



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FLÁVIA CZEKALSKI DE ARAÚJO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Stylosanthes*
scabra SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Recife
2019

FLÁVIA CZEKALSKI DE ARAÚJO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Stylosanthes*
scabra SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Genética Vegetal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadores: Prof^a. Dr^a. Valesca Pandolfi
Dr. João Pacífico Bezerra Neto

**Recife
2019**

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Araújo, Flávia Czekalski de
Expressão diferencial e respostas fisiológicas de *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico / Flávia Czekalski de Araújo - 2019.
167 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Coorientadores: Valesca Pandolfi

João Pacífico Bezerra Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Transcriptoma 2. Taxas gasosas 3. Modulação de aquaporinas
I. Benko Iseppon, Ana Maria (Orientadora) II. Pandolfi, Valesca (Coorientadora) III. Bezerra Neto, João Pacífico (Coorientador) IV. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-041

FLÁVIA CZEKALSKI DE ARAÚJO

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL E RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *Stylosanthes*
scabra SOB DÉFICIT HÍDRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos parciais para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 26/02/2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon (Orientadora)
Departamento de Genética UFPE

Dr. Mauro Guida dos Santos (Examinador Externo)
Departamento de Botânica – UFPE

Dr^a. Lidiane L. Barbosa Amorim (Examinador Externo)
Instituto Federal do Piauí-IFPI

Dr^a. Flavia Figueira Aburjaile (Examinador Externo)
Departamento de Genética -UFPE

Dr. José Ribamar C. Ferreira Neto (Examinador Interno)
Departamento de Genética - UFPE

*À minha inigualável Mãezinha, Maria Czekalski,
pela dedicação, carinho e força de sempre. Quem
me ensinou a sorrir e ter fé, mesmo nos momentos
mais difíceis. Fonte diária de inspiração, por se
fazer presente em minha vida em todos os
momentos, pelo amor incondicional e pelos
esforços em prol do meu bem-estar.*

Minha eterna dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que está presente constantemente em minha vida, guiando e iluminando os meus passos.

À minha família, em especial à minha Mãe, Maria Czekalski, por sempre apoiar e incentivar as minhas escolhas, ao meu pai e meus irmãos que me compreenderam e me fortaleceram para chegar até aqui.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Maria Benko Iseppon, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa no LGBV / UFPE, pelos ensinamentos na construção do conhecimento científico e por sempre me incentivar a seguir em frente, aperfeiçoando a minha formação profissional.

Aos meus coorientadores Dr^a Valesca Pandolfi e Dr. João Pacífico Bezerra, pelo companheirismo diário, pelos ensinamentos, conselhos, confiança, paciência infinita, amizade, descontração e disponibilidade nos momentos mais críticos. Sempre tendo uma frase de estima para me mover para frente!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade e ensinamentos.

À Embrapa Semi-Árido, Petrolina/PE, pela concessão do material vegetal utilizado nessa pesquisa, especialmente aos pesquisadores Dr. Nataniel Franklin de Melo e Carolina V. Morgante pela confiança e apoio.

Às amigas Artemisa Borges, Carolline Pires, Bruna Piereck, Mitalle Matos e Sheyla Silva, por toda contribuição, conhecimento, desespero, grande amizade e muitas risadas compartilhadas.

Todo o meu carinho e admiração às fisiologistas Dr^a Rebeca Rivas e Dr^a Gabriela Frosi, pela importante contribuição nesse trabalho e por sempre se disponibilizarem em ajudar com muita atenção e dedicação.

Ao Prof. Dr. Mauro Guida dos Santos e Prof. Dr. Ederson A. Kido pela disponibilização dos seus laboratórios e contribuição no desenvolvimento deste estudo.

Ao amigo Dr. José Ribamar C. Ferreira Neto, por todo conhecimento compartilhado, apoio, incentivo, compreensão, amizade, brincadeiras e ajuda nos momentos de desespero.

À Dr^a Lidiane L. Amorim, pelo suporte, incentivo e amizade ao longo desses anos.

À Dr^a. Roberta Lane e à Dr^a Flavia Aburjaile pela amizade, apoio e incentivo.

Aos amigos Wilson Dias, Thialisson Caaci, Raquel Gonçalves, Daniel Santos, Joelson Crispim, Elenilson Santos e Diogo Cavalcanti pela amizade, ajuda, apoio, cooperação e vivências compartilhados.

A todos os membros que fazem a querida família LGBV pela convivência, pelo apoio e incentivo constante, em especial à Vanessa Souza e à Jaysa Araújo por todo amparo, incentivo, orações e amizade.

Muito obrigada!

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”.

(Isaac Newton)

RESUMO

A família Fabaceae figura como uma das maiores famílias vegetais, sendo a segunda mais importante em termos agrícolas. Compreende culturas de elevada importância socioeconômica, como a *Stylosanthes scabra*, uma espécie arbustiva forrageira, nativa do semiárido brasileiro, com ótimo desempenho mesmo sob condições ambientais desfavoráveis, constituindo um importante objeto de estudo, como potencial fonte de genes de interesse agrícola e biotecnológico. O objetivo deste trabalho foi avaliar aspectos ecofisiológicos de *S. scabra* submetida ao déficit hídrico, analisar a modulação da expressão das proteínas de canais de membrana – as Aquaporinas (AQPs) sob tal condição de estresse, assim como eleger genes candidatos a controles endógenos, adequadamente testados por testes estatísticos como genes de referência adequados para validação da expressão de *S. scabra*. No que se refere aos dados fisiológicos e bioquímicos de *S. scabra*, observa-se uma plasticidade metabólica em condições de déficit hídrico, em vista das alterações nas taxas de trocas gasosas e acúmulo de solutos, visando manter o equilíbrio de seu ambiente interno. Adicionalmente, apenas 6 h após a reidratação a planta retornou aos níveis considerados normais. Importantes variáveis fisiológicas como $CH_{Rfoliar}$, assimilação de CO_2 (A) e eficiência de uso de água (EUA) corroboram sua robustez frente a condições desfavoráveis. A conexão entre expressão gênica diferencial e resposta fisiológica sob déficit hídrico revelou possíveis estratégias adotadas por *S. scabra* para lidar com ambientes que apresentem baixa disponibilidade hídrica. Foram identificadas 51 AQPs candidatas no transcriptoma de *S. scabra* sendo: 17 proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), 14 proteínas intrínsecas de membranas plasmáticas (PIPs), seis proteínas intrínsecas de membrana de nódulos (NIPs), seis pequenas proteínas básicas intrínsecas (SIPs) e oito (MIPs). Por sua vez, não foram identificados membros da subfamília XIP (proteína intrínseca desconhecida X). Dados do transcriptoma (RNA-Seq) revelaram alto nível de conservação das AQPs. Três genes de referência foram determinados para *S. scabra* (UBQ10, F-Fox e β -Tub_2). As SsAQPs (PIP2.6 e TIP1) foram moduladas positivamente após 48 h de déficit hídrico, enquanto a SsTIP1 apresentou regulação negativa, após 6 h de reidratação em *S. scabra*. Já os alvos PIP2.2 e TIP2 tiveram sua expressão reprimida durante o estresse e induzida após a reidratação. Esses resultados apontam mecanismos especiais de resposta ao déficit hídrico, aplicáveis no melhoramento genético de *S. scabra* e de espécies relacionadas.

Palavras-chave: Transcriptoma. Taxas gasosas. Modulação de aquaporinas.

ABSTRACT

The Fabaceae family figures as one of the largest plant families, being the second most important in terms of agriculture. It comprises crops of high socioeconomic importance, such as *Stylosanthes scabra*, a forage plant native from the Brazilian semiarid region, with a superior performance under unfavorable environmental conditions, being an important study object, as a potential source of biotechnologically interesting genes. The objective of this work was to evaluate the ecophysiological aspects of *S. scabra* submitted to water deficit, to analyze the transcriptional orchestration of aquaporins (AQPs) under this stress, as well as to develop reference genes for application in quantitative real-time PCR reactions for expression validation in *S. scabra*. Regarding the physiological and biochemical data of *S. scabra*, a metabolic plasticity is observed under conditions of water deficit, in view of the changes in the rates of gas exchange and accumulation of solutes, aiming to maintain the balance of its internal environment. Additionally, only 6 h after rehydration the plant returns to levels considered normal. Important physiological variables such as $\text{CHRF}_{\text{foliar}}$, CO_2 assimilation (A) and water use efficiency (WUE), corroborate *S. scabra* robustness against unfavorable conditions. The connection between differential gene expression and physiological response under water deficit revealed possible strategies adopted by *S. scabra* to deal with environments with low water availability. 51 AQP candidates were identified in the transcriptome of *S. scabra* produced in response to the water deficit, including: 17 intrinsic tonoplast proteins (TIPs), 14 intrinsic plasma membrane proteins (PIPs), six intrinsic membrane-node proteins (NIPs), six small intrinsic basic proteins (SIPs) and eight (MIPs). In turn, member of the XIP (unknown intrinsic protein X) subfamily was identified. Transcriptomic (RNA-Seq) data showed a high conservation level of AQPs. Three reference genes were determined for *S. scabra* (UBQ10, F-Fox and β -Tub_2). The SsAQPs (PIP2.6 and TIP1) were positively modulated after 48 h of water deficit, while SsTIP1 showed negative regulation 6 h after rehydration in *S. scabra*. On the other hand, the PIP2.2 and TIP2 targets had their expression repressed during stress and induction after rehydration. These results point to specialized response mechanisms to water deficit, applicable to the genetic improvement of *S. scabra* and related species.

Keywords: Transcriptome. Gas charges. Modulation of aquaporins.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Distribuição natural de espécies do gênero <i>Stylosanthes</i> (seções <i>Styposanthes</i> ou <i>Stylosanthes</i>), com base em dados taxonômicos, genéticos e geográficos	24
Figura 2 –	Dendrograma parcial da análise filogenética e a composição dos genomas (letras maiúsculas) de espécies de <i>Stylosanthes</i>	25
Figura 3 –	Distribuição geográfica de <i>S. scabra</i> no território brasileiro. A. Os pontos plotados são as coordenadas fornecidas pelas coleções (vermelho) ou as coordenadas da sede do município (azul). B. Quantitativo de registros de coleta de <i>S. scabra</i> nos estados brasileiros	26
Figura 4 –	Esquema ilustrativo do transporte de moléculas de água por meio das aquaporinas nas membranas celulares	32
Figura 5 –	Esquema da topologia geral das aquaporinas: estrutura com seis hélices transmembranas (H1-H6) conectadas por cinco loops (LA-LE)	37
Figura 6 –	Estruturas tridimensionais de aquaporinas de plantas	38
Figura 7 –	Localização esquemática das quatro principais subfamílias de aquaporinas nas organelas vegetais	39

Aspectos fisiológicos e bioquímicos associados às respostas ao déficit hídrico em *Stylosanthes scabra*

Figura 1 –	Mostra das plantas de <i>S. scabra</i> , após quatro meses de crescimento em casa de vegetação - Embrapa Semiárido, Petrolina, PE	50
Figura 2 –	Trocas gasosas em <i>S. scabra</i> (Ss) sob déficit hídrico. (A) Condutância estomática (gs), (B) Assimilação líquida de CO ₂ (A), (C) Eficiência do uso da água (EUA) e (D) Temperatura (°C)	55
Figura 3 –	Fluorescência em <i>S. scabra</i> (Ss) sob déficit hídrico. (A) Taxa de Transporte de Elétrons (ETR), (B) <i>quenching</i> Fotoquímico (qP)	56

Figura 4 –	Análises bioquímicas em folhas e raízes de <i>S. scabra</i> após 6, 24 e 48 horas de déficit hídrico (suspensão de rega) e 6 h após a reidratação	57
Figura 5 –	Análises bioquímicas em folhas e raízes de <i>S. scabra</i> após 6, 24 e 48 horas de déficit hídrico (suspensão de rega) e 6 h após a reidratação	58
Figura 6 –	(A) Clorofila a (Chl a), (B) clorofila b (Chl b) e (C) carotenóides (Car) em folhas e raízes de plantas jovens de <i>S. scabra</i> submetidas ao déficit hídrico	58
Figura 7 –	Perfil global de expressão gênica e identificação de DEGs (genes diferencialmente expressos - $\log_2FC > 1$; $p\text{-value} < 0,05$) em resposta aos tratamentos	59
Figura 8 –	Transcritos diferencialmente expressos de <i>S. scabra</i> envolvidos em diferentes processos metabólicos sob estresse hídrico, mapeados no genoma de <i>Medicago truncatula</i> via MapMan	62
Figura 9 –	Genes diferencialmente expressos, mapeados nas vias metabólicas de estresses. A. Vias metabólicas no tratamento 6 h de supressão de rega. B. Vias metabólicas no tratamento 24 h de supressão de rega	63
Figura 10 –	<i>Heatmap</i> construído com os transcritos diferencialmente expressos ($p\text{-value} < 0,05$) em <i>S. scabra</i> (baseando-se no $\log_2FC$, <i>fold change</i>), sob condições de déficit hídrico	64

Aquaporinas expressas em *Stylosanthes scabra* Vogel e sua modulação sob déficit hídrico

Figura 1 –	Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na metodologia	84
Figura 2 –	Análise de similaridade de sequências, utilizando o método de <i>Neighbor Joining</i> (NJ), das subfamílias de aquaporinas expressas em <i>S. scabra</i> , com bootstrap ao nível de 1000 replicações	87
Figura 3 –	Alinhamento das 51 aquaporinas candidatas em <i>S. scabra</i> utilizando o Clustal Omega e o Jalview	90
Figura 4 –	Alinhamento múltiplo das sequências aquaporinas candidatas da subfamília TIP em <i>S. scabra</i> , mostrando o 5º filtro de seletividade	92

Figura 5 –	Peso molecular e ponto isoeletrico de aquaporinas de <i>S. scabra</i> distribuídos de acordo com as subfamílias	93
Figura 6 –	Distribuição das SsAQPs no genoma de <i>Arachis duranensis</i> (2n = 10) (A) e no genoma de <i>Arachis ipaensis</i> (2n = 10) (B)	95
Figura 7 –	Análise do geNorm. A. Estabilidade média da expressão (Valor M) de todos os dez genes de referência candidatos em <i>S. scabra</i> sob estresse de déficit hídrico da raiz	96
Figura 8 –	Diagrama de Venn demonstrando o número de candidatos a genes codificantes de aquaporinas, expressos em <i>S. scabra</i> , frente a comparação controle (irrigado) vs tratado (déficit hídrico), nos dois tratamentos 6 e 24 h de suspensão de rega	97
Figura 9 –	Perfis de expressão gênica de candidatos à aquaporinas (AQPs) no tecido radicular de <i>S. scabra</i> sob déficit hídrico, seguindo o agrupamento hierárquico de acordo com o programa CLUSTER3.0	98
Figura 10 –	Representação gráfica dos níveis de expressão relativa dos genes alvo, obtidos a partir do programa REST2009, entre as diferentes combinações	103
Figura sup.1 –	Avaliação NJ de 70 sequências proteicas de nove espécies, incluindo plantas e microrganismos	118

LISTA DE TABELAS

Aspectos fisiológicos e bioquímicos associados às respostas ao déficit hídrico em *Stylosanthes scabra*

Tabela 1 –	Tratamentos empregados de <i>S. scabra</i> sob déficit hídrico – Embrapa Semiárido, Petrolina, PE	51
Tabela 2 –	Conteúdo hídrico relativo da folha (CHR _{foliar}) de <i>S. scabra</i> submetido ao déficit hídrico ($n=3\pm D.P$)	54
Tabela 3 –	Lista de primers desenhados para genes diferencialmente expressos em <i>S. scabra</i> sob déficit hídrico	65

Aquaporinas expressas em *Stylosanthes scabra* Vogel e sua modulação sob déficit hídrico

Tabela 1 –	Candidatos a genes codificantes de aquaporinas em <i>S. scabra</i> que apresentaram maior identidade com proteínas de domínio MIP em microrganismos, descritas no banco de dados do NCBI	88
Tabela 2 –	Domínios conservados, filtros de seletividade e posições de Froger's dos candidatos à aquaporinas em <i>S. scabra</i>	91
Tabela 3 –	Candidatos a genes codificantes de aquaporinas de <i>S. scabra</i> (SsAQPs) diferencialmente expressas ($p<0,05$) frente ao déficit hídrico, comparativamente ao controle irrigado	99
Tabela 4 –	Lista de <i>primers</i> desenhados para genes candidatos à aquaporinas em <i>S. scabra</i> , com expressão gênica diferencial (<i>in silico</i>)	100
Tabela 5 –	Eficiência de amplificação dos genes candidatos à aquaporinas em <i>S. scabra</i>	101
Tabela 6 –	Dados de expressão gênica dos genes alvo, obtidos a partir do programa REST2009, entre as diferentes combinações	101
Tabela sup. 1 –	Lista de sondas (<i>seed sequence</i>), correspondente a 77 aquaporinas descritas na literatura para espécies vegetais, utilizadas para busca de homólogos no transcriptoma de <i>S. scabra</i>	119
Tabela sup. 2 –	Características e propriedades físico-químicas das aquaporinas identificadas em <i>S. scabra</i>	120

LISTA DE ABREVIATURAS

A	<i>Liquid Assimilation of CO₂</i> ; Assimilação Líquida de CO ₂
ABA	<i>Abscisic acid</i> ; Ácido abscísico
ACT	<i>Actin</i> ; Actina
AIB	<i>Indolbutyric Acid</i> ; Ácido Indolbutírico
ALT	<i>Total Free Amino Acids</i> ; Aminoácidos Livres Totais
AQP	<i>Aquaporin</i> ; Aquaporina
ar/R	<i>Aromatic/Arginine</i> ; Região arginina/aromática
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Busca por Alinhamento Local
Car	<i>Carotenoids</i> ; Carotenoides
CD Search	<i>Conserved Domain Search Service</i> ; Serviço de Pesquisa de Domínio Conservado
cDNA	<i>Complement DNA</i> ; DNA complementar
CENARGEN	Centro Nacional de Recursos Genéticos e Biotecnologia
CHiB	<i>Chitinase B</i> ; Quitinase B
Chl <i>a</i>	<i>Chlorophyll a</i> ; Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	<i>Chlorophyll b</i> ; Clorofila <i>b</i>
CHR	<i>Relative Water Content</i> ; Conteúdo Hídrico Relativo
CIAT	<i>International Center for Tropical Agriculture</i> ; Centro Internacional de Agricultura Tropical
Cq	<i>Quantification Cycle</i> ; Ciclo de quantificação
Cqs	<i>Variance of the quantification Cycles</i> ; Variação dos ciclos de quantificação
GR	<i>Reference Gene</i> ; Gene de Referência
CRIA	Centro de Referência em Informação Ambiental
CST	Carboidratos Solúveis Totais
CV	<i>Coefficient of Variance</i> ; Coeficiente de Variância
DE	<i>Differentially Expressed</i> ; Diferencialmente Expresso
DEGs	<i>Differentially Expressed Genes</i> ; Genes Diferencialmente Expressos
DH	Deficit hídrico
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido desoxirribonucleico
DR	<i>Down-Regulated</i> ; Reprimido

E	<i>Efficiency</i> ; Eficiência
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ETR	<i>Electron Transport Rate</i> ; Taxa de Transporte de Elétrons
EUA	Eficiência do Uso da Água
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> ; Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
FBOX	<i>F-box protein</i> ; Proteína F-box
FC	<i>Fold Change</i>
Gs	<i>Stomatal Conductance</i> ; Condutância Estomática
HIP	<i>Hybrid Intrinsic Protein</i> ; Proteínas híbridas intrínsecas de membrana
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
kDa	Kilodalton
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> ; Análise Molecular de Genética Evolutiva
MIP	<i>Major Intrinsic Protein</i> ; Proteínas Intrínsecas de Membrana
MIQE	<i>Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments</i> ; Informação Mínima para a Publicação de Experimentos de Qpcr
mRNA	<i>RNA Messenger</i> ; RNA mensageiro
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NIP	<i>Nodulin26-like Intrinsic Proteins</i> ; Proteínas de Membrana de Nódulos
ns	Não significativo (ao nível $p < 0.05$)
pb	Pares de Bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
pI	<i>Isoelectric Point</i> ; Ponto Isoelétrico
PIP	<i>Plasma Membrane Intrinsic Protein</i> ; Proteínas Insntinseca de Membrana Plasmática
PM	<i>Molecular weight</i> ; Peso molecular
PST	Proteínas Solúveis Totais
qP	<i>Quenching</i> Fotoquímico
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i> ; Programa de expressão relativa
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ácido Ribonucleico

RNA-Seq	<i>RNA sequencing</i> ; Sequenciamento de RNA
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Espécies Reativas de Oxigênio
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i> ; PCR quantitativo em Tempo Real
SIP	<i>Small Intrinsic Proteins</i> ; Pequenas Proteínas Intrínsecas de Membranas
SNPs	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ; Polimorfismo de Nucleotídeo Único
TIP	<i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i> ; Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto
Tm	Temperatura de <i>Melting</i>
TM	<i>Transmembrane Domains</i> ; Domínios Transmembranas
UBQ10	<i>Polyubiquitin 10</i> ; Poliubiquitina 10
UR	<i>Up-Regulated</i> ; Induzido
XIP	<i>Uncharacterized X Intrinsic Protein</i> ; Proteína Intrínseca Desconhecida X
β-TUB	<i>Beta-Tubulin</i> ; Beta-Tubulina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	LEGUMINOSAS CULTIVADAS E NATIVAS	22
2.2	A ESPÉCIE <i>Stylosanthes scabra</i>	23
2.2.1	Taxonomia, origem e distribuição geográfica	23
2.2.2	Características genéticas e morfológicas	27
2.2.3	Utilização e importância econômica	27
2.2.4	Bancos de germoplasma e recursos genéticos	28
2.2.5	Estudos com <i>S. scabra</i>: estado da arte	29
2.3	RESPOSTAS DE PLANTAS AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO	30
2.4	PROTEÍNAS DE CANAL DE ÁGUA – AQUAPORINAS	31
2.4.1	Classificação	33
2.4.1.1	PIP - Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática	34
2.4.1.2	TIP - Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto	35
2.4.1.3	NIP - Proteínas Intrínsecas de Nódulos	35
2.4.1.4	SIP - Pequenas Proteínas Básicas Intrínsecas de Membrana	36
2.4.2	Composição estrutural e localização subcelular das aquaporinas	37
2.4.3	Estudos da expressão diferencial em aquaporinas	39
2.5	METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMAS	41
2.5.1	RNA-Seq	42
2.5.2	PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)	43
3	ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS ÀS RESPOSTAS AO DÉFICIT HÍDRICO EM <i>Stylosanthes scabra</i>	46
4	AQUAPORINAS EXPRESSAS EM <i>Stylosanthes scabra</i> VOGEL E SUA MODULAÇÃO SOB DÉFICIT HÍDRICO	78
5	CONCLUSÕES	122
	REFERÊNCIAS	123

APÊNDICE A – PLANT AQUAPORINS: DIVERSITY, EVOLUTION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS	136
APÊNDICE B – PLANT ELITE SQUAD: FIRST DEFENSE LINE AND RESISTANCE GENES – IDENTIFICATION, DIVERSITY AND FUNCTIONAL ROLES	165
APÊNDICE C – COWPEA AND ABIOTIC STRESSES: IDENTIFICATION OF REFERENCE GENES FOR TRANSCRIPTIONAL PROFILING BY QPCR	166
APÊNDICE D – NBS-LRR GENES – PLANT HEALTH SENTINELS: STRUCTURE, ROLES, EVOLUTION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS	167

1 INTRODUÇÃO

Plantas da família Fabaceae (também conhecidas como leguminosas) apresentam grande importância socioeconômica, na geração de empregos, no fornecimento de grãos e produtos para alimentação humana e animal. Os diferentes usos de seus derivados estendem-se às aplicações industriais, incluindo produtos alimentícios, farmacológicos e da cadeia de biocombustíveis, entre outras (PONNUSHA et al., 2011; PATEL, 2014). Adicionalmente, muitas leguminosas são utilizadas na recuperação de solos degradados e/ou na melhoria daqueles que naturalmente apresentam baixa fertilidade (LOCATELLI et al., 1991).

Dentre as leguminosas cultivadas de interesse socioeconômico, encontra-se a espécie *Stylosanthes scabra* Vogel, uma importante forrageira nativa do semiárido brasileiro (popularmente conhecida por “estilosantes” ou “alfafa do nordeste”). A espécie vem sendo amplamente utilizada na alimentação animal (COATES et al., 1997), principalmente em regiões onde por vezes se torna uma das poucas opções para plantio. Trata-se de uma importante fonte de pastagem perene, principalmente em associação com gramíneas e plantas nativas herbáceas e subarborescentes (CAMERON et al., 1996; COSTA; VALLS, 2015). Propriedades como tolerância à seca (NAGAICH et al., 2013), capacidade de crescer em solos com baixa fertilidade, moderadamente ácidos (EDYE e TOPARK-NGARM, 1992) e em regiões conhecidas pela salinidade do solo, fazem desta espécie uma fonte valiosa na prospecção de genes associados à tolerância aos estresses abióticos citados.

Dentre a diversidade de estresses ambientais que frequentemente afetam o crescimento e desenvolvimento vegetal, a baixa disponibilidade de água é, sem dúvida, um dos fatores mais importantes. Neste cenário, a compreensão dos mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos que propiciam a tolerância à seca é de extrema importância. Por se tratar de uma via complexa, muitos genes são acionados para que haja uma rápida reprogramação dos padrões de expressão. Em geral, a modulação da expressão está associada a diferentes fatores, incluindo aspectos morfológicos (ex. redução da área foliar, murcha, camadas cerosas, aparecimento de tricomas, sistema radicular eficiente), fisiológicos (transpiração reduzida, eficiente uso de água, limitação da fotossíntese em nível de cloroplasto, fechamento estomático, ajuste osmótico) e bioquímicos (acúmulo de solutos como síntese de prolina, poliaminas e trealose, entre outros, aumento da atividade da enzima nitrato redutase e aumento no armazenamento de carboidratos) (MENESES et al., 2006; BENKO-ISEPPON, 2013).

Manter seu balanço hídrico sob condições adversas, como seca e altas temperaturas, por exemplo, é um grande desafio para as plantas terrestres. Dependendo da espécie e do contexto fisiológico (ex. disponibilidade de água no solo), a transpiração pode ser restrita pelo fechamento estomático ou mantida para favorecer o consumo de CO₂ e a temperatura da folha mais baixa. Desta forma, o sistema de transporte de água na planta tem que ser eficiente ao ponto de não causar desidratação da planta.

A percepção de que as aquaporinas vegetais são capazes de transportar água e muitos outros substratos fisiológicos em nível intra e intercelular contribuiu para a grande expansão das pesquisas com essas moléculas (LI, SANTONI and MAUREL, 2014). Isoformas específicas de aquaporinas foram identificadas face à sua contribuição em processos fisiológicos e de desenvolvimento tão diversos quanto germinação de sementes, osmoregulação, regulação do sistema hidráulico de folhas e raízes, fixação de CO₂ ou absorção de nutrientes (SEKI et al., 2002; MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008; BENKO-ISEPPON et al., 2011). Essas proteínas foram caracterizadas em cinco subfamílias: proteínas de membrana plasmática (PIP), proteínas de membrana de tonoplasto (TIP), proteínas de membrana de nódulos (NIP); pequenas proteínas básicas intrínsecas de membranas (SIP) e proteína intrínseca desconhecida X (XIP) (PARK et al., 2010; Deshmukh et al., 2013).

Apesar da importância das AQPs no transporte de água, tanto em nível celular quanto fisiológico, aspectos relativos às suas funções fisiológicas e seus mecanismos regulatórios ainda não foram plenamente elucidados (HACHEZ et al., 2008), especialmente face à sua ampla diversidade na especificidade de substrato, localização, regulação transcricional em resposta aos estresses e pós-traducional (MAUREL, 2007). Além disso, algumas AQPs são expressas constitutivamente, enquanto outras são reguladas mediante determinadas condições ambientais, além de apresentarem especificidade tecidual (ALEXANDERSSON et al., 2005).

Tendo em vista que o controle da expressão gênica é realizado (na maioria das vezes) em nível transcricional – o que garante um menor gasto energético celular e níveis adequados de proteínas produzidas (FELLER et al., 2011) – a transcriptômica tem sido um dos grandes protagonistas em estudos de expressão gênica. Atualmente, o sequenciamento massivo de transcritos com sequenciamento de nova geração (RNA-Seq) e a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) destacam-se entre as principais metodologias empregadas na identificação e análise de genes associados à tolerância da planta a determinada situação de estresse.

Os transcriptomas gerados demandam análises com ferramentas de bioinformática, permitindo a interpretação dos dados obtidos, bem como a seleção e caracterização de genes-

candidatos importantes no mecanismo de tolerância a estresses abióticos, propiciando avanços significativos para o melhoramento vegetal (BENKO-ISEPPON et al., 2012).

Neste contexto, o presente estudo objetivou avaliar a modulação da expressão das aquaporinas de *S. scabra*, bem como avaliar os principais aspectos fisiológicos e bioquímicos desta planta sob condições de deficiência hídrica. Tendo em vista que se trata de um estudo pioneiro em relação à espécie em tela (*S. scabra*) e com relação ao tipo de estresse estudado (supressão de rega), a identificação de um conjunto de genes normalizadores para uso em RT-qPCR foi incluída como objetivo deste estudo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar aspectos fisiológicos e bioquímicos de *Stylosanthes scabra* quando submetida ao déficit hídrico (supressão de rega), analisando a modulação da expressão, com ênfase para aquaporinas, como componentes da resposta adaptativa ao estresse abiótico em questão.

1.1.2 Objetivos Específicos

- (a) Conduzir experimentos em casa de vegetação de *S. scabra* sob déficit hídrico, para análises moleculares e fisiológicas, bem como contribuir para a construção de um banco de dados do transcriptoma dessa espécie, por meio da técnica de RNA-Seq;
- (b) Avaliar parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *S. scabra* sob condição de deficiência hídrica em casa de vegetação;
- (c) Identificar genes relacionados ao transporte de água e solutos (aquaporinas) em *S. scabra*, descrevendo domínios, assinaturas e regiões conservadas;
- (d) Selecionar e validar três genes de *S. scabra* que se comportem como normalizadores (referência) para aplicação em estudos de validação de expressão via RT-qPCR;
- (e) Estabelecer um perfil de expressão *in silico* de genes selecionados a partir do transcriptoma, validando sua expressão via RT-qPCR.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEGUMINOSAS CULTIVADAS E NATIVAS

A família Fabaceae destaca-se por sua importância econômica e ecológica, sendo foco de inúmeras análises filogenéticas referentes a níveis de subfamílias, tribo e grupo genérico (LPWG, 2013). De acordo com LPWG (2017), a atual classificação da família Fabaceae (composta por três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae) está desatualizada, não refletindo o atual conhecimento relatado para a filogenia das leguminosas (KASS; WINK, 1996; WOJCIECHOWSKI et al., 2004; MCMAHON; SANDERSON, 2006; CARDOSO et al., 2013b; LPWG, 2013). Em 2017, foi estabelecida uma nova classificação para essa família botânica, sendo dividida em seis subfamílias: Duparquetioideae (um gênero e uma espécie); Cercidoideae (12 gêneros e 335 espécies); Detarioideae (84 gêneros e 760 espécies); Dialioideae (17 gêneros e 85 espécies); Caesalpinioideae (148 gêneros e 4400 espécies) e Papilionoideae (503 gêneros e 14.000 espécies) (LPWG, 2017).

Dentre as subfamílias, a Papilionoideae apresenta ampla distribuição, ocorrendo desde as florestas pluviais, até a borda dos desertos secos e frios (POLHILL; RAVEN, 1981; LEWIS et al. 2005; GOMES et al., 2018), sendo muitas espécies de importância econômica. A maioria das espécies que ocorrem no Brasil pertence ao gênero *Crotalaria* (~ 690 espécies) e ao gênero *Indigofera* (~700 espécies). O feijão comum, o feijão-caupi, o amendoim, o grão-de-bico, a fava, a soja e a lentilha, são algumas das espécies da subfamília Papilionoideae, as quais se destacam pelo alto valor nutricional dos seus grãos secos. Outra espécie dessa subfamília, de alta importância socioeconômica é a estilosa, principalmente pelo seu uso como forrageira na alimentação animal (COATES et al., 1997; BARROSO et al., 2007).

As leguminosas assumem importância social e econômica, principalmente pela geração de empregos e por fornecer produtos para alimentação humana e animal. As diferentes utilizações dos seus derivados estendem-se às aplicações industriais, tais como, geração de biomassa (carvão, celulose, madeira, arborização), além de produtos farmacêuticos devido aos fitoquímicos com potencial antioxidante e antimicrobiano. Também são utilizadas como matéria prima na produção de perfumes e tinturas, sendo muitas espécies utilizadas na ornamentação (LEWIS, 1987; LEWIS; OWEN, 1989; PONNUSHA et al., 2011; PATEL, 2014). Vários estudos vêm sendo realizados sobre o uso do feijão-caupi visando à proteção da saúde humana (SIDDHURAJU; BECKER, 2006). Dentre estes, a identificação da molécula BTCl (*Black eyed-pea Trypsin Chymotrypsin Inhibitor*) destaca-se devido à sua capacidade de

matar células cancerígenas humanas sem agredir células saudáveis (BOLGUE, 2011). Além disso, algumas leguminosas que apresentam porte arbóreo ou arbustivo são utilizadas na recuperação de solos degradados e na melhoria daqueles que naturalmente têm baixa fertilidade. Essa prática tem sido bem usual nas regiões tropicais, em áreas destinadas à produção de alimento básico (LOCATELLI et al., 1991).

Dentre as leguminosas produtoras de grãos o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) tem seu papel de destaque, principalmente por apresentar uma ampla adaptação a diferentes ambientes, sendo a terceira leguminosa produtora de grãos mais comumente cultivada no Brasil (BLAIR et al., 2009), estando atrás apenas da soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e do amendoim (*Arachis hypogaea* L.), bem como devido ao seu alto valor nutritivo quando comparado aos cereais (BROUGHTON et al., 2003). A soja (*G. max*) apresenta importância mundial, da qual se obtém proveito em diversos segmentos. É amplamente utilizada na alimentação humana, por conter macro e micronutrientes essenciais, além de responder por mais da metade da produção de óleo vegetal e por representar fonte potencial para a produção de biodiesel (SINGH et al., 2007). O gênero *Vigna* também merece destaque devido aos seus diversos usos tradicionais (NOFEL, 2016) além de atrair atenção especial frente aos seus recursos genéticos, principalmente devido ao seu potencial econômico e ecológico por meio da exploração da variabilidade genética de espécies cultivadas e, ainda, pela possibilidade de transferência de características genéticas desejáveis das espécies silvestres às cultivadas, aproveitando eventuais compatibilidades reprodutivas (FERY, 2002).

As espécies pertencentes à família Fabaceae apresentam uma autonomia no suprimento de nitrogênio devido à sua capacidade em formar simbiose com bactérias conhecidas como rizóbios. Essa interação permite que o nitrogênio presente no ar atmosférico seja convertido e transferido para as plantas em níveis assimiláveis, devido à presença dessas bactérias nos nódulos das raízes (DUELLI; NOEL et al., 1997, BROUGHTON et al., 2003, BROUGHTON et al., 2006). Dentre as espécies pertencentes a essa família, a forrageira *Stylosanthes scabra* é o foco principal do presente estudo.

