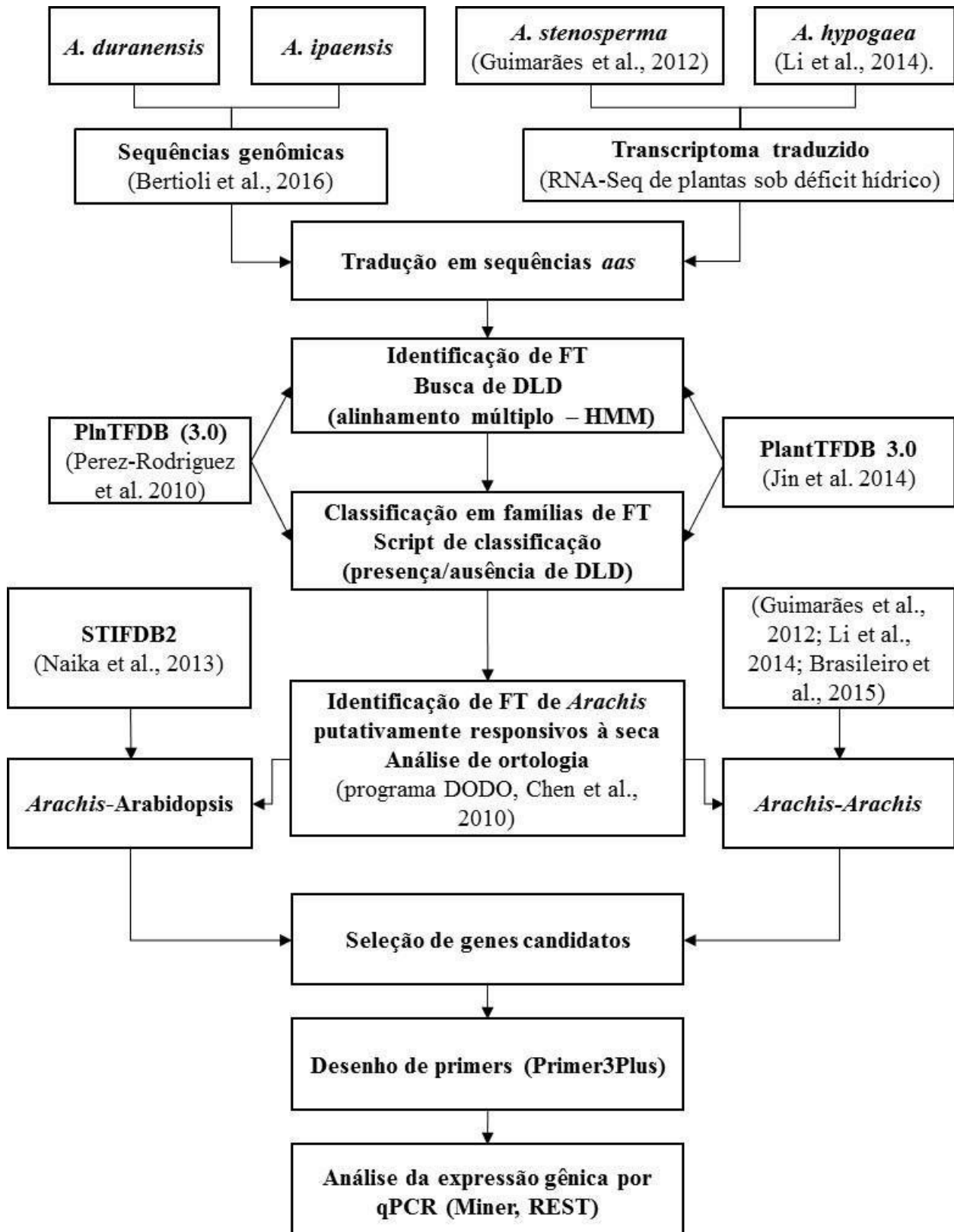
- Shameer K, Ambika S, Varghese SM, Karaba N, Udayakumar M e Sowdhamini R (2009) STIFDB— Arabidopsis stress responsive transcription factor dataBase. International journal of plant genomics, 2009:1-8.
- Siddiqui H, Khan S, Rhodes BM e Devlin PF (2016) FHY3 and FAR1 act downstream of light stable phytochromes. Frontiers in plant science, 7:175.
- Simpson CE, Starr JL, Church, GT, Burow MD e Paterson AH (2003) Registration of 'NemaTAM' peanut.(Registrations Of Cultivars). Crop Science 43:1561-1562.
- Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M e Rozen SG (2012) Primer3—new capabilities and interfaces. Nucleic Acids Research 40:e115-e115.
- Wang CT, Wang XZ, Tang YY, Chen DX, Cui FG, Zhang JC e Yu SL (2011) Phylogeny of *Arachis* based on internal transcribed spacer sequences. Genet Res Crop Evol 58:311-319.
- Wang W, Tang W, Ma T, Niu D, Jin JB, Wang H e Lin R (2016) A pair of light signaling factors FHY3 and FAR1 regulates plant immunity by modulating chlorophyll biosynthesis. Journal of integrative plant biology 58:91-103.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S e Madden T (2012) Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13:134.
- Zhang H, Jin J, Tang L, Zhao Y, Gu X, Gao G e Luo J (2010) PlantTFDB 2.0: update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. Nucleic acids research 39(suppl 1):D1114-D1117.
- Zhang T, Zhang D, Liu Y, Luo C, Zhou Y e Zhang L (2015) Overexpression of a NF-YB3 transcription factor from *Picea wilsonii* confers tolerance to salinity and drought stress in transformed *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology and Biochemistry 94:153-164.

Zhao L, Ding Q, Zeng J, Wang FR, Zhang J, Fan SJ e He XQ (2012) An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis* 23:647-650.

Zhao S e Fernald RD (2005) Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of computational biology* 12:1047-1064.

## Material Suplementar

**Figura S1** – Representação esquemática das etapas de identificação e classificação de FT em *Arachis* spp. sob déficit hídrico.



**Tabela S1** – Classificação de fatores de transcrição baseada na presença/ausência de domínios de ligação ao DNA (DLD)

Família		DLD	Domínios auxiliares	Domínios proibidos	
AP2/ERF superfamily	AP2 <sup>1,2</sup>	AP2 (>=2) (PF00847)			
	ERF <sup>1</sup>	AP2 (1) (PF00847)			
	RAV <sup>1</sup>	AP2 (PF00847) B3 (PF02362)			
B3 superfamily	ARF <sup>1,2</sup>	B3 (PF02362)	Auxin_resp (PF06507)		
	B3 <sup>1,2</sup>	B3 (PF02362)			
BBR-BPC <sup>1,2</sup>		GAGA_bind (PF06217)			
BES1 <sup>1,2</sup>		DUF822 (PF05687)			
bHLH <sup>1,2</sup>		HLH (PF00010)			
bZIP <sup>1,2</sup>		bZIP_1 (PF00170)			
C2C2 superfamily	CO-like <sup>1,2</sup>	zf-B_box (PF00643)	CCT (PF06203)		
	Dof <sup>1,2</sup>	zf-Dof (PF02701)			
	GATA <sup>1,2</sup>	GATA-zf (PF00320)			
	LSD <sup>1</sup>	zf-LSD1 (PF06943)		Peptidase_C14 (PF00656)	
	YABBY <sup>1,2</sup>	YABBY/ARID <sup>3</sup>	YABBY (PF04690)	ARID	
		YABBY/HMG <sup>3</sup>	YABBY (PF04690)	HMG	ARID
C2H2	C2H2-zinc finger <sup>1,2</sup>	zf-C2H2 (PF00096)		RNase_T (PF00929)	
	C2H2-Jumonji <sup>3</sup>	Zf-C2H2 (PF00096) Jumonji (PF02373, PF02375)			
C3H	C3H <sup>1,2</sup>	zf-CCCH (PF00642)		RRM_1 (PF00076) ou Helicase_C (PF00271)	
	C3H/SWIB <sup>3</sup>	zf-CCCH (PF00642)	SWIB		
CAMTA <sup>1,2</sup>		CG-1 (PF03859)			
CPP superfamily	CPP <sup>1,2</sup>	TCR (PF03638)			
	CPP/SET <sup>3</sup>	TCR (PF03638)	SET		
CCAAT <sup>2</sup>		CBFB_NFYA CBFD_NFYB_HMF CCAAT-Dr1 NF-YB NF-YC			
	DBB-ZfB <sup>1</sup>	zf-B_box (>=2) (PF00643)			

DBB superfamily	DBB-SWIB <sup>3</sup>	zf-B_box (>=2) (PF00643)	SWIB	
E2F/DP superfamily	E2F/DP <sup>1,2</sup>	E2F_TDP (PF02319)		
	E2F/DP/bZIP <sup>3</sup>	E2F_TDP (PF02319)	bZIP (PF00170)	
EIL <sup>1,2</sup>		EIN3 (PF04873)		
FAR1 superfamily	FAR1 <sup>1,2</sup>	FAR1 (PF03101)		
	FAR1-Like <sup>3</sup>	FAR1 (PF03101)	WRKY	
GARP superfamily	ARR-B <sup>1</sup>	G2-like	Response_reg (PF00072)	
	G2-like <sup>1,2</sup>	G2-like		
GeBP superfamily	GeBP <sup>1,2</sup>	DUF573 (PF04504)		
	GeBP-jumonii <sup>3</sup>	DUF573 (PF04504)	Jmjc	
	GeBP-Trihelix <sup>3</sup>	DUF573 (PF04504)	Trihelix	
GRAS <sup>1,2</sup>		GRAS (PF03514)		
GRF <sup>2</sup>	GRF/QLQ <sup>1</sup>	WRC (PF08879)	QLQ (PF08880)	
	GRF/Jumonii <sup>3</sup>	WRC (PF08879)	Jumonii	
HB superfamily	HD-ZIP <sup>1</sup>	Homeobox (PF00046)	HD-ZIP_I/II ou START (PF01852)	
	TALE <sup>1</sup>	Homeobox (PF00046)	BELL ou ELK (PF03789)	
	HB-PHD <sup>1</sup>	Homeobox (PF00046)	PHD (PF00628)	
	HB-DDT <sup>3</sup>	Homeobox	DDT	
	HB-QLQ <sup>3</sup>	Homeobox	QLQ	
	HB-other <sup>1,2</sup>	Homeobox (PF00046)		
HRT-like <sup>1,2</sup>		HRT-like		
HSF <sup>1,2</sup>		HSF_dna_bind (PF00447)		
LBD (AS2/LOB) <sup>1,2</sup>		DUF260 (PF03195)		
LFY <sup>1,2</sup>		FLO_LFY (PF01698)		
MADS superfamily	M-type <sup>1,2</sup>	SRF-TF (PF00319)		
	MIKC <sup>1</sup>	SRF-TF (PF00319)	K-box (PF01486)	
MYB superfamily	MYB <sup>1,2</sup>	Myb_dna_bind (>=2) (PF00249)		SWIRM (PF04433) RWP-RK (PF02042)
	MYB_related <sup>1,2</sup>	Myb_dna_bind (1) (PF00249)		SWIRM (PF04433) RWP-RK (PF02042)
	MYB/Nin-like fusion <sup>3</sup>	Myb_dna_bind (1) (PF00249)	RWP-RK (PF02042)	