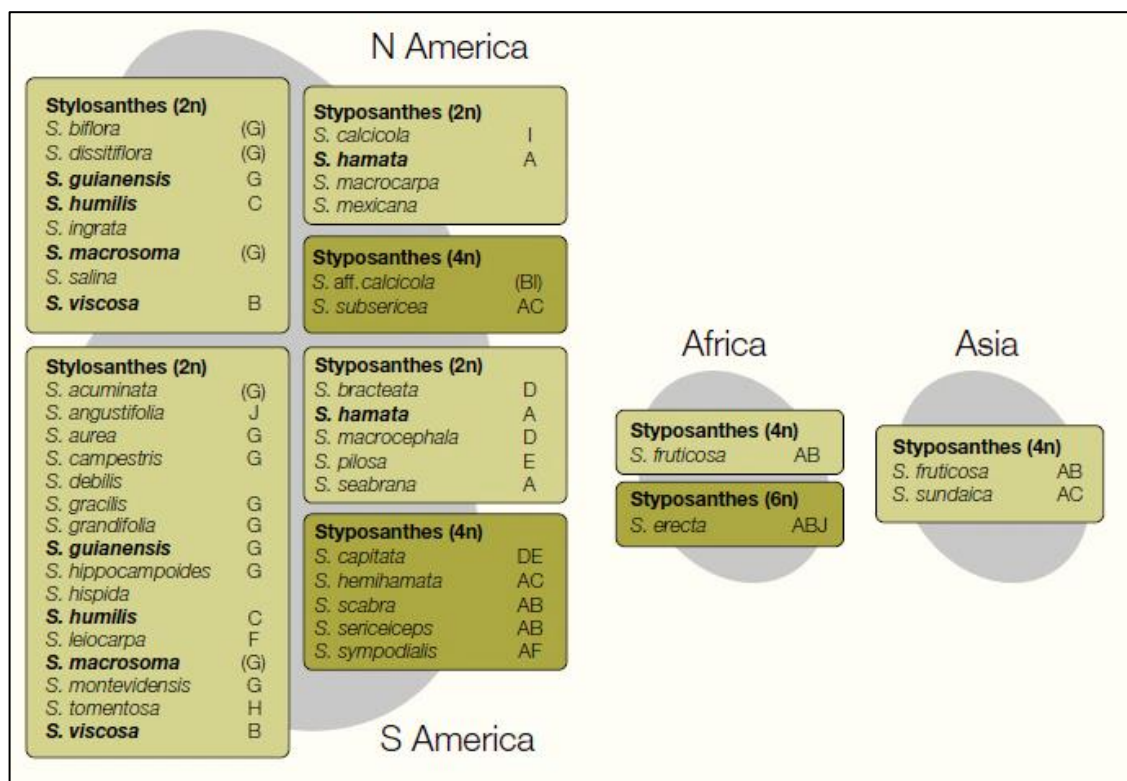
2.2 A ESPÉCIE *Stylosanthes scabra*

2.2.1 Taxonomia, origem e distribuição geográfica.

Descrito em 1788, por Swartz, o gênero *Stylosanthes* representa um importante grupo dentre as plantas forrageiras tropicais e subtropicais (CHAKRABORTY, 2004). Antigamente

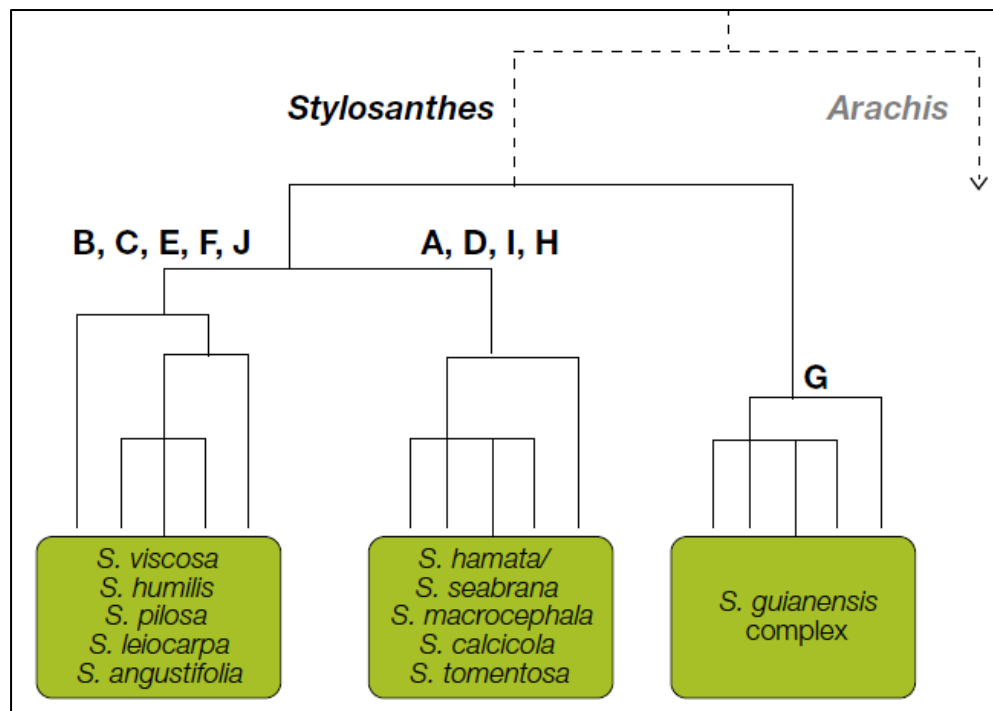
pertencia à tribo Aeschynomene (RUDD, 1981), passando recentemente à tribo Dalbergieae, abrangendo espécies arbóreas, lianas e herbáceas (LEWIS et al., 2005). O gênero pertence à subfamília Papilionoideae (POLHILL; RAVEN, 1981; LPWG, 2017), com 50 espécies descritas, das quais, 31 ocorrem no Brasil, o qual é considerado o centro de origem e diversidade do grupo (LEWIS et al., 2005; COSTA; VALLS, 2015). Com exceção de *S. fruticosa*, *S. erecta* e *S. sundaica*, o gênero *Stylosanthes* é quase que integralmente nativo da América (Figura 1), cujas espécies fazem parte da flora natural de muitas regiões da América do Sul e Central, México e Caribe (WILLIAMS et al., 1984).

Figura 1: Distribuição natural de espécies do gênero *Stylosanthes* (seções *Styposanthes* ou *Stylosanthes*), com base em dados taxonômicos, genéticos e geográficos (MANNETJE 1984; WILLIAMS et al., 1984; LIU et al., 1999; GAMA-LÓPEZ et al., 2001). Destacadas em negrito estão as espécies que apresentam distribuição pan-americana, enquanto as letras maiúsculas representam a estrutura do genoma: *S. seabrana* / *S. hamata* (Grupo A), *S. viscosa* (Grupo B), *S. humilis* (Grupo C), *S. macrocephala* / *S. bracteata* (Grupo D), *S. pilosa* (Grupo E), *S. leiocarpa* (Grupo F), *S. guianensis* (Grupo G), *S. tomentosa* (Grupo H) e *S. calcicola* (Grupo I) (LIU et al., 1999), ou derivado (entre parênteses) (STAPPEN et al., 2002). Observa-se que apenas estão incluídas espécies com nível de ploidia conhecido (Fonte: CHAKRABORTY, 2004).



Em 1838, Vogel agrupou as espécies pertencentes a esse gênero em duas seções, conforme características do eixo floral e bractéolas: *Styposanthes* (espécies com eixo floral secundário rudimentar e duas bractéolas internas) e *Stylosanthes* (espécies sem o eixo, com apenas uma bractéola interna). A separação das espécies nessas duas seções também se baseia na variabilidade genética, levando em conta que a maioria das espécies do gênero *Stylosanthes* é diploide ($2n = 20$), existindo também espécies poliploides ($2n = 40$ e $2n = 60$). Os membros da seção *Styposanthes* são exclusivamente alopoliploides, enquanto os pertencentes à seção *Stylosanthes* são exclusivamente diploides (THOMAS et al., 1999; STAPPEN et al., 2002). O gênero *Stylosanthes* tem origem monofilética, sendo a espécie *S. guianensis* considerada a mais antiga, claramente distinta dos representantes do gênero, estando proximamente relacionada ao gênero *Arachis* (Figura 2) (GILLIES; ABBOTT 1994; LAVIN et al., 2001; STAPPEN et al., 2002)

Figura 2: Dendrograma parcial da análise filogenética e a composição dos genomas (letras maiúsculas) de espécies de *Stylosanthes*, derivadas de LIU et al. (1999), LAVIN et al. (2001) e STAPPEN et al. (2002). Os genomas representados correspondem apenas as espécies diploides (Fonte: CHAKRABORTY, 2004).



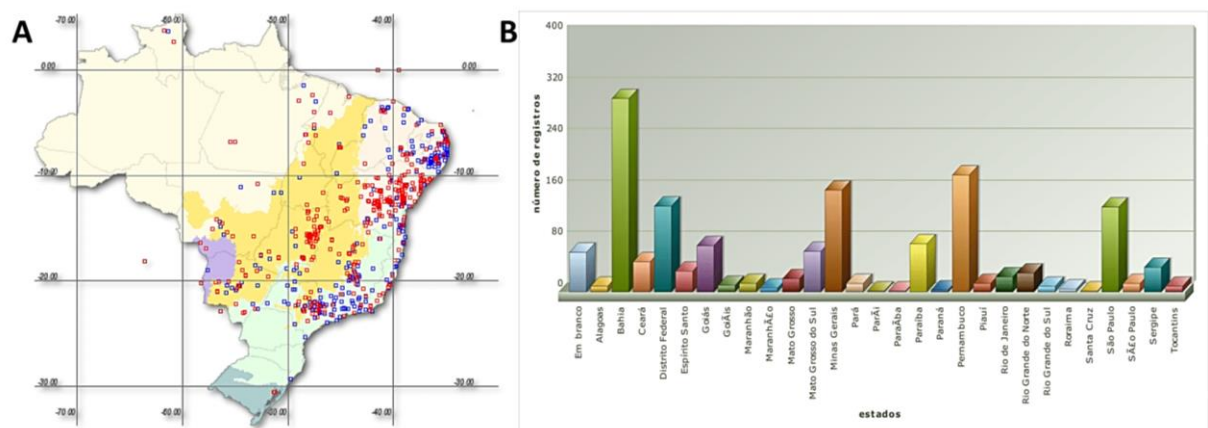
Dentre as espécies do gênero *Stylosanthes*, cinco são utilizadas predominantemente como leguminosas forrageiras de trópicos úmidos a semiáridos: *S. scabra*, *S. seabrana*, *S. hamata*, *S. guianensis* e *S. viscosa* (RAMESH et al., 1997; CHANDRA; PATHAK; BHATT,

2006). Essas espécies apresentam capacidade de restaurar a fertilidade e propriedades físicas do solo, além de fornecer cobertura vegetal permanente. Dentre essas, destaca-se a espécie *S. scabra* devido à sua tolerância à seca (NAGAICH et al., 2013).

Stylosanthes scabra Vogel pertence à subfamília Papilionoideae, tribo Dalbergieae, secção *Styposanthes* (LEWIS et al., 2005; LPWG, 2017). De acordo com Marques e colaboradores (2018), essa espécie teve sua origem no período do Pleistoceno Médio (0,63 a 0,52 milhões de anos atrás). Originária da América do Sul (mais especificamente no domínio fitogeográfico brasileiro da Caatinga), *S. scabra* pode ser encontrada na Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (CAMERON et al., 1996; COATES et al., 1997; COSTA; VALLS, 2015). Sua distribuição geográfica inclui as regiões Norte (Pará, Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte); Centro-oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Rio Grande do Sul) (COSTA; VALLS, 2015) (Figura 3A).

Até o momento há dados catalogados em 76 coleções, com 1.445 registros de coleta de *S. scabra* no Brasil (CRIA, 2019), sendo a Bahia o estado com o maior número de registros (300), seguido pelo estado de Pernambuco (181 registros) (Figura 3B). Por não se tratar de uma espécie endêmica do Brasil, *S. scabra* tem sido também encontrada no leste da Bolívia, Venezuela, Colômbia, Equador e Índia, em alguns casos como espécie introduzida (WILLIAMS et al., 1984; CHANDRA; PATHAK; BHATT, 2006; COSTA, 2006; COSTA; VALLS, 2015).

Figura 3: Ocorrência reportada de *S. scabra* no território brasileiro. **A.** Os pontos plotados são as coordenadas fornecidas pelas coleções (vermelho) ou as coordenadas da sede do município (azul). **B.** Quantitativo de registros de coleta de *S. scabra* nos estados brasileiros (Fonte: CRIA, 2019).



2.2.2 Características genéticas e morfológicas

Estudos citogenéticos (através de Hibridização Genômica *In Situ* – GISH) e dados filogenéticos (DNA plastidial e sequências de rDNA) apontam as espécies *S. hamata* (doador materno) e *S. viscosa* (doador paterno) como os progenitores diploides ($2n = 2x = 20$) da espécie alotetraploide *S. scabra* ($2n = 4X = 40$) (MARQUES et al., 2018).

Trata-se de uma leguminosa herbácea, com germinação e crescimento lentos, porte subarbustivo, reprodução por autofecundação (embora uma taxa de 2 – 6% possa apresentar reprodução cruzada (STACE; CAMERON, 1984). Apresenta uma raiz principal aprumada e lenhosa, caule lenhoso (20-150 cm de altura), de hábito predominantemente ereto. Apresenta ramos e folíolos escabrosos e viscosos – o que facilmente pode ser confundida com a espécie *S. viscosa*. O florescimento e frutificação ocorre entre os meses de outubro a agosto (COSTA, 2006; COSTA et al., 2008; FORTUNA-PEREZ et al., 2011).

2.2.3 Utilização e importância econômica

S. scabra destaca-se no âmbito econômico face à sua utilização na alimentação animal, sendo uma das principais fontes de pastagem perene. Como as demais leguminosas forrageiras, *S. scabra* tem participação direta na fixação do nitrogênio atmosférico, apresentando vantagens quando comparada as demais plantas forrageiras. Essa interação resulta na melhoria do solo, favorecendo a recuperação de áreas degradadas e redução de custos, tendo em vista o menor uso de fertilizantes comerciais nitrogenados nas regiões áridas e semiáridas do Brasil (McKEY, 1994; MOURÃO et al., 2011). Estudos realizados na Índia reportaram boa adaptação de *S. scabra* em áreas de baixa pluviosidade, degradadas e semiáridas (CHANDRA et al., 2004; CHANDRA, 2009).

As forrageiras do gênero *Stylosanthes* apresentam baixo teor de fósforo (P), o qual diminui à medida que as plantas envelhecem, especialmente sob estresse hídrico. Apesar da quantidade de P ser inadequado para a nutrição animal, outros minerais parecem estar disponíveis em quantidades suficientes (NIRANJAN et al., 1994). Além disso, características como a boa folhagem e lignina reduzida são fundamentais para aumento do consumo e digestibilidade (CHAKRABORTY, 2004).

Em alguns países essas espécies são usadas nos sistemas de cultivo *cut-and-carry*, além de apresentar uma rebrota jovem, potencial agroflorestal e qualidades que sugerem valor para a conservação da forragem. O rendimento de matéria seca em condições ideais pode chegar a

mais de 10 t / ha, embora, em solos pobres, com baixa pluviosidade, esse rendimento pode reduzir drasticamente a 1 t / ha. Em pastagens de gramíneas / leguminosas pode contribuir com 2-7 t / ha de massa seca, relatando uma produção anual de 140-160 kg.ha⁻¹ de ganhos, quanto ao peso vivo (CHAKRABORTY, 2004).

A proporção de *Stylosanthes* na dieta pode variar de 10 a 60%. Destaca-se que a espécie perene *S. scabra* apresenta um padrão mais uniforme de consumo, quando comparada a outras espécies de *Stylosanthes* também perenes ou herbáceas (CHAKRABORTY, 2004).

A carência por forragens, tanto em quantidade quanto em qualidade, é um fator limitante na produção de rebanhos, especialmente em regiões de longos períodos de seca, além da exploração indiscriminada dos recursos forrageiros nativos (ARAÚJO FILHO, 2013). Diante disso, *S. scabra* apresenta-se como uma excelente opção para forragem, destacando-se dentre as leguminosas como uma das mais adaptadas a diferentes situações (CHANDRA et al., 2004), ocorrendo desde regiões mais úmidas (como o agreste Pernambucano) até regiões submetidas a estresses extremos de seca, como a caatinga (FAO, 2017). Ressalta-se, assim, a importância de obter mais informações sobre essa importante forrageira, incluindo a prospecção de genes associados à tolerância ao estresse abiótico para que possam ser disponibilizados como alvos em programas de melhoramento genético vegetal e obtenção de cultivares mais tolerantes, a fim de aumentar sua produtividade e consequentemente seu uso agropecuário.

2.2.4 Bancos de germoplasma e recursos genéticos vegetais

A heterogeneidade em uma população é fundamental para que os programas de melhoramento genético de plantas possam selecionar genótipos superiores (KARIA et al., 2002). Diante disso, vários países tropicais, entre eles o Brasil, mobilizaram esforços de coleta e avaliação de leguminosas tropicais, visando a identificação de forrageiras potenciais. Atualmente, existem dois grandes bancos de germoplasma ativos na América Latina de leguminosas forrageiras de interesse econômico (incluindo membros do gênero *Stylosanthes*): um localizado no Brasil, na EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e outro na Colômbia, no CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Entre os objetivos na manutenção desses bancos de germoplasma incluem: (a) a caracterização morfológica e agrônômica dos inúmeros acessos, como estratégia de pré-melhoramento; (b) avaliar a variabilidade genética entre espécies, entre populações da mesma espécie e dentro de populações, através de marcadores moleculares; (c) renovar e conservar acessos de *Stylosanthes* spp. do banco de germoplasma; bem como (d) realizar o intercâmbio de materiais entre os

bancos de germoplasma (EMBRAPA, 2017). A conservação e manutenção de germoplasma das espécies de *Stylosanthes* são altamente relevantes e essenciais como subsídio ao programa de melhoramento.

Neste contexto, estudos vêm sendo realizados para identificar a variabilidade genética entre os acessos de *Stylosanthes* coletados no semiárido brasileiro, onde foi identificada uma ampla variedade genética intra/interespecífica, a qual pode possibilitar a seleção de genitores para uso em programas de melhoramento genético (SANTANA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2016), bem como para desenvolver cultivares mais adaptadas e produtivas, suprimindo, assim, a demanda na caprinovinocultura da região (CAVALCANTI; RESENDE, 2006).

2.2.5 Estudos com *S. scabra*: estado da arte

Plantas nativas apresentam uma diversidade muito maior que as cultivadas e, portanto, o estudo dessas espécies a nível molecular representa uma forma racional de conciliar o uso e a manutenção da biodiversidade. Estudos que visem priorizar o aproveitamento da flora nativa da caatinga, a exemplo da *S. scabra*, tornam-se essenciais, tendo em vista sua adaptação às condições edafoclimáticas do semiárido nordestino, tolerante a seca, de grande variabilidade genética e, portanto, uma fonte valiosa de genes a ser explorada. Por se tratar de uma forrageira nativa, representa uma alternativa sustentável para as populações locais, especialmente aquelas que executam atividades agropecuárias.

Entretanto, trabalhos envolvendo esta espécie ainda são muito escassos, com nenhuma referência à temática “*Stylosanthes scabra* / abiotic stress / transcriptomic”, nem mesmo com uso das palavras: “*Stylosanthes scabra* / Aquaporin” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>; Busca em 06/02/2019). As publicações com ‘*Stylosanthes scabra*’ (17 artigos) se restringem à origem e caracterização genômica da alotetraplóide *S. scabra*, sendo Marques et al. (2018) o artigo mais recente. Um estudo avaliando a variabilidade genética entre as espécies do gênero *Stylosanthes* foi conduzido por Huang e colaboradores (2017). Outro estudo (DURMIC et al., 2017) comparou o valor nutritivo em uma ampla diversidade de plantas forrageiras comuns aos sistemas pastoris tropicais na Austrália.

Ao nosso conhecimento, este estudo representa a primeira tentativa em estabelecer um conjunto de genes envolvidos nos mecanismos moleculares, fisiológicos e bioquímicos de *S. scabra* em resposta a vários regimes de deficiência hídrica. A escassez de informações acerca do transcriptoma, bem como de genes específicos associados ao transporte de água em *S. scabra*, enfatiza-se a necessidade em compreender o conjunto de transcritos que possa estar

induzido ou reprimido em resposta ao déficit hídrico, ressaltando-se assim a importância desse estudo.

2.3 RESPOSTAS DE PLANTAS AO ESTRESSE POR DÉFICIT HÍDRICO

A existência de um ou vários fatores biótico ou abiótico que exercem uma pressão sobre a normalidade dos sistemas biológicos das plantas pode ser definida como uma situação de estresse (NIU et al., 1995) a qual tende a comprometer o desenvolvimento das culturas. Dentre os mais impactantes fatores abióticos destacam-se o déficit hídrico, salinidade, temperaturas extremas, e alta incidência luminosa (TESTER; BACIC, 2005).

A redução da disponibilidade hídrica é uma das situações mais críticas e comuns nas lavouras de ambientes semiáridos, sendo também a mais limitante da produção vegetal, interferindo na distribuição das espécies em diferentes ambientes (BOYER, 1982; FLOWERS, 2004; ASHRAF, 2010; TESTER; LANGRIDGE, 2010). Apresentam efeitos em qualquer estágio fenológico da planta, podendo variar de acordo com a severidade e duração do estresse (FAROOQ et al., 2009). As consequências podem ser primárias, tais como a redução do potencial hídrico e a desidratação celular, alterando propriedades físicas e bioquímicas das células ou secundárias, como a geração de ROS (*reactive oxygen species*; espécies reativas de oxigênio), redução na estabilidade de membranas, aumento da desnaturação proteica, variação no balanço iônico, distúrbio metabólico e morte celular (TAIZ; ZEIGER, 2013).

A capacidade de tolerar ao déficit hídrico (DH) é uma característica que difere amplamente entre as espécies vegetais. Em plantas mais sensíveis, os processos fisiológicos são adversamente afetados pela redução na hidratação dos tecidos, enquanto que plantas com maior tolerância apresentam maior chance de sobrevivência – mesmo por longos períodos de baixa hidratação (CHAKRABORTY et al., 2015). Essa “capacidade” de tolerar (adquirida ao longo do processo evolutivo) resultou no desenvolvendo uma gama de modificações morfológicas, fisiológicas, moleculares e metabólicas para se “proteger” do fator de estresse (BARTELS; SOUER, 2004; BENKO-ISEPPON et al., 2011).

Segundo Bewley (1979), a planta pode sobreviver a uma perda de água protoplasmática severa se apresentar três principais condições: (1) que o dano esteja num nível o qual possa ser reparado, (2) manter sua integridade fisiológica no estado desidratado e (3) mobilizar recursos de reparo na reidratação que restitua efetivamente os danos sofridos durante a desidratação. Esses critérios podem ser estabelecidos mediante variações nos aspectos morfológicos,

fisiológicas e bioquímicas. Características como suculência, folhas com revestimento seroso, raízes profundas, com sistema de reserva, dormência e densa pilosidade que minimiza a evapotranspiração são algumas das adaptações morfológicas desenvolvidas por plantas em resposta ao DH. Tais adaptações são caracteres convergentes observados em plantas de diferentes áreas semiáridas, secas ou salinas existentes nos diversos continentes de nosso planeta (BENKO-ISEPPON et al., 2011). O *status* hídrico de uma planta pode ser determinado através de parâmetros variáveis como o potencial hídrico (Ψ_w) e o conteúdo hídrico relativo da folha (CHR_{foliar}), expresso como porcentagem do seu conteúdo de água em turgor pleno (TAIZ; ZEIGER, 2013). Além disso, os mecanismos bioquímicos também são alterados através do acúmulo de solutos para diminuir o potencial hídrico do citosol e do vacúolo, de forma a permitir a absorção de água e promover a manutenção da pressão de turgor da célula (SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

Como resposta ao regime hídrico, os vegetais também apresentam uma sensibilidade em seus processos fisiológicos como uma estratégia da planta para lidar com as variações na disponibilidade de água (TAIZ; ZEIGER, 2013). A fim de manter um alto conteúdo hídrico, as plantas aclimatam-se para minimizar a perda de água. Desta forma, o fechamento estomático é a primeira linha de defesa das plantas à deficiência hídrica, assim podendo evitar a dessecação por meio da redução da taxa transpiratória (MANSFIELD; ATKINSON, 1990; MAHAJAN; TUTEJA, 2005).

2.4 PROTEÍNAS DE CANAL DE ÁGUA: AQUAPORINAS

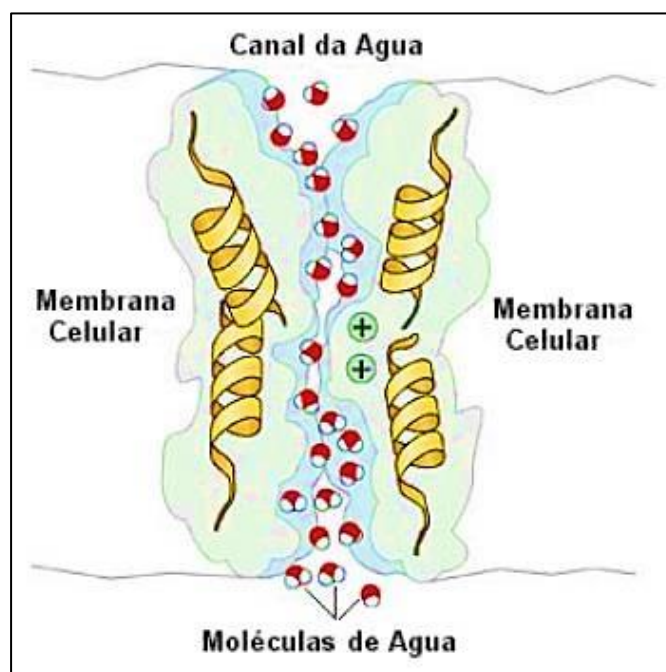
O transporte de água é um mecanismo essencial para o crescimento e desenvolvimento das plantas. No decorrer de muitos anos, considerou-se que o transporte hídrico ocorria por meio de simples difusão entre as moléculas lipídicas das membranas celulares, sem influência de um sistema de transporte específico. Entretanto, estudos indicam a existência de canais transportadores específicos, especialmente levando em conta, por exemplo, as elevadas taxas de permeabilidade de água observadas em eritrócitos em humanos (MACEY, 1984), bem como no alongamento celular e fechamento estomático das plantas (que demandam uma rápida translocação de água) (revisado por GASPAR et al., 2011).

Na década de 90, Preston e Agre (1991) isolaram a primeira aquaporina (AQP) de glóbulos vermelhos humanos, denominada CHIP28. Três anos mais tarde, foi identificada e caracterizada a função do primeiro transportador em plantas, na espécie modelo *Arabidopsis thaliana* (MAUREL et al., 1993). No ano de 2003, Peter Agre recebeu o prêmio Nobel em

química, em reconhecimento à “descoberta dos canais em membranas celulares”. São inegáveis a importância e a revolução causada por essa descoberta em várias áreas do conhecimento, tal como na biofísica do transporte de água, na fisiologia do transporte de fluidos, na biologia estrutural de proteínas de membrana e na fitopatologia de desordens relacionadas ao equilíbrio hídrico (KNEPPER; NIELSEN, 2004).

As AQPs, também conhecidas como superfamília MIPs (*Major Intrinsic Protein* / Principais Proteínas Intrínsecas), são proteínas de membrana que operam como componentes essenciais nas relações hídricas das plantas, facilitando a osmose, mediante à formação de poros que realizam o rápido transporte bidirecional de água, exercendo papel crucial no controle da água nas células e tecidos (Figura 4) (AGRE et al., 2002; JAVOT; TYERMAN, et al., 2002; FOUQUET et al., 2008). Essas proteínas também estão relacionadas a diversos processos importantes no metabolismo vegetal, incluindo aquisição de nutrientes, crescimento celular, fixação de carbono, sinalização celular e respostas a diversos tipos de estresse (MAUREL, 2007, BESSE et al., 2011).

Figura 4: Esquema ilustrativo do transporte de moléculas de água por meio das aquaporinas nas membranas celulares (Fonte: ZHAO et al., 2008).



Como revisado por Luang e Hrmova (2017), as MIPs são reportadas em todos os reinos da vida, incluindo as arque- e eubactérias, protozoários, leveduras, plantas e mamíferos. Apresentam peso molecular que varia entre 26 e 30 kDa, exibindo peptídeos formados de 250

a 300 aminoácidos (FORREST; BHAVE, 2007). Ao longo do tempo evolutivo, estes transportadores especializaram-se em relação à localização e função (associados ao transporte de diversos substratos), bem como pela associação a vários efeitos na fisiologia vegetal (JOHANSON et al., 2001; FORREST; BHAVE, 2007; GOMES et al., 2009). Devido à sua função no transporte de água essas proteínas foram denominadas de aquaporinas, entretanto, é sabido que as mesmas são capazes de transportar outras moléculas, tais como glicerol, ureia, ácido bórico ($B(OH)_3$), ácido silícico, amônia (NH_3), dióxido de carbono (CO_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (TYERMAN et al., 2002; LUDEWIG E DYNOWSKI, 2009; WU e BEITZ, 2007; HOVE; BHAVE, 2011).

Após a descoberta das AQPs vários estudos foram realizados. Até o momento foram descritos 13 homólogos em humanos (*Homo sapiens*) (ISHIBASHI; HARA; KONDO, 2009) sendo relatada uma maior abundância dessas proteínas em plantas. Foram identificados seis homólogos em amendoim – *Arachis hypogaea* L. (DEVI et al., 2016); 23 na briófita *Physcomitrella patens* L. (DANIELSON; JOHANSON, 2008); mais de 35 membros em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (JOHANSON et al., 2001); 37 em feijão-caupi – *V. unguiculata* (BEZERRA-NETO, 2012); 71 em algodão – *Gossypium hirsutum* L. (PARK et al., 2010); 84 em soja – *Glycine max* (L.) Merrill (DESHMUKH et al., 2013); 120 em canola – *Brassica napus* (SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2017).

O maior número de AQPs em plantas pode ser explicado em decorrência das duplicações de genes e maiores níveis de ploidia – comum em plantas (DESHMUKH; SONAH; BELANGER, 2016). A duplicação integral do genoma, duplicação segmentar, recombinação ectópica, deslizamento na replicação ou atividade de retrotransposons (DESHMUKH et al., 2013) também justificam maior número de AQPs em plantas. Acredita-se que ao longo do tempo evolutivo a diversidade de isoformas de AQPs reportadas em plantas tenha sofrido diversificação e neofuncionalização, levando à evolução de diferentes funções especializadas que proporcionam vantagens adaptativas para o crescimento sob diversas condições ambientais (CHAUMONT; MOSHELION; DANIELS, 2005; DESHMUKH et al., 2013).

2.4.1 Classificação

A superfamília das MIPs em plantas são categorizadas com base na distribuição filogenética, em quatro subfamílias principais: Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática (PIP – *Plasma Membrane Intrinsic Protein*); Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto (TIP – *Tonoplast Intrinsic Proteins*); Proteínas Intrínsecas de Nódulos (NIP – *Nodulin26-like Intrinsic*

Proteins); Pequenas Proteínas Básicas Intrínsecas de Membrana (SIP – *Small and Basic Intrinsic Proteins*) (JOHANSON et al., 2001; ZARDOYA, 2005; MAUREL, 2007; ZHAO et al., 2008; SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2017). Recentemente, uma quinta subfamília, denominada Proteínas Intrínsecas Desconhecida X (XIP – *Uncharacterized X Intrinsic Protein*) foi descrita em briófitas e algumas espécies de plantas superiores (DANIELSON; JOHANSON, 2008; PARK et al., 2010; DESHMUKH et al., 2013). Além destas, em plantas primitivas foram descritas duas subfamílias adicionais: Proteínas Intrínsecas tipo GlpF (GIP – *GlpF-Like Intrinsic Protein*) e proteínas intrínsecas híbridas (HIP – *Hybrid Intrinsic Protein*), e acredita-se que tenham sido perdidas por plantas superiores durante o curso da evolução (GUSTAVSON et al., 2005; DANIELSON; JOHANSON, 2008).

2.4.1.1 Proteínas Intrínsecas de Membrana Plasmática – PIP

A subfamília PIP contém a maior abundância de aquaporinas com 13 membros em *Arabidopsis* (JOHANSON et al., 2001), 14 em milho (CHAUMONT et al., 2001) e 43 em canola (SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2017). Aquaporinas dessa subfamília demonstram uma alta conservação dos resíduos de aminoácidos nos motivos NPA e na região ar/R (Phe-His-Thr-Arg-F-H-T-R) (CHAUMONT et al., 2001; SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2017). As mesmas estão localizadas exclusivamente em membranas plasmáticas e apresentam peso molecular aproximado de 30 kDa e ponto isoelétrico de 9,0, característica devida à presença de vários aminoácidos básicos na extremidade carboxi-terminal (C) (GOMES et al., 2009).

Os membros pertencentes às PIPs podem ser categorizados em dois grupos de acordo com a filogenia, denominados PIP1 e PIP2 (ZARDOYA, 2005). Apresentam divergências no comprimento das regiões amino- (N) e carboxi-terminal (C), bem como nas características de permeabilidade à água (KALDENHOFF; FISCHER, 2006). As PIP1 exibem uma longa extremidade N-terminal, porém uma cauda C-terminal curta, enquanto os representantes de PIP2 apresentam uma cauda N-terminal curta e uma extremidade C-terminal longa, além de 4-10 aminoácidos adicionais no primeiro *loop* extracitosólico (GOMES et al., 2009).

Apesar de apresentarem resíduos de aminoácidos dos filtros de seletividade semelhantes a permeabilidade e função celular de PIP1 e PIP2 divergem (WALLACE; ROBERTS, 2004). As PIP1 podem atuar no transporte de pequenos solutos ou gases, podendo exibir a atividade do canal de água mediada por modificações ou interação com outras aquaporinas (BIELA et al., 1999; UEHLEIN et al., 2003). Os membros de PIP2 assumem um papel em diferentes

processos fisiológicos envolvidos no transporte de água em raízes, folhas, órgãos reprodutivos e na germinação de sementes (LOPEZ et al., 2003; SCHUURMANS et al., 2003; BOTS et al., 2005).

2.4.1.2 Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto – TIP

As proteínas dessa subfamília foram uma das primeiras aquaporinas a serem identificadas e caracterizadas na espécie modelo *A. thaliana* (MAUREL et al., 1993). Representantes de TIPs são localizados na membrana do vacúolo celular, sendo responsáveis pelo fluxo de água e pequenos solutos através da membrana, além de atuar nos processos de regulação do turgor, sinalização e degradação celular (KALDENHOFF; FISCHER, 2006). Essas proteínas diferem da subfamília PIP pela ausência de 20 a 38 aminoácidos nas caudas N-terminais (CHAUMONT et al., 2001). O peso molecular das TIPs varia entre 25 e 28 kDa e seu ponto isoelétrico apresenta-se mais ácido, com amplitude de 4.0 a 6.7 (JOHANSON; GUSTAVSSON, 2002). As aquaporinas pertencentes a essa subfamília podem ser agrupadas em cinco grupos de isoformas (TIP1; TIP2; TIP3; TIP4 e TIP5) (CHAUMONT et al., 2001, GOMES et al., 2009).

Além de apresentarem alta capacidade no transporte de água (MAUREL et al., 1997), muitas isoformas TIP transportam pequenas moléculas, principalmente: glicerol (GERBEAU et al., 1999), CO₂ (UEHLEIN et al., 2003), ureia (LIU et al., 2003) e NH₃ (LOQUÉ et al., 2005). Devido à alta permeabilidade à água encontrada nos membros TIPs, bem como devido a seu envolvimento na osmoregulação, o fluxo de água não limitante através do tonoplasto é aparente. Destaca-se ainda que a condutância observada de pequenos solutos e de gás pode relacionar essas proteínas a importantes caminhos metabólicos como o ciclo de ureia ou a síntese de aminoácidos (KALDENHOFF; FISCHER, 2006).

2.4.1.3 Proteínas Intrínsecas de Nódulos – NIP

Acredita-se que essa subfamília tenha sido adquirida a partir de um único evento de transferência horizontal a partir de bactérias, na origem das plantas terrestres (ZARDOYA et al., 2005), visto que quando exposta a condições baixas de nitrogênio no solo, as leguminosas podem ser infectadas por bactérias fixadoras de nitrogênio (WEAVER et al., 1991).