Meinox <sup>3</sup>		Knox1		Homeobox
		Knox2		Glo_ED1_BRP_like
NAC <sup>1,2</sup>		NAM (PF02365)		
NF-X1 <sup>1</sup>		Zf-NF-X1 (PF01422)		
NF-Y superfamily	NF-YA <sup>1</sup>	CBFB_NFYA (PF02045)		
	NF-YB <sup>1</sup>	NF-YB		
	NF-YC <sup>1</sup>	NF-YC		
Nin-like <sup>1,2</sup>		RWP-RK (PF02042)		
NZZ/SPL <sup>1,2</sup>		NOZZLE (PF08744)		
SAP <sup>1,2</sup>		STER_AP		
S1Fa-like <sup>1,2</sup>		S1FA (PF04689)		
SBP <sup>1,2</sup>		SBP (PF03110)		
SRS <sup>1,2</sup>		DUF702 (PF05142)		
TCP <sup>1,2</sup>		TCP (PF03634)		
Trihelix <sup>1,2</sup>		Trihelix		
VOZ <sup>1,2</sup>		VOZ		
Whirly <sup>1,2</sup>		Whirly (PF08536)		
WRKY <sup>1,2</sup>		WRKY (PF03106)		
ZF-HD <sup>1,2</sup>		ZF-HD_dimer (PF04770)		
FHA <sup>2</sup>		FHA (PF00498)		
LIM <sup>2</sup>		LIM(PF00412)		
PLATZ <sup>2</sup>		PLATZ (PF04640)		
TUB <sup>2</sup>		Tub (PF01167)		
ULT <sup>2</sup>		ULT		
TAZ <sup>2</sup>		zf-TAZ(PF02135)		PHD (PF00628)
Alfin-like	Alfin-like <sup>2</sup>	Alfin-like		DDTh2 VARL
	Alfin-like-DDT <sup>3</sup>	Alfin-like	DDTh2	VARL
BSD <sup>2</sup>		BSD (PF03909)		
CSD <sup>2</sup>		CSD (PF00313)		
DBP <sup>2</sup>		DNC (Download from PlnTFDB) PP2C (PF00481)		
OFP <sup>2</sup>		Ovate(PF04844)		
Sigma70-like <sup>2</sup>		sigma70_r2 (PF04542)		

		sigma70_r3 (PF04539) sigma70_r4 (PF04545)		
Tify <sup>2</sup>	Tify-I <sup>3</sup>	tify (PF06200)	GATA(PF00320)	
	Tify-IIa <sup>3</sup>	tify (PF06200)	CCT (PF06203)	GATA(PF00320)
	Tify-IIb <sup>3</sup>	tify (PF06200)		GATA(PF00320)
mTERF <sup>2</sup>		mTERF (PF02536)		
VARL	VARL <sup>2</sup>	VARL		PHD (PF00628) SET
	VARL/Alfin-like fusion <sup>3</sup>	VARL	Alfin-like	
	VARL/PHD/SET <sup>3</sup>	VARL	PHD (PF00628) SET	

**Tabela S2** – Sequência de iniciadores utilizados para a análise da expressão de genes de FT e suas respectivas eficiências de amplificação

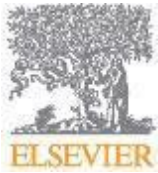
Gene	Família FT	Espécie	Iniciador Forward (5'-3')	Iniciador Reverse (5'-3')	Tamanho amplicon (cDNA)	Eficiência de amplificação
Aradu.UXN6T	FAR1c	<i>A. duranensis</i>	AGTGTTCTACGCCGAAAGG	GCGGATCTGTCAACATTGGC	87 pb	0,9
Aradu.G38ML	MADS	<i>A. duranensis</i>	CCTGATGGAGCTGGACTTGG	ACTTTGGATGTTAGCGCCGA	138 pb	0,89
Araip.RC4R7	WRKY	<i>A. ipaensis</i>	CCACCTTCACTGCCACTTGA	GGCCAGCAAAGCCTCAATAG	151 pb	0,9
Araip.MAL00	AP2-EREBP (AP2)	<i>A. ipaensis</i>	AAGCTGCCAGGGCTTATGAC	CGTTGCCTCCTGACGATTCA	117 pb	0,91
Aradu.B7RDX	MYB-related	<i>A. duranensis</i>	ACGCTCTTTGTTGAGGCAGA	GATGCTCATTGGGCTTTGGG	93 pb	0,91
Aradu.B1C6F	FAR1a	<i>A. duranensis</i>	GTGCTCATAACAGAGGGTGCA	TGGACCCCTTCATAGGTTGTG	90 pb	0,9
Aradu.YFQ3P	NAC	<i>A. duranensis</i>	AGGCTTGATGATTGGGTGCT	CCGCCCAAGATGGTTGTAT	76 pb	0,88
Aradu.023N4	FAR1b	<i>A. duranensis</i>	CGGAATTCTCAGACTCGCA	TGCACCCCATGAATACAGCA	87 pb	0,91

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados aqui expostos refletem a importância de se avaliar diversos parâmetros fisiológicos e bioquímicos na resposta de plantas ao déficit hídrico. Em *Arachis* spp., o TRAf foi sensível ao aumento da severidade do déficit hídrico, porém, não foi útil como indicativo de tolerância. A análise conjunta dos dados de trocas gasosas e fluorescência sugere possíveis limitações não estomáticas em *A* nas espécies analisadas, além de apontar uma potencial susceptibilidade à seca em *A. duranensis*. O valor superior de  $g_s$  e a tendência a manutenção de um maior TRAf sob déficit hídrico, sugere a presença de um possível mecanismo de aclimação diferenciado em *A. triseminata* para retardar ou minimizar os efeitos causados pela exposição ao estresse. Os métodos de MDA e EL utilizados foram eficientes na detecção dos efeitos do déficit hídrico sobre a integridade de membranas, tanto em *A. hypogaea* como nas quatro espécies silvestres analisadas, em diferentes níveis de hidratação, porém foram contraditórios na indicação de tolerância entre espécies. As reduções observadas nos teores de clorofila *a* e carotenoides refletem a sensibilidade do aparato fotossintético ao déficit hídrico. Além disso, podem ser relacionadas negativamente a redução na taxa de *A* e ao aumento dos danos a integridade das membranas. O maior valor de prolina observado em *A. hypogaea* BRS Havana sugere que esta variedade pode ter sido favorecida por seleção indireta com plantas de maior teor de prolina sob déficit hídrico durante o seu desenvolvimento e que podem haver mecanismos diferenciados de ajuste osmótico entre a espécie cultivada e as silvestres. Isto posto, foi possível constatar a sensibilidade dos parâmetros avaliados à deficiência hídrica em *Arachis* spp., no entanto, para a avaliação de tolerância à seca mostraram-se insatisfatórios, sugerindo-se a necessidade de ensaios futuros de atividade enzimática para avaliação de estresse oxidativo e o acúmulo de outros osmólitos compatíveis para definição dos mecanismos de ajuste osmótico que atuam em cada espécie analisada.

Quanto a caracterização genética das espécies silvestres do gênero *Arachis*, os resultados apontam a conservação das famílias de FT e suas frequências entre espécies do gênero, e semelhanças entre vias regulatórias de FT entre *Arachis* spp. A análise de ortologia entre genes responsivos ao déficit hídrico de *Arachis* spp. e *Arabidopsis* indicou a conservação de vias reguladas por FT em *A. duranensis* e *A. ipaensis*. Adicionalmente, a modulação da expressão de genes que codificam FT difere entre espécies de *Arachis* sob déficit hídrico e os genes FAR1a e MYB-related mostraram-se bons candidatos para futuros estudos de expressão gênica sob déficit hídrico.

**ANEXO I**  
**NORMAS DAS REVISTAS**

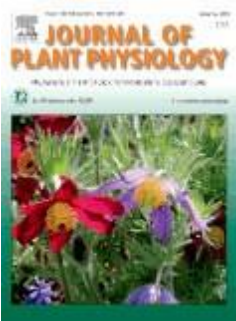


# JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY

Mechanisms of Plant Function: from Molecular to Ecosystem Scales

## AUTHOR INFORMATION PACK TABLE OF CONTENTS

- **Description**
- **Audience**
- **Impact Factor**
- **Abstracting and Indexing**
- **Editorial Board**
- **Guide for Authors**



ISSN: 0176-1617

## DESCRIPTION

The Journal of Plant Physiology is a broad-spectrum journal that welcomes high-quality submissions in all major areas of **plant physiology: growth and development**, biochemistry and metabolism, **transport and translocation**, and **plant responses to stress**. Studies are welcome at all levels of integration ranging from molecules and cells to organisms and their environments and are expected to use state-of-the-art methodologies. To be considered for publication, papers must significantly contribute to the mechanistic understanding of physiological processes, and not be merely descriptive, or confirmative of previous results. We also encourage the submission of papers that explore the physiology of non-model species as well as accepted models and those that bridge basic and applied research.

The Journal of Plant Physiology publishes several types of articles: Original Research Articles, Reviews, Perspectives Articles, and Short Communications. While Reviews and Perspectives papers are usually invited by an editor, we also welcome proposals for such manuscripts on topics of high current interest to the physiology community. Original research papers comprise the majority of published contributions.

Founded in 1909, with roots tracing back to 1818, the Journal of Plant Physiology has consistently published landmark papers in plant physiology, and is one of the world's oldest international journals in the botanical sciences.

**An official journal of the Federation of European Societies of Plant Biology (FESPB)**

### Benefits to authors

We provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

## AUDIENCE

Plant physiologists, biochemists, botanists, taxonomists, ecologists, geneticists, agriculturists, forest scientists, plant molecular biologists.

## **IMPACT FACTOR**

2015: 2.971 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

## **ABSTRACTING AND INDEXING**

BIOSIS

Biochemistry and Biophysics Citation Index

Cambridge Scientific Abstracts

Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences

Current Contents/Life Sciences

MEDLINE®

FSTA (Food Science and Technology Abstracts)