As NIPs estão localizadas na membrana plasmática e no retículo endoplasmático e constituem um grupo de aquaporinas multifuncionais (MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008). Quando comparada com as PIPs e TIPs a expressão dos membros da subfamília NIP é inferior,

estando associada a especializações celulares, tais como zonas de alongação radicular (GOMES et al., 2009). Em um estudo realizado com a soja, observou-se que essa subfamília representa cerca de 10% do total de proteínas de membrana (FORTIN et al., 1987, WALLACE et al., 2006).

Em estudos distintos por meio de análises de expressão heteróloga, observou-se que os membros das NIPs se mostraram funcionais para o transporte de água e glicerol, porém apresentaram baixa permeabilidade para a água (KALDENHOFF; FISCHER, 2006; GOMES et al., 2009). Diante disso, as NIPs são subdivididas em dois subgrupos, conforme a estrutura do filtro de seletividade ar/R. O primeiro grupo inclui as aquaporinas associadas ao transporte de água e de glicerol, enquanto o segundo está envolvido no transporte de solutos maiores, como a ureia (WALLACE et al., 2006)

2.4.1.4 Pequenas Proteínas Básicas Intrínsecas de Membrana – SIP

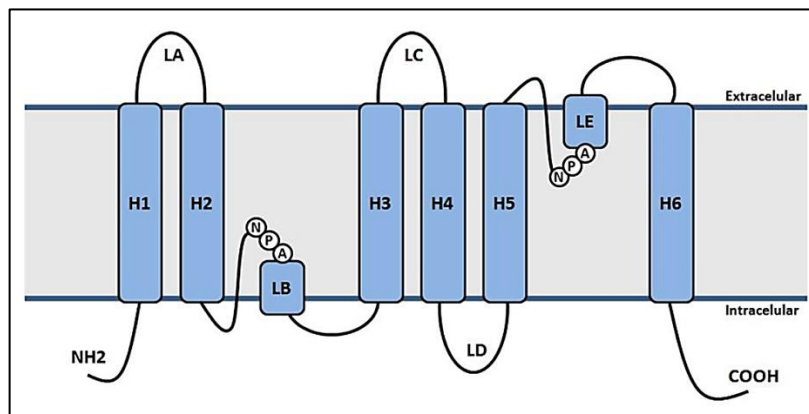
A subfamília de pequenas proteínas básicas intrínsecas de membrana, conhecida como SIP, compreende pequenas proteínas (26 kDa) como as integrantes da subfamília TIP, porém este grupo apresenta uma característica altamente básica, com o pI em torno de 9.0 (KALDENHOFF; FISCHER, 2006; SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2017). Esse alto índice no pI pode ser causado pela série de lisinas em suas regiões C-terminais (JOHANSON; GUSTAVSSON, 2002). Além disso, as NIPs apresentam uma alta divergência na sequência inteira, bem como a ausência, quase que absoluta, da conservação na pequena hélice do *loop* B, nos motivos NPA e uma extremidade N-terminal curta (CHAUMONT et al., 2001, MAESHIMA; ISHIKAWA, 2008).

Dentre as MIPs, essa é a subfamília com o menor número de membros, sendo identificada inicialmente através de mineração de dados nos bancos de sequências para geração de uma filogenia (KALDENHOFF; FISCHER, 2006). Estudos *in vitro* indicam que as SIP atuam no transporte de água através da membrana do retículo endoplasmático, porém mais estudos precisam ser realizados para elucidação da função, mas sabe-se que elas estão envolvidas na regulação do volume e concentração iônica do lúmen, assim como na morfologia da organela. As SIPs podem ser classificadas estruturalmente em dois subgrupos: SIP1 e SIP2. (FORREST; BHAVE, 2007).

2.4.2 Composição estrutural e localização subcelular das aquaporinas

As aquaporinas, independente da função e do organismo, apresentam uma estrutura geral comum, composta por seis α -hélices transmembranas (H1-H6 – TMH, *transmembrane hélices*) conectadas por cinco *loops* (LA, LB, LC, LD e LE), onde LA, LB e LC (*loops* hidrofóbicos) estão localizados no lado extracelular, enquanto B e D (*loops* hidrofílicos) estão do lado intracitoplasmático (Figura 5) (CHAUMONT et al., 2001, TYERMAN et al., 2002). A maioria das membranas de aquaporinas constitui tetrâmeros (WALZ et al., 1994, DANIELS et al., 1999, FOTIADIS et al., 2001), sendo cada subunidade (do tetrâmero) responsável pela formação de um poro aquoso por meio do *loop* B (citoplasmático) e o *loop* E (extra citoplasmático). Dois motivos conservados de aminoácidos “Asparagina-Prolina-Alanina” (NPA), estão localizados nos *loops* B e E, que se dobras e se inserem no centro da membrana, contribuindo para a formação do poro, bem como para sua função de transportador (FORREST; BHAVE 2007; GOMES et al., 2009).

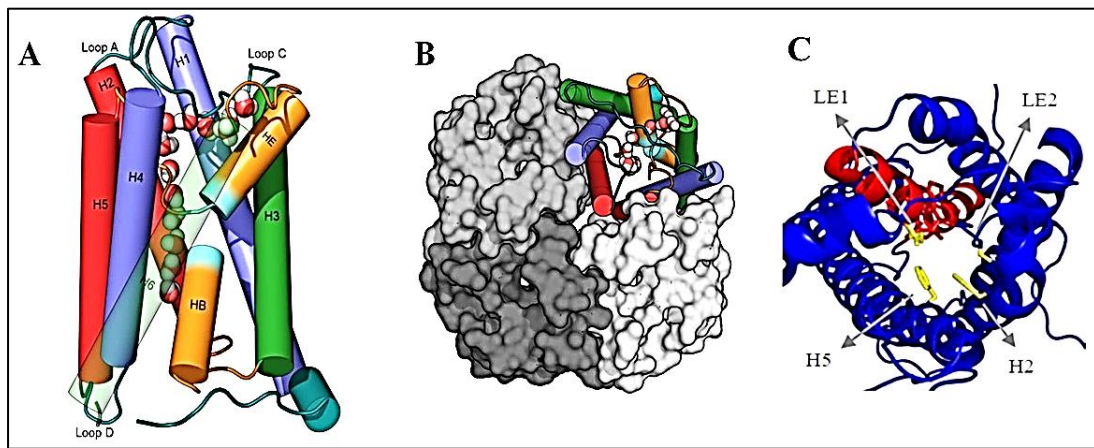
Figura 5: Esquema da topologia geral das aquaporinas: estrutura com seis hélices transmembranas (H1-H6) conectadas por cinco *loops* (LA-LE). Os *Loops* B e E contêm os motivos conservados NPAs, formadores do poro. NH₂ extremidade amino-terminal e COOH: extremidade carboxi-terminal (Fonte: Bezerra-Neto, 2012).



A estrutura primária pode ser dividida em duas partes similares denominadas hemiporos, provavelmente originadas por duplicações gênicas ao longo do curso evolutivo, sendo cada hemiporo constituído por três hélices transmembranas H1-H3 ou H4-H6 e um *loop* hidrofóbico contendo o motivo NPA. Já, para a formação da estrutura tridimensional, as aquaporinas sofrem dobras formando uma estrutura em forma de “ampulheta”, modelo conhecido como *hourglass* (Figura 6) (GOMES et al., 2009; FORREST; BHAVE, 2007). Uma segunda região altamente conservada nas aquaporinas são os filtros de seletividade, conhecido como constrição ar/R (*aromatic/arginine*) ou filtro ar/R, posicionado mais próximo à região

extra-citoplasmática. Esse filtro é constituído por quatro resíduos de aminoácidos conservados. Nas alfa-hélices estão os resíduos H2 e H5, enquanto que LE1 e LE2 são encontrados no *loop* E (Figura 6).

Figura 6: Estruturas tridimensionais de aquaporinas de plantas. A. Modelo de *hourglass* (ampulheta), com os seis domínios transmembranas (H1-H6), conectados pelos *loops*. B. Tetrâmero visto do lado vacuolar da TIP2 de *A. thaliana* (adaptado de KIRSCHT et al., 2016) e C. Modelo tridimensional perpendicular à bicamada lipídica em *G.max*, com os resíduos dos filtros representados pelas hélices (H5 e H2) e alça nas posições 1 e 2 (LE1 e LE2)
Fonte: adaptado de MENESSAGI, 2015.

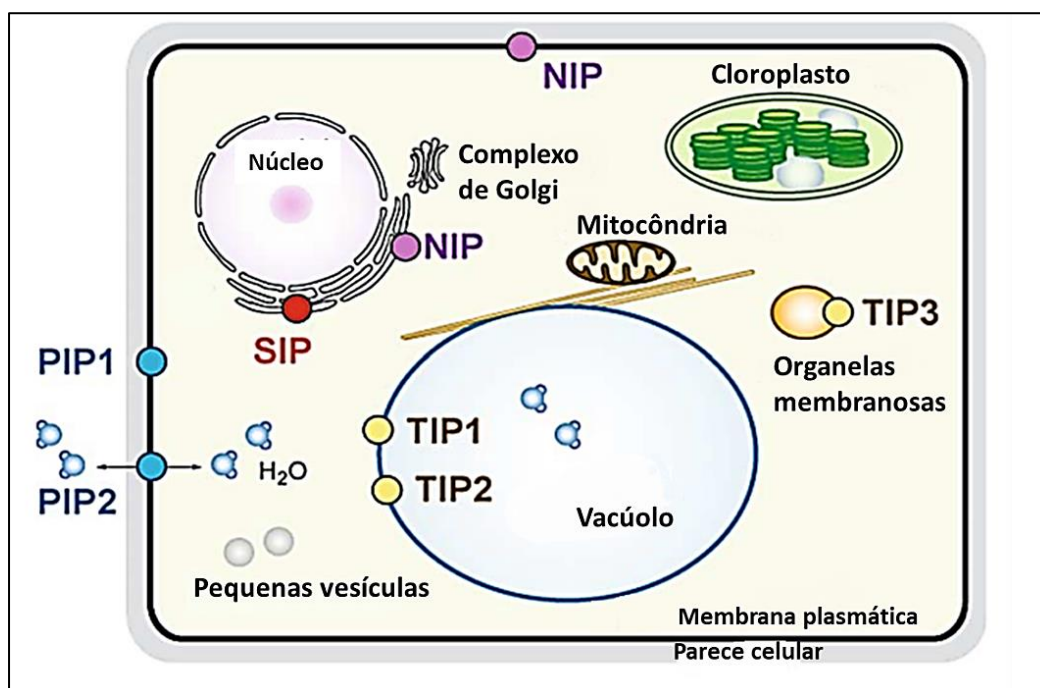


Recentemente, um 5º filtro de seletividade foi descrito em *A. thaliana* associado à permeabilidade à amônia. O processo molecular pelo qual as aquaporinas facilitam o fluxo de amônia através das membranas sugere que ocorra uma atuação na modulação de perdas de amônia da membrana plasmática para a atmosfera (por exemplo, durante a fotorrespiração), modificando a eficiência do uso de nitrogênio das plantas (KIRSCHT et al., 2016). A região ar/R está posicionada no centro do poro, formando uma segunda constrição, separada do motivo NPA, a qual é tida como o principal ponto de seletividade para a permeabilidade de solutos (FORREST; BHAVE, 2007). Os resíduos conservados são responsáveis pela formação de pontes de hidrogênio durante o transporte de moléculas de água ou glicerol, ou ainda repelir cátions do poro (SUI et al., 2001).

Além desses filtros e dos motivos NPA outra região conservada também desempenha papel importante na especificidade de aquaporinas aos solutos – os resíduos de *Froger*. Essa região é composta por cinco aminoácidos conservados, conhecidos por discriminar aquagliceroporinas que fazem o transporte de glicerol (GLPs) das aquaporinas que conduzem água (FROGER et al., 1998).

Na Figura 7 está a representação esquemática da localização subcelular das diferentes subfamílias de AQPs: os membros pertencentes à subfamília PIP nas membranas plasmáticas e os membros de TIP nos vacúolos. Já para os representantes das subfamílias NIP e SIP a localização subcelular é incerta (CHAUMONT et al., 2005), embora evidências da presença desses membros tenham sido reportadas nas membranas do retículo endoplasmático e na membrana plasmática de células (MAUREL, 2007; MAESHIMA 2008).

Figura 7: Localização esquemática das quatro principais subfamílias de aquaporinas nas organelas vegetais. PIPs (na membrana plasmática); TIPs (no vacúolo); NIPs (no retículo endoplasmático e membrana plasmática) e SIPs (retículo endoplasmático); Fonte: adaptado de Maeshima e Ishikawa (2008).



2.4.3 Estudos da expressão diferencial em aquaporinas

Vários ensaios baseados em análise de transcriptoma têm sido amplamente utilizados para identificar genes diferencialmente expressos em resposta a diversos fatores, tanto bióticos quanto abióticos. Tais metodologias tornam possível o entendimento da dinâmica de expressão de aquaporinas durante aplicação de determinado estresse, como por exemplo, a diferentes períodos de déficit hídrico (DESHMUKH et al., 2013; SONG et al., 2016).

Algumas aquaporinas são expressas constitutivamente, enquanto outras têm sua expressão modulada frente a diversos estímulos, como estágios de desenvolvimento e diferentes

condições ambientais (KJELLBOM et al., 1999), entre os quais alta salinidade (BOURSIAC et al., 2005) e disponibilidade hídrica (ALEXANDERSSON et al., 2005). Além disso, a expressão dos genes de aquaporinas é regulada de forma diferente em cada órgão/tecido específico (Revisado por TYERMAN, NIEMIETZ e BRAMLEY, 2002).

As respostas das aquaporinas frente ao estresse hídrico foram investigadas em várias espécies de plantas. A análise desses resultados tem levado a interpretações divergentes (HUSSAIN et al., 2011). Uma das vertentes afirma que o aumento dos níveis de expressão das aquaporinas após a aplicação do estresse hídrico pode conferir às plantas uma capacidade adicional no enfrentamento ao estresse submetido (LIAN et al., 2004). Distintamente, para outro grupo de autores, a diminuição nos níveis de expressão de aquaporinas pode favorecer a planta, evitando a perda excessiva de água durante períodos de estresse hídrico (SMART et al., 2001).

Entre as subfamílias de aquaporinas, as PIPs e TIPs apresentam níveis de expressão mais abundantes nos diferentes tecidos, comparativamente a NIPs e SIPs (PARK et al., 2010). O recrutamento de diversos membros das subfamílias TIP e PIP tem sido demonstrado em resposta ao déficit hídrico. Estudos realizados com *Arabidopsis* em resposta ao déficit hídrico, evidenciam que todos os genes PIPs foram reprimidos em resposta ao estresse hídrico, com exceção de AtPIP1;4 e AtPIP2;5 que foram induzidos (ALEXANDERSSON et al., 2004). Além disso, a redução dos níveis de expressão de aquaporinas da subfamília PIP em resposta ao déficit hídrico também foi observada em outras espécies, como em raízes de tabaco (MAHDIEH et al., 2008) e raízes e galhos de plantas de oliveira (SECCHI, LOVISOLO e SCHUBERT, 2007).

Entretanto, resultados contrastantes têm sido observados em outras plantas submetidas a este mesmo estresse. Dados de transcriptômica de canola submetida ao déficit hídrico revelaram que existe um contraste entre a expressão de aquaporinas em diferentes tecidos, observando-se uma regulação negativa (*down-regulation*) de aquaporinas em raiz e regulação positiva (*up-regulation*) em folha. Essa alteração na expressão foi mais proeminente nas categorias PIP e TIP, sendo constatado que todos os genes diferencialmente expressos em folha foram pertencem a essas duas subfamílias (SONAH; DESHMUKH; BÉLANGER, 2017). Além disso, o padrão de expressão pode variar de acordo com a magnitude do estresse. Por exemplo, em híbridos de *Vitis* após aplicação de estresse hídrico moderado foi observado que cinco genes PIPs investigados foram reprimidos, entretanto, a continuidade de aplicação do estresse aumentou os níveis de expressão desses genes em folhas e houve baixa expressão em raiz (GALMÉS et al. 2007).

2.5 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMAS

Os recentes avanços nas tecnologias de sequenciamento de DNA resultaram na geração massiva de dados que, embora indiscutivelmente relevantes, não são suficientes para elucidar por completo os mecanismos moleculares envolvidos em muitos processos biológicos (EGAN et al., 2012), demandando estudos laboratoriais complementares. O acúmulo exponencial dessas sequências gênicas depositadas em bancos de dados públicos tem aumentado a demanda por metodologias que auxiliem na identificação funcional dos genes ou confirmação de homólogos, bem como na elucidação dos seus padrões de expressão (CALSA JUNIOR et al., 2004; TRIPATHI et al., 2016).

No primeiro estágio da expressão gênica, a transcrição de genes e mudanças na sua atividade transcricional são indicativas da identidade e função destes. Padrões de expressão compartilhados entre diferentes genes podem sugerir uma correlação funcional entre eles, considerando-se que mudanças no perfil transcricional refletem demandas impostas sobre as células que resultarão em alterações das suas condições fisiológicas (SANCHITA; SHARMA, 2016). A análise de expressão diferencial baseia-se na regulação de genes, ou seja, em situações fisiológicas diferentes, através da comparação de uma condição estressada *versus* controle, com avaliação da regulação do gene, seja ela aumentada (induzida), diminuída (reprimida) ou, ainda, permanecendo inalterada (CASASSOLA et al., 2013).

Assim, tecnologias voltadas à detecção dos níveis de mRNA na célula permitem a identificação do padrão de transcrição espaço-temporal dos genes e correlação destes com os processos biológicos (SHIMKETS, 2004), permitindo a identificação de genes-chave em redes de interação. Baseando-se nisso, foram desenvolvidas várias técnicas baseadas na contagem de transcritos, visando à determinação da expressão gênica sob determinada condição. Entre as tecnologias mais utilizadas estão: o microarranjo de DNA (DNA *microarray*; SCHENA et al., 1995) também conhecido chip de nucleotídeos, sendo baseada em hibridação; a EST (Etiqueta de Sequência Expressa – *Expressed Sequence Tag*; ADAMS et al., 1991), SuperSAGE (Análise Super Seriada da Expressão Gênica – *Super Serial Analysis of Gene Expression*; MATSUMURA et al., 2004) e RNA-Seq (Sequenciamento do RNA – *RNA Sequencing*; MORTAZAVI et al., 2008), sendo as três últimas baseadas em sequenciamento.

As abordagens baseadas em sequenciamento fornecem uma maior abrangência, fornecendo dados mais robustos, quando comparadas aos métodos baseados em hibridação. Em adição, a maior cobertura, maior nível de sensibilidade e a natureza de alto rendimento, tornam o sequenciamento de nova geração – NGS (*Next-Generation Sequencing*) uma das melhores

tecnologias nas análises de expressão gênica (MARIONI et al., 2008; 'T HOEN et al., 2008; OZSOLAK; MILOS, 2011).

2.5.1 Sequenciamento de RNA (RNA-Seq)

Dentre as técnicas baseadas em sequenciamento de alto rendimento, o RNA-Seq apresenta diversas vantagens sobre as outras com mesmo perfil, não se limitando ao conhecimento prévio do genoma ou dos transcritos de um organismo, mostrando-se como uma tecnologia atrativa para espécies cuja sequência genômica não foi ainda determinada (WANG et al., 2009). Além disso, a tecnologia tem capacidade para revelar complexidades anteriormente inacessíveis ao transcriptoma, como a localização precisa das conexões entre os transcritos, a conectividade entre os exons, isoformas expressas de genes, análises de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de Nucleotídeo Único), novos promotores, etc., tudo com alta sensibilidade e reprodutibilidade (WANG et al., 2009; OSHLACK et al., 2010; CASASSOLA et al., 2013). Com esta tecnologia é possível, por exemplo, sequenciar o transcriptoma completo de um organismo com quantidades muito menores de RNA em comparação às demais tecnologias.

Em linhas gerais, a técnica baseia-se na obtenção de uma biblioteca de cDNA a partir da conversão do RNA total ou fracionado [poli (A)+]. Adaptadores ligados em uma ou ambas extremidades dos fragmentos de cDNA permitem o reconhecimento da direção das *reads* (entre 30 e 400 pb) após o sequenciamento de alto rendimento. As sequências resultantes são alinhadas contra um genoma de referência ou montadas *de novo* (neste último caso, quando a espécie não possui genoma sequenciado) a fim de se obter um mapa transcriptômico de escala genômica, composto pela estrutura transcricional e/ou nível de expressão de cada gene (WANG et al., 2009).

Quando associados a ferramentas de bioinformática adequadas, os dados gerados por RNA-Seq nos permitem avaliar a dinâmica da expressão gênica numa escala global, sob diferentes contextos celulares e situações biológicas. Esta análise é baseada no pressuposto de que a profundidade de cobertura de uma sequência é proporcional à expressão do gene de interesse correspondente, comparando-se a amostra tratada com uma amostra controle (JAIN, 2012).

Apesar das limitações inerentes à técnica (ex. dificuldade na detecção de transcritos pequenos ou a necessidade de poder computacional e de bioinformatas capacitados para o processamento dos dados), a tecnologia de RNA-Seq tem se consolidado como um método

padrão para análise transcriptômica. Associada à técnica de RT-qPCR, o RNA-Seq mostra-se como uma das estratégias mais eficazes para descobrir novos genes (HOWLAD et al., 2012). De toda forma, o RNA-Seq é o primeiro método baseado em sequenciamento que permite que todo o transcriptoma possa ser estudado com um alto rendimento e de forma quantitativa (WANG et al., 2009).

2.5.2 PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR)

A tecnologia de RNA-Seq revolucionou o campo da transcriptômica ao permitir a identificação e quantificação da abundância de mRNA em células, tecidos e organismos por meio de um conjunto diversificado de *reads* geradas, o que facilitou as análises de detecção da variação no nível de expressão de transcritos e variantes específicos (WANG et al., 2009; OZSOLAK; MILOS, 2011; MOHORIANU et al., 2017). No entanto, a validação biológica dos resultados de expressão gênica é uma parte essencial de qualquer experiência de perfil de expressão. Em meio a uma variedade de métodos moleculares utilizados para quantificar a expressão de um gene, RT-qPCR é considerada atualmente como o “padrão-ouro” para determinar a quantidade exata de um único transcrito de mRNA numa amostra biológica (SINICROPI et al. 2007; VANHAUWAERT et al., 2014).

Descrita pela primeira vez por BUSTIN (2000), a RT-qPCR baseia-se no princípio de conversão do mRNA em cDNA pela ação da enzima transcriptase reversa. Esta técnica combina amplificação e detecção do fragmento amplificado em uma única etapa, graças a diferentes fluorocromos que correlacionam a concentração do produto de PCR com a intensidade da fluorescência (ALEMU, 2014). A alta sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão da técnica, bem como sua simplicidade e velocidade de processamento prático, tornam a RT-qPCR o melhor método de escolha para a validação de estudos genômicos (VANHAUWAERT et al., 2014).

A reação de amplificação pode ser visualizada em tempo real por meio da captação de um sinal fluorescente não específico (intercalantes de DNA) ou específico (sondas marcadas). Dentro os fluoróforos mais utilizados nas reações é o *SYBR Green I* o qual se intercala a qualquer fita-dupla de DNA (cDNA) presente na amostra, emitindo fluorescência (HUGGETT; BUSTIN, 2011). Por sua vez, o *TaqMan* atua como um fluoróforo de detecção específica, uma vez que o sinal somente é gerado quando a sonda específica do *amplicon* hibridiza com sua região complementar. Esse tipo de sonda permite ainda a quantificação de múltiplos genes em uma mesma reação devido à especificidade com o transcrito alvo, reduzindo dessa forma a

quantidade de amostras e reagentes necessários. Apesar das vantagens inerentes ao uso de fluoróforos específicos, o *SYBR Green* ainda é o mais intensivamente utilizado pelos pesquisadores, principalmente devido ao seu baixo custo e à facilidade no preparo da amostra (BIO-RAD LABORATORIES, 2006; SHIPLEY, 2006). Os produtos da RT-qPCR são posteriormente quantificados através de cálculos absolutos ou relativos (TYBURSKI et al., 2008). Apesar da robustez do método, algumas variáveis (ex. tipo de extração e forma de armazenamento do RNA, a reação da transcrição reversa, a especificidade dos *primers* e a eficiência de cada curva de amplificação, entre outros) durante o processo podem afetar os resultados da RT-qPCR (ALEMU, 2014). Por esse motivo, o consórcio internacional de cientistas acadêmicos compilou algumas instruções de Informações Mínimas para Publicação Quantitativa de Experimentos de PCR em Tempo Real (MIQE – *Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*), visando padronizar um protocolo para experimentos com RT-qPCR (BUSTIN et al., 2009). De acordo com MIQE, em análises de RT-qPCR é recomendado o uso de genes normalizadores internos (ou genes de referência – GR) adequados para cada condição avaliada (BUSTIN et al., 2009), ou seja, genes cuja expressão não apresente variação entre as células de diferentes tecidos e condições experimentais (THELLIN et al., 1999). Se tais requisitos não forem cumpridos, a normalização para diferentes referências internas pode resultar no aumento de “ruídos” ou resultados errôneos, uma vez que há uma forte correlação do nível de expressão com a quantidade total de mRNA presente nas amostras (BUSTIN et al., 2009). Se o gene normalizador escolhido apresentar variações na expressão entre as amostras, as pequenas diferenças nos padrões de expressão entre os genes de interesse serão perdidas. Ainda, se a condição experimental se mostrar como um fator determinante para a mudança direcional na expressão do GR, a normalização subsequente resultará em erro (DHEDA et al., 2004). Assim, a escolha de um GR adequado é uma etapa fundamental na confiabilidade dos dados de expressão (BUSTIN et al., 2009).

Normalmente, um único gene de referência não é suficiente para uma normalização satisfatória e segura dos dados, pois, na prática, sempre há uma pequena variação observada, sendo necessária a seleção de genes com a expressão mais estável ou com o menor desvio da média. Assim, Vandesompele e colaboradores (2002) sugeriram que um índice de estabilidade fosse calculado pela variação média entre pares de genes, comparando o gene de controle com outros candidatos validados. Para essa finalidade, alguns programas têm sido indicados, sendo o geNorm (VANDESOMPELE et al., 2002), o NormFinder (ANDERSEN et al., 2004) e o BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), entre os mais usados. Alguns pesquisadores optam pelo uso

individual de cada programa, embora a estratégia de combinar vantagens de cada programa e fazer a seleção de genes com base em uma comparação dos resultados de cada método utilizado parece ser a mais adequada. (SPIEGELAERE et al., 2015). Estudos anteriores também são úteis como ponto de partida para seleção de candidatos a GR (KOZERA; RAPACZ, 2015).

3 ASPECTOS FISIOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES ASSOCIADOS ÀS RESPOSTAS AO DÉFICIT HÍDRICO EM *Stylosanthes scabra*

Artigo a ser submetido à Revista Journal of Plant Physiology (FI: 3.121)

Flávia Czekalski de Araújo^a; Rebeca Rivas^b; Grabiella Frosi^b; Benjamim Pereira da Costa Neto^c; Saulo de Tarso Aidar^c; Nataniel Franklin de Melo^c; Valesca Pandolfi^a; Mauro Guida Santos^b; Sheyla Silva^a, Tercilio Calsa-Júnior^a, Ana Maria Benko-Iseppon^a

^a Departamento de Genética, Centro de Biociencias, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil.

^b Departamento de Botânica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

^c Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Petrolina, PE, Brasil.

Autor para correspondência:

Ana Maria Benko-Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Telefone: 55-81-2126-7816; Fax: 55-82-2126-8522;
Email: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Resumo

Stylosanthes scabra é uma leguminosa nativa do semiárido brasileiro e apresenta grande importância econômica devido à sua utilização na alimentação animal, tratando-se de um dos principais componentes de pastagens perenes da região. O objetivo do estudo foi compreender os aspectos fisiológicos e bioquímicos apresentados em *S. scabra* sob o déficit hídrico. Para isso, 72 plantas com quatro meses de idade foram colocadas em potes de 10 kg e submetidas à supressão de rega por 6, 24 e 48 h, seguidas de reidratação, sendo avaliadas 6 h após rega em casa de vegetação. Para cada tratamento foram consideradas três réplicas biológicas. Nesse período foram avaliados nas folhas o conteúdo hídrico relativo (CHR_{foliar}), trocas gasosas, fluorescência e pigmentos fotossintéticos. Nas raízes e folhas foram quantificados metabólitos primários. O CHR_{foliar} apresentou reduções de 12%, 34% e 45%, nos tratamentos 6 h, 24 h e 48 h sob restrição hídrica, respectivamente. Após a reidratação, o tratamento estressado não diferiu do controle. Reduções foram verificadas nos parâmetros de trocas gasosas e fluorescência nos três tratamentos analisados, sendo mais significativa após 48 h de estresse, sugerindo que reduções na assimilação do CO₂ podem ter sido resultantes do fechamento dos estômatos. Após o curto período de reidratação as taxas do CHR_{foliar}, trocas gasosas e fluorescência apresentaram uma rápida recuperação. Após 6 h de estresse verificou-se que as folhas tratadas apresentaram reduções significativas (41%) nos açúcares (carboidratos solúveis totais, CST) e aminoácidos livres totais (ALT), enquanto nas raízes foram observados aumentos mais proeminentes, com 735% nos CST e 273% nos ALT. Foram identificados aumentos significativos de prolina tanto na folha (6 h) como na raiz (24 h), equivalentes a 77% e 31%, respectivamente. Esse metabólito permaneceu elevado (31%) na raiz mesmo após 48 h de regime hídrico. A partir de dados de RNA-Seq, foi possível identificar um grande número de genes diferencialmente expressos (17.449 DEGs), nos tratamentos 6 h e 24 h sob déficit hídrico. Dentre os termos GO enriquecidos, destacam-se os termos associados ao metabolismo de açúcares e resposta antioxidante, como possível resposta ao estresse aplicado. Nos pigmentos fotossintéticos só houve diferença nos carotenoides das plantas tratadas, com redução de 51% (tratamento 6 h) comparado ao controle. Após reidratação, o acúmulo de CST e ALT foi menor no tratamento, comparado ao período de déficit hídrico. Diante dos resultados, foi possível observar que *S. scabra* apresenta um admirável grau de tolerância ao estresse hídrico, alterando rapidamente seus parâmetros fisiológicos e bioquímicos, reduzindo rapidamente sua abertura estomática e alterando as concentrações de modo diferenciado entre parte aérea e subterrânea. O acúmulo de açúcares e aminoácidos nas raízes é um indicativo de ajustamento osmótico nesse tecido para manutenção do movimento de água e crescimento desse tecido diante da redução da disponibilidade hídrica. Dessa forma, *S. scabra* torna-se um modelo interessante para ser utilizado em programas de melhoramento genético, visando a obtenção de cultivares mais tolerantes à dessecação.

Palavras-chave: Estilosantes, seca, semiárido, trocas gasosas, metabolismo primário, RNA-Seq.

1. Introdução

Stylosanthes scabra Vogel (Fabaceae) é uma leguminosa de hábito herbáceo, nativa do semiárido brasileiro, sendo amplamente cultivada, principalmente em ambientes tropicais e subtropicais (Williams et al., 1984; Cameron et al., 1996, Costa, 2015). Apresenta alta plasticidade frente aos fatores abióticos, ocorrendo desde o agreste até o semiárido pernambucano no Nordeste do Brasil (FAO, 2017). Nesse contexto, destaca-se a importância na identificação de mecanismos e estratégias de tolerância da espécie sob déficit hídrico.

Para sobreviver a ambientes adversos, como a deficiência hídrica, as plantas apresentam uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas como forma de manter sua homeostase. Diante de uma restrição hídrica, a redução da absorção de água pelas raízes pode acarretar na perda de turgor que consequentemente reduz o crescimento. Além disso, a redução da disponibilidade de água tem uma relação direta entre a redução da concentração intercelular de CO₂, em razão do fechamento estomático, gerando um declínio na assimilação do CO₂ e no rendimento quântico do fotossistema II, levando a diminuição da produção de biomassa (Baker, 1993; Daszkowska-Golec e Szarejko, 2013; Pimentel, 2004). Os efeitos recorrentes da restrição hídrica são evidentes em qualquer estágio fenológico da planta, podendo variar conforme a severidade, duração do estresse e número de eventos (Farooq et al., 2009).

Segundo Williams e Gardner (1984) diversas espécies do gênero *Stylosanthes* apresentam estratégias de aclimação para responder a uma seca severa. Diante dessa capacidade, Williams e Gardner (1984) consideram as espécies *S. hamata* cv. Verano e *S. scabra* cv. Seca adequadas para sobreviverem a estações secas nos trópicos. A redução das taxas fotossintéticas, observada na maioria das plantas, reduz o fornecimento de esqueletos de carbono para a síntese de metabólitos primários, acarretando na regulação do metabolismo do carbono (Łabanowska et al., 2013). Diante desse cenário, as plantas podem hidrolisar compostos de reserva para a manutenção do seu metabolismo (Rossiell et al, 1981) e acumular solutos compatíveis no interior da célula como forma de auxiliar a captação de água e manutenção da pressão de turgor (Kramer e Boyer, 1995; Theriappan et al., 2011; Sami et al., 2019; Dar et al., 2018).

Além das respostas fenotípicas observadas, as plantas quando submetidas a estresses ambientes, tendem a modificar seu transcriptoma. Com o advento do desenvolvimento de técnicas de sequenciamento e de ferramentas de análise bioinformática, progressos relevantes foram realizados a fim de decodificar vias de sinalização de estresse e os principais genes associados a resposta ao estresse abiótico nas plantas (Liu et al., 2014). A regulação diferencial

de genes e vias específicos, em alguns casos, têm sido relacionadas a uma melhor adaptação das plantas (Zhang et al., 2004).

Dentre as aplicações das técnicas de NGS (*Next-Generation Sequence*), destaca-se a metodologia de RNA-Seq, uma tecnologia muito usada para identificação de novos genes e isoformas, detecção de variantes incluindo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*; Polimorfismo de nucleotídeo único), InDels, SSRs (*Simple Sequence Repeats*) e eventos de fusão gênica, permitindo uma melhor compreensão dos genes diferencialmente expressos e respostas fisiológicas sob estresse hídrico em plantas (Fracasso et al., 2016; Zhang et al., 2018; Mashaki et al., 2018).

Pelo alto potencial adaptativo e por habitar diferentes regiões que exibem baixos níveis de precipitações, a forrageira *S. scabra* torna-se um interessante objeto de estudo para o entendimento do comportamento das trocas gasosas, metabólitos primários e modulação gênica, quando submetida ao déficit hídrico. Diante do exposto, este trabalho teve por objetivo avaliar os aspectos fisiológicos, bioquímicos e moleculares apresentados em *S. scabra*, sob o déficit hídrico.

2. Material e métodos

2.1. Material vegetal

O experimento foi conduzido com indivíduos de *S. scabra* propagados por estaquia, utilizando-se como matriz o acesso 85/UNEB, proveniente do banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia, e conduzido na Embrapa Semiárido (Petrolina, PE). A metodologia de enraizamento foi realizada com estacas de aproximadamente 10 cm de comprimento com a adição de AIB (ácido indolbutírico, 1.000 ppm, diluído em talco mineral). O material foi colocado em sacos plásticos (15 x 8 cm) contendo substrato composto por solo (argissolo) e vermiculita (proporção de 3:1) e mantidos em telado com 50% de sombreamento e com irrigação uma vez ao dia. Nessas condições, obteve-se uma taxa de enraizamento de aproximadamente 90% das estacas. As plantas foram posteriormente transferidas para vasos plásticos (capacidade de 10 L), sendo cultivadas em substrato composto por areia, argissolo, vermiculita, mantidos em casa-de-vegetação.

2.2. Desenho experimental, imposição do estresse e coleta do material

Após quatro meses de cultivo (Fig. 1), as plantas foram categorizadas em dois tratamentos: controle (rega 500 mL às 9:00 h) e o déficit hídrico (suspensão de rega). As medidas e coletas foram realizadas às 6, 24 e 48 h após a suspensão de rega e 6 h após a reidratação. Para cada tempo foram coletadas três réplicas que representaram três plantas por vaso, totalizando nove plantas por tratamento (Tab. 1).