Reference Update

Research Alert

SCISEARCH

Science Citation Index

Current Awareness in Biological Sciences

CAB Abstracts

Chemical Abstracts Service

Scopus

Science Citation Index Expanded

## **EDITORIAL BOARD**

### *Editor-in-Chief*

**Herbert J. Kronzucker**, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

**Quan-Sheng Qiu**, Lanzhou University, Gansu, China

**Christian Wilhelm**, Universität Leipzig, Leipzig, Germany

**Chunhong Yang**, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

**Manuscript Managing Officer (Submissions from Europe, Africa, Middle East)**

Laura Clart

**Christina Schindler**, Inst. für Botanik, Universität Leipzig, Johannisallee 21-23, 04103, Leipzig, Germany,

Fax: ++49-341-973-6899

**Manuscript Managing Officer (Subm. from The Americas, Asia (excl. China), Australia, Oceania)**

**Dev T. Britto**, Department of Biological Sciences, University of Toronto, 1265 Military Trail, Toronto, M1C

1A4, Ontario, Canada

**Manuscript Managing Officer (Submissions from China)**

**Cheng Liu**, Inst. of Botany, Photosynthesis Research Center, Chinese Academy of Sciences (CAS),

Nanxincun 20, Xiangshan, 100093, Beijing, China

### *Review Editor*

**Dev T. Britto**, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada

### *Book Review Editor*

**Torsten Jakob**, Universität Leipzig, Leipzig, Germany

### *Advisory Board*

**Kang Chong**, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China

**John Cushman**, University of Nevada at Reno, Reno, Nevada, USA

**Jaume Flexas**, Universitat de les Illes Balears, Palma de Mallorca, Spain

**Zhizhong Gong**, China Agricultural University, Beijing, China

**Franz Hoffmann**, University of California at Irvine, Irvine, California, USA

**Norman P.A. Huner**, Western University, London, Ontario, Canada

**Werner Kaiser**, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg, Germany

**Jaakko Kangasjärvi**, University of Helsinki, Helsinki, Finland

**Bryan D. McKersie**, Research Triangle Park, North Carolina, North Carolina, USA

**R. George Ratcliffe**, University of Oxford, Oxford, UK

**John Raven**, University of Dundee, Dundee, Scotland, UK

**Uwe Sonnewald**, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, Germany

**Sudhir K. Sopory**, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), New Delhi, India

### *Subject Editors*

**Claudia Büchel**, Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt, Germany

**Fan Chen**, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China  
**Joost van Dongen**, RWTH Aachen University (RWTH), Aachen, Germany  
**Brett Ferguson**, University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia  
**Aurelio Gomez Cadenas**, Universitat Jaume I, Castellón, Spain  
**Dirk K. Hincha**, Max Planck Institut (MPI) für molekulare Pflanzenphysiologie, Potsdam, Germany  
**Abir Igamberdiev**, Memorial University of Newfoundland, St. Johns, Newfoundland and Labrador, Canada  
**Autar Mattoo**, U.S. Department of Agriculture (USDA), Agricultural Research Service (ARS), Beltsville, Maryland, USA  
**Zed Rengel**, University of Western Australia, Perth, Western Australia, Australia  
**Hans Schnyder**, Technische Universität München, Freising, Germany  
**Weiming Shi**, Chinese Academy of Sciences, Nanjing, China  
**Greg Vanlerberghe**, University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada  
**Shuhua Yang**, China Agricultural University, Beijing, China  
**Editorial Board**  
**Joong-Hoon Ahn**, Konkuk University, Seoul, South Korea  
**Francisco Javier Cejudo**, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain  
**Luis A. del Rio**, University of Granada, Granada, Spain  
**Zsuzsanna Kolbert**, University of Szeged, Közép fasor 52, Hungary  
**Jinxing Lin**, Beijing Forestry University, Beijing, China  
**Sylvia Lindberg**, Stockholms Universitet, Stockholm, Sweden  
**Luigi Sanità di Toppi**, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy  
**Teruhiro Takabe**, Meijo University, Tempaku-ku, , Nagoya, Japan  
**Edith Taleisnik**, INTA Centro Regional La Pampa, Córdoba, Argentina  
**Bai-Chen Wang**, Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing, China

## GUIDE FOR AUTHORS

### INTRODUCTION

The *Journal of Plant Physiology (J Plant Physiol)* publishes, in English, original papers, short communications and reviews in all areas of plant physiology, plant biochemistry, plant molecular biology and functional biotechnology of plants.

Manuscripts covering applied issues can be accepted only if establishing general principles in plant physiology and contributing to the understanding of physiological mechanisms. Studies that merely confirm known facts in just another species will normally not be considered for publication.

#### *Types of paper*

The *Journal of Plant Physiology* accepts three types of manuscripts:

#### **Invited Reviews (IR)**

Authors interested in writing a review article should contact one of the editors in advance by submitting a summary of the intended manuscript. The editor may then send an official letter of invitation with further instructions.

#### **Original Papers (OP)**

Original Papers represent a substantial novel finding in plant physiology, normally produced through the application of a combination of experimental techniques. The text should not exceed 10 printed pages including tables and figures (45000 characters plus up to ten figures and/or tables).

#### **Short Communications (SC)**

Short Communications should not exceed 4 printed pages including tables and figures (20000 characters and up to 4 figures and/or tables). Please note: A SC is not a publication that contains too few or preliminary data to justify a full paper. It should report "urgent data" that should be communicated to the scientific community prior to the completion of the full investigation.

#### *Page charges*

This journal has no page charges.

#### *Submission checklist*

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:



- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

*Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

## BEFORE YOU BEGIN

### *Ethics in publishing*

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

### *Declaration of interest*

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. [More information](#).

### *Submission declaration*

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

### *Changes to authorship*

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

*Article transfer service*

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article

is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information](#).

### Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

### Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

*Elsevier supports responsible sharing*

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

### Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

*Funding body agreements and policies*

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

### Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

#### Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

*Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

*Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)*

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2400**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

#### *Green open access*

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 24 months.

#### *Language (usage and editing services)*

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

### **Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

#### *Submit your article*

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/jplph>.

## **PREPARATION**

#### *Use of word processing software*

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns.

The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Article structure**

#### *Subdivision - unnumbered sections*

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

#### *Introduction*

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

#### *Material and methods*

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

#### *Theory/calculation*

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

#### *Results*

Results should be clear and concise.

#### *Discussion*

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

#### *Conclusions*

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

#### *Appendices*

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

### **Essential title page information**

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible. Report data rather than giving a description of the experiments performed, if possible. Try to void "the effect of on..." or similar.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

### **Summary**

A concise and factual summary is required. The summary should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. A summary is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, references should not be included. Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the summary itself. The summary will be attached to the invitation letter mailed to potential reviewers.

#### *Graphical abstract*

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: [Illustration Service](#).

### Keywords

Immediately after the summary, provide a maximum of 6 keywords, using British or American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

### Abbreviations

List all abbreviations used which are non-standard. Abbreviations used for the axes of graphs should be listed in the abbreviation list not the figure legend. Use abbreviations consistently after the first introduction.

### Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

### Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding. If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

### Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

### Footnotes

Footnotes are not permitted.

### Artwork

#### Electronic artwork

#### General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

#### Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

**Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

*Color artwork*

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

If the printed version of the figures is to be black-and-white, authors should submit black-and-white figures for review. If a manuscript was reviewed and accepted with color figures, it should be published in color.

*Illustration services*

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

*Figure captions*

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

**Tables**

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

**References**

Keep the number of references at the required minimum. Avoid web citations unless their future availability is guaranteed. Text citations and references listed in the reference list must perfectly match. Mismatches, including year of publication and misspellings of names, will cause problems when electronic links are established and, consequently, delay the publication of the manuscript.

*Web references*

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

*Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should



include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

#### *References in a special issue*

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

#### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-plant-physiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

#### *Reference style*

*Text:* All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown ....'

*List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

#### *Examples:*

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13.03.03).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

#### *Journal abbreviations source*

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **Video**

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting

in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

### **Supplementary material**

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our [artwork instruction pages](#).

### **Database linking**

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). [More information and a full list of supported databases](#).

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article.

AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Common problems in manuscript formatting**

- do not start sentence with an abbreviation or a numeral
- abbreviation for "liter" always capital (upper case) "L", for example mL
- always insert space between numeral and unit, for example 1 mL, 1 mM, 1 h, 1 min
- use consistently h for hour(s), min for minute(s), s for second(s), d for day(s); note: h not hs for hours, no period
- do not use "&" for "and"
- do not use terms Southern/Northern/Western, instead: DNA/RNA/protein gel blot analysis/hybridization
- use nomenclature, including gene names and symbols and other genetic terms, in a scientifically accurate manner according to nomenclature conventions adopted by the scientific community
- give authority in Materials and Methods only
- use correct journal abbreviations
- use short form of page numbering
- use correct punctuation in text citations and references
- be consistent in formatting figures and tables (for example, writing Gene Expression but Enzyme activity is inconsistent application of capitalization)



## AFTER ACCEPTANCE

### *Availability of accepted article*

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

### **Online proof correction**

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### **Offprints**

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.



## INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN 1415-4757 *printed version*  
ISSN 1678-4685 *online version*

- [Scope and policy](#)
- [Submission of papers](#)

### Scope and policy

**Genetics and Molecular Biology** (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The journal considers contributions that present the results of original research in genetics, molecular biology, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been published or are not under consideration for publication elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, as evaluated by the Editor, are reviewed by an Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

The official abbreviation for Genetics and Molecular Biology is **Genet. Mol. Biol.**

#### Open-Access policy

Genetics and Molecular Biology articles are made available in full content at SciELO (Scientific Library Online) hosted at <http://www.scielo.br/gmb>. Back issues dating until 1998 are available through this site.

GMB articles published since 2009 are also indexed at PubMed Central and available in full text version at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1440/>.

Back issues of earlier titles (Brazilian Journal of Genetics and Revista Brasileira de Genética) are hosted at GMB's own site: <http://www.gmb.org.br>

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to Genetics and Molecular Biology.

For nonmembers and institutions, the annual subscriptions rates (four issues/year) are informed at the journal's website <http://www.gmb.org.br>.

### Submission of papers

1. Manuscripts have to be submitted through our online submission platform: <https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

A cover letter addressed to the Editor-in-Chief is required

2. For submission the following instructions must be observed:

- The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.
- Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m)
- The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).
- Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).
- Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed.

Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

### 3. Categories of Contribution

#### Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the title page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The Title Page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations

must be indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names separated by "and"; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Do not start a sentence with an Arabic numeral. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; we also recommend to present names of orders or families in the Title and/or when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text.

The text includes the following elements:

*Introduction* - Description of the background that led to the study.

*Material (or Subjects) and Methods* - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

*Results* - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

*Discussion* - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

**e) Conflict of Interest: Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.**

f) **The References Section**: Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to

data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by *et al.* Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>) or Thomson Reuters Web of Knowledge.

*Sample journal article citation:*

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatius* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

*Sample book citation:*

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 p.

*Sample chapter-in-book citation:*

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

*Sample electronic article citation:*

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

g) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

*Sample Internet resource citation:*

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM Software, [http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid\\_design.htm](http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm) (September 4, 2009)

h) **Tables: Formats for tables are Word or RTF in Windows platform.**

**They** must be prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator) and must be numbered consecutively in Arabic numerals). A concise title should be provided above the table. Each column should have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

i) **Figures: Formats for figures are TIFF or JPEG. They** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require resolution yielding 300 dpi for grayscale and color figures. These resolutions refer to the output size of the file, that being the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that

images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted and will be reproduced free of charge in the electronic and printed versions. Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file.

j) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

k) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

l) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

m) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, a statement must be provided that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

n) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the print version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

*Supplementary material - the following online material is available for this article:*

- *Table S1 - < short title >*
- *Figure S1 - < short title >*

#### Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited, include an Abstract no longer than five percent of the paper's length, but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion in a single section and without headers. Up to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.n

#### Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

#### Review Articles

Review Articles are welcome.

#### Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

#### History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

#### 4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author, who will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by e-mail to the Editorial Office.

#### 5. Availability of articles and deposition in databases

Article copies are provided as PDF-files. Authors may deposit these in their personal or institutional homepage, as well as in public databases.

#### 6. Publication charge

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.

### **Gene/Protein Nomenclature Guidelines and Requirements for *Genetics and Molecular Biology* Authors:**

#### 1. General Guidelines

- ALWAYS use approved gene/protein names and symbols in your paper (see below)
- ALWAYS check out every single gene/protein name and symbol in your paper (even if you have seen it published previously and think you know what it is)
- Sometimes the approved gene/protein name or symbol is no longer valid. In these cases, on first mention of the gene/protein, first use the approved designation and then add in parenthesis (previously known as xxx). Thereafter, use the correct symbol and not the previous designation.

#### 2. Guidelines for Specific Species

##### **Human/Non-human primates/Domestic species/and default for everything that is not a mouse, rat, fish, worm, or fly**

Website for nomenclature rules and finding human gene (and mutant allele) symbols:

- <http://www.genenames.org>

### General rules:

- Full gene names are not italicized and Greek symbols are NEVER used
  - eg: insulin-like growth factor 1
- Gene symbols
  - Greek symbols are never used
  - hyphens are almost never used
  - gene symbols are italicized, all letters are in upper case
    - eg: *IGF1* (in italics)
- Proteins designations
  - same as the gene symbol, but not italicized and, depending on species, all in upper case, but at least first letter in upper case
    - eg: IGF1
- mRNA and cDNA use the gene symbol and formatting conventions
  - eg: "... levels of *IGF1* (in italics) mRNA increased when..."

### Mouse/Rat/Chicken

Websites for nomenclature rules and finding gene (and mutant allele) symbols:

- (mouse, rat, and chicken) <http://www.informatics.jax.org/>
- (dedicated to rat) <http://rgd.mcw.edu/>

General nomenclature rules (applicable to mouse, rat, and chicken):

- Full gene names are not in italics and Greek symbols are NEVER used
  - eg: insulin-like growth factor 1
- Gene symbols
  - Greek symbols are never used
  - hyphens are almost never used
  - gene symbols are italicized, first letter upper case all the rest lower case
    - eg: *Igf1* (italicized)
- Proteins designations
  - same as the gene symbol, but not italicized and all upper case
    - eg: IGF1
- mRNA and cDNA use the gene symbol and formatting conventions
  - eg: "... levels of *Igf1* (italicized) mRNA increased when..."
- Mutant alleles should be defined when first mentioned
  - eg: *Igf1<sup>tm1Arge</sup>/Igf1<sup>tm1Arge</sup>* (italicized) is one of several knockout alleles of *Igf1* (italicized)
    - All letters and numbers are italicized and the allelic designation (*tm1Arge*) is a superscript
    - After initial specification, the homozygous KO can be indicated as *Igf1*<sup>-/-</sup> (all in italics and <sup>-/-</sup> as superscript); the heterozygote is *Igf1*<sup>+/-</sup> etc.