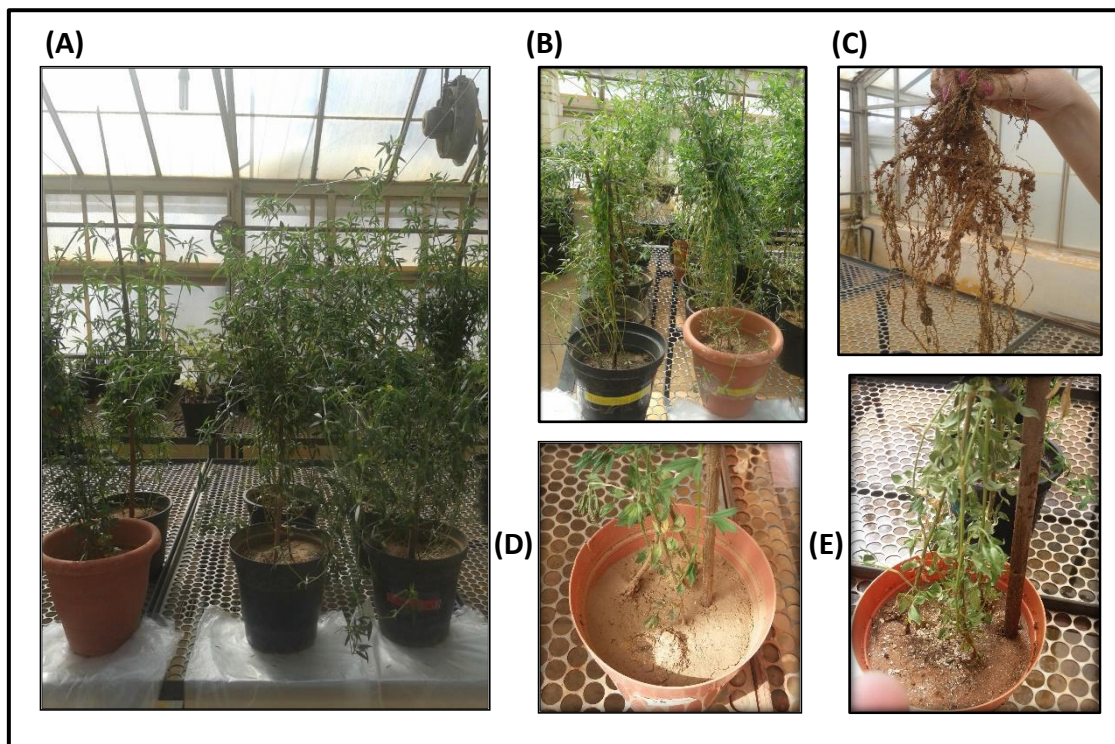


Fig. 1. Mostra das plantas de *S. scabra*, após quatro meses de crescimento em casa de vegetação – Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. **(A)** Mostra parcial das plantas no momento da primeira coleta (6 h após estresse e controle); **(B)** Vista da parte aérea e **(C)** vista da parte radicular; Mostra do solo após 48 h de estresse **(D)** e do vaso controle, sem supressão de rega **(E)**.

2.3. Avaliações fisiológicas e bioquímicas

2.3.1 Conteúdo hídrico relativo, trocas gasosas e fluorescência da planta

As medidas fisiológicas foram realizadas ao longo de todo experimento, nos diferentes tempos e tratamentos. Para realização das medidas do conteúdo hídrico relativo foliar (CHR_{foliar}) foram coletados, trifolíolos isentos de qualquer comprometimento à saúde do vegetal, nos tempos previamente estabelecidos: 6, 24 e 48 h de supressão de rega e 6 h após a

reidratação. A análise foi feita seguindo metodologia proposta por Barrs e Weatherley (1962), utilizando a fórmula:

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

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 °C para análises bioquímicas.

Tab. 1. Tratamentos empregados de *S. scabra* sob déficit hídrico – Embrapa Semiárido, Petrolina, PE. Abreviações: T – Tratamento; DH – Déficit hídrico por supressão de rega; RI: Reidratação; RB, Réplicas biológicas. Consideradas três plantas por vaso.

TRATAMENTOS		FISIOLOGIA	
		RB	Vasos (Plantas)
T1 (6 h DH) (15:00 h)	Controle	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
	Tratamento	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
T2 (24 h DH) (9:00 h)	Controle	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
	Tratamento	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
T3 (48 h DH) (9:00 h)	Controle	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
	Tratamento	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
T4 (6 h após RI) (15:00 h)	Controle	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
	Tratamento	RB1	03 (09)
		RB2	
		RB3	
TOTAL		24 (72)	

Os valores para as trocas gasosas e fluorescência da clorofila *a* foram obtidos com um analisador de gás por infravermelho (IRGA, LI-COR, modelo LI-6400XT, Lincoln, NE, EUA) com uma câmara de fluorescência (6400-40) acoplada com uma área de 2 cm² e um fluxo de gás de 300 mmol.s⁻¹. Para avaliar a variável fluorescência da clorofila *a*, a emissão de fluorescência a um estado de equilíbrio (Ft) e a emissão máxima de fluorescência (Fm') foram determinados para folhas adaptadas a luz submetidas à fotossíntese estável. As medidas foram

realizadas em folhas maduras e não-senescentes do trifolíolo de *S. scabra* sob fluxo de fótons fotossintético (FFF) constante de $1200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Foram obtidos valores de assimilação líquida de CO_2 (A), condutância estomática (g_s), eficiência do uso da água foi calculada pela razão da assimilação líquida de CO_2 e taxa de transpiração (E) ($\text{EUA}=A/E$). Por meio da fluorescência da clorofila *a* foi calculado segundo Baker (2008), o *quenching* fotoquímico (qP) e a taxa de transporte de elétrons [$\text{ETR} = (\Delta F - F_m') \times \text{DFFF} \times 0,5 \times 0,84$]. Para calcular a ETR, 0,5 foi usado como a fração de energia de excitação distribuído para PSII e 0,84 foi usado como a fração de luz incidente absorvida pelas folhas.

2.3.2. Análise Bioquímica

Folhas maduras e sadias e raízes foram coletadas para as análises bioquímicas. Os tecidos foram congelados em nitrogênio líquido e armazenadas em ultrafreezer -80°C . Foram quantificados os carboidratos solúveis totais (CST) (Dubois et al., 1956), aminoácidos livres totais (ALT) (Moore e Stein, 1948), proteínas solúveis totais (PST) (Bradford, 1976) prolina (Bates et al., 1973), clorofila *a* (Chl *a*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides (Lichtenthaler e Buschmann, 2001). Todas as quantificações foram determinadas com espectrofotômetro (Thermo Scientific/Modelo Genesys 10S UVVIS) de duplo feixe ajustado ao comprimento de onda específico para cada composto orgânico.

2.4. Extração de RNA total, qRT-PCR e sequenciamento de RNA

Para o sequenciamento do RNA-Seq e RT-qPCR, o RNA total foi extraído de raízes de *S. scabra* nos tratamentos 6 h e 24 h de déficit hídrico, seguindo protocolo descrito por Zhao e colaboradores (2012) com modificações. A síntese do cDNA foi feita por meio do kit *Improm-IITM Reverse Transcription Systems* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os tratamentos 6 e 24 h foram submetidos a sequenciamento pela tecnologia de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500), *paired end*, contemplando três réplicas biológicas, com posterior montagem das sequências para obtenção do transcriptoma da espécie (banco privado gerado pelo grupo do LGBV/UFPE; dados não publicados) via ferramenta Trinity (Grabherr et al., 2011), seguindo o protocolo de Haas et al. (2013). Os *primers* foram desenhados utilizando o programa Primer3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), considerando as condições padronizadas estabelecidas pelo programa, exceto: tamanho do

amplicon (100 – 150 pb), temperatura de *Melting* (58 ° - 62 °C), conteúdo GC (40 – 60%), *Max Poly-X* (3) e *Max self complementarity* (5).

2.5. Enriquecimento ontologia gênica (GO), mapeamento MapMan e clusterização hierárquica

Os DEGs (Genes Diferencialmente Expressos) foram submetidos à análise de caracterização de processos biológicos e funções moleculares no GO (*Gene Ontology*; Ontologia Gênica) (<http://www.geneontology.org/>). Para enriquecimento dos termos GO foi utilizada a ferramenta online AgriGO (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2>), utilizando a espécie *Arachis ipaensis* como referência, considerando-se a proximidade filogenética e por dispor de genoma sequenciado. A análise estatística foi realizada utilizando o método de Fisher, considerando valores significativos os que apresentaram *p-value* < 0,05.

O programa MapMan 3.6.0RC1 (<https://mapman.gabipd.org/mapman>) foi aplicado para categorização dos DEGs identificados em *S. scabra*, mapeados contra as vias de *Medicago truncatula* (Riaño-Pachón et al. 2009). Os genes *UP-* e *Down-regulated* estão indicados em vermelho e azul, respectivamente. Para a clusterização hierárquica, foi utilizado o programa Cluster 3.0, construindo um *heatmap* (visualização no TreeView) para os transcritos selecionados para validação por RT-qPCR.

2.6. Análises estatísticas

A análise estatística dos dados fisiológicos e bioquímicos foi realizada utilizando-se o software STATISTICA 8.0 (StatSoft. Inc., Tulsa, OK 74104, USA). Os dados foram analisados quanto à distribuição normal, através do Teste de normalidade Shapiro-Wilk (W) e homogeneidade (Teste de Levene). Para as variáveis que apresentaram dados paramétricos, foi realizado o Teste t (*p* < 0,05). Para a variável CHR_{foliar} (24 h), que não apresentou distribuição normal e nem homogeneidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney (*p* < 0,05). Antes da análise estatística, os dados referentes ao CHR_{foliar} (porcentagem) foram transformados utilizando a fórmula $ASEN(RAIZ(X/100))$.

3. Resultados

3.1. Balanço hídrico foliar

O conteúdo hídrico foliar apresentou uma redução conforme o aumento da severidade do regime hídrico. Observou-se reduções significativas no $\text{CHR}_{\text{foliar}}$ de *S. scabra* nos três tempos submetidos à suspensão da irrigação. Após 6 h de déficit hídrico verificou-se um declínio de 12% em relação às plantas controle, seguido por redução de 34% e 45% após 24 h e 48 h da suspensão de rega, respectivamente. Após 6 h do período de reidratação, os valores referentes ao $\text{CHR}_{\text{foliar}}$ da planta sob déficit hídrico apresentaram recuperação total (100%) (Tab.2.).

Tab. 2. Conteúdo hídrico relativo da folha ($\text{CHR}_{\text{foliar}}$) de *S. scabra* submetido ao déficit hídrico ($n=3\pm\text{D.P.}$). A análise foi realizada comparando os dois grupos: controle (irrigado) *versus* déficit hídrico nos quatro tratamentos aplicados, 6 h, 24 h, 48 h de supressão de rega e 6 h após a reidratação. Valores seguidos por * diferem entre si pelo teste t ($p<0,05$).

Tratamentos	<i>Stylosanthes scabra</i>	
	Irrigado	Déficit hídrico
6 h supressão de rega	81,40 $\pm$ 0,02	71,404 $\pm$ 5,96*
24 h supressão de rega	71,53 $\pm$ 0,10	47,015 $\pm$ 3,17*
48 h supressão de rega	83,68 $\pm$ 2,75	45,695 $\pm$ 5,79*
6 h após reidratação	71,68 $\pm$ 2,31	76,01 $\pm$ 5,73 ^{ns}
$\text{CHR}_{\text{foliar}}$ (%)		

3.2. Trocas gasosas

A deficiência hídrica reduziu significativamente as trocas gasosas em *S. scabra*. Ao analisar a condutância estomática verificou-se diferença significativa em todos os tempos estudados (Fig. 2A). Após 6 h da suspensão de rega observou-se redução de 65% da abertura dos estômatos, seguido de reduções de 79% e 88% após 24 h e 48 h de suspensão de rega, respectivamente. Após a reidratação não houve recuperação da *gs*, mantendo-se reduzido 68% quando comparado ao controle.

Quanto ao déficit hídrico, a assimilação líquida de CO_2 (*A*) também reduziu frente ao aumento do tempo de supressão de rega, indicando estar relacionada à diminuição de água no

solo. Pôde-se observar que para essa condição de estresse houve reduções de 30%, 73% e 91%, após 6, 24 e 48 h, respectivamente, quando comparado ao controle (Fig. 2B). Subsequentemente, 6 h após a reidratação a planta recuperou a A indicando uma alta capacidade da espécie *S. scabra* em retornar à eficiência de sua taxa de A mediante um curto período de reposição de água no solo.

A eficiência do uso de água de *S. scabra* apresentou significância estatística apenas 48 h após a suspensão de rega, mostrando uma redução de 48% (Fig. 2C). Após a reidratação a eficiência do uso da água foi recuperada demonstrando não haver uma divergência significativa quando equiparada ao controle, sendo observado valores altos tanto para as plantas irrigadas quanto não irrigadas, respectivamente.

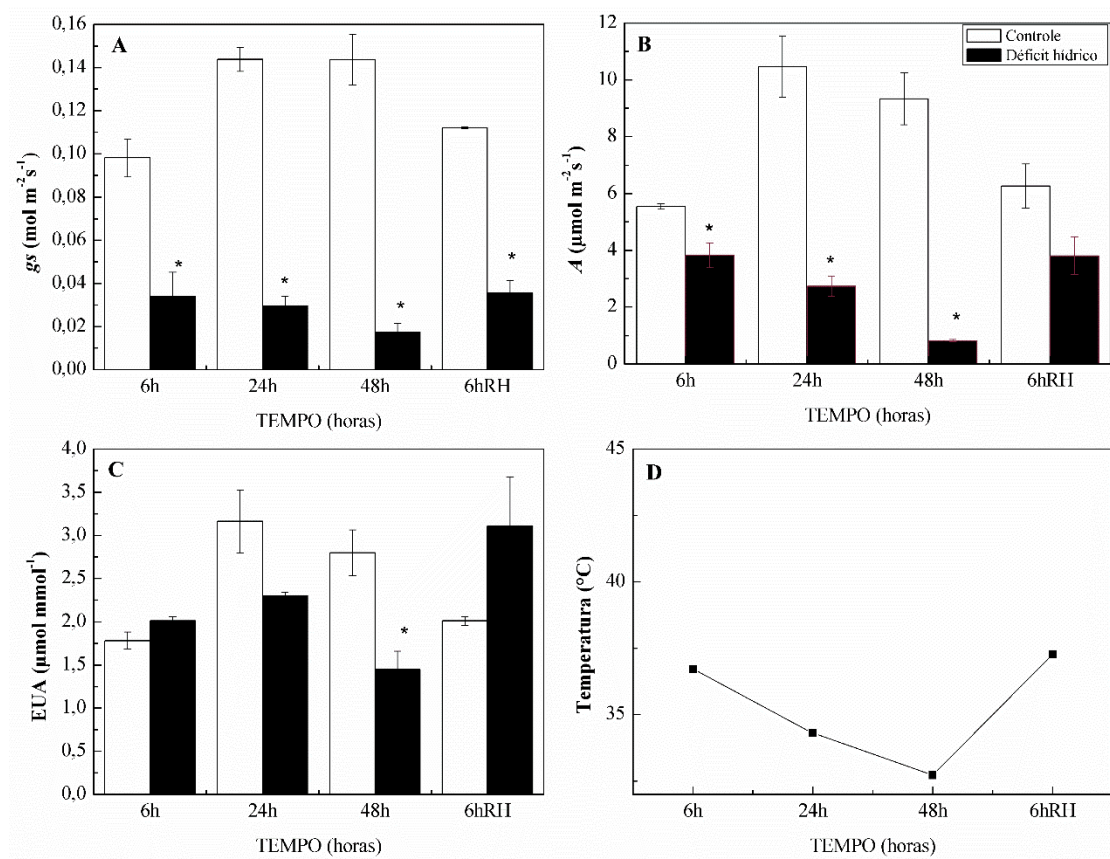


Fig. 2. Trocas gasosas em *S. scabra* (Ss) sob déficit hídrico. (A) Condutância estomática (g_s), (B) Assimilação líquida de CO₂ (A), (C) Eficiência do uso da água (EUA) e (D) Temperatura (°C). Barras brancas correspondem às condições de controle (irrigado) e as barras pretas equivalem às condições de déficit hídrico. Asteriscos (*) correspondem aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) pelo teste t quando comparados o controle vs tratado para cada um dos tempos estudados.

3.3. Fluorescência da clorofila *a*

Comparando-se as plantas sob déficit hídrico com as irrigadas, constataram-se alterações significativas nos parâmetros fotoquímicos conforme imposição do déficit hídrico. Ao analisar a ETR, observaram-se reduções de acordo com a severidade do regime hídrico em *S. scabra*. Essas reduções foram significativas após 24 e 48 h de suspensão de rega, sendo identificado um percentual de 15% e 23%, respectivamente. Os valores observados quanto ao qP em *S. scabra* apontaram redução significativa após 24 h de suspensão de rega, em comparação ao início das avaliações.

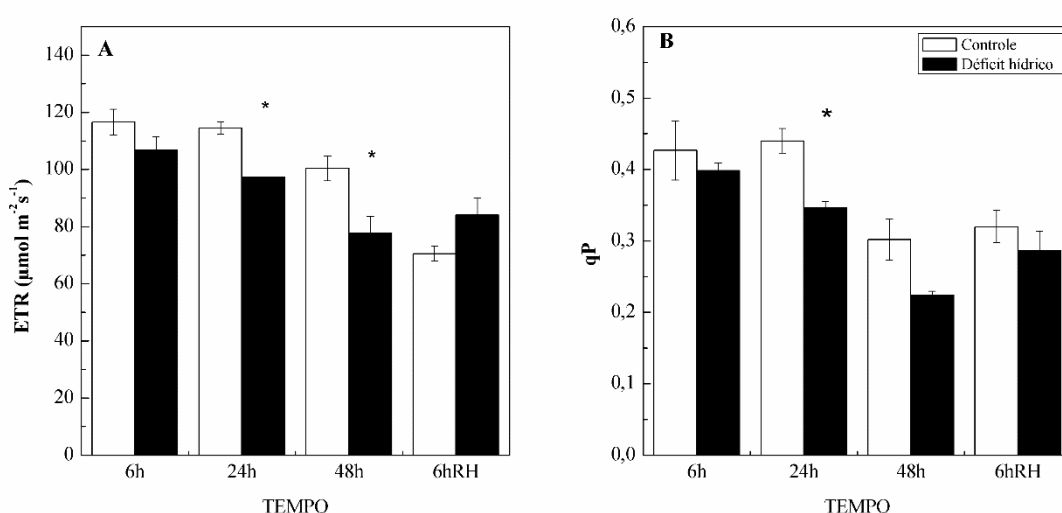


Fig. 3. Fluorescência em *S. scabra* (Ss) sob déficit hídrico. (A) Taxa de Transporte de Elétrons (ETR), (B) quenching Fotoquímico (qP). Barras brancas correspondem às condições de controle (irrigado) e as barras pretas equivalem às condições de déficit hídrico. Asteriscos (*) correspondem aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) pelo teste *t* quando comparados o controle vs tratado para cada um dos tempos estudados.

3.4. Análises Bioquímicas

Foi possível observar as alterações apresentadas no sistema bioquímico de *S. scabra*. Após 6 h de suspensão de rega verificou-se que as folhas sob déficit hídrico tiveram reduções significativas de 41% nos CST e ALT (Fig. 4). Após 24 e 48 h de déficit hídrico houve aumento de 77% em prolina, e redução 57% nas PST em folhas de *S. scabra* (Fig. 5). Nas raízes, após 24 h de suspensão de rega, houve aumentos de 735% nos CST, 273% nos ALT, 31% na prolina e 158% nas PST. Os ALT e a prolina mantiveram seus conteúdos aumentados significativamente após 48 h de déficit hídrico nas raízes de *S. scabra*.

Após 6 h de reidratação, os CST reduziram 51% nas folhas de *S. scabra*. Em contraste, nas raízes de *S. scabra* apresentaram aumento em CST e ALT de 206 e 266% após 6 h de

reidratação, respectivamente. Adicionalmente, foi observada uma redução na prolina de 31% nas raízes após 6 h de reidratação.

Houve alterações em todos os solutos orgânicos após 24 h de estresse por déficit hídrico. Entretanto, após reidratação, o acúmulo de CST e ALT foi menor no tratamento, comparado ao período de déficit hídrico e a prolina reduziu comparativamente ao controle.

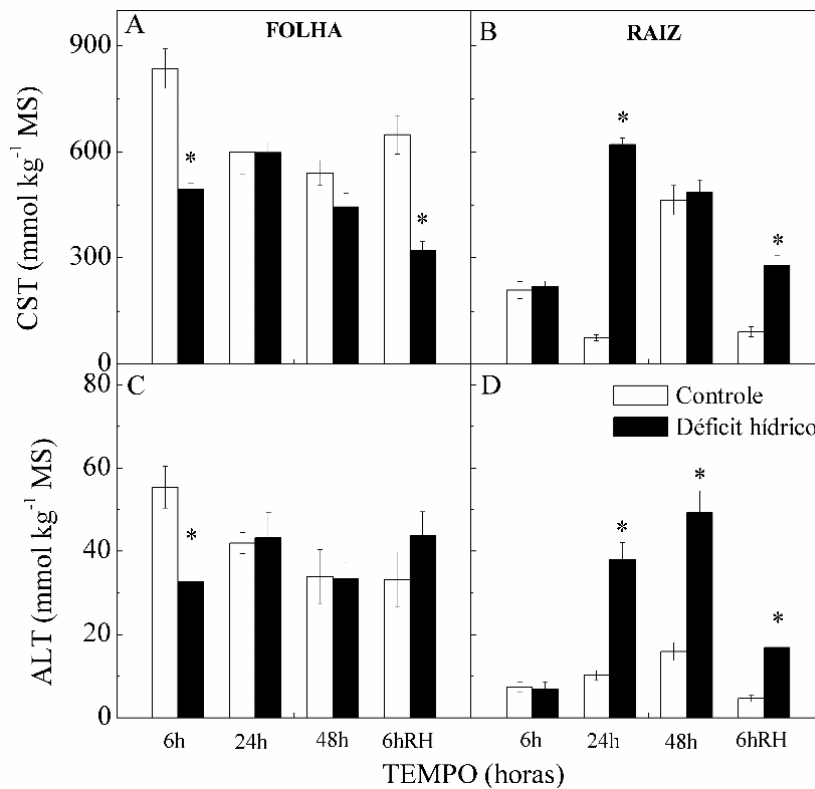


Fig. 4. Análises bioquímicas em folhas e raízes de *S. scabra* após 6, 24 e 48 horas de déficit hídrico (suspensão de rega) e 6 h após a reidratação. (A-B) Carboidratos Solúveis Totais – CST; (C-D) Aminoácidos Livres Totais – ALT. Barras brancas correspondem às condições de déficit hídrico e as barras pretas equivalem às condições de controle (irrigado). Asteriscos (*) correspondem aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados o controle vs déficit hídrico para cada um dos tempos estudados.

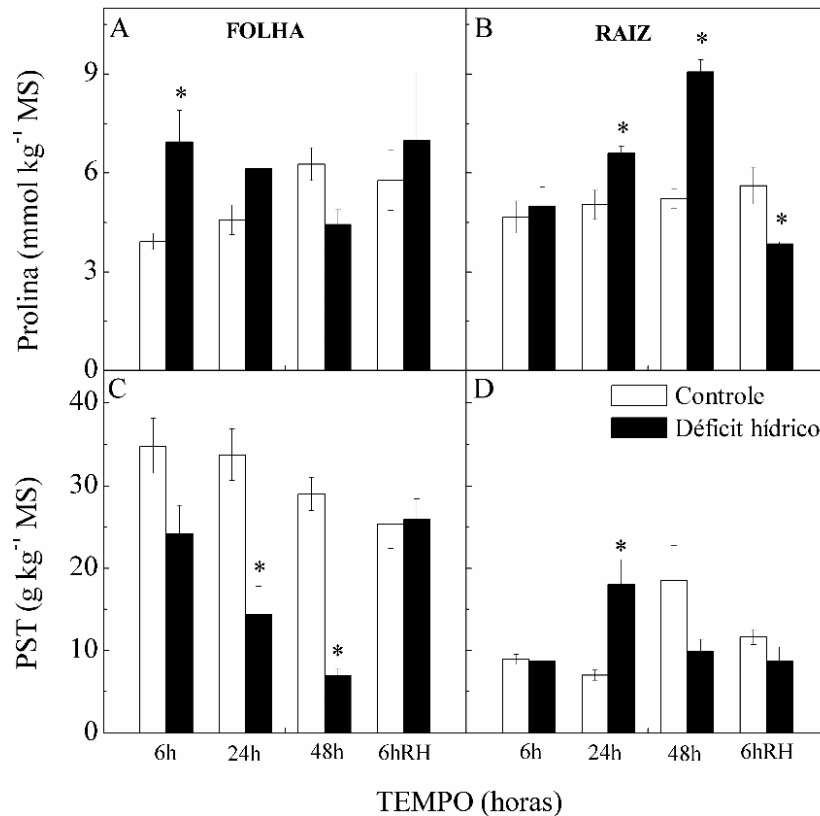


Fig. 5. Análises bioquímicas em folhas e raízes de *S. scabra* após 6, 24 e 48 horas de déficit hídrico (suspensão de rega) e 6 h após a reidratação. (A-B) Prolina, (C-D) Proteínas Solúveis Totais – PST. Barras brancas correspondem às condições de déficit hídrico e as barras pretas equivalem às condições de controle (irrigado). Asteriscos (*) correspondem aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados o controle vs déficit hídrico para cada um dos tempos estudados.

Quanto à clorofila *a* e *b* não houve diferença significativa ao longo do experimento. Entretanto, houve redução de 51% após 6 h de suspensão de rega nos carotenóides (Fig. 6).

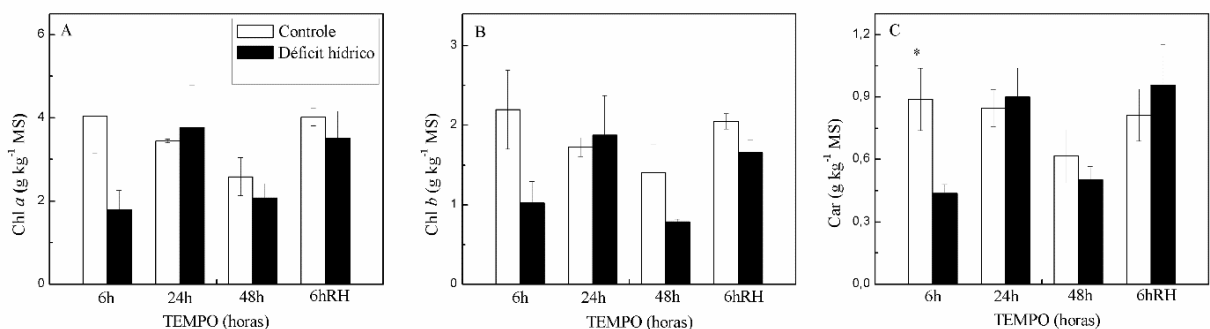


Fig.6. (A) Clorofila *a* (Chl *a*), (B) clorofila *b* (Chl *b*) e (C) carotenóides (Car) em folhas e raízes de plantas jovens de *S. scabra* submetidas ao déficit hídrico. Barras brancas correspondem às condições de déficit hídrico e as barras pretas equivalem às condições de controle (irrigado). Asteriscos (*) correspondem aos valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) quando comparados o controle vs tratado para cada um dos tempos estudados.

3.5. Identificação de genes DE em *S. scabra* sob déficit hídrico

Foram detectados 17.449 genes diferencialmente expressos (DEGs) ($\log_2FC > 1$; $p\text{-value} < 0,05$) entre os tratamentos 6 h e 24 h, incluindo 9.660 e 7.786 genes regulados positivamente e negativamente, respectivamente. Em seguida, verificou-se os DEGs por tratamento, 6 h e 24 h de supressão de rega. Entre os genes regulados positivamente, 146 DEGs foram detectados em ambos tratamentos de déficit hídrico (Fig.7). Em contraste, um número maior de DEGs (236) em comum, com regulação negativa, foi identificado ao comparar os dois tratamentos (Fig. 7). O quantitativo mais representativo foi detectado para genes que tiveram sua expressão induzida no tratamento 24 h de supressão de rega (7.683 UR), sendo essa indução gênica possivelmente uma resposta ao déficit hídrico imposto nas plantas de *S. scabra*.

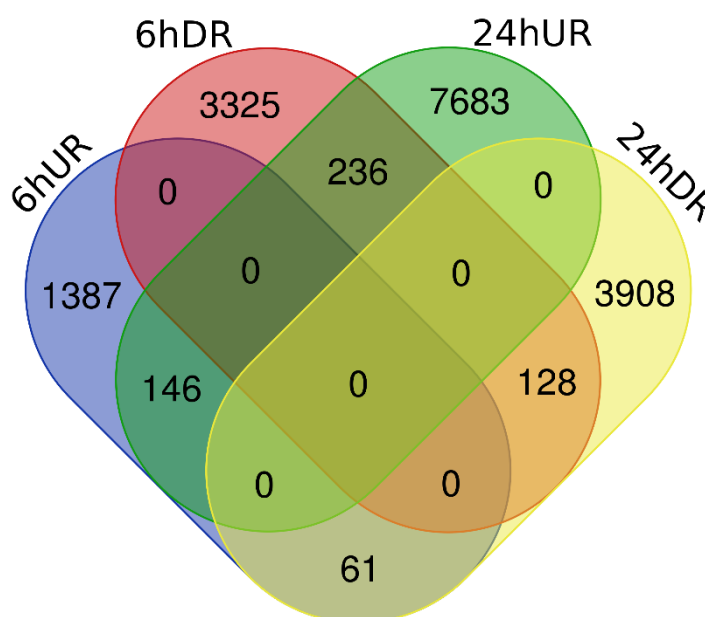


Fig. 7: Perfil global de expressão gênica e identificação de DEGs (genes diferencialmente expressos – $\log_2FC > 1$; $p\text{-value} < 0,05$) em resposta aos tratamentos. Diagrama de Venn ilustra a sobreposição entre os DEGs identificados após 6 h e 24 h de supressão de rega em *S. scabra*. UR – Regulação positiva; DR – Regulação negativa.

3.6. Enriquecimento de Ontologia Gênica (GO) dos DEGs

A análise de enriquecimento de termos GO (Ontologia Gênica) realizada para o tratamento 6 h de supressão de rega, mostrou que 80 termos foram enriquecidos num conjunto de transcritos cuja regulação foi induzida ($FDR \leq 0,05$) e 146 termos GO foram

significativamente enriquecidos ($FDR \leq 0,05$), mediante um conjunto de transcritos que apresentou regulação positiva (dados não mostrados). A respeito do primeiro conjunto, foi observado diversos processos biológicos, entre eles, o processo de transcrição de ácido nucleicos (GO:0097659), regulação da expressão gênica (GO:0010468), catabolismo (GO:0016052) e metabolismo (GO:0005975) de carboidratos, processo de biossíntese de macromoléculas (GO:0009059), processo de oxidação-redução (GO:0055114) e resposta a estímulos de produtos químicos (GO:0042221). Bem como, funções moleculares associadas a atividades hidrolases (GO:0004553), catalases (GO:0003824), oxidoredutases (GO:0016705), de inibidores de endopeptidases (GO:0004866) e antioxidante (GO:0016209).

Termos GO enriquecidos, a partir de um grupo de transcritos reprimidos, demonstraram processos biológicos associados a biossíntese de macromoléculas (GO:0009059), oxidação-redução (GO:0055114), transporte transmembrana (GO:0055085), metabolismo do carboidrato (GO:0005975), processo de biossíntese de monossacarídeos (GO:0046364), transporte de prótons acoplados à síntese de ATP (GO:0015986), processo homeostático (GO:0042592). Enriquecimentos também foram observados em para os termos GO relacionados ao estresse oxidativo, como processo metabólico de espécies reativas de oxigênio – ROS (GO:0072593), processo metabólico superóxido (GO:0006801) e atividade antioxidante (GO:0016209).

Funções moleculares identificadas, mostraram atividades oxidoredutase (GO:0016491), hidrolase – O-glicosil (GO:0004553), catalase (GO:0003824), atividade reguladora da endopeptidase (GO:0061135), antioxidante (GO:0016209) e transferase (GO:0016758). Termos associados atividade da citocromo-c oxidase (GO:0004129) e atividade de transferência de elétrons (GO:0009055) também foram detectados.

Para o tratamento 24 h de supressão de rega, também foram identificados termos GO enriquecidos, partindo de um conjunto de transcritos induzidos, relacionados a processos biológicos associados aos ácidos nucleicos (GO:0006351; GO:0097659; GO:0032774), regulação gênica (GO:0010468), regulação do processo metabólico de macromoléculas (GO:0060255). Diferentemente do observado no tratamento 6 h, processos biológicos relacionados ao estresse oxidativo, como processo metabólico de espécies reativas de oxigênio – ROS (GO:0072593) e processo metabólico superóxido (GO:0006801), foram enriquecidos a partir de transcritos com expressão induzida, o que pode indicar um mecanismo de defesa frente ao déficit hídrico. Termos GO associados a recombinação de DNA (GO:0006310) também foram enriquecidos, indicando uma resposta ao estresse aplicado por meio de rearranjo de genes.

Ao contrário do observado no tratamento 6 h de supressão de rega, no tratamento 24 h funções moleculares associadas a atividade da citocromo-c oxidase (GO:0004129) foram observadas em transcritos que apresentaram expressão induzida. Atividades, tais como hidrolases (GO:0004553), oxidoredutases (GO:0016709) e antioxidante (GO:0016209), também foram identificadas.

Considerando o grupo de transcritos reprimidos no tratamento 24 h, vários termos GO foram enriquecidos associados a processos biológicos ao transporte transmembrana (GO:0055085) metabolismo de carboidratos (GO:0005976; GO:0005975; GO:0044262). Também foram observados termos enriquecidos associados a resposta a estresse biótico (GO:0009607) e resposta a estímulos oxidativo (GO:0006979). Também foram identificadas funções moleculares relacionadas a atividades de ATPase (GO:0042626), catalase (GO:0003824) e oxidoredutase (GO:0016491). Ao comparar os tratamentos 6 h e 24 h pode-se perceber uma relação de termos GO enriquecidos para o metabolismo de carboidratos e atividade antioxidante. Respostas associadas ao estresse aplicado foram identificadas logo após 6 h de supressão de rega.

3.7. Expressão diferencial de genes associados aos processos metabólicos de MapMan

De forma global, os resultados do mapeamento da via MapMan estavam de acordo com a análise de enriquecimento do GO. Vários DEGs envolvidos nas vias metabólicas dos açúcares, aminoácidos, transdução de sinal, sinalização hormonal, transporte transmembrana, tais como as aquaporinas, transporte de potássio e cálcio, ATPases, entre outras. A modulação gênica nessas vias metabólicas mapeadas foi mais representativa após 24 h de déficit hídrico (Fig. 8).