For more details on these nomenclature conventions, see:

- MGI Nomenclature page: <http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/index.shtml>
- MGI Quick Guide for Genes: [http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/short\\_gene.shtml](http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/short_gene.shtml)

### Fish (use for all fish)

Website for nomenclature rules and gene (and mutant allele) symbols



- [http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB\\_home.app](http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?MIval=aa-ZDB_home.app)

General rules:

- Full gene names are italicized, all lower case, NEVER use Greek symbols
  - eg: *cyclops* (in italics)
- Gene symbols are italicized, all lower case
  - eg: *cyc* (in italics)
- Protein designations are the same as the gene symbol, but first letter only upper case and not italicized
  - eg: Cyc

**Fly**

Website for nomenclature rules and gene (and mutant allele) symbols

<http://www.flybase.org>



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

**Sociedade Brasileira de Genética**  
**Rua Cap. Adelmio Norberto da Silva, 736**  
**14025-670 Ribeirão Preto SP Brasil**  
**Tel.: (55 16) 3911-4130 / Fax.: (55 16) 3621-3552**



[editor@gmb.org.br](mailto:editor@gmb.org.br)

**ANEXO II**  
**DETALHES DA METODOLOGIA**

## 1. Material vegetal

Pelo fato dos acessos silvestres apresentarem germinação de sementes e crescimento mais lento em relação à espécie cultivada, para a obtenção de plantas com portes semelhantes, as sementes de *A. triseminata* foram colocadas para germinar duas semanas antes dos demais genótipos silvestres e estes, duas semanas antes do genótipo cultivado. Sementes das cinco espécies avaliadas foram imersas em solução do fungicida Captan SC (Milenia) 0,3% por um min e, após 10 min de secagem, transferidas para caixas gerbox sobre papel de germinação umedecido com solução de Ethrel 720 (Bayer) 0,6% e mantidas por três dias a temperatura constante de 28 °C, em câmara de germinação, até a emissão de radícula. Em seguida, as plântulas foram transplantadas individualmente para vasos plásticos (1,2 L), perfurados na parte inferior, contendo uma mistura de areia, barro vermelho e húmus de minhoca na proporção de 1:1:1. Para cada 50 L do referido substrato, foram adicionados 375 g de adubo NPK 6/24/12. As plantas foram mantidas em telado e regada a cada dois dias. O controle de ataque de insetos e fungos foi realizado por meio da pulverização quinzenal de Actara (Syngenta) 0,7% e Amistar Top (Syngenta) 0,1%, respectivamente.

## 2. Desenho experimental e imposição do déficit hídrico

O delineamento experimental adotado foi em blocos ao acaso, com três repetições (implantadas uma após o término da outra, com uma semana de duração por repetição), em esquema fatorial 5x3, com cinco espécies (*A. duranensis*, *A. hypogaea*, *A. ipaensis*, *A. magna* e *A. triseminata*) e três níveis de hidratação do solo. Cada parcela foi composta por três plantas com 60 dias de idade para as espécies silvestres e com 30 dias para *A. hypogaea*, totalizando 45 plantas por bloco. A imposição do déficit hídrico foi conduzida, utilizando o método descrito por Ding et al. (2014), no qual a quantidade máxima de água retida pelo solo no vaso, expressa em porcentagem de massa, é considerada como 100% de capacidade de pote (CP) e, os três níveis de hidratação do solo definidos foram: 75% da CP (controle), 45% da CP (estresse moderado) e 20% da CP (estresse severo), durante cinco dias.

Para a determinação da CP, realizada antes do transplântio das mudas, uma quantidade fixa de massa de solo seco foi adicionada nos vasos. Em seguida, o solo foi saturado com água até o gotejamento. Após 24 horas, os vasos contendo solo saturado foram pesados para a determinação da umidade do solo e CP correspondente, por meio da fórmula:

$$\text{Umidade do solo} = \left( \frac{SU - SS}{SS} \right) \quad (1)$$

onde, a umidade do solo é dada em gramas de água por gramas de solo, *SU* é a massa de solo úmido e *SS*, massa de solo seco. Tendo sido considerado que a densidade do solo foi aproximadamente igual à da água e que todos os vasos apresentavam aproximadamente a mesma massa de solo, o volume de

água foi determinado e fixado como volume a 100% da CP e, a partir dele, foi determinado o volume de água para os outros pontos (75%, 45%, e 20%) para imposição do déficit hídrico. Para determinar o volume de água a ser repostado nos vasos diariamente, os mesmos foram pesados para a determinação da umidade do solo e da CP diária:

$$CP(\%) = \left( \frac{\text{rolume de água presente no solo}}{\text{rolume máximo de água que o solo pode reter}} \right) \times 100 \quad (2)$$

A quantidade de água repostada correspondeu à diferença entre o volume máximo de água que o solo deveria ter e o volume de água presente no solo para cada nível de estresse.

### 3. Avaliações fisiológicas e bioquímicas

#### 3.1 Trocas gasosas, fluorescência e estado hídrico da planta

No último dia de imposição do déficit hídrico, no intervalo entre 8:00 e 11:00 h, folíolos completamente expandidos foram utilizados para realizar avaliações de trocas gasosas (fotossíntese –  $A$ , condutância estomática –  $g_s$  e eficiência intrínseca do uso água –  $A/g_s$ ) e fluorescência (razão da fluorescência variável/máxima –  $F_v'/F_m'$  na presença de luz, taxa de transporte de elétrons – TTE e rendimento quântico de transporte de elétrons –  $\Phi_{FSII}$ ), utilizando-se o analisador de gases por infravermelho (Infra-Red Gas Analyser – IRGA, LI-6400XT, Licor).