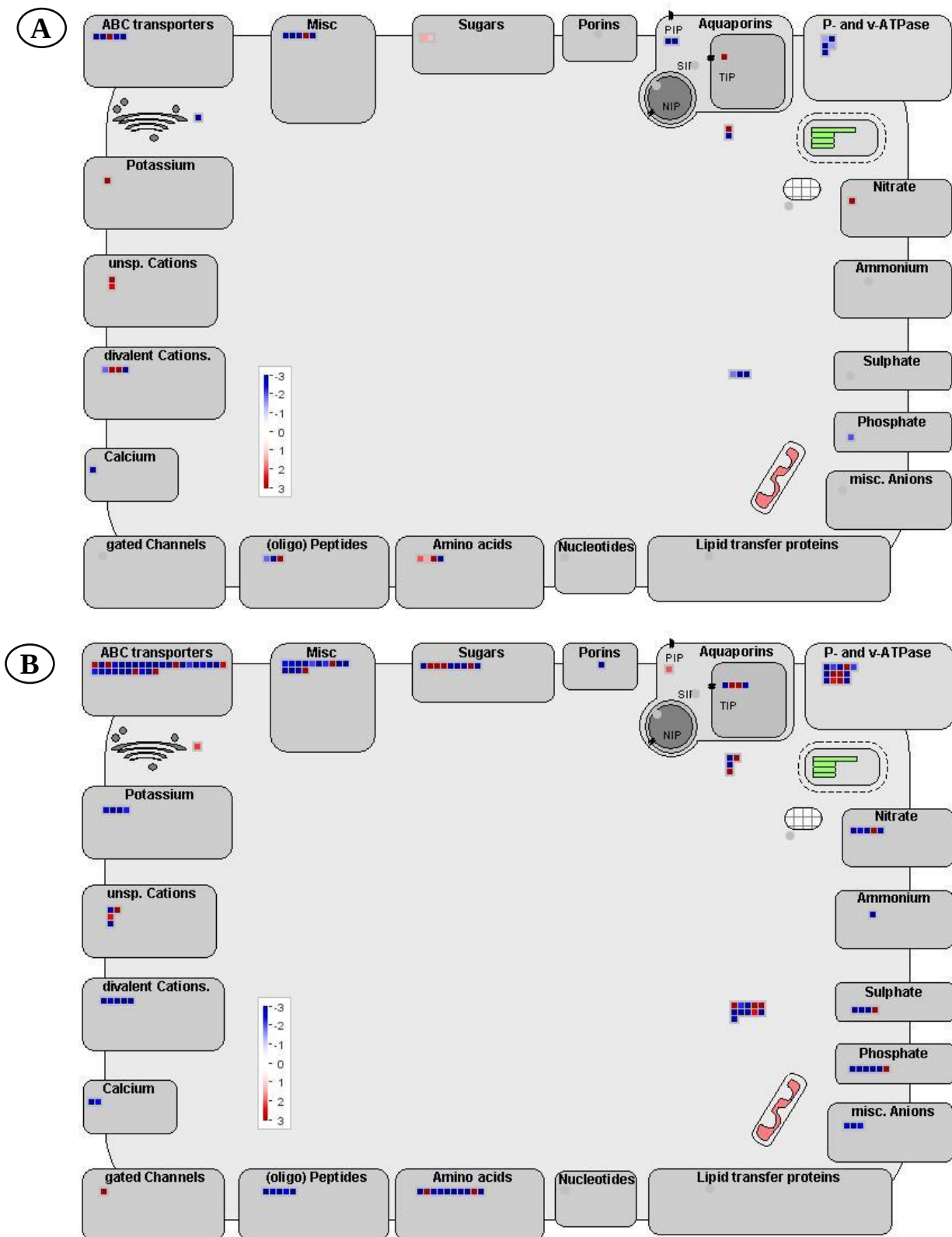


Fig. 8: Transcritos diferencialmente expressos de *S. scabra* envolvidos em diferentes processos metabólicos sob estresse hídrico, mapeados no genoma de *Medicago truncatula* via MapMan. **A.** DEGs no tratamento 6 h sob déficit hídrico. **B.** DEGs no tratamento 24 h sob déficit hídrico.

Ao analisar a via de estresse abiótico nos tratamentos 6 h (Fig 9.A) e 24 h (Fig 9.B), vários genes foram modulados, tanto positivamente quanto negativamente, sendo esses genes associados aos estresses térmicos, seca, salinidade, entre outros. Quanto a via redox, genes foram regulados associados a peroxidases, catalases, glutathione, entre outros. Além disso, foi possível também identificar genes modulados na via de estresse biótico, o que pode indicar uma resposta de *crosstalk*, nos tratamentos 6 h e 24 h (Fig. 9).

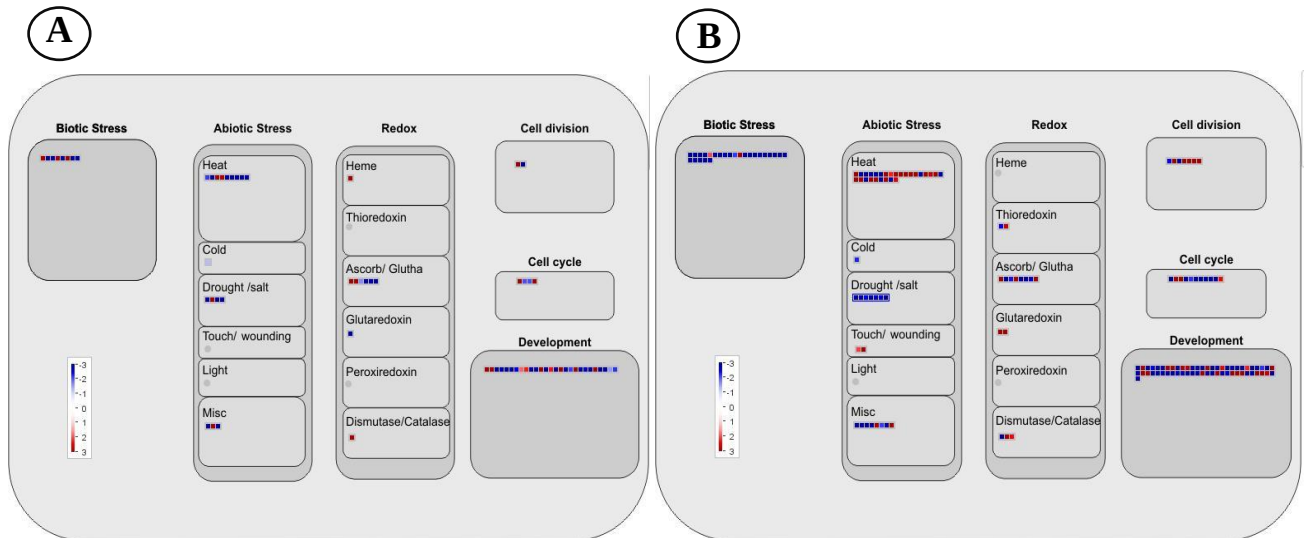


Fig. 9: Genes diferencialmente expressos, mapeados nas vias metabólicas de estresses. A. Vias metabólicas no tratamento 6 h de supressão de rega. B. Vias metabólicas no tratamento 24 h de supressão de rega.

3.8. Análise de genes diferencialmente expressos

Com base na regulação gênica positiva e no enriquecimento de termos GO, 25 pares de *primers* foram desenhados frente a genes responsivos ao déficit hídrico, a partir de análises *in silico* dos DEGs. O *heatmap* (Fig. 10) representa os valores de indução (vermelho) e repressão (azul) da expressão dos transcritos selecionados (Tab. 3), seguido de suas respectivas anotações. Dentre dos DEGs escolhidos, observam-se respostas associadas aos transportes de açúcar, água, íons, moléculas envolvidas na respiração celular e fotossíntese, a saber: citocromo, fosfoenolpiruvato carboxiquinase (ATP) e carreadores de elétrons (NADP e FAD), além de enzimas envolvidas na resposta antioxidante e proteínas relacionadas à patogenicidade (com receptor do ácido abscísico PYL4).

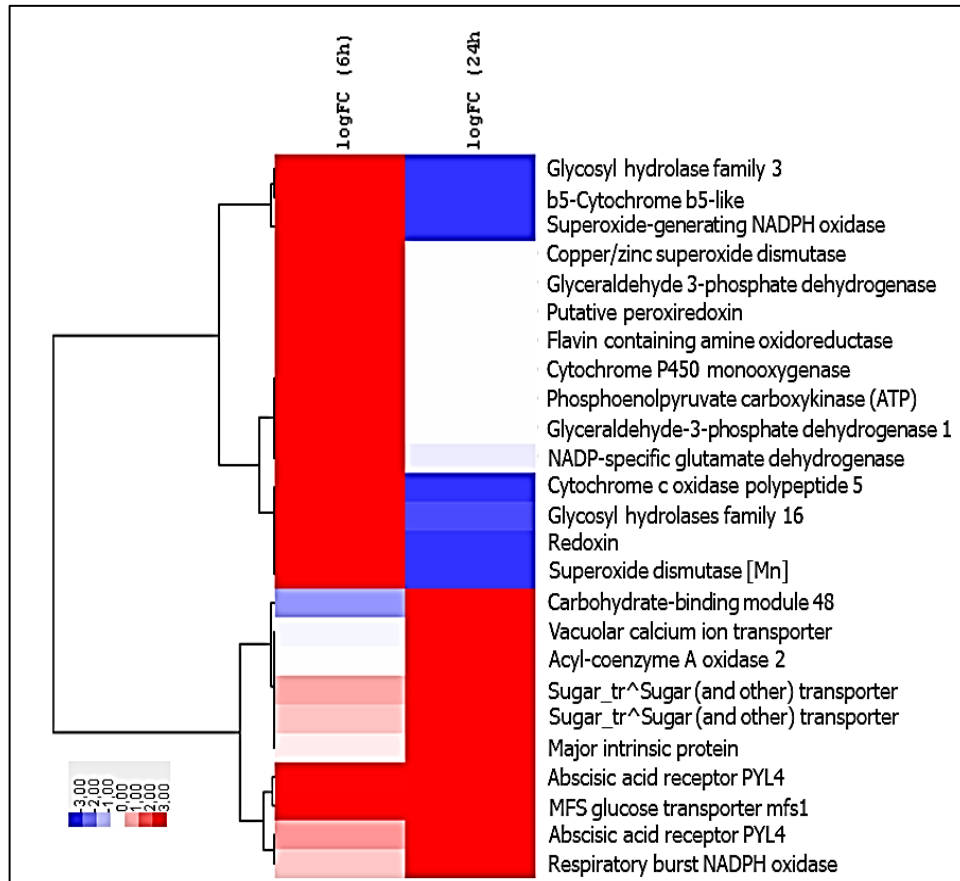


Fig. 10. Heatmap construído com os transcritos diferencialmente expressos ($p\text{-value} < 0,05$) que apresentaram enriquecimento dos termos GO, selecionados para o desenho de *primers* de *S. scabra* (baseando-se no log₂FC, *fold change*) sob condições de déficit hídrico. Os valores em vermelho e azul indicam aumento e diminuição da expressão na raiz, respectivamente, conforme escala na base à esquerda; seguidos de suas anotações funcionais.

Tab. 3: *Primers* desenhados para genes diferencialmente expressos identificados no transcriptoma de *S. scabra*, sob déficit hídrico.

Transcrito (ID <i>S. scabra</i>)	Nome	Primer F	Primer R
TRINITY_DN110533_c0_g2_i1	Primer 1	TCAGGGACACTTGCTCTGTCT	CCAGCTTTACCTCGAATACCC
TRINITY_DN124501_c1_g1_i5	Primer 2	GCAAGTAAATCCCTGGGTAGC	ATCTTTGGTGCCTTTGCCTAT
TRINITY_DN110430_c0_g1_i1	Primer 3	GCAGAACAGCAAACAAAGGAG	GATCATCCCTATGCCTTCACA
TRINITY_DN109582_c0_g1_i2	Primer 4	TACACGAGGTTGGTCGAAGAC	ATGCTATGACACCTGGGACAG
TRINITY_DN127823_c0_g1_i5	Primer 5	AGATAGTTGACGTTGCCGTTG	TTGCACCAAAGACACTCTCCT
TRINITY_DN65635_c0_g1_i1	Primer 6	TCCCACCCAATCTTCCTTATC	TATGGGTTGACTTTGGGACAG
TRINITY_DN111076_c0_g2_i4	Primer 7	AGTGCGAGAAGACCAACAGTG	CTGCCTACTATGTCGCCTTTG
TRINITY_DN130484_c1_g4_i4	Primer 8	TGTAACCCACGATTCTTTTCA	TTCCAACCTCGAATGTTTCTG
TRINITY_DN107917_c0_g1_i4	Primer 9	GCAAAGACGACAACCTTCTTG	CACCTTCGGCACTGTTCTTTA
TRINITY_DN61576_c0_g1_i1	Primer 10	TGGTTAAGCGCAATAGACGTT	ATCCGAGAACGGAGACAAAGT
TRINITY_DN103878_c0_g1_i1	Primer 11	GGTCTTCACCAGACGAAATGA	CTCCGACAGTGGATGCTAAAG
TRINITY_DN129086_c1_g5_i1	Primer 12	GGGTTGTTCTTCAAATGCGTA	GAGGACATCAAGTGGGATGAA
TRINITY_DN127931_c0_g1_i1	Primer 13	GCCAAAGTTCGAGGACCTTTAG	ACCGGCTACGGTCTCATCTAT
TRINITY_DN111583_c0_g2_i2	Primer 14	GGCATAGGTATCGGTCAAGAA	AAATCCAAGGGCGTAGATGTC
TRINITY_DN116293_c0_g1_i2	Primer 15	ACCAAAGGTGAAGACGAGGAT	AGAATCAAAGCCACAGGAAT
TRINITY_DN118539_c5_g1_i1	Primer 16	CTGTTGGGTGTGGTAATGAT	AGTTTACTACGGCCTCCCTTG
TRINITY_DN132070_c2_g1_i6	Primer 17	CGCGAGAGATTGAAGGTTACA	TGAAGTGACGGTGGTTGTAGA
TRINITY_DN108759_c0_g1_i1	Primer 18	AAACGTCCTTGAAGTCCACCT	CTCAACGTCGCCTTTACTGTC
TRINITY_DN131824_c0_g1_i3	Primer 19	CATGCCATACACCTCCAGTCT	CGCCATTTACTCTCTCAATGC
TRINITY_DN121890_c0_g1_i2	Primer 20	GTGTTGCCGTGTATTCGCTAT	TAGCATCAGAAAGGCAATGCT
TRINITY_DN130903_c0_g1_i5	Primer 21	TGTTGATGCAGTTTCGTATCG	AATCTTACGTGGTGGATGTGC
TRINITY_DN123951_c0_g1_i3	Primer 22	TCTTACTCCGAAGCCAAGTGA	CTTCCACGTCATGGGATACTG
TRINITY_DN130825_c0_g1_i2	Primer 23	CGTTCTTGAGGATCTCCACTG	TTTCTGTCGGGATACATGAGG
TRINITY_DN120684_c0_g2_i2	Primer 24	AAAGTTGTTCCACCGTTGTTGG	TGCCTACGATCTCTTCTGCAT
TRINITY_DN119865_c0_g3_i1	Primer 25	AGATGTTAGCACCAACGGAAA	CTTTGTCTTTGCTGGTGAAGG

Essas análises foram realizadas objetivando, posteriormente, a validação desses genes diferencialmente expressos (via RNA-Seq), por meio da técnica padrão-ouro para análise de expressão gênica, a PCR em tempo real (RTqPCR).

4. Discussão

A restrição hídrica provoca alterações bioquímicas, fisiológicas e moleculares nos vegetais cuja irreversibilidade depende do genótipo, da duração, severidade do estresse e do número de eventos, bem como do estágio de desenvolvimento da planta. Genes diferencialmente expressos foram identificados sob déficit hídrico no transcriptoma de *S. scabra* por meio da técnica de RNA-Seq, a qual tem sido frequentemente utilizada com sucesso na identificação de genes induzidos por estresse hídrico em sorgo (*Sorghum bicolor*) (Fracasso et al., 2016), grão-de-bico (*Cicer arietinum*) (Mashaki et al., 2018) e em milho (*Zea mays*) (Zhang et al., 2018), entre outras espécies vegetais. Zhang et al. (2018) relataram uma maior abundância de transcritos reprimidos do que induzidos, sob condições de seca, indicando que o

déficit hídrico tende a inibir a expressão gênica globalmente, no presente estudo foi observado o inverso, onde DEGs induzidos (9.660 DEGs) foram mais representativos do que os genes reprimidos (7.786 DEGs) em *S. scabra*, indicando que a indução de genes globais está associado à resposta ao déficit hídrico na espécie estudada.

De acordo com Lawlor e Cornic (2002) quando plantas com metabolismo C3 apresentam um CHR_{foliar} abaixo de 50%, essa condição passa a ser um estado letal de água. Em contrapartida, um efeito significativo foi observado nas relações folha-água, visto que as plantas de *S. scabra* atingiram CHR de 45%. Entretanto, quando submetidas à condição de reidratação, as plantas de *S. scabra* recuperaram a turgescência celular em um curto período de tempo (6 h), indicando alta condutividade hidráulica e tolerância à baixa disponibilidade de água, corroborando com trabalhos descritos na literatura para outra espécie C3 (Frosi et al., 2013; Rivas et al., 2017). Esse poder de resiliência pode estar associado a genes que codificam proteínas facilitadoras de transporte de água, como é o caso da aquaporinas, visto que vários DEGs foram mapeados nessa via, frente a restrição hídrica, tendo a sua expressão induzida frente ao déficit hídrico, confirmando resultados observados por Araújo et al. (Capítulo IV da tese), via RT-qPCR na raiz de *S. scabra*.

Análises prévias realizadas com o transcriptoma de espécies silvestres de *Arachis*, considerado o gênero filogeneticamente mais próximo de *Stylosanthes*, por Azevedo Neto et al. (2010). Os autores avaliaram plantas das espécies silvestres *A. duranensis*, *A. ipaensis*, *A. stenosperma* e da espécie cultivada, *A. hypogaea*, submetidas a 20 dias de suspensão da rega. Conforme esperado, foram verificadas diferenças significativas entre os valores obtidos de CHR_{foliar} para plantas controle e tratamento, sendo feita uma ressalva na redução mais acentuada para a espécie cultivada *A. hypogaea*.

A deficiência hídrica reduziu significativamente as trocas gasosas em *S. scabra*, ocorrendo uma redução na condutância estomática no início (6 h) do experimento, o que demonstra uma resposta rápida ao déficit hídrico a fim de minimizar a perda d'água por transpiração. O mecanismo de retomar rapidamente as taxas de A com apenas 6 h após reidratação em contrapartida à manutenção de g_s ainda com nível baixo, representa uma estratégia para aumentar a EUA, proporcionando o seu crescimento com o mínimo de perda da água por transpiração. De acordo com Galle et al. (2011) essa rápida recuperação de A acompanhada de valores baixos de g_s pode ocorrer devido à manutenção da condutância mesofílica, considerando-se que o mesófilo pode apresentar resistência menor à difusão do CO_2 , sendo o estômato o principal fator limitante para a fotossíntese.

A EUA está associada à produção de biomassa (importante para a produção comercial) pela quantidade de água aplicada ou evapotranspirada nas plantas. Sousa et al. (2000) observaram que as eficiências máximas do uso da água apresentadas pela cultura do melão foram obtidas mediante maior frequência de irrigação, colaborando com o aumento na EUA apresentado na espécie *S. scabra* após a reidratação. A capacidade das plantas de *S. scabra* em aumentar a eficiência do uso da água, em um curto período de tempo após a reidratação, pode indicar mais uma estratégia rápida de resiliência dessas plantas.

Apesar das reduções nas trocas gasosas terem sido observadas a partir de 6 h após a suspensão de rega, qP e ETR, parâmetros relacionados à fotoquímica, só reduziram após 24 h dessa condição. Na medida em que a água se torna limitante, ocorre também a limitação do CO₂ para fixação através da Rubisco em decorrência do fechamento estomático. Consequentemente, há um excesso de energia no aparato fotossintético devido ao baixo consumo de NADPH no ciclo de Calvin.

Diante desse cenário tanto a eficiência quântica quanto a taxa de transporte de elétrons são prejudicadas enquanto o excesso de energia pode proporcionar estresse oxidativo, através da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Sabe-se que o estresse por seca resulta em uma produção massiva de ROS (Munne-Bosch et al., 2001; Jubany-Mari et al., 2010), como verificado no RNA-Seq de *S. scabra*, onde houve enriquecimento na indução da expressão do processo metabólico de espécies reativas de oxigênio – ROS (GO:0072593) e processo metabólico superóxido (GO:0006801), após 24 h de déficit hídrico. É sabido que ROS podem causar danos ao maquinário fotossintético, membranas, clorofila e proteínas, bem como ao DNA e ao RNA (Uzilday et al., 2012). No entanto, a presença de antioxidantes pode evitar a formação de ROS, sequestrá-los ou promover sua degradação, prevenindo a ocorrência de danos às células das plantas (Serkedjieva, 2011). Vários termos GO foram enriquecidos com atividade antioxidante no transcriptoma de *S. scabra* sob déficit hídrico.

Após 24 h de déficit hídrico, foram identificados termos GO enriquecidos associados a resposta a estímulos oxidativo (GO:0006979), onde DEGs tiveram sua expressão gênica reprimida. Tal resultado pode indicar uma estratégia rápida e eficiente de *S. scabra* frente à restrição hídrica, por meio da indução da expressão de enzimas antioxidantes, como SOD (superóxido dismutase) e peroxidases.

Estudos recentes revelaram relação direta da *gs* com a ETR. O fechamento estomático reduz a concentração interna de CO₂ (C_i), a *A* e também o fluxo de elétrons não cíclico (Lemos Filho, 2000; Queiroz et al., 2002; Rivas et al., 2016). A restrição hídrica, além de limitar a assimilação de carbono em diversos pontos, pode interferir na diminuição do ciclo de vida de

leguminosas, especialmente no período reprodutivo, reduzindo o período de alocação de reservas para as estruturas reprodutivas (Maehler et al., 2003). Devido à importância que as leguminosas têm na fixação biológica de nitrogênio, destaca-se a importância da disponibilidade de água no solo, para evitar o comprometimento da produtividade dessas culturas (Kaschuk et al., 2010). Walter et al. (2011) e Rivas et al. (2013) ressaltam que uma planta submetida a condições recorrentes de estresse ambiental tende a apresentar uma resposta maior de tolerância, evento conhecido como *hardening*.

A planta percebe a falta de água através das raízes e em seguida envia sinais à parte aérea para se aclimatar. Nesse sentido, um dos principais mecanismos compreende a síntese de ABA (Ácido abscísico) nas raízes, o qual é transportado via xilema para as folhas, enquanto mensageiros secundários induzem o fechamento estomático (Mahajan e Tuteja, 2005). Foi verificado o enriquecimento de termo associado à resposta ao estímulo biótico (GO:0009607) frente ao déficit hídrico em *S. scabra*. Acredita-se que respostas a estresses bióticos e abióticos compartilham determinados aspectos moléculas e vias de sinalização (Kunkel e Brooks, 2002; O'Donnell et al. 2003; Seo et al., 2008).

Desta forma *S. scabra* apresentou maior concentração dos metabólitos estudados na raiz. Diante da seca, as plantas tendem a aumentar a razão raiz / parte aérea, a fim de diminuir a área transpirante aumentando a biomassa da raiz para captar água do subsolo. Além disso, o aumento de metabólitos nas células radiculares proporciona a redução do potencial hídrico que favorece o transporte de água para dentro da raiz, mantendo a pressão de turgor. Um estudo comparativo entre 14 leguminosas, incluindo *S. scabra*, avaliou o acúmulo de teores de solutos de baixo peso molecular, frente ao estresse hídrico (Ford, 1984). O autor observou um maior acúmulo nas folhas mais jovens e totalmente expandidas, de alguns compostos, entre eles a prolina. A concentração de íons inorgânicos, açúcares e de ácidos orgânicos diminuíram ou permaneceram inalterados na maioria das espécies sob o déficit hídrico. Este estudo sugeriu que acúmulo de alguns compostos pode ser um indicador efetivo de tolerância de leguminosas estudadas aos baixos potenciais hídricos nas folhas (Ford, 1984).

A prolina, presente em alta concentração nas folhas e nas raízes de *S. scabra*, pode atuar como molécula com ação sinalizadora, osmorreguladora, osmoprotetora e sequestradora de ROS, evitando danos celulares. Cultivares tolerantes de *A. hypogaea* ao déficit hídrico apresentaram níveis mais elevados de prolina, em comparação às suscetíveis (Padmavathi e Rao, 2013; de Lima Pereira et al., 2015; Ranganayakulu et al., 2012, 2015). Resultados semelhantes foram relatados por Rivas et al. (2016) em duas cultivares da leguminosa *V. unguiculata*, sendo reportada uma diferença significativa entre o genótipo tolerante e o sensível.

Dentre os solutos quantificados, os carboidratos são elementos-chave, pois podem realizar o papel de sinalizador diante do déficit hídrico, podendo ser armazenados tanto na forma de polissacarídeos com baixa atividade osmótica como o amido, quanto na forma de açúcares altamente solúveis e higroscópicos como a sacarose e hexoses (Buckeridge et al., 2000; Whittaker et al., 2007). No tecido foliar, essa recuperação ficou evidenciada pelas concentrações de proteínas, com reduções no tratamento déficit hídrico, indicando uma diminuição de sua síntese, sem diferir do controle após a reidratação.

O metabolismo dos carboidratos é um dos processos mais essenciais em planta, com o intuito de absorver a energia gerada durante o processo fotossintético. Seus substratos estão associados aos mecanismos de resposta à seca, além de atuarem como fontes de energia. Junto a isso, a restrição hídrica também induz o acúmulo de diferentes açúcares, incluindo glicose (Hayano-Kanashiro et al., 2009; Zhang et al., 2018). Considerando-se nossos dados de RNA-Seq, vários termos GO relacionados ao metabolismo de carboidratos apresentaram enriquecimento. Essa modulação no transcriptoma de *S. scabra* sob déficit hídrico, pode estar associada a alterações nos teores de carboidratos nos diferentes tecidos, demonstrando o importante papel desses genes na tolerância à seca nas plantas.

A manutenção dos teores de pigmentos fotossintéticos, clorofila *a* e clorofila *b*, pode contribuir para uma recuperação rápida após o período de déficit hídrico, como verificado pela retomada da taxa de assimilação líquida de CO₂, mesmo sob um *gs* reduzido, resultados similares foram relatados por Rivas e colaboradores (2013). Quanto ao pigmento acessório carotenoide, uma redução foi observada após 6 h de déficit hídrico, o que pode comprometer o aparato fotossintético tornando-o desprotegido, principalmente, contra a ação do oxigênio singlete, que é extremamente reativo, podendo danificar muitos componentes celulares, como lipídeos (Taiz e Zeiger, 2009). Porém, após períodos mais longos de regime hídrico, esse pigmento manteve-se inalterado, provavelmente desempenhando um papel essencial na fotoproteção das plantas. A manutenção dos teores de clorofila e carotenoides, sob a condição de déficit hídrico também se destaca uma estratégia de tolerância.

Análises com *A. hypogaea* revelaram que os pigmentos fotossintéticos foram influenciados negativamente em função da disponibilidade hídrica no solo, o que pode indicar uma sensibilidade à baixa disponibilidade de água (Graciano et al., 2016), sendo os efeitos mais proeminentes na cultivar sensível comparativamente à tolerante (Padmavathi e Rao, 2013; Ranganayakulu et al., 2012, 2015).

Por fim, o presente estudo colabora para uma melhor compreensão das respostas de tolerância ao déficit hídrico em *S. scabra*, com base nas análises fisiológicas e transcriptômicas.

A abordagem de enriquecimento de GO (*Gene Ontology*) revelou que os DEGs estavam significativamente associados a vias de sinalização de defesa, como processos de metabolismo de carboidratos, redução da oxidação, atividade oxidoredutase, transporte transmembrana e transdução de sinal. Recentemente vários trabalhos vêm confirmando essas associações entre os genes diferencialmente expressos e termos GO enriquecidos, sob condições de déficit hídrico às respostas fisiológicas. Esses estudos almejam compreender os mecanismos envolvidos nas respostas das plantas e auxiliar nos programas de melhoramento genético de plantas (Cramer et al. 2007; Micheletto et al. 2007; Fracasso et al., 2016; Mashaki et al., 2018; Zhang et al., 2018).

5. Conclusões

S. scabra mostrou comportamento de tolerância mediante o regime hídrico, recuperando rapidamente seu CHR_{foliar} após um curto período de reidratação, mesmo com a *gs* reduzida nesse período. Um dos fatores que pode ter ajudado nessa rápida recuperação foi o acúmulo de solutos orgânicos nas raízes (como açúcares e aminoácidos), atuando em um possível ajustamento metabólico para manter o fluxo de água para o interior das raízes. A conexão entre expressão gênica diferencial e resposta fisiológica sob déficit hídrico revelou estratégias, tais como modulação da expressão gênica e aumento de metabólitos, adotadas por *S. scabra* para lidar com ambientes que apresentem baixa disponibilidade de água. Os resultados aqui reportados sugerem após um espaço muito curto de exposição à seca, *S. scabra* altera rapidamente o metabolismo das raízes, para captação de água e possivelmente crescimento, para explorar mais o solo caso a deficiência persista. Junto a isso, pode-se perceber a indução da expressão de genes associados ao sistema de defesa antioxidante e atividade enzimática de açúcares. Além disso, o acúmulo de carotenoides nas folhas, indica fotoproteção da maquinaria fotossintética, enquanto a diminuição de solutos nas folhas e aumento nas raízes sugerem uma translocação desses solutos. Dessa forma, essa leguminosa apresenta-se como uma excelente cultura para programas de melhoramento genético, visando fornecer subsídio para a pecuária, onde os níveis de precipitações são escassos.

6. Referências

- Adair, S.T., Meirelles, S.T., Pocius, O., Delitti, W.B.C., Souza, G.M., Gonçalves, A.N., 2010. Desiccation tolerance in *Pleurostima purpurea* (Velloziaceae). *Plant. Growth. Regul.* 62, 193–202.
- Asada, K., 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 50, 601- 639.
- 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. *J Plant Interact.* 5(1), 1-10.
- Baker, N.R., 1993. Light-use efficiency and photoinhibition of photosynthesis in plants under environmental stress. In: Smith JAC, Griffiths H (eds.), *Water deficits plant responses from cell to community*. Bios Scientific Publisher, Oxford. 221-235.
- Barrs, H.D., Weatherley, P.E., 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Crop. Sci.* 15(3), 413-428.
- Bates, L.S., Waldren, R.P., Teare, I.D. 1973. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil.* 39, 205–207.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Broekaert, W.F., Terras, F.R.G., Cammue, B.P.A. 2000. Induced and Preformed Antimicrobial Proteins. In: Slusarenko, A.J., Fraser, R.S.S., van Loon L.C. (eds) *Mechanisms of Resistance to Plant Diseases*. Springer, Dordrecht.
- Buckeridge, M.S., Tiné, M.A.S., Santos, H.P., Lima, D.U., 2000. Polissacarídeos de reserva de parede celular em sementes: estrutura, metabolismo, funções e aspectos ecológicos. *Rev. Bras. Fisiol. Veg.* 12, 137-162.
- Cameron, D.F., Edye, L.A., Chakraborty, S., Manners, J.M., Liu, C.J., Date, R.A., Boland, R.M., 1996. An integrated program to improve anthracnose resistance in *Stylosanthes*—a review. In *Proc 8th Australian Agronomy Conf, Toowoomba*. Aust. Inst. Agric. Sci. 112-115.

- Costa, L.C., Da-Valls, J.F.M., 2017. *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29854>. Acesso em 14 de Outubro de 2017.
- Cramer, G.R., Ergül, A., Grimplet, J., Tillett, R.L., Tattersall, E.A.R., Bohlman, M.C., Vicent, D., Sonderegger, J., Evans, J., Osborne, C., Quilici, D., Schlauch, K.A., Shooley, D.A., Cushman, J.C. 2007. Waters and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolites profiles. *Funct. Integr. Genomics*. 7, 111-134.
- Dar, M., Irfan, M., Rehman, F., Naushin, F., Khan, F. 2016. Proline Accumulation in Plants: Roles in Stress Tolerance and Plant Development. Book: Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies. 155–166.
- Daszkowska-Golec, A., Szarejko, I. 2013. Open or close the gate – stomata action under the control of phytohormones in drought stress conditions. *Front. Plant. Sci.* 4, 138.
- De Lima Pereira, J.W., Silva, E.C.A., Luz, L.N., Nogueira, R.J.M.C., Melo Filho, A.P., Lima, L.M., Santos, R. C., 2015. Cluster analysis to select peanut drought tolerance lines. *Aust. J. Crop. Sci.* 9(11), 1095-1105.
- Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J. K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356.
- Fao (Food and Agriculture Organization of the United Nations), 2017. Bancos de germoplasma. Foa Fiat Panis. 2017; 1: 1. Disponível em: <http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000068.htm>. Acessado em 30 de outubro de 2017.
- Farooq, M., Wahid, A., Kobayashi, N., Fujita, D., Basra, S. M. A., 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29(1), 185-212.
- Filek, M., Labanowska, M., Koscielniak, J., Biesaga-Koscielniak, J., Kurdziel, M., Szarejko, I., Hartikainen, H. 2015. Characterization of barley beaf tolerance to drought stress by chlorophyll fluorescence and electron paramagnetic resonance studies. *J. Agron. Crop. Sci.* 201, 228-240.
- Ford, C.W., 1984. Accumulation of low molecular weight solutes in waterstressed tropical legumes. *Phytochemistry*. 23, 1007–1015.

- Frosi, G., Oliveira, M.T., Almeida-Cortez, J., Santos, M.G., 2013. Ecophysiological performance of *Calotropis procera*: An exotic and evergreen species in Caatinga, Brazilian semi-arid. *Acta. Physiol. Plant.* 35, 335–344.
- Galle, A., Florez-Sarasa, I., Aououad, H.E., Flexas, J., 2011. The Mediterranean evergreen *Quercus ilex* and the semi – deciduous *Cistus albidus* differ in their leaf gas exchange regulation and acclimatation to repeated drought and rewatering cycles. *J. Exp. Bot.* 62, 5207-5216.
- Grabherr, M.G., Haas, B.J, Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Lin, F., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., di Palma, M., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, K., Regev, A. 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnol.* 29 (7), 644–652.
- Graciano, A.E.S., Santos, H.R.B., Nogueira, R.J.M.C., 2016. Trocas gasosas, eficiência fotoquímica e pigmentos fotossintéticos de cultivares de amendoim sob deficiência hídrica no solo. *Braz. J. Appl. Technol. Agric. Agric. Sci.* 9(1).
- Haas, B.J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P.D., Bowden, J., Couger, M.B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M.D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C.N., Henschel, R., LeDuc, R.D., Friedman, N., Regev, A. 2013. De Novo Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis. *Nat. Protoc.* 8(8): 1494–512.
- Hayano-Kanashiro, C., Calderon-Vazquez, C., Ibarra-Laclette, E., Herrera-Estrella, L., Simpson, J. 2009. Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. *PloS One.* 4(10), e7531.
- Huber, S.C., Rogers, H.H., Mowry, F.L., 1984. Effects of water stress on photosynthesis and carbon partitioning in soybean (*Glycine max* [L.] Merr.) plants grown in the field at different CO₂ levels. *Plant Physiol.* 76(1), 244-249.
- Jubany-Mari, T., Munne-Bosch, S., Alegre, L. 2010. Redox regulation of water stress responses in field-grown plants. Role of hydrogen peroxide and ascorbate. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 351–8.

- Kim, J.Y., Mahé, A., Brangeon, J., Prioul, J.L., 2000. A maize vacuolar invertase, IVR2, is induced by water stress. Organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression. *Plant Physiol.* 124(1), 71-84.
- Kramer, P. J., Boyer, J. S., 1995. Water relations of plants and soils. Londres: Academic Press.
- Kunkel, B.N., Brooks, D.M. 2002. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 325–331.
- Łabanowska, M., Wesełucha-Birczyńska, A., Kurdziel, M., Sepioło, K., 2013. The mechanism of thermal activated radicalformation in potato starch studied by electron paramagnetic resonance and Raman spectroscopies. *Carbohydr. Polym.* 91, 339–347.
- Lawlor, D.W., Cornic, G., 2002. Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant Cell. Environ.* 25, 275–294.
- Lemos-Filho, J., 2000. Fotoinibição em três espécies do cerrado (*Annona crassifolia*, *Eugenia dysenterica* e *Campomanesia adamantium*) na estação seca e na chuvosa. *Rev. Bras. Bot.* 23(1), 45-50.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS. *Cur. Protoc food Anal. Chem.* 1–8.
- Maehler, A.R., Pires, J.L.F., Costa, J.A., Ferreira, F.G. (2003). Potencial de rendimento da soja durante a ontogenia em razão da irrigação e arranjo de plantas. *Pesq. Agropec. Bras.* 38(2), 225-231.
- Mahajan, S.; Tuteja, N., 2005 Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* 444, 139-158.
- Mashaki, K.M., Garg, V., Ghomi, A.A.N., Kudapa, H., Chitikineni, A., Nezhad, K.Z., Yamchi, A., Soltanloo, H., Varshney, R.K., Thudi, M. 2018. RNA-Seq analysis revealed genes associated with drought stress response in kabuli chickpea (*Cicer arietinum* L.). *PloS One.* 13(6), e0199774.
- Micheletto, S., Rodriguez-Uribe, L., Hernandez, R., Richins, R.D., Curry, J., O’Connell, M.A. 2007. Comparative transcript profiling in roots of *Phaseolus acutifolius* and *P. vulgaris* under water deficit stress. *Plant Sci.* 173, 510-520.

- Moore, B.Y.S., Stein, H., 1948. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. *J. Biol. Chem.* 176, 367–388.
- Munne-Bosch, S., Jubany-Mari, T., Alegre, L. 2001. Drought-induced senescence is characterized by a loss of antioxidant defences in chloroplasts. *Plant Cell. Environ.* 24, 1319–27.
- O'Donnell, P.J., Schmelz, E.A., Moussatche, P., Lund, S.T., Jones, J.B., Klee, H.J. 2003. Susceptible to intolerance a range of hormonal actions in a susceptible *Arabidopsis* pathogen response. *Plant J.* 33, 245–257.
- Padmavathi, T.A., Rao, D.M., 2013. Differential accumulation of osmolytes in 4 cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought stress. *J. Crop. Sci. Biotech.* 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. 92-117.
- Queiroz, C.G., Garcia, Q.S., Lemos Filho, J.P., 2002. Atividade fotossintética e peroxidação de lipídios de membrana em plantas de aroeira-do-sertão sob estresse hídrico e após reidratação. *Braz. J. Plant Physiol.* 14(1), 59-63.
- 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 Physiol. Plant.* 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. *J. Exp. Biol. Agric. Sci.* 3(1), 97-103.
- Riaño-Pachón, D.M., Nagel, A., Neigenfind, J., Wagner, R., Basekow, R., Weber, E., Mueller-Roeber, B., Diehl, S., Kersten, B. 2008. GABI PD: the GABI primary database—a plant integrative ‘omics’ database. *Nucleic. Acids Res.* 37, D954–D959.
- Rivas, R., Falcão, H.M., Ribeiro, R.V., Machado, E.C., Pimentel, C., Santos, M.G., 2016. Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. *S. Afr. J. Bot.* 103, 101-107.

- Rivas, R., Frosi, G., Ramos, D.G., Pereira, S., Benko-Iseppon, A.M., Santos, M.G., 2017. Photosynthetic limitation and mechanisms of photoprotection under drought and recovery of *Calotropis procera*, an evergreen C3 from arid regions. *Plant Physiol. Biochem.* 118, 589-599.
- Rivas, R., Oliveira, M.T., Santos, M.G., 2013. Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* 63, 200–208.
- Rossiello, R.O.P.; Fernandes, M.S.; Flores, J.P.O., 1981. Efeitos da deficiência hídrica sobre o crescimento e a acumulação de carboidratos solúveis de milho. *Pesq. Agropec. Bras.* 16, 561-566.
- Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., Haya, H. 2016. Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiol. Bioch.* 109, 54–61.
- Seo, P.J., Lee, A.K., Xiang, F., Park, C.M. 2008. Molecular and functional profiling of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. *Plant Cell. Physiol.* 49(3), 334-44.
- Serkedjieva, J. 2011. Antioxidant effects of plant polyphenols: a case study of a polyphenol-rich extract from *Geranium sanguineum* L. In: GUPTA, S.D. Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants. Enfi eld: Sci. Publishers. 13, 275–293.
- Smirnoff, N., 1995. Antioxidant systems and plant response to the environment. In: Environment and plant metabolism—flexibility and acclimation. First edition. Oxford: Sci. Publishers. 217-243.
- Sousa, V.F., Coêlho, E.F., de Andrade Junior, A.S., Folegatti, M.V., Frizzzone, J.A., 2000. Eficiência do uso da água pelo meloeiro sob diferentes frequências de irrigação. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambiente.* 4(2), 183-188.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2004. *Fisiologia vegetal*. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 719p.
- Taiz, L., Zeiger, E., 2009. *Fisiologia Vegetal*. 4a ed. Artmed, Porto Alegre, 820p.
- Theriappan, P., Gupta, A., Dhasarathan, P. 2011. Accumulation of Proline under Salinity and Heavy metal stress in Cauliflower seedlings. *JASEM* ISSN 1119-8362. 15(2), 251–255.

- Uzilday, B., Turkan, I., Sekmen, A.H., Ozgur, R., Karakaya, H.C., 2012. Comparison of ROS formation and antioxidant enzymes in *Cleome gynandra* (C4) and *Cleome spinosa* (C3) under drought stress. *Plant Sci.* 182, 59-70.
- Walter, J., Nagy, L., Hein, R., Rascher, U., Beierkuhnlein, C., Willner, E., Jentsch, A., 2011. Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environ. Exper. Bot.* 71, 34–40.
- Whittaker, A., Martinelli, T., Farrant, J.M., Bochicchio, A., Vazzana, C. 2007. Sucrose phosphate synthase activity and the co-ordination of carbon partitioning during sucrose and amino acid accumulation in desiccation-tolerant leaf material of the C4 resurrection plant *Sporobolus stapfianus* during dehydration. *J. Exp. Bot.* 58, 3775-3787.
- Williams, J., Gardner, C.J. 1984. Environmental constraints to growth and survival of *Stylosanthes*. In Stace, H.M., Edye, L.A. (eds) ‘The biology and agronomy of *Stylosanthes*’. Academic Press: North Ryde, NSW. 181–201.
- Williams, R.J., Reid, R., Schultze-Kraft, R., Souza-Costa, N.M., Thomas, B.D., 1984. Natural distribution of *Stylosanthes*. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. Academic Press, Sydney.
- Zhang, X., Lei, L., Lai, J., Zhao, H., Song, W. 2018. Effects of drought stress and water recovery on physiological responses and gene expression in maize seedlings. *BMC Plant Biol.* 18(1), 68.

4 AQUAPORINAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS EM *Stylosanthes scabra* E SUA MODULAÇÃO SOB DÉFICIT HÍDRICO

Artigo a ser submetido à Revista PLOS ONE (FI: 2.806)

Flávia Czekalski de Araújo¹, João P. Bezerra-Neto¹, Valesca Pandolfi¹, Nataniel Franklin de Melo², Ana M. Benko Iseppon^{1*}

¹ Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa, Petrolina, PE, Brasil.

*Corresponding author.

E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Resumo

Proteínas intrínsecas da membrana (*Membrane Intrinsic Proteins*, MIPs) – comumente conhecidas como aquaporinas (AQPs) – formam canais transmembranares que facilitam o transporte de água e solutos através de membranas em nível intra- e intercelular em muitos organismos. O presente estudo objetivou identificar e caracterizar AQPs candidatas no transcriptoma de *Stylosanthes scabra*, avaliando sua expressão diferencial frente ao déficit hídrico. Para isso, foram geradas bibliotecas de RNA-Seq com tratamentos pareados (estresse e controle), os quais foram analisados através de ferramentas de bioinformática. Uma análise fenética comparativa com AQPs descritos para soja (*Glycine max*) recuperou 51 AQPs em *S. scabra*. Os candidatos foram classificados em quatro subfamílias, incluindo: 17 proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIPs), 14 proteínas intrínsecas de membranas plasmáticas (PIPs), seis proteínas intrínsecas de membrana de nódulos (NIPs), seis pequenas proteínas básicas intrínsecas (SIPs) e oito (MIPs). Não foram identificados representantes para a subfamília XIP (proteína intrínseca desconhecida X). Os transcritos identificados mostraram um alto nível de conservação quanto aos motivos NPA, filtros de seletividade e posições de *Froger's*. Foi observada uma separação das AQPs de acordo com o peso molecular e o ponto isoelétrico descrito para cada uma das subfamílias. Três genes de referência foram determinados para *S. scabra* (UBQ10, F-Fox e β -Tub_2), sendo adequados para as análises de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). A análise da expressão diferencial dos dados de RNA-Seq revelou 11 genes diferencialmente expressos, sendo selecionados para validação por RT-qPCR. A análise de RT-qPCR de quatro SsAQPs revelou indução (SsPIP2.6 e SsTIP1.4), diminuição (SsTIP2.4) e manutenção da expressão (SsPIP2.2) no tratamento de 48 h após imposição do déficit hídrico, enquanto no tratamento 6 h após reidratação, SsPIP2.2 e SsTIP2 apresentaram expressão induzida, já o SsTIP1.4 foi reprimido. A identificação das AQPs no transcriptoma de *S. scabra* revelou significativa diversidade e modulação diferencial, fornecendo informações relevantes sobre seus mecanismos sob déficit hídrico.

Palavras-chave: Estilosantes; seca; proteínas intrínsecas de membrana; transcriptoma.

Introdução

O gênero *Stylosanthes* (família Fabaceae, subfamília Papilionoideae; Polhill e Raven, 1981) é constituído por 50 espécies descritas, das quais, aproximadamente 30 ocorrem no Brasil, considerado o principal centro de origem e diversidade do grupo (Lewis et al., 2005; Costa & Da-Valls, 2015). Dentre as espécies do gênero, *Stylosanthes scabra* Vogel destaca-se pela importância econômica, face à sua utilização como forrageira na alimentação animal (Coates et al., 1997). É uma espécie alotetraplóide ($2n=40$) (Stace & Cameron, 1984), de germinação e crescimento lentos, porte arbustivo, com sistema reprodutivo predominantemente autógamo, porém com uma pequena taxa (2-6%) de reprodução cruzada (Tropical Forages, 2017). É uma planta nativa da caatinga, porém não é endêmica do Brasil. Apresenta-se amplamente distribuída no território brasileiro – especialmente nos estados da Bahia, Pernambuco, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal – além do leste da Bolívia, Venezuela, Colômbia e Equador (Williams et al., 1984; Costa, 2006, Costa & Valls, 2015; Cria, 2019). Popularmente conhecida no Brasil como ‘alfafa do nordeste’, a cultura destaca-se como uma das mais importantes leguminosas forrageiras perenes utilizadas como fonte de pastejo (Fao, 2017).

A boa adaptação a solos de baixa fertilidade natural, simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio e tolerância à seca são características que tornam a *S. scabra* uma espécie de importância agrícola. Além disso, é capaz de colonizar vários ambientes, desde regiões mais úmidas até regiões submetidas a longos períodos de seca, característicos de domínios fitogeográficos, como: Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Cameron et al., 1996, Costa & Valls, 2015; Fao, 2017). Tendo em vista sua adaptabilidade a diferentes condições ambientais, aliada à alta variabilidade genética, *S. scabra* é de grande interesse em programas de melhoramento genético, por ser uma valiosa fonte de genes associados à tolerância aos fatores de estresse, principalmente ao déficit hídrico.

Neste contexto, as aquaporinas (AQPs) – proteínas intrínsecas de membrana (MIP, *Membrane Intrinsic Protein*) – apresentam relevante importância frente ao déficit hídrico, uma vez que atuam no transporte de água e de outros solutos, como amônia (NH_3), Dióxido de carbono (CO_2), Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ureia, através das membranas de plantas (Tyerman et al., 2002; Ludewig & Dynowski, 2009). Compreendem um grupo de pequenas proteínas (24-30 kDa) presentes em todos os organismos (Heymann & Engel, 1999; Agre & Kozono, 2003; Wudick et al., 2009) e classificadas, de acordo com a similaridade de sequências, em cinco subfamílias distintas: (1) PIPs (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*; Proteínas de

Membrana Plasmática), (2) TIPs (*Tonoplast Intrinsic Proteins*; Proteínas de Membrana de Tonoplasto), (3) NIPs (*Nodulin26-like Intrinsic Proteins*; Proteínas de Membrana de Nódulos), (4) SIPs (*Small basic Intrinsic Proteins*; Pequenas Proteínas Básicas Intrínsecas de Membrana) e (5) XIP (*Uncharacterized X Intrinsic Protein*; Proteína intrínseca desconhecida X), sendo esta última identificada em musgo (Danielson & Johanson, 2008) e algumas espécies de dicotiledôneas (Park et al., 2010; Zhang et al., 2013; Ariani & Gepts, 2015; Deshmukh et al., 2013). Estudos de prospecção *in silico* têm revelado variação no número de MIPs em plantas, exemplos incluem seis homólogos em amendoim – *Arachis hypogaea* L. (Devi et al., 2016); 23 em briófito *Physcomitrella patens* L. (Danielson & Johanson, 2008); 35 membros em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Johanson et al., 2001); 71 em algodão – *Gossypium hirsutum* L. (Park et al., 2010); 84 em soja – *Glycine max* (L.) Merrill (Deshmukh et al., 2013); e 120 em canola – *Brassica napus* L. (Sonah et al., 2017). As múltiplas isoformas de MIPs em plantas são refletidas pela alta diversidade de localização celular e de substratos fisiológicos (em adição à água), constituindo componentes fundamentais para a evolução de membranas e diversidade de expressão diferencial de genes (Fox et al., 2017). Tais propriedades revelam a importância que essas proteínas desempenham nas relações hídricas das plantas, estabelecendo conexões importantes entre fluxo de água intra e intercelular, o crescimento e desenvolvimento das plantas e suas respostas adaptativas frente ao ambiente em constante modificação (Maurel & Chrispeels, 2001; Alexandersson et al., 2005; Wang et al., 2017).

As relações água-planta são críticas, principalmente por atuarem sobre as condições fisiológicas, como transpiração, fotossíntese, pressão de vapor atmosférico e condutância estomática, influenciando diretamente o rendimento das culturas (Chaumont et al., 2005; Devi et al., 2016). Embora muitas plantas sejam capazes de tolerar determinados fatores de estresse, como a seca, os mecanismos envolvidos em tais condições envolvem vias complexas, uma vez que se trata de uma característica poligênica (Tardieu, 2005), envolvendo interações nos diferentes aspectos morfológicos, fisiológicos e bioquímicos da planta frente ao fator de estresse (Meneses et al., 2006). Neste contexto, a biologia molecular e a bioinformática assumem um papel fundamental na prospecção e análise de genes estresse-responsivos, permitindo a identificação de materiais promissores, contribuindo significativamente para a melhoria das culturas (Gowda et al., 2002). Como consequência dos avanços nestas áreas, bancos de dados privados e públicos de genomas, transcriptomas, proteomas e metabolomas (Ahuja et al., 2010) têm sido gerados e disponibilizados, auxiliando na compreensão de vias metabólicas associadas à resposta das plantas à seca (Tuberosa & Salvi, 2006). Similarmente, estudos de expressão gênica diferencial têm proporcionado uma eficiente estratégia na

identificação de genes que codificam para aquaporinas de um determinado organismo (Chaumont et al., 2001; Park et al., 2010).

Dentre as técnicas de análise de expressão gênica baseadas em sequenciamento de alto rendimento, o RNA-Seq se sobressai comparativamente às demais por não se limitar ao conhecimento prévio do genoma, além de requerer uma baixa quantidade de material genético (Wang et al., 2009). Sabe-se que algumas aquaporinas são expressas constitutivamente, enquanto outras têm sua expressão modulada frente a diversos estímulos, como estágios de desenvolvimento e diferentes condições ambientais (Kjellbom et al., 1999). Diante disso, inúmeros estudos vêm utilizando a tecnologia do RNA-Seq a fim de compreender o perfil transcricional de plantas em resposta a algum fator de estresse, a exemplo do déficit hídrico. Tais estudos mostram uma variação considerável na expressão de aquaporinas, as quais podem ser induzidas ou reprimidas, dependendo da magnitude do estresse aplicado (Aharon et al., 2003; Galmés et al., 2007; Jang et al., 2007; Sonah et al., 2017).

Apesar da importância das aquaporinas no transporte de água, tanto em nível celular quanto fisiológico, o entendimento por completo das funções fisiológicas e dos mecanismos regulatórios dessas proteínas ainda possui lacunas a serem elucidadas (Hachez et al., 2006). Tal situação é mais grave, principalmente em plantas não modelo, visto que não apresentam informações sobre sequências biológicas em bancos de dados, como é o caso de *S. scabra*. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar os genes codificantes para aquaporinas no transcriptoma de *S. scabra*, avaliando sua expressão frente ao déficit hídrico, visando sua aplicação no melhoramento vegetal.

Material e métodos

Identificação e caracterização de AQPs de *S. scabra*

Plantas de *S. scabra* foram submetidas ao estresse por déficit hídrico (supressão de rega), consistindo quatro tratamentos distintos (6 h, 24 h, 48 h de supressão de rega e 6 h após a reidratação), cada um com seu controle, em triplicata biológica. Os tratamentos 6 e 24 h (tecido radicular) foram submetidos ao sequenciamento, pela tecnologia de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500), com posterior montagem das sequências para obtenção do transcriptoma da espécie (banco privado gerado pelo grupo do LGBV/UFPE; dados não publicados) via ferramenta Trinity (Grabherr et al., 2011), seguindo o protocolo de Haas et al. (2013). Um conjunto de 77 genes codificadores de AQPs (35 de *A. thaliana*; 33 de *Oryza sativa*, 7 de *A.*

hypogaea, 1 de *A. diogeni* e 1 de *P. patens*; Tabela suplementar 1) foi utilizado como *query* (*seed sequence*) na identificação de possíveis ortólogos de AQPs no transcriptoma de *S. scabra*, via tBLASTn ($e\text{-value} \leq 10^{-5}$).

As sequências resultantes de *S. scabra* foram submetidas à ferramenta BLASTx ($e\text{-value} \leq 10^{-5}$) contra o banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) a fim de confirmar sua identidade, levando em conta seus domínios conservados. Através da ferramenta TransDecoder, as sequências de nucleotídeos foram traduzidas em proteínas e alinhadas através do programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). A presença dos domínios conservados completos foi confirmada através da ferramenta CD-Search (*Batch*) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) (Fig. 1). Sequências redundantes e que apresentaram domínio MIP incompleto foram eliminadas da análise.

Classificação e análise fenética

Sequências proteicas de AQPs foram usadas para gerar um alinhamento múltiplo utilizando o CLUSTAL ω do pacote MEGA 7 (Tamura et al., 2007). A árvore fenética foi construída por meio do método *Neighbor-Joining* considerando $p\text{-distance}$ e um *bootstrap* de 1.000 repetições. A classificação e nomenclatura das AQPs de *S. scabra* (Fig. 2) foram realizadas com base na similaridade estrutural comparativamente a ortólogos descritos para soja (*G. max*; Zhang et al., 2013).

Características estruturais

As características físico-químicas das AQPs de *S. scabra*, como o ponto isoelétrico (pI) e o peso molecular (PM), foram determinados por meio do programa ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A localização subcelular dessas proteínas foi predita por meio da ferramenta Plant-mPLOC (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/plant-multi/>), enquanto que o software *online* TMHMM (Krogh et al., 2001) foi utilizado para identificar os domínios transmembranares (TM). A detecção das regiões conservadas associadas com a especificidade do soluto, os motivos NPA, ar/R e posições de *Froger's* foi feita com base na avaliação manual do alinhamento das sequências proteicas (Fig. 1).

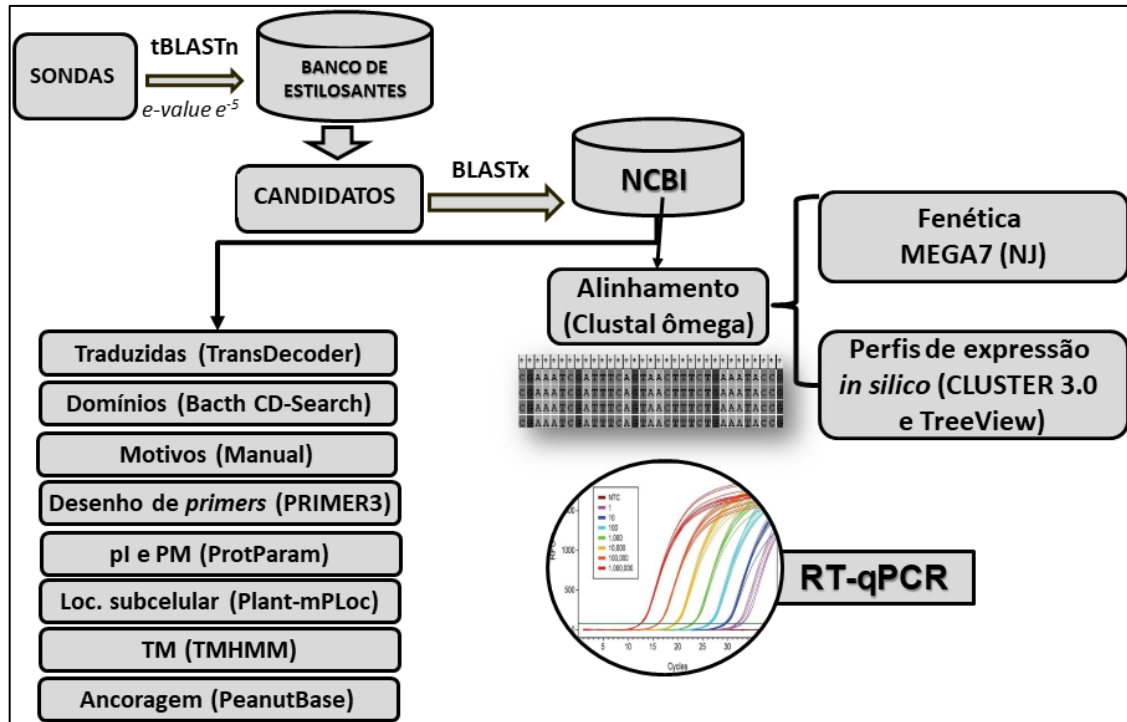


Figura 1: Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na anotação funcional e estrutural de Aquaporinas no transcriptoma de *Stylosanthes scabra*.

Ancoragem de contigs de *S. scabra* nos cromossomos virtuais de *Arachis duranensis* e *Arachis ipaensis*

AQPs candidatas de *S. scabra* (SsAQPs) foram alinhadas contra os pseudogenomas de *A. duranensis* e *A. ipaensis* disponíveis no servidor web PeanutBase database (<https://www.peanutbase.org/>) utilizando a ferramenta BLASTn (*cut-off* de e^{-5}), de modo a permitir a identificação da localização espacial de AQPs-homólogas nos genomas dessas espécies aparentadas. Esta abordagem permitiu a identificação da distribuição, posição relativa e abundância das AQPs nas duas espécies de amendoim, inferida a partir da representação gráfica do cariótipo virtual.

Análise *in silico* da expressão diferencial das SsAQPs sob déficit hídrico

A expressão diferencial de *S. scabra* (dados não publicados) submetida ao déficit hídrico (suspensão de rega) por 6 e 24 horas, comparativamente aos seus respectivos controles (sem suspensão de rega), foi avaliada *in silico* utilizando a ferramenta *Empirical Analysis of Digital Gene Expression in R* (edgeR) (Robinson et al., 2010) implementada no pacote Bioconductor (Huber et al. 2015), aplicada a cada comparação (caso-controle). Transcritos que apresentaram

valores de $\log_2FC >1.0$ ou <-1.0 , com $p\text{-value} <0.05$ foram considerados diferencialmente expressos (DE; induzidos ou reprimidos). A clusterização dos transcritos DE foi realizada com o auxílio do programa CLUSTER 3.0 (Eisen et al., 1998), sendo o *heatmap* visualizado através do software TreeView (Page, 1996).

Seleção de genes normalizadores

Sequências de *S. scabra* que não foram DE ($\log_2FC$ entre 0 a 0,5) foram selecionadas com intuito de estabelecer um grupo de genes candidatos a normalizadores (referência). Os *primers* foram desenhados através da ferramenta *online* Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), utilizando-se as condições estabelecidas pelo programa, com os seguintes ajustes: tamanho do *amplicon* (80 – 200 pb), temperatura de *melting* (75 ° - 95 °C), conteúdo GC (45 – 55%), *Max Poly-X* (3), *Max self complementarity* (3) e *GC clamp* (1). Genes de referência já descritos e estabelecidos para leguminosas, como *Arachis hypogaea* (Brand & Hovav, 2010) e *Vigna unguiculata* (Amorim, et al., 2018) também foram testados. Os valores de estabilidade dos candidatos a genes normalizadores em *S. scabra* foram verificados por meio do programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002).

Extração de RNA, síntese de cDNA e RT-qPCR

A extração do RNA do tecido radicular da estíloso foi realizada nos tratamentos: 6, 24 e 48 h após a supressão de rega e 6 h após a reidratação, além dos controles para cada tempo (em triplicata biológica). O protocolo de extração utilizado foi descrito por Zhao e colaboradores (2012). Após o tratamento com DNase I (*DNase Treatment and Removal* - Ambion) e a qualidade e quantidade verificados em eletroforese em gel de agarose 1,5% e em fluorímetro (Qubit), respectivamente, alíquotas de 1 µg de RNA de cada amostra foram convertidas em cDNA utilizando o *Improm-II Reverse Transcription Systems* (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Os pares de *primers* para os candidatos a AQPs de *S. scabra* foram desenhados com base no transcriptoma da espécie com auxílio da ferramenta Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), utilizando as condições padronizadas estabelecidas pelo programa, exceto os parâmetros anteriormente descritos para genes de referência. As reações de RT-qPCR foram realizadas utilizando o equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System, sob as seguintes condições: 95 °C por 2 min para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos de 95 °C por 15 s; 1 min à 60 °C para anelamento. A curva de *melting* foi gerada variando a temperatura de amplificação de 65 - 95°C. Todas as reações foram realizadas em triplicata (réplicas biológicas e técnicas) (Bustin et al., 2009). A

eficiência de amplificação (E) foi determinada a partir de uma curva padrão gerada por diluições seriadas de cDNA (1/10, 1/100, 1/1000) para cada *primer*, em triplicata, usando a equação: $E = 10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$ (Rasmussen, 2001).

Resultados

Identificação e análise comparativa das SsAQPs

O presente trabalho representa o primeiro inventário de aquaporinas de *S. scabra*, tomando como base seu transcriptoma obtido a partir de experimentos de déficit hídrico. Para este estudo, após a mineração no banco de transcritos de *S. scabra*, foram obtidos 3.690 alinhamentos dentro das especificações. Após a retirada de redundâncias, foram identificadas 125 sequências exclusivas, das quais, 51 apresentaram o domínio conservado MIP completo, característico da família de aquaporinas. Após análise de similaridade com os membros descritos para *G. max*, essas 51 sequências foram classificadas em cinco subfamílias (Fig. 2), a saber: TIP (17), PIP (14), NIP (6), SIP (6) e MIPs (8).

Vale ressaltar que esses transcritos classificados de forma geral como MIPs são sequências identificadas em *S. scabra* que apresentaram o domínio MIP completo, porém, ao analisar a função via BLASTx, verificou-se que essas sequências apresentaram maior similaridade com AQPs descritas em microrganismos no banco de dados do NCBI (Tabela 1; Fig. Suplementar 1). As AQPs tendem a se agrupar de acordo com cada subfamília com base na composição de suas sequências de aminoácidos.

Nenhum membro da subfamília XIP foi identificado em *S. scabra* no transcriptoma analisado. A subfamília TIP foi a mais abundante, formando quatro subgrupos: TIP1, TIP2, TIP3, TIP4 (o subgrupo TIP5 não foi observado na espécie estudada). Os membros pertencentes à subfamília PIP representam o segundo grupo mais abundante, e foram classificados em dois subgrupos, PIP1 e PIP2 (este último grupo com maior número de transcritos). Os representantes da subfamília NIP formaram quatro subgrupos (NIP1, NIP2, NIP5 e NIP6), estando os demais subgrupos ausentes. A subfamília SIP se agrupou em duas categorias, SIP1 e SIP2. Como observado na tabela 1, dos transcritos classificados no grupo MIP, sete apresentaram maior identidade com AQPs dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Botryobasidium botryosum*, nomeadas de MIP1 a MIP7, enquanto o membro SsAQPZ apresentou uma identidade de 99% com bactéria do gênero *Bradyrhizobium*.

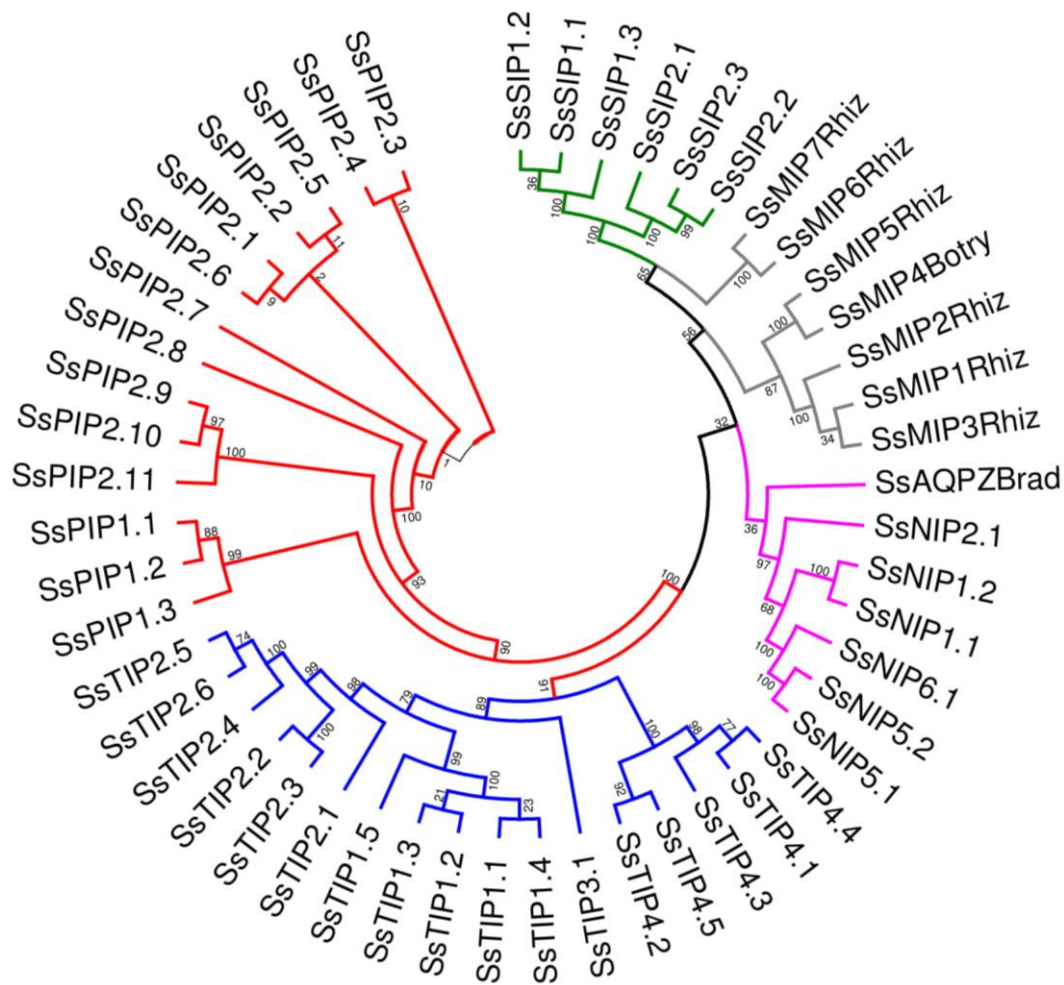


Figura 2. Análise de similaridade de sequências, utilizando o método de *Neighbor Joining* (NJ), das subfamílias de aquaporinas expressas em *S. scabra*, com *bootstrap* ao nível de 1000 replicações. As cores dos ramos correspondem às subfamílias de aquaporinas identificadas em *S. scabra*: vermelho – PIP, azul – TIP, rosa – NIP, verde – SIP e MIPs (maior identidade com microrganismos) - cinza.

Na árvore construída a partir do método NJ (Fig. 2), observa-se que as AQP's que apresentaram maior similaridade com fungo foram agrupadas em um *cluster* demonstrando maior semelhança com as demais AQP's da subfamília SIP, enquanto que SsAQPZ-Brad (maior identidade com a bactéria *Bradyrhizobium*) agrupou com AQP's pertencentes à subfamília NIP. Essa semelhança pode estar associada a bactérias do gênero *Rhizobium*, visto que há indícios de que as NIP's chegaram às plantas por transferência horizontal de bactérias (Zardoya et al., 2002). Essa relação de AQP's de *S. scabra* com microrganismos pode indicar uma relação de simbiose a fim de melhorar o transporte de água nas raízes de plantas. A definição da origem

dos transcritos (se da planta ou de microrganismos que a habitam) depende da busca dessas sequências no genoma da espécie.

Tabela 1: Aquaporinas candidatas do transcriptoma de *S. scabra* que apresentam maior identidade com proteínas de domínio MIP de microrganismos, de acordo com o banco de dados do NCBI. ID (Identidade); *R. solani* (*Rhizoctonia solani*); *B. botryosum* (*Botryobasidium botryosum*).

SsAQPs	Transcrito	ID (NCBI)	Identidade com Microrganismo	ID (%)
SsAQPZ_Brad	TRINITY_DN42748_c0_g1_i1	WP_018453820.1	Bactéria (<i>Bradyrhizobium</i>)	99%
SsMIP1_Rhiz	TRINITY_DN116212_c0_g1_i5	CCO27222.1	Fungo (<i>R. solani</i>)	90%
SsMIP2_Rhiz	TRINITY_DN116212_c0_g1_i3	CCO27222.1	Fungo (<i>R. solani</i>)	89%
SsMIP3_Rhiz	TRINITY_DN116212_c0_g1_i1	CCO27222.1	Fungo (<i>R. solani</i>)	90%
SsMIP4_Botry	TRINITY_DN124506_c0_g1_i4	KDQ11549.1	Fungo (<i>B. botryosum</i>)	51%
SsMIP5_Rhiz	TRINITY_DN102991_c0_g2_i1	CUA66720.1	Fungo (<i>R. solani</i>)	87%
SsMIP6_Rhiz	TRINITY_DN114950_c0_g1_i1	EUC53798.1	Fungo (<i>R. solani</i>)	70%
SsMIP7_Rhiz	TRINITY_DN110464_c0_g1_i1	CCO27222.1	Fungo (<i>R. solani</i>)	90%

Análise de regiões conservadas (Motivos NPAs, filtros (ar/R) e posições de *Froger's*)

Para a identificação dos padrões conservados das SsAQPs foram analisadas as regiões dos motivos NPAs, filtros de seletividade (ar/R – H2, H5, LE1 e LE2) e posições de *Froger's* (P1 – P5) (Fig. 3). A avaliação dos domínios MIPs conservados de aquaporinas em *S. scabra* identificou dois motivos NPA (Asparagina-Prolina-Alanina), sendo o primeiro localizado no *loop* B e o segundo no *loop* E, ambos reconhecidos como formadores de uma das duas constrições do poro.

Das 51 SsAQPs, 13 apresentaram variações na composição dos aminoácidos nestas posições. Todos os representantes das subfamílias PIP e TIP exibiram os motivos NPA conservados, sem nenhuma alteração nos resíduos. O mesmo não foi observado nas subfamílias NIP e SIP, bem como no grupo MIPs. Para NIP e SIP foram relatadas substituições dos resíduos de alanina (A) por aminoácidos com propriedades físico-químicas tanto semelhantes [valina, (V); leucina (L)] como distintas [serina (S)]. Apenas os membros SsNIP1.1, SsNIP1.2 e SsNIP2.1 apresentaram alto grau de conservação em relação à integridade dos motivos NPA nos *loops* B e E (Tabela 2). No grupo MIP quatro exibiram as seguintes alterações: em SsMIP4_Botry, a asparagina (N) foi substituída por uma serina (S), e a alanina (A) por uma glicina (G), enquanto que em SsMIP4_Rhiz houve a alteração de uma alanina (A) para uma cisteína (C), ambos no *loop* B. Já no *loop* E, todos os representantes que apresentaram

alterações, tiveram mutação do resíduo prolina (P) para uma treonina (T) ou alanina (A) (Tabela 2).