O teor relativo de água foliar (TRAf) foi mensurado conforme descrito por Barr e Weatherley (1962), utilizando a fórmula:

$$TRAf (\%) = \left( \frac{PF - PS}{PT - PS} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde, PF é o peso fresco; PS, peso seco e PT, peso túrgido. Em primeiro lugar, o peso fresco de folíolos recém-colhidos foi obtido. Posteriormente, os folíolos foram imersos em água destilada em placas de Petri durante 24 h e, em seguida, foi obtido o seu peso túrgido. Os folíolos foram mantidos em estufa durante 72 h para obtenção do peso seco. Folhas frescas, para cada ponto de análise, foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a  $-80^\circ\text{C}$  para análises bioquímicas e genéticas.

#### Avaliação de dano a membranas

A avaliação de dano a membranas foi realizada por duas metodologias: quantificação de aldeído malônico (MDA) e determinação de Extravazamento de eletrólitos (EL). A quantificação de MDA foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Cakmak e Horst (1991), medindo-se as substâncias reativas ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) e expresso em equivalentes de MDA. Amostras de 0,15 g de tecido foliar fresco foram macerados em 2 mL de ácido tricloroacético (TCA 0,1%, p/v)

e transferidos para microtubos de 1,5 mL. A solução foi centrifugada a 10.000 g, por 15 min a 4 °C. Foram transferidos 500 µL do sobrenadante para um tubo de ensaio de vidro com rosca contendo 1,5 mL de solução de TBA 0,5%, preparada em TCA 20%, na hora do uso. Na amostra referente ao controle negativo, foram adicionados 500 µL de TCA 0,1%, em substituição ao sobrenadante. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 20 min a 90 °C, em banho-maria com agitação, para a condução da reação colorimétrica. A seguir, as amostras foram imersas em banho de gelo para cessar a reação, transferidas para microtubos de 2 mL e centrifugadas a 10.000 g, por 5 min a 4 °C. Uma alíquota de 280 µL do sobrenadante foi pipetada em placas tipo Elisa com fundo em U, em triplicatas, e a absorbância das amostras foi medida a 532 nm, no espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific). O coeficiente de extinção molar (absortividade) do MDA (155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) foi utilizado para os cálculos e os resultados expressos como µmol de MDA g<sup>-1</sup> MS (Massa Seca).

O EL foi determinado a partir de seis discos foliares de 1 cm de diâmetro acondicionados em tubos do tipo Falcon de 15 mL contendo 10 mL de água deionizada, mantidos por 2 h à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a leitura da condutividade elétrica da solução (C1). Os tubos de ensaio foram incubados a 90 °C por 30 min e, após entrarem em equilíbrio térmico com o ambiente, procedeu-se nova leitura (C2) da condutividade elétrica da solução. O EL foi calculado conforme a fórmula (Lutts et al., 1996):

$$EL (\%) = \left( \frac{C1}{C2} \right) \times 100 \quad (4)$$

### Quantificação de pigmentos fotossintéticos

Para a extração de pigmentos fotossintéticos, aproximadamente, 0,150 g de amostras foliares frescas foram maceradas em 1,5 mL de acetona 80%, sob condições de luz natural e transferidas para microtubos. Em seguida, a solução foi centrifugada a 15.000 g, por 10 min a temperatura ambiente e 200 µL do sobrenadante foram pipetados, em triplicatas, em placas tipo Elisa de polipropileno com 96 poço para a quantificação do conteúdo de carotenoides totais, clorofilas *a* e *b* e clorofila total, de acordo com Lichtenthaler (1987). As leituras foram realizadas nos comprimentos de onda de 470, 647 e 664 nm no espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific). Os cálculos foram realizados por meio das seguintes fórmulas e os resultados expressos em µg/g de MS:

$$\text{Clorofila total} = C(a + b) = (7,15 \times \text{Abs664}) + (18,71 \times \text{Abs647}) \quad (5)$$

$$\text{Clorofila a} = Ca = (12,25 \times \text{Abs664}) - (2,79 \times \text{Abs647}) \quad (6)$$

$$\text{Clorofila b} = Cb = (21,50 \times \text{Abs647}) - (5,10 \times \text{Abs664}) \quad (7)$$

$$\text{Carotenoides totais} = C(x + c) = \frac{[(1000 \times \text{Abs470}) - (1,82 \times Ca) - (85,02 \times Cb)]}{198} \quad (8)$$

### Quantificação de prolina livre

A concentração de prolina livre, extraída a partir de folhas, foi quantificada seguindo a metodologia descrita por Bates et al. (1973), com modificações. Amostras de 0,15 g de folhas frescas foram maceradas em 2 mL de ácido sulfossalicílico 3% e transferidas para microtubos de 2 mL. Estas foram centrifugadas a 12.000 g, por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, o volume final foi completado para 2 mL com ácido sulfossalicílico 3% e foram transferidas para tubos de ensaio de vidro com rosca. Na amostra referente ao controle negativo, foram adicionados 2 mL de ácido sulfossalicílico 3%, em substituição ao sobrenadante. Em seguida, foi adicionado 2 mL de reagente ninhidrina 2,5% e 2 mL de ácido acético glacial. Os tubos foram agitados em vortex e incubados em banho-maria com agitação por 1 h a 100 °C. Após esse período, as amostras foram incubadas em gelo por 10 min, para cessar a reação, e foram adicionados 4,0 mL de tolueno. Os tubos foram agitados em agitador tipo vortex e mantidos em repouso por 10 min, a temperatura ambiente, para separação das fases. Alíquotas de 250 µL da fase superior foram pipetadas em placas tipo Elisa de polipropileno com 96 poços em triplicatas e a absorbância foi medida a 520 nm, no espectrofotômetro Multiskan GO (Thermo Scientific). O teor de prolina foi determinado a partir de uma curva padrão com nove pontos nas concentrações de 0,00, 0,02, 0,04, 0,07, 0,09, 0,12, 0,14, 0,18 e 0,20 µ mol de prolina e expresso em µ mol/g de MS.