Os filtros de seletividade (constituídos por quatro resíduos conservados) formam a segunda constrição do poro – também conhecida como constrição arginina/aromática (ar/R) – considerada como o maior delimitador de permeabilidade ao soluto. Além disso, alguns resíduos dessa região são responsáveis pelo fornecimento de pontes de hidrogênio para que as moléculas de água sejam transportadas (Wallace & Roberts, 2004).

Neste estudo, foram verificadas variações consideráveis de acordo com as subfamílias e os grupos das SsAQPs. Os quatro aminoácidos conservados na região ar/R de PIP foram: fenilalanina (F) – histidina (H) – treonina (T) e arginina (R), nas posições H2, H5, LE1 e LE2, respectivamente, independente dos grupos PIP1 e PIP2. A única exceção foi SsPIP1.1 que além de não apresentar o motivo NPA no *loop* E, também não exibiu a arginina (A) na posição LE2 do filtro de seletividade (Tabela 2). Em contrapartida, na subfamília TIP, os resíduos foram fortemente conservados, embora tenham apresentado variações de acordo com os grupos identificados: TIP1 (H-I-A-V), TIP2 (H-I-G-R), TIP3 (H-I-A-L) e TIP4 (H-I-A-R), sendo I = isoleucina e L = leucina. Alterações nos filtros de seletividade de NIPs também foram observadas segundo os grupos identificados em: NIP1 (W-V-A-R), NIP2 (G-S-G-R), SsNIP5 (A-I-G-R) e SsNIP6 (T-I-G-R), sendo W = triptofano (Tabela 2). As SsAQPs classificadas dentro do grupo MIP não apresentaram um padrão de conservação dos filtros de seletividade, com exceção de SsAQPZ_Brad que demonstrou os mesmos resíduos presentes na subfamília PIP, embora agrupada com membros da subfamília NIP de acordo com a similaridade de sequência (Fig. 2).

Os resíduos conservados de *Froger's* são responsáveis por diferenciar aquaporinas de aquagliceroporinas, provendo especificidades funcionais. As PIPs apresentaram um padrão Q-S-A-F-W conservado, com exceção dos membros PIP1.1 e PIP2.11 que apresentaram apenas o resíduo conservado no sítio P1, onde PIP1.1 ainda demonstrou alteração, sendo o resíduo glutamina (Q) substituído por um glutâmico (E). Todos os sítios *Froger's* presentes nos grupos TIP1 e TIP2 mostraram-se conservados (T-S-A-Y-W), ao passo que em TIP3, a serina (S) foi alterada para uma alanina (A), enquanto em TIP4, uma treonina (T) foi substituída por uma alanina (A).

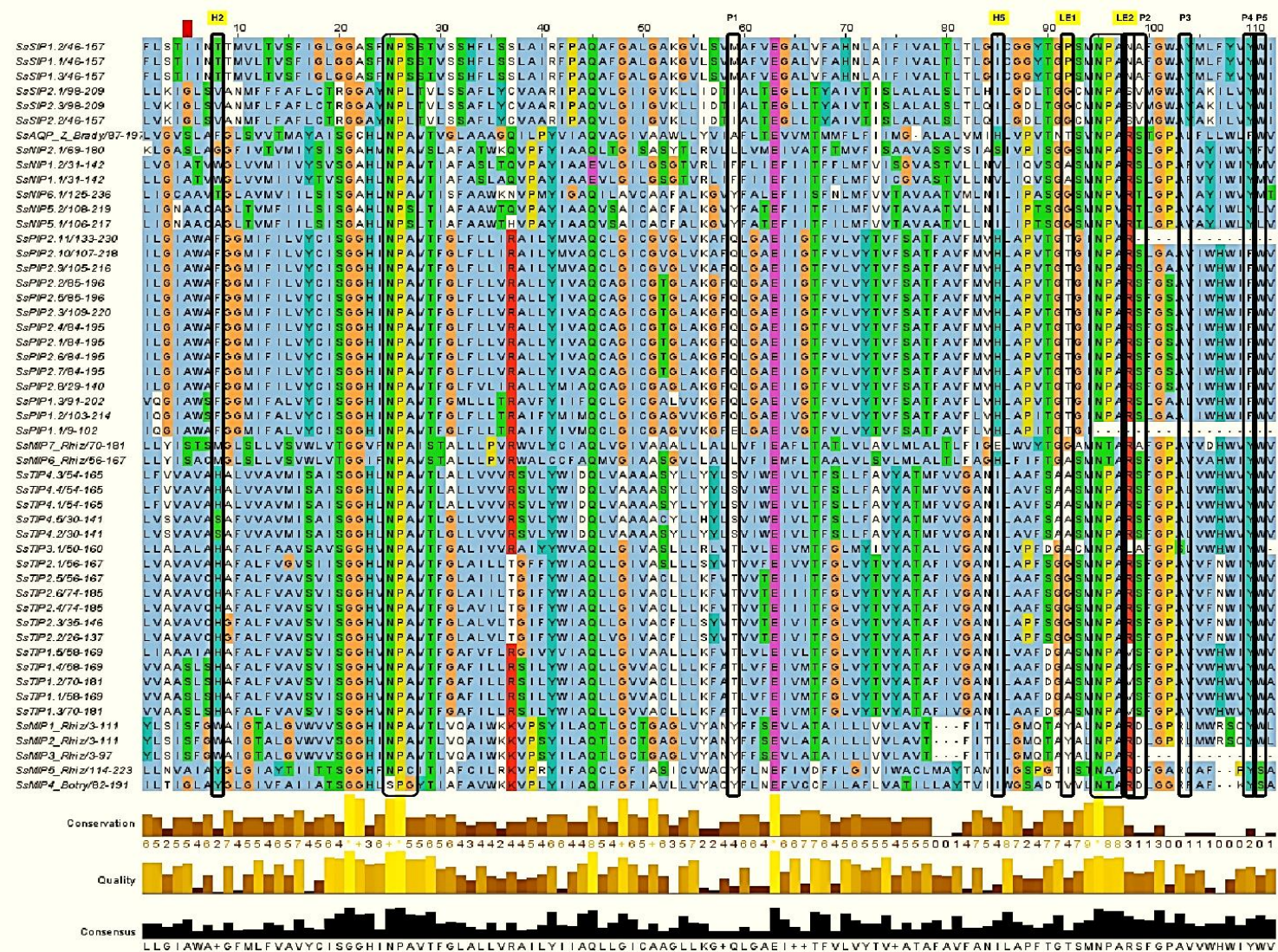


Figura 3: Alinhamento das 51 aquaporinas candidatas do transcriptoma de *S. scabra* utilizando o Clustal Omega e o Jalview. Destaque para os motivos NPA (asparagina-prolina-alanina), filtros de seletividade (H2, H5, LE1 e LE2) e resíduos de *Froger's* (P1-P5). Gráfico de barras amarelas/marrons indica regiões de conservação dos resíduos e maior qualidade do alinhamento, enquanto o gráfico de barras pretas (na base do alinhamento) apresenta a sequência consenso (regiões variáveis indicadas por +).

Tabela 2. Domínios conservados das aquaporinas candidatas identificadas em *S. scabra*.

SsAQPs	Loop						Filtros de seletividade				Posições de Froger's				
	B		E				H2	H5	LE1	LE2	P1	P2	P3	P4	P5
SsPIP1.1	N	P	A	-	-	-	F	H	T	-	E	-	-	-	-
SsPIP1.2	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP1.3	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.1	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.2	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.3	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.4	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.5	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.6	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.7	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.8	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.9	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.10	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	S	A	F	W
SsPIP2.11	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	Q	-	-	-	-
SsTIP1.1	N	P	A	N	P	A	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
SsTIP1.2	N	P	A	N	P	A	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
SsTIP1.3	N	P	A	N	P	A	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
SsTIP1.4	N	P	A	N	P	A	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
SsTIP1.5	N	P	A	N	P	A	H	I	A	V	T	S	A	Y	W
SsTIP2.1	N	P	A	N	P	A	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
SsTIP2.2	N	P	A	N	P	A	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
SsTIP2.3	N	P	A	N	P	A	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
SsTIP2.4	N	P	A	N	P	A	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
SsTIP2.5	N	P	A	N	P	A	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
SsTIP2.6	N	P	A	N	P	A	H	I	G	R	T	S	A	Y	W
SsTIP3.1	N	P	A	N	P	A	H	I	A	L	T	A	S	Y	W
SsTIP4.1	N	P	A	N	P	A	H	I	A	R	S	S	A	Y	W
SsTIP4.2	N	P	A	N	P	A	S	I	A	R	S	S	A	Y	W
SsTIP4.3	N	P	A	N	P	A	H	I	A	R	S	S	A	Y	W
SsTIP4.4	N	P	A	N	P	A	H	I	A	R	S	S	A	Y	W
SsTIP4.5	N	P	A	N	P	A	S	I	A	R	S	S	A	Y	W
SsNIP1.1	N	P	A	N	P	A	W	V	A	R	F	S	A	Y	M
SsNIP1.2	N	P	A	N	P	A	W	V	A	R	F	S	A	Y	M
SsNIP2.1	N	P	A	N	P	A	G	S	G	R	L	S	A	Y	F
SsNIP5.1	N	P	S	N	P	V	A	I	G	R	Y	T	A	Y	L
SsNIP5.2	N	P	S	N	P	V	A	I	G	R	Y	T	A	Y	L
SsNIP6.1	N	P	A	N	P	V	T	I	G	R	Y	T	A	Y	M
SsSIP1.1	N	P	S	N	P	A	N	G	P	N	M	A	A	Y	W
SsSIP1.2	N	P	S	N	P	A	N	G	P	N	M	A	A	Y	W
SsSIP1.3	N	P	S	N	P	A	N	G	P	N	M	A	A	Y	W
SsSIP2.1	N	P	L	N	P	A	S	Q	G	S	I	V	A	Y	W
SsSIP2.2	N	P	L	N	P	A	S	Q	G	S	I	V	A	Y	W
SsSIP2.3	N	P	L	N	P	A	S	H	G	S	I	V	A	Y	W
SsAQPZ_Brad	N	P	A	N	P	A	F	H	T	R	A	S	A	F	W
SsMIP1 Rhiz	N	P	A	N	P	A	W	G	Y	R	Y	D	R	W	L
SsMIP2 Rhiz	N	P	A	N	P	A	W	G	Y	R	Y	D	R	W	L
SsMIP3 Rhiz	N	P	A	N	P	A	W	G	Y	R	Y	-	-	-	-
SsMIP4_Botry	S	P	G	N	T	A	Y	I	V	R	Y	D	R	A	A
SsMIP4 Rhiz	N	P	C	N	A	A	Y	I	I	R	Y	D	R	S	I
SsMIP5 Rhiz	N	P	A	N	T	A	M	H	A	R	L	S	A	Y	W
SsMIP6 Rhiz	N	P	A	N	T	A	M	E	G	R	L	A	A	Y	W

Na subfamília NIP observou-se um padrão característico: NIP1 (F-S-A-Y-M); NIP2 (L-S-A-Y-F); NIP5 (Y-T-A-Y-L) e NIP7 (Y-T-A-Y-M). Quanto à subfamília SIP, os membros do grupo SIP1 apresentaram o padrão M-A-A-Y-W e os representantes do grupo SIP2 demonstraram a conservação dos resíduos I-V-A-Y-W, com a alteração de uma metionina (M) por uma isoleucina (I), assim como de uma alanina (A) para uma valina (V), nas posições P1 e P2, respectivamente. Esses padrões observados nas diferentes subfamílias e distintos grupos provavelmente refletem a especificidade dos substratos reconhecidos e transportados por cada membro.

Identificação do quinto filtro de seletividade putativo em SsAQPs

Ao analisar o alinhamento múltiplo das SsTIPs foi verificada a conservação de um resíduo no *Loop C* (LC) em todas as sequências de *S. scabra* (Fig. 4). Esse resíduo foi recentemente descrito por Kirscht *et al.* (2016) como o quinto filtro de seletividade (região arginina/aromática), devido à sua contribuição na identificação de soluto em *A. thaliana*. O alinhamento das sequências proteicas de TIP revelou uma variação no aminoácido presente na posição LC (ar/R), de acordo com os grupos pertencentes a essa subfamília. As SsTIP1 e SsTIP3 apresentaram uma fenilalanina (F), enquanto que as SsTIP2 e SsTIP4 exibiram uma histidina (H) na mesma posição.

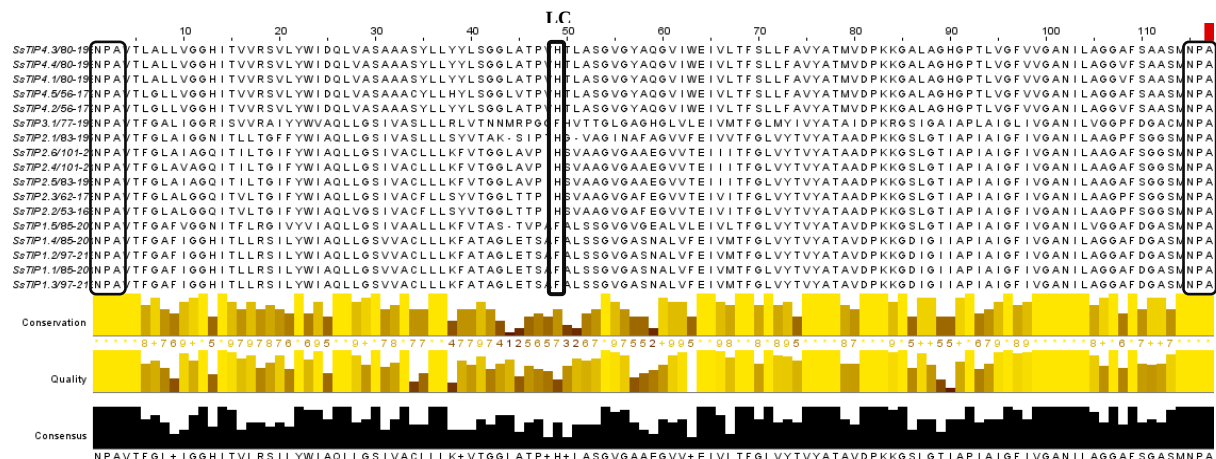


Figura 4: Alinhamento múltiplo das sequências aquaporinas candidatas da subfamília TIP em *S. scabra* mostrando o 5º filtro de seletividade – LC (ar/R) proposto recentemente para *A. thaliana* (AtTIP2-1).

Propriedades bioquímicas, localização subcelular e domínios transmembranas

Ao analisar as propriedades bioquímicas dos transcritos codificantes para aquaporinas em *S. scabra*, verificou-se que as subfamílias apresentaram uma separação de acordo com o peso molecular (PM) e ponto isoelétrico (pI) (Tabela suplementar 2).

As SsAQP identificadas codificam proteínas que variam de 157 a 396 aminoácidos (média de 266), com PM variando de 16,21 a 43,10 kDa (média de 28,07) e pI no intervalo de 4,77 a 9,9 (média 7,65) (Fig. 5). Os membros da subfamília TIP possuem os menores valores para o peso molecular (média 25,13 kDa) e o ponto isoelétrico (média 6,02), enquanto as maiores médias do PM foram relatadas para os representantes do grupo MIP (30,12 kDa), seguido da subfamília PIP (29,74 kDa).

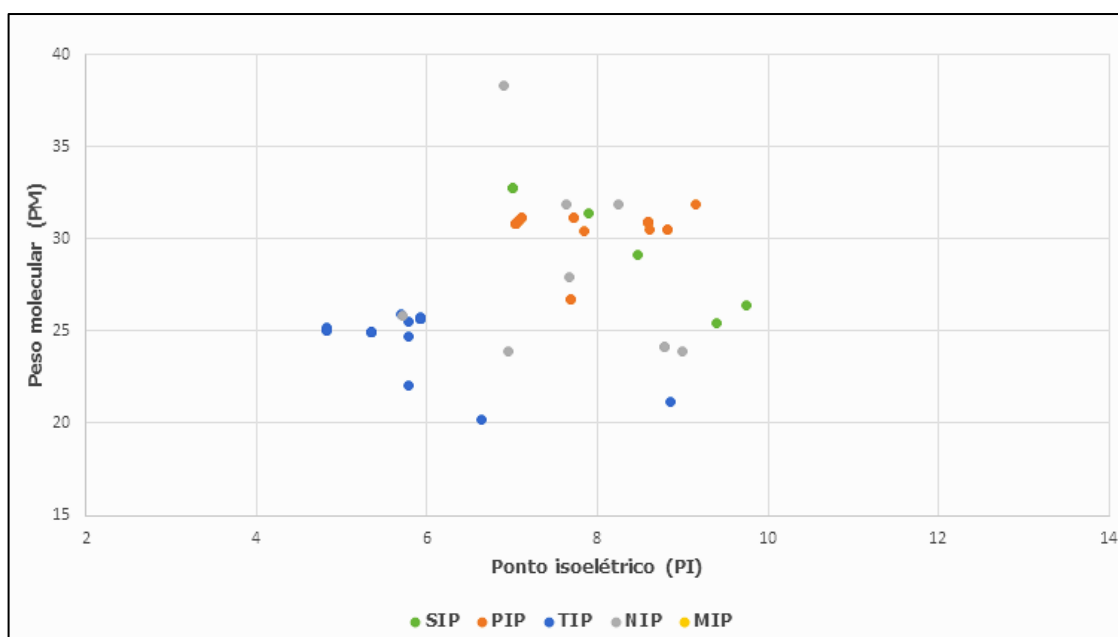


Figura 5: Peso molecular e ponto isoelétrico de aquaporinas de *S. scabra* distribuídos de acordo com as subfamílias: Proteínas de Membrana Plasmática (PIPs) - vermelho; Proteínas de Membrana de Tonoplasto (TIP) – azul; Proteínas de Membrana de Nódulos (NIP) – cinza; Proteínas de Membrana de Nódulos (NIP), Pequenas Proteínas Básicas Intrínsecas de Membrana (SIP) – verde e Proteínas com maior similaridade com microrganismos (grupo MIP) - laranja.

NIPs e SIPs apresentaram PM de 29,60 e 28,19 kDa, respectivamente. A subfamília SIP foi a que exibiu o maior valor de pI (média 9,8). Os membros pertencentes ao grupo MIP apresentaram variações mais proeminentes para o PM (de 17,23 a 43,10 kDa), com pI variando entre ácido e básico (6,81 e 8,87, respectivamente). Diante desse resultado e considerando-se a

identificação dos resíduos conservados, fazem-se necessárias análises adicionais visando à caracterização mais detalhadas desses candidatos (Fig. 5).

A análise da localização subcelular revelou que a maioria das SsAQPs está localizada (de forma geral) na membrana plasmática (MP), apresentando seis domínios transmembranares. Todas as TIPs foram localizadas na membrana do vacúolo (V). Outras SsAQPs (SsPIP1.1; SsNIP1.1, SsNIP1.2, SsMIP1_Rhiz e SsMIP3_Rhiz), além da localização na membrana plasmática, também apresentaram localização vacuolar (Tabela suplementar 2).

Ancoragem das SsAQPs nos genomas de *A. duranensis* e *A. ipaensis*

O alinhamento dos 51 transcritos de *S. scabra* contra os cromossomos virtuais de *Arachis* (Fig. 6) revelou 40 homólogos em *A. duranensis* (Fig. 6A) e 42 em *A. ipaensis* (Fig. 6B) distribuídos em nove dos 10 cromossomos (Chr) presentes nas espécies, sendo o cromossomo 1 (em ambas) o único que não teve sequência ancorada. Por sua vez, o cromossomo 3 apresentou o maior número de transcritos ancorados: 12 *loci* em ambas as espécies. Os cromossomos 2, 6 e 8, foram os menos representativos em *A. duranensis*, com dois *loci* cada. Já em *A. duranensis*, o cromossomo 2 apresentou apenas um *loci*.

Quanto à posição relativa das sequências nos cromossomos de *A. duranensis* e *A. ipaensis*, verificou-se que a maior densidade de *loci* correspondentes a AQPs em *S. scabra* estava concentrada nas regiões terminais dos cromossomos das espécies citadas (Fig. 6).

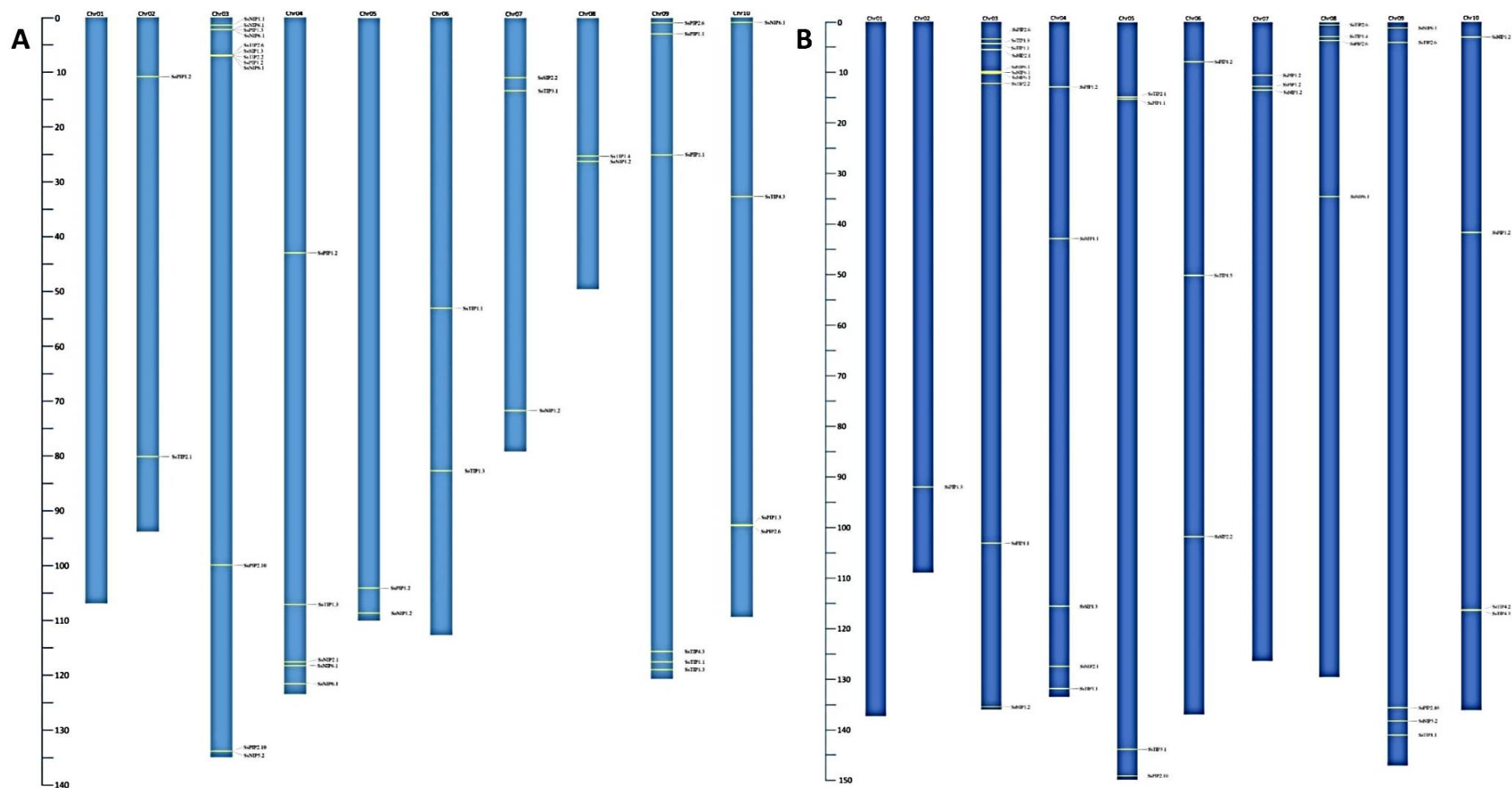


Figura 6: Distribuição das SsAQPs no genoma de *Arachis duranensis* (2n = 10) **(A)** e de *A. ipaensis* (2n = 10) **(B)**. Os cromossomos são representados por barras azuis, e os *loci* ancorados são mostrados por traços amarelos em regiões cromossômicas de homologia. A escala à esquerda de cada idiograma virtual representa o tamanho dos cromossomos em Mpb (Mega pares de base).

Genes normalizadores de *S. scabra*

A identificação de normalizadores (=genes referência; GR) em *S. scabra* foi realizada por meio de uma triagem de dez candidatos previamente selecionados. Todos os pares de *primers* avaliados por RT-qPCR resultaram em amplificações únicas, em todas as amostras de *S. scabra*, demonstrando especificidade do *primer*. O ciclo de quantificação (Cq) entre os candidatos variou de 19,53 (serine; *serine decarboxylase 1 - Arachis ipaensis*) a 26,55 (NEED; *NEDD8 ultimate buster 1 isoform X2 - Arachis ipaensis*) sob estresse de déficit hídrico na raiz.

A estabilidade dos candidatos a GRs foi avaliada levando em consideração todos os tempos experimentais (6, 24 e 48 h de suspensão de rega e 6 h de reidratação do tecido radicular), através do algoritmo geNorm. Todos os dez genes selecionados alcançaram alta estabilidade de expressão, com valores abaixo do limite padrão ($M = 1,5$). A estabilidade média da expressão é calculada por meio do valor de M, quanto menor, mais estável é o gene. Na Fig. 7 estão representados os dados de estabilidade dos GRs, sendo UBQ10, F-Fox, β -Tub_2, Alcd3, Serine, ACD11, Kinase, NEED8, BAG6, Met16 (Fig. 7A), de maior para menor estabilidade.

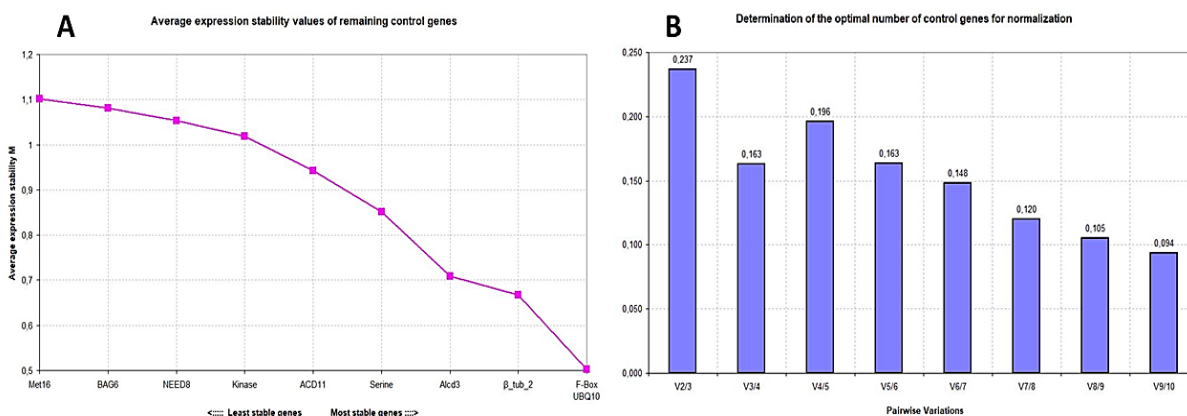


Figura 7: Análise do geNorm. **A.** Estabilidade média da expressão (Valor M) de dez genes candidatos a normalizadores em *S. scabra* sob estresse de déficit hídrico em raiz. β -TUB (beta-tubulina); FBOX (proteína F-box); UBQ10 (polibiquitina 10); Alcd3 (álcool desidrogenase 3); Serine (serina descarboxilase 1); ACD11 (ligação de ACD111); Kinase (quinase tipo receptor regulada por cálcio/calmodulina 1); NEED (proteína NEDD8); BAG6 (proteína BAG6 rica em prolina X1) e Met16 (proteína do tipo metiltransferase 16).

A análise de variação “par a par” (valor V) revela o número ótimo de genes de referência a ser considerado no ensaio em questão. O valor V3 / 4 (0,163) para o conjunto global de dados (quatro tratamentos), sendo um pouco maior que o recomendado como ponto de corte ideal ($V = 0,150$) (Fig. 7B). No entanto, de acordo com Vandesompele et. al. (2002), mesmo o valor V estando acima do ponto de corte, a utilização dos três melhores GRs, é na maioria dos casos a

estratégia de normalização válida, culminando em resultados precisos e confiáveis, comparativamente ao uso de apenas um gene de referência. Alguns autores também têm considerado a utilização da combinação dos três melhores GRs com valores de variação par a par acima de 0,15 (Vieira et al., 2011; Zhang et al., 2013).

A partir das análises do geNorm, foi possível eleger UBQ10 (M = 1,039), F-Fox (M = 1,003), e β -Tub_2 (M = 1,025) como a melhor combinação de *primers* para as análises de expressão gênica em *S. scabra* sob déficit hídrico. Os dois últimos (F-Fox e β -Tub_2) foram recentemente descritos como excelentes normalizadores em *Vigna unguiculata* sob estresse de salinidade, além do gene β -Tub_2 apresentar alta estabilidade na mesma espécie, sob desidratação radicular (Amorim, et al., 2018).

Expressão diferencial *in silico* (RNA-Seq) de SsAQPs sob déficit hídrico

Na comparação controle (irrigado; sem supressão de rega) *versus* tratado (déficit hídrico) verificou-se que a maioria das SsAQPs (46 das 51) apresentou expressão modulada após 6 e 24 h supressão de rega. Apenas uma foi exclusiva para a condição 6 h, enquanto que na condição de 24 h quatro foram exclusivas (Fig. 8).

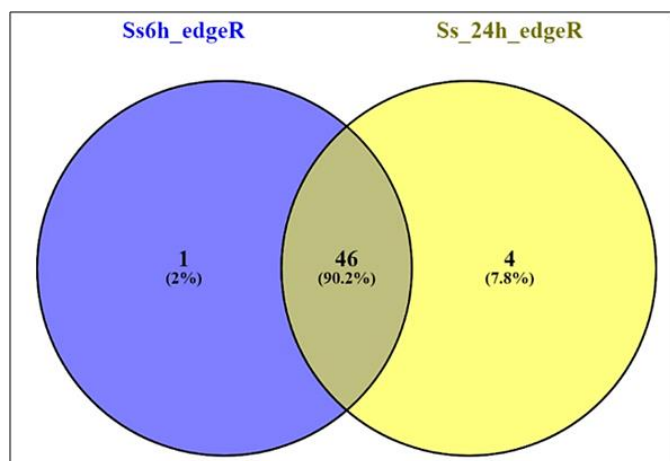


Figura 8: Diagrama de Venn demonstrando o número de candidatos a genes codificantes de aquaporinas diferencialmente expressos em *S. scabra*, frente a comparação controle (irrigado) vs tratado (déficit hídrico), nos dois tempos (6 e 24 h) após a suspensão de rega. O círculo azul e o amarelo correspondem aos transcritos nos tempos 6 e 24 h, respectivamente, enquanto a intersecção de ambos representa os que foram expressos em ambos os tratamentos.

Um perfil de expressão gênica *in silico* por clusterização hierárquica foi construído baseado nos valores de log₂FC dos 51 transcritos (SsAQPs) obtidos por RNA-Seq (Fig. 9). Diante disso, observou-se o agrupamento das sequências em dois grandes grupamentos (*clusters*), tendo os *clusters* 1 e 2, agrupado 28 e 23 membros de SsAQPs, respectivamente. No *cluster* 1 foram agrupadas a maioria das SsAQPs com regulação negativa, e no *cluster* 2, com

regulação positiva. De acordo com o transcriptoma, 11 SsAQPs apresentaram expressão gênica diferencial no tecido radicular de *S. scabra*, frente ao déficit hídrico aplicado.

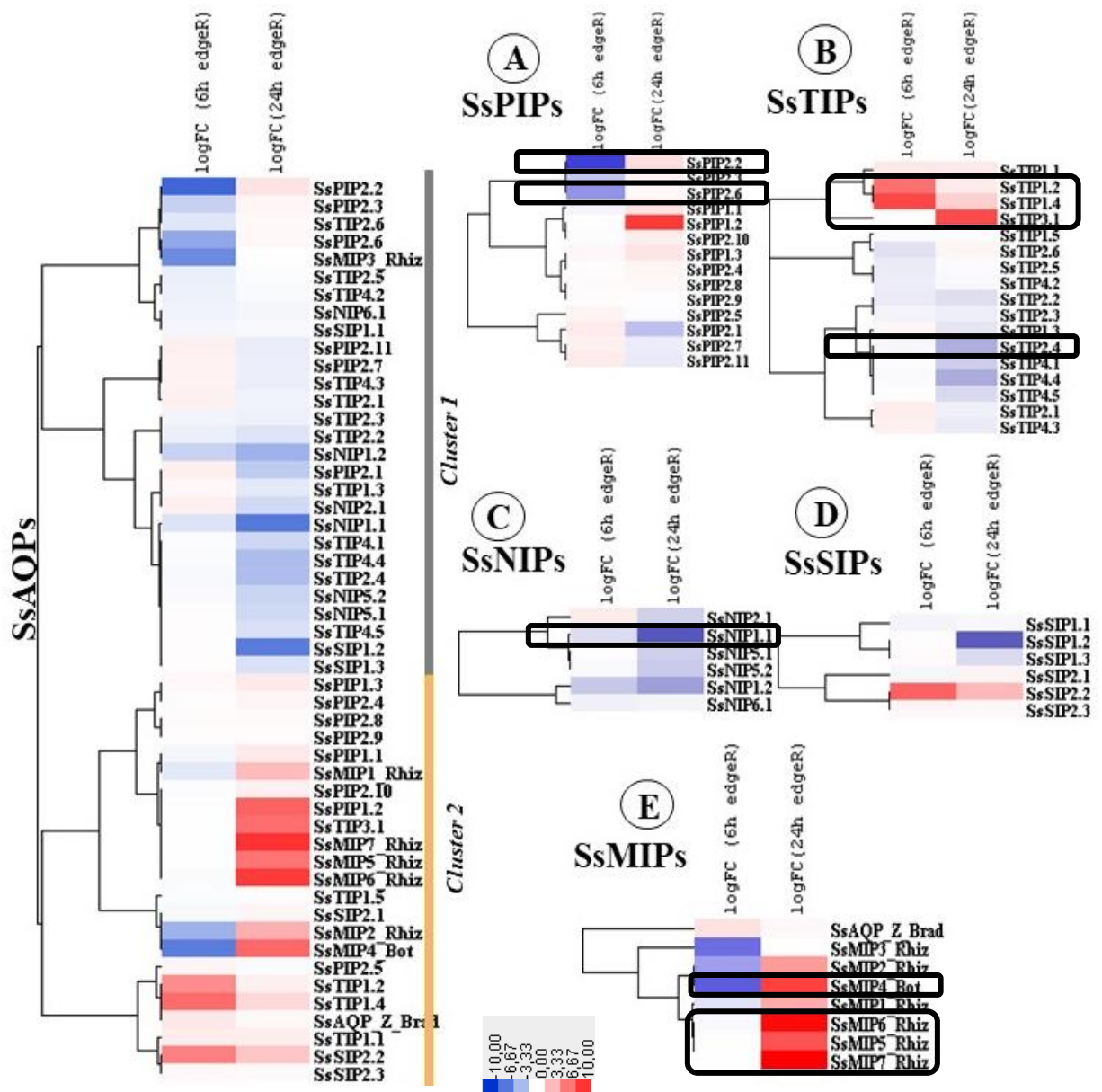


Figura 9: Perfis de expressão gênica de aquaporinas candidatas (AQPs) no tecido radicular de *S. scabra* sob déficit hídrico, seguindo o agrupamento hierárquico de acordo com o programa CLUSTER3.0. As sequências foram nomeadas considerando as iniciais da espécie *Ss* (*Stylosanthes scabra*), seguindo pela subfamília PIP (proteína intrínseca da membrana plasmática), TIP (proteínas intrínsecas de tonoplasto), NIP (proteínas intrínsecas tipo NOD26) ou SIP (pequenas proteínas intrínsecas básicas). Os tempos sequenciados pela tecnologia RNA-Seq foram 6 h e 24 h de supressão de rega. A sigla SsAQPs representa a expressão gênica das 51 SsAQPs agrupadas em dois clusters (*clusters* 1 e 2). A, B, C, D e E correspondem aos perfis de expressão gênica das subfamílias, PIP, TIP, NIP, SIP e MIP, respectivamente. Os retângulos pretos representam os genes diferencialmente expressos, quando comparados controle vs estresse nos tratamentos analisados.

Ao comparar o controle (irrigado) com o estressado (déficit hídrico) no tratamento 6 h de supressão de rega, apenas um transcrito mostrou-se induzido, com confiabilidade estatística significativa, enquanto três foram regulados negativamente (SsMIP4_Bot; PIP2.2 e PIP2.6) (Tabela 3). Para o tratamento 24 h, foi detectado um maior nível de expressão gênica diferencial, onde seis transcritos tiveram sua expressão regulada positivamente, enquanto dois (SsTIP2.4 e SsNIP1.1) foram modulados negativamente.

A partir do *heatmap* gerado, pode-se observar um agrupamento hierárquico de acordo com o nível de expressão gênica, onde o *cluster* 1 agrupou os transcritos que tiveram expressão reprimida [PIP2.2 e PIP2.6 (6 h) e TIP2.4 e NIP1.1 (24 h)]. Por outro lado, o *cluster* 4 agrupou todos os transcritos induzidos (SsMIP7_Rhiz; SsMIP4_Bot; SsMIP6_Rhiz; SsTIP3.1; SsPIP1.2 e SsMIP5_Rhiz (24 h), e SsTIP1.4 (6 h)]. Curiosamente, quando submetido à supressão de irrigação, SsMIP4_Bot mostrou-se reprimido no tratamento 6 h, mas após 24 h de déficit hídrico, a mesma teve a sua expressão induzida, indicando uma modulação de expressão desencadeada pelo estresse aplicado.

Tabela 3: Aquaporinas candidatas diferencialmente expressas ($p < 0,05$) frente ao déficit hídrico, comparativamente ao controle irrigado no transcriptoma de *S. scabra* (SsAQPs). Transcritos *up*- e *down*-regulados são demonstrados (em negrito) pelos valores positivos e negativos, respectivamente.

Transcrito (ID)	SsAQPs (ID)	6h_CA x DF log_FC	edger. p-value	24h_CA x DF log_FC	edger. p-value
TRINITY_DN110464_c0_g1_i1	SsMIP7_Rhiz	nf	nf	10,43311186	8,29E-05
TRINITY_DN124506_c0_g1_i4	SsMIP4_Bot	-6,334299701	0,001468044	7,377877942	0,0005993
TRINITY_DN114950_c0_g1_i1	SsMIP6_Rhiz	-0,128420249	1	9,559767299	0,00137255
TRINITY_DN20367_c0_g1_i1	SsTIP3.1	nf	nf	7,077690912	0,015990859
TRINITY_DN123301_c0_g1_i3	SsTIP2.4	-0,23530317	0,811357128	-3,102796856	0,017597925
TRINITY_DN97814_c0_g1_i1	SsPIP1.2	nf	nf	7,672867795	0,022740227
TRINITY_DN102991_c0_g2_i1	SsMIP5_Rhiz	nf	nf	6,696350687	0,023366514
TRINITY_DN112170_c0_g1_i1	SsNIP1.1	-1,274733405	0,578321503	-6,522170628	0,028081989
TRINITY_DN119865_c0_g2_i4	SsTIP1.4	7,168295867	0,00030535	1,774396692	0,133895035
TRINITY_DN122014_c1_g1_i12	SsPIP2.2	-7,44371898	0,01355736	1,222049522	0,673215854
TRINITY_DN122014_c1_g1_i9	SsPIP2.6	-4,206376363	0,031384782	0,201640565	0,898278191

*Identificação; CA, controle; DF, déficit hídrico; FC, *fold change*. Transcritos induzidos em vermelho e reprimidos em azul.

Expressão gênica diferencial de SsAQPs via RT-qPCR

Com base nos transcritos de *S. scabra* diferencialmente expressos, 11 pares de *primers* foram desenhados: quatro para a subfamília TIP, três para PIP, e quatro para SsMIPs (Tabela 4).

O tamanho dos *amplicons* variou de 111 a 185 pb (para SsMIP2_Rhiz e para SsMIP1_Rhiz, respectivamente). Todos os *primers* foram testados no cDNA do tecido radicular de *S. scabra*.

Tabela 4: Lista de *primers* desenhados para genes candidatos à aquaporinas em *S. scabra*, com expressão gênica diferencial (*in silico*). Abreviações: UP – *up regulated* (induzido); Down – *down regulated* (reprimido); 6 h – Biblioteca de RNA-Seq após 6 h de supressão de rega; 24 h – Biblioteca de RNA-Seq após 24 h de supressão de rega.

Nome do <i>primer</i>	Sequência (5'-3')	Regulação Gênica	Biblioteca de RNA-Seq	Tamanho do <i>Amplicon</i> (pb)
SsMIP1_Rhiz	(F) TCAATAGGAGAGCGGTGGAG (R) AGCCGCCAAATTCTCTAACC	UP	24 h	185
SsMIP_Botry	(F) TCACGAGCAGTGTTGAGGAC (R) CGTGTGCTGTTTCATCCTTG	Down / UP	6 h / 24 h	159
SsMIP2_Rhiz	(F) CATGCCGAAATGTAGAGCAG (R) TGCTGCGTATTCCAATCAAG	UP	24 h	111
SsTIP3	(F) GCAAGTGCTAGTGCCAACAG (R) GAGGGTTGATGAGGCAACAC	UP	24 h	165
SsTIP2.4	(F) TCCACTGACAACAGCAGGTC (R) TATGCAACAGCAGCAGATCC	Down	24 h	156
SsPIP1	(F) AAACGAAGGTGCCAACAATC (R) TGGAGCTGGAGTGGTTAAGG	UP	24 h	128
SsMIP3_Rhiz	(F) TCGGTGATGAGCCCTAGTTC (R) CAACTTCTGGTGGGCATTTC	UP	24 h	169
SsNIP1	(F) TTTCTGATGGAAGCGAAAGC (R) ACAACGACTACGGGAAGCAG	Down	24 h	145
SsTIP1.4	(F) TGCAGATGTTTCGAGTCCAG (R) CATGTCAACCCTGCTGTCAC	UP	6 h	150
SsPIP2.2	(F) AATTTTCAGCACCCAAAGCAG (R) CTATACATCGTGGCGCAGTG	Down	6 h	147
SsPIP2.6	(F) AAGGAACAACCCGAACGTC (R) TGATGGTGTGGAATCTTGG	Down	6 h	124

Inicialmente foi realizada uma triagem para definir a concentração ideal dos *primers* (0,2 a 0,5 μ M), considerando-se o ciclo inicial de detecção de amplificação. Dos 11 pares de *primers* desenhados, para aquaporinas candidatas com expressão gênica diferencial, sete amplificaram produto específico. Esses sete, foram analisados quanto à sua eficiência de amplificação em triplicatas técnicas e *bulks* de cDNA das amostras relativas ao déficit hídrico e seus respectivos controles, considerando o cDNA concentrado e três diluições seriadas (1:10, 1:100, 1:1.000). Destes, quatro transcritos, apresentaram eficiência na amplificação, sendo membros pertencentes às subfamílias PIP (SsPIP2.6; SsPIP2.2) e TIP (SsTIP1; SsTIP2), com valores de eficiência de 92,2%, 95,02%, 108,3% e 105,67% respectivamente (Tabela 5). Os mesmos foram avaliados na quantificação relativa a partir de cDNAs, considerando os quatros tratamentos experimentais (6, 24, 48 h de supressão de rega e 6 h após a reidratação), sob

condições normais e estresse, utilizando a combinação determinada de genes de referência UBQ10, Beta-tubulina 2 e F-Box.

Tabela 5: Eficiência de amplificação dos genes candidatos à aquaporinas em *S. scabra*. Legenda: SsPIP (Ss, *Stylosanthes scabra*; PIP, Proteínas Intrínsecas à Membrana Plasmática); SsTIP (Ss, *Stylosanthes scabra*; TIP, Proteínas Intrínsecas ao Tonoplasto).

Alvos	Transcrito	Eficiência
SsPIP2.6	TRINITY_DN122014_c1_g1_i9	92,2 %
SsPIP2.2	TRINITY_DN122014_c1_g1_i12	95,02%
SsTIP1	TRINITY_DN119865_c0_g2_i4	108,3 %
SsTIP2	TRINITY_DN123301_c0_g1_i3	105,67 %

A tabela 6 apresenta os níveis de expressão relativa, referentes aos genes alvo, mediante os diferentes tratamentos entre controles e condições de estresse. Analisando as comparações entre às condições de estresse em relação ao controle nos tratamentos 6 h (T6hC6h) e no 24 h (T24hC24h), pôde-se observar que três alvos não apresentaram expressão gênica diferencial significativa (ns), com exceção do alvo SsTIP2 (SsTIP2.4), que teve a sua expressão reprimida no tempo de 24 h, corroborando com resultados observados por meio da tecnologia de RNASeq (Tabela 3).

Tabela 6: Dados de expressão gênica dos genes alvo, obtidos a partir do programa REST2009, entre as diferentes combinações: T6hC6h (tratamento com déficit hídrico 6 h contra o seu respectivo controle), T24hC24h (tratamento com déficit hídrico 24 h contra o seu respectivo controle), T48hC48h (tratamento com déficit hídrico 48 h contra o seu respectivo controle), T6hRC6hR (tratamento 6 h após a reidratação contra o seu respectivo controle) utilizando-se como genes de referência UBQ10, Beta-tubulina 2 e F-Box.

Alvos	Transcrito (RNAseq)	Expressão relativa							
		T6hC6h		T24hC24h		T48hC48h		T6hRC6h	
SsPIP2.6	TRINITY_DN122014_c1_g1_i9	1,028	ns	1,298	ns	2,704	Up	1,454	ns
SsPIP2.2	TRINITY_DN122014_c1_g1_i12	0,963	ns	0,762	ns	1,33	ns	1,987	Up
SsTIP1.4	TRINITY_DN119865_c0_g2_i4	1,164	ns	1,164	ns	2,817	Up	0,242	Down
SsTIP2.4	TRINITY_DN123301_c0_g1_i3	0,511	ns	0,301	Down	0,117	Down	2,133	Up

Comparando-se a condição de estresse em relação ao controle no tratamento 48 h (T48hC48h) observa-se que os alvos PIP2.6 e TIP1 apresentaram superexpressão gênica cerca de três vezes mais, comparativamente aos seus respectivos controles (Tabela 6), indicando uma resposta tardia dessas SsAQPs frente ao déficit hídrico. Por sua vez, SsPIP2.2 não apresentou

regulação significativa, e SsTIP2 seguiu a tendência de diminuição da expressão gênica frente ao maior tempo de exposição ao déficit hídrico, como mostrado pela tecnologia do RNASeq (Tabela 3). Ao analisar a condição comparativa entre o tratamento de 6 h após a reidratação e seu controle (T6hRT6hR), observou-se que o alvo PIP2.6 não apresentou modulação significativa na sua expressão, enquanto o alvo TIP1, teve a sua expressão reduzida, com *fold-change* 0,242 e os alvos SsPIP2.2 e SsTIP2 tiveram suas expressões gênicas induzidas, o que pode indicar que esses membros estejam associados ao transporte de água nas raízes de *S. scabra*. Vale salientar que isoformas do mesmo transcrito (SsPIP2.2 e SsPIP2.6) apresentaram regulações distintas.

A SsPIP2.6 mostrou um padrão de expressão nas raízes como resultado da imposição do déficit hídrico. Este padrão foi primeiramente caracterizado por uma manutenção da sua expressão nos tratamentos iniciais (6 h e 24 h), seguido por um aumento da sua expressão em plantas submetidas ao estresse máximo aplicado, 48 h de supressão de rega (Fig. 10A). Após 6 h da reidratação (Fig. 10B), a mesma retomou a sua expressão para valores não significativos. A SsTIP1, apresentou o mesmo padrão de expressão que SsPIP2.6 (Fig. 10A), com exceção no tratamento 6 h após a reidratação, onde a mesma apresentou uma regulação negativa (Fig. 10B), o que pode estar associado com a seletividade do substrato. SsPIP2.2 quando submetida aos tempos de estresse, manteve a sua expressão gênica, enquanto, SsTIP2, teve uma diminuição da expressão nos tempos de 24 h (Fig. 10C) e 48 h (Fig. 10D) de déficit hídrico. No entanto, ambos apresentaram expressão induzida após um curto período de reidratação (Fig. 10E). Dessa forma, observou-se que *S. scabra* quando submetida ao estresse máximo, modulou a regulação de quatro candidatos a genes codificantes de aquaporinas de maneira significativamente maior do que os valores observados nos controles (Fig. 10).

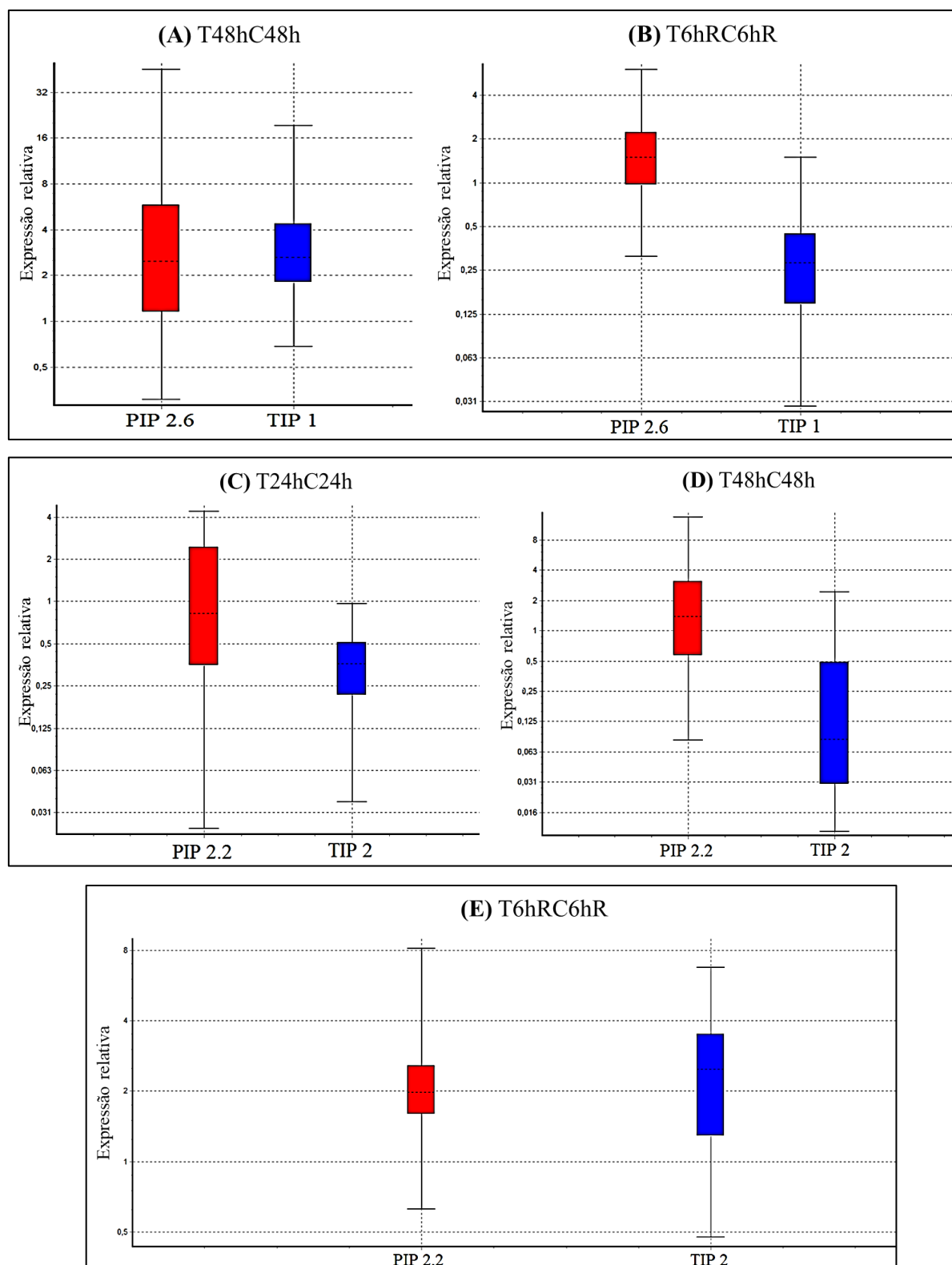


Figura 10: Representação gráfica dos níveis de expressão relativa dos genes alvo, obtidos a partir do programa REST2009, entre as diferentes combinações: T24hC24h (tratamento com déficit hídrico 24 h contra o seu respectivo controle), T48hC48h (tratamento com déficit hídrico 48 h contra o seu respectivo controle), T6hRC6hR (tratamento 6 h após a reidratação contra o seu respectivo controle) utilizando-se como genes de referência UBQ10, Beta-tubulina 2 e F-Box. Na vertical está demonstrada a taxa de expressão dos genes.

Discussão

Diversidade das SsAQPs e ausência de XIP em *S. scabra*

O quantitativo de 51 aquaporinas candidatas identificadas em *S. scabra* foi similar ao relatado para *Hevea brasiliensis* (51) (Zou *et al.*, 2015), *Populus trichocarpa* (58) (Gupta & Sankararamakrishnan, 2009), *Brassica rapa* (57) e *Brassica oleracea* (57) (Sonah *et al.*, 2017). Porém, quando comparado com outras espécies houve um maior número de isoformas do que por exemplo o abacaxi (*Ananas comosus* L.) com 23 (Bezerra-Neto *et al.*, 2018), o grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) com 40 (Deokar & Tar'na, 2016) e o feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*) com 41 (Ariani e Gepts, 2015). Porém o número observado foi inferior ao de algodão (*Gossypium* spp.) com 71 (Park *et al.*, 2010), da soja (*G. max*; 84) (Deshmukh *et al.*, 2013) e no nabo (*Brassica napus*; 120) (Sonah *et al.*, 2017), sendo essa última a espécie com maior número de aquaporinas relatadas até o momento. Apesar das 51 AQPs de *S. scabra* compreender um número comparável ao descrito para outras espécies, acredita-se que este esteja subestimado, tendo em vista que este estudo foi conduzido apenas com o transcriptoma da raiz e não com o genoma completo. Sonah e colaboradores (2017) analisaram o primeiro genoma poliploide completamente sequenciado de *B. napus* e mostraram que as duplicações recentes do genoma da espécie resultaram em um maior número de AQPs com praticamente nenhuma perda após a duplicação, indicando que há uma correlação positiva entre o tamanho do genoma, a dosagem de genes e o número de aquaporinas.

As aquaporinas são classificadas em subfamílias, sendo relatada a existência de até sete subfamílias, quando incluídos vegetais mais primitivos (briófitas e pteridófitas). Em *S. scabra* foram identificadas quatro subfamílias principais de AQPs (PIP, TIP, NIP e SIP), de forma semelhante ao observado na leguminosa grão-de-bico (*C. arietinum* L.) (Deokar & Tar'na, 2016) e em sete espécies pertencentes à família Brassicaceae (Sonah *et al.*, 2017). Já em estudos realizados com *G. max*, *Gossypium* spp., *Citrus sinensis* L. Osb., e *P. vulgaris* (Park *et al.*, 2010, Deshmukh *et al.*, 2013; Ariani & Gepts, 2015; Martins *et al.*, 2015) cinco subfamílias foram reportadas, incluindo a XIP, a qual não foi identificada neste estudo em *S. scabra*. Segundo Sonah e colaboradores (2017), a perda dessa subfamília em espécies de Brassicaceae sugere que as funções das XIPs foram compartilhadas ou providas por outras AQPs, ou ainda que foram de menor importância, o que poderia justificar a sua ausência em *S. scabra*, pelo menos considerando o tecido e a condição analisados. Uma maior segurança sobre a ausência ou

presença de XIP em estilosantes apenas será possível após o sequenciamento de seu genoma completo.

Oito transcritos classificados no grupo MIP apresentaram maior identidade com AQPs de fungos e de bactéria, indicando uma relação ecológica benéfica, visto que estudos relatam um papel regulador, inovador e fundamental para AQP de fungos em interação simbiótica. Navarro-Ródenas et al. (2015) observaram que uma aquaporina de *Laccaria bicolor* (LbAQP1) atua como um canal de sinalização molecular, essencial para o desenvolvimento da rede de *Hartig* (“*hartig net*” refere-se a uma rede de hifas que se estende até a raiz, penetrando entre as células epidérmicas e corticais de plantas ectomicorrízicas) nas pontas das raízes de *Populus tremuloides*. No entanto, até o momento não se tem clareza da contribuição das aquaporinas fúngicas para o transporte aquático da micorriza com os próprios fungos, bem como com a relação planta-água. Segundo alguns trabalhos, a expressão de aquaporinas fúngicas parece ser beneficiada na associação micorrízica e sob condições de déficit hídrico (Dietz et al. 2011; Navarro-Ródenas et al. 2012; Li et al. 2013), suportando assim evidências da importância das aquaporinas fúngicas sobre o movimento da água em plantas micorrizadas (Navarro-Ródenas et al., 2015).

Resíduos conservados em aquaporinas de plantas

Os motivos NPA demonstram estar envolvidos na especificidade do substrato das aquaporinas, bem como no papel de localização da proteína membrana (Guan et al., 2010; Eriksson et al., 2013). Vários estudos corroboraram que as modificações nas regiões conservadas de NPA são mais acentuadas para as subfamílias NIP e SIP (Gomes et al., 2009; Sonah et al., 2017; Shivaraj et al., 2017a). Contudo, alterações podem ser relatadas nas demais subfamílias, embora em uma frequência muito baixa (Shivaraj et al., 2017a). O motivo NPA do *loop* LE da subfamília NIP em *S. scabra* apresentou uma mutação onde a alanina foi substituída por uma valina, sendo esse resíduo compatível com o transporte de formamida, ureia e glicerol, apresentando baixos níveis de transporte de água, indicando que tal substituição de resíduos afeta mais intensamente a capacidade de transporte de água, apresentando pouco efeito na seletividade do soluto (Forrest & Bhavé, 2007).

Os filtros de seletividade (ar/R) identificados em todos os membros da subfamília PIP foram altamente conservados em *S. scabra*, apresentando o padrão: fenilalanina, histidina, treonina, e arginina, correspondentes às posições H2, H5, LE1 e LE2, respectivamente, o qual tem sido confirmado em diferentes espécies de plantas (Deokar & Tar'na 2016; Shivaraj et al., 2017b; Sonah et al., 2017). Shivaraj e colaboradores (2017a) relataram a ausência do resíduo

fenilalanina ou qualquer outro aminoácido conservado na posição H2 para algumas PIP em linho. Contudo, esse padrão conservado (exibido pelas PIPs de espécies vegetais) apresenta um filtro de seletividade ar/R muito hidrofílico - uma característica registrada em AQPs transportadoras de água, em contraste com as outras famílias (Shivaraj et al., 2017b). Os padrões conservados identificados para TIPs estão bem descritos, apresentando variações de acordo com as diferentes subfamílias. Maiores variações são relatadas para as subfamílias NIP e SIP (Shivaraj et al., 2017a; Deokar & Tar'na 2016; Shivaraj et al., 2017b; Sonah et al., 2017). Mutações nas regiões dos filtros de seletividade (ar/R) alteram a capacidade de transporte destas proteínas (Ariani & Gepts, 2015).

Dentre os membros da subfamília NIP, o grupo NIP2 teve uma isoforma (SsNIP2.1) expressa em *S. scabra*, consequentemente destaca-se a possível presença de aquaporinas do grupo NIP-III, as quais estão associadas ao transporte de silício, estando esse soluto relacionado com benefícios na fertilização de plantas. A presença desses transportadores é incomum em dicotiledôneas, como relatado para famílias Brassicaceae e Solanaceae, as quais são consideradas culturas com baixos níveis de acúmulo de silício (Ma et al., 2006; Deshmukh et al., 2015; Sonah et al., 2017). Por outro lado, a maioria das monocotiledôneas apresenta benefícios devido ao acúmulo de silício. Em sorgo (*Sorghum bicolor*), por exemplo, foi verificada uma alta silicificação endodérmica da raiz, a qual poderia estar associada a uma maior resistência à seca (Lux et al., 2002). Assim, a presença desse grupo em *S. scabra* e, considerando o estresse ao qual essa planta foi submetida (déficit hídrico), seria plausível associar a NIP-III como uma estratégia adotada na tolerância à deficiência de água.

Quanto ao 5º filtro de seletividade (descrito recentemente na literatura) foi observada a presença de aminoácidos semelhantes em *B. napus*. Além disso, foi descrito o aminoácido tirosina (Y) em BnTIP5 (Sonah et al., 2017), grupo não identificado para *S. scabra*. Em *Arabidopsis* também foi verificada uma conservação do resíduo de histidina em todas as isoformas de TIP2, havendo a substituição por fenilalanina nos grupos TIP1 e TIP3. Contudo, a presença de uma F na posição LC no *loop* C também é capaz de direcionar estericamente a arginina na posição HE na hélice E para o lado do poro, embora, fornecendo um ambiente mais hidrofóbico neste filtro de seletividade (Kirscht et al., 2016).

Propriedades bioquímicas das aquaporinas de *S. scabra* e de outras espécies vegetais

As propriedades bioquímicas das AQP de plantas estão associadas às diferentes características de suas funções (Hove & Bhawe, 2011). Assim como relatado no presente estudo, Sonah et al. (2017) observaram que os menores valores médios foram reportados para a

subfamília TIP (PM = 26 kDa e pI = 5,6) das aquaporinas de canola (*B. napus*). Além disso, eles observaram uma média similar para os membros pertencentes à subfamília PIP (29,8 KDa). Porém, ao verificar o peso molecular da subfamília SIP, observa-se um valor inferior ao identificado neste estudo. Outros trabalhos também revelaram um pI relativamente menor para os membros pertencentes ao grupo das proteínas vacuolares, quando comparadas às outras subfamílias de aquaporinas em *A. thaliana* (Carter et al., 2004) e grão-de-bico (*C. arietinum* L) (Deokar & Tar'na 2016). Ao se considerar o pI percebeu-se que a maioria das proteínas pertencentes às subfamílias PIP, NIP e SIP apresentaram um pH mais próximo de básico, enquanto que as TIPs exibiram um pH mais ácido, resultados esses semelhantes aos de análises realizadas com membros da família Brassicaceae (Sonah et al., 2017).

Distribuição genômica de aquaporinas em *Arachis* spp.

Estudos têm revelado que a distribuição dos genes de AQPs nos cromossomos de plantas é bastante irregular. Assim, como observado no presente estudo para *S. scabra*, a maioria dos genes de AQPs está restrita a poucos cromossomos, onde apenas o cromossomo 3 suporta 30 % dos genes mapeados nos genomas de *A. duaranensis* e *A. ipaensis*. Sonah et al., (2017) também observaram que a maioria das AQPs ancoradas no genoma de *B. napus* estava localizada no cromossomo 3. Foi verificado um alto grau de sintenia entre as AQPs de *S. scabra* e aquelas do gênero *Arachis*. Tal similaridade era esperada, visto tratar-se do gênero mais próximo filogeneticamente da espécie aqui estudada (Stappen et al., 2002). Ao analisar a sintenia entre espécies pertencentes a família Brassicaceae, observou-se a distribuição irregular desses genes, sendo o cromossomo 3 o que apresentou o maior número de *loci* em *A. thaliana*, *B. rapa* e *B. oleracea* (Bezerra-Neto et al., 2018). Apesar dessa maior colinearidade de genes de AQPs no cromossomo 3 de diferentes espécies, ainda não é bem compreendida, sendo necessário mais estudos a fim de elucidar a relação do cromossomo 3 com o transporte de solutos nas plantas.

Os genes codificantes de AQPs tendem a se organizar em agrupamentos (*clusters*), muitas vezes formando superaglomerados. Acredita-se que os eventos de duplicação segmental sejam responsáveis pelo surgimento das repetições ao longo de cada cromossomo (revisado por Panchy et al., 2016). Regiões conservadas observadas neste estudo, também foram relatadas em outros estudos, onde descreveram a existência de uma maior prevalência de genes de AQPs nas regiões terminais e subterminais dos cromossomos (Sonah et al., 2017; Bezerra-Neto et al., 2018), fato que pode estar relacionado com a variabilidade genética presente na família gênica de aquaporinas, visto que essas regiões são mais ricas em genes nas angiospermas, como

observado por exemplo no genoma da soja (Schmutz et al, 2010), sendo consideradas mais propícias à ocorrência de mutações (Lambling et al., 2017).

Expressão gênica de AQPs de plantas sob estresse abiótico

Diversos trabalhos analisando a expressão de genes codificadores relatam a modulação do transcriptoma da planta, sob condições ambientais específicas, como revisado por Bezerra-Neto et al. (2018). A resposta da planta em nível transcricional de genes codificantes de AQPs é complexa e requer modulação diferencial e específica da permeabilidade à água da membrana, podendo resultar a ativação de isoformas específicas. Como revisado por Forrest & Bhavé (2007), há um padrão muito conflitante de expressão de AQP em diferentes espécies de plantas.

A regulação do transporte de água por meio de AQPs é complexa e envolve diferentes mecanismos e fatores, ocorrendo de maneira específica e dependente de diversas variáveis, incluindo a resposta hormonal e o tipo de estresse ambiental, como déficit hídrico, salinidade e ataque de patógenos, entre outros. Genes codificantes de AQPs podem ser regulados por várias vias de sinalização, tornando difícil a distinção de um padrão de expressão associado a cada AQP variante (Yamada et al., 1997; Hachez & Zelazny, 2006). Sob o estresse da seca, as AQPs podem ser reguladas positiva ou negativamente em diferentes tecidos vegetais (Gálms et al., 2007).

Em uma análise de expressão gênica das AQPs no tecido radicular do linho, por meio de *microarray* e RNA-Seq (Shivaraj et al., 2017a), observou-se que as TIP exibiram menor expressão, enquanto as PIP exibiram maior expressão, semelhante ao observado para as subfamílias PIP e TIP no transcriptoma de *S. scabra*. Sonah et al. (2017) ao analisarem a expressão gênica diferencial (RNA-Seq) de aquaporinas em *B. napus* sob condições de déficit hídrico, observaram um contraste interessante entre os diferentes tecidos das plantas, sendo observado que a expressão global de BnAQPs aumentou duas vezes em folhas, enquanto diminuiu significativamente nas raízes. Ainda nesse estudo verificou-se que dentre os subgrupos pertencentes à subfamília TIP, apenas os membros do grupo TIP1 apresentaram um maior nível de expressão no tecido radicular, sob ambos os tratamentos de controle e seca.

Em folhas de *B. napus* 16 genes apresentaram expressão diferencial frente à restrição hídrica, todos pertencentes às subfamílias PIP e TIP (Sonah et al., 2017). Distintamente, no transcriptoma do presente estudo foram detectados representantes de três subfamílias (PIP, TIP e NIP), além de SsAQPs classificadas como SsMIPs, identificadas em *S. scabra*, entretanto, o quantitativo identificado foi próximo (11 SsAQPs diferencialmente expressas). Por sua vez, em arroz foi verificada uma maior expressão de TIP1.1 nas raízes quando expostas à restrição de

água (Liu *et al.*, 1994), em consonância com o observado no presente trabalho, tanto por meio da técnica de RNASeq (indução no tratamento 6 h – Tabela 3), bem como por RTqPCR, onde um membro do grupo TIP1 teve regulação positiva após 48 h de déficit hídrico (Tabela 6).

Foi observado que três dias após a reidratação das plantas de *Vitis* sp. submetidas ao déficit hídrico por sete dias, todos os genes de AQPs mantiveram seus níveis de expressão constitutivos na raiz, com exceção de TIP2 que diminuiu sua expressão (Gálms *et al.*, 2007). Por sua vez, no presente estudo, o membro pertencente ao subgrupo TIP2 teve um acúmulo na sua expressão, enquanto o membro pertencente no subgrupo TIP1 exibiu regulação negativa após 6 h de reidratação. No entanto, a leguminosa estudada demonstrou uma resposta mais rápida frente aos diferentes estímulos de estresse e reidratação.

Vale ressaltar que as AQPs pertencentes à subfamília PIP estão mais relacionadas ao transporte de água, enquanto que as TIPs, além do transporte de água, também são comumente associadas ao transporte de peróxido de hidrogênio e ureia, como relatado para AtTIP em *Arabidopsis* (Bienert *et al.*, 2007). Acredita-se que os membros dessa subfamília TIP desempenhem funções semelhantes em *S. scabra*. É relevante compreender se as respostas de expressão gênica diferencial observadas influenciam principalmente o transporte de água, ou se elas podem exercer um papel importante associado ao transporte de peróxido de hidrogênio sob condições de estresses abióticos (Kadam *et al.*, 2017). Sabe-se que o peróxido de hidrogênio está envolvido na regulação do crescimento radicular, provavelmente atuando a jusante da auxina (Ivanchenko *et al.*, 2013). Diante do exposto, são necessários mais estudos a fim de compreender o papel desempenhado pela aquaporinas TIP1 em *S. scabra*, visto que Bienert *et al.* (2006) relataram que diferentes padrões de expressão de TIPs podem resultar na manutenção da condutividade hidráulica e/ou alterar a distribuição de peróxido de hidrogênio na raiz.

Gálms *et al.* (2007) observaram que a expressão gênica de aquaporinas está associada com o *status* ecofisiológico, o órgão da planta e a magnitude do estresse abiótico aplicado, podendo este último causar variações drásticas na expressão desses genes. Liu *et al.* (1994) sugerem que a expressão de aquaporinas é sensível ao estresse hídrico como parte do controle da homeostase da planta, apoiando as diferenças observadas na regulação gênica de AQPs em *S. scabra*.

As AQPs identificadas na raiz de *S. scabra* indicam haver uma manutenção da sua expressão nos tempos iniciais de déficit hídrico. No entanto, em um tempo mais tardio após a imposição do estresse observou-se a necessidade de incremento no transporte de água por meio da AQPs induzidas. Diante dessa modulação gênica detectada nas AQPs de *S. scabra*, pode-se

sugerir que as mesmas estão associadas à facilitação do transporte de água, atuando como um mecanismo de resposta ao déficit hídrico.

Conclusões e perspectivas

- Foram identificados 51 transcritos homólogos a aquaporinas nas raízes da Fabaceae *S. scabra*, todos com o domínio conservado MIP íntegro, sob déficit hídrico. Estes parálogos foram agrupados em quatro subfamílias (PIP, TIP, NIP, SIP), além de oito SsAQPs com maior similaridade com MIPs de microrganismos, sendo necessários mais estudos a fim de elucidar a relação entre AQPs de plantas e de microrganismos.
- Não foi observada a presença de membros da subfamília XIP, sob o estresse aplicado.
- Os padrões conversados para os filtros de seletividade variaram de acordo com as subfamílias e grupos.
- As SsAQPs mapeadas nos genomas de *Arachis* (*A. duranensis* e *A. ipaensis*, ambas com $2n = 10$) apresentaram distribuição preferencialmente subterminal, estando ausentes apenas no cromossomo 3 em ambas as espécies. Também se observa semelhança significativa quando comparada a distribuição de AQPs entre as duas espécies, indicando conservação evolutiva.
- Foram identificados três genes de referência (UBQ10, F-Fox e β -Tub_2) adequados para a validação da expressão de transcritos de *S. scabra* sob déficit hídrico em RT-qPCR.
- As SsPIP2.2, SsPIP2.6, SsTIP1 e SsTIP2 tiveram sua expressão modulada durante o déficit hídrico e 6 h após a reidratação, podendo essa regulação estar associada à resposta de tolerância ao estresse aplicado em *S. scabra*.

Os resultados aqui obtidos podem contribuir para um maior entendimento dos mecanismos genéticos associados à resposta ao déficit hídrico, disponibilizando informações novas para os programas de melhoramento genético de *S. sabra* e espécies relacionadas.

Referências

- Agre P, Kozono D. Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases. *FEBS Letters*. 2003; 555(1): 72–78.
- Aharon R, Shahak Y, Wininger S, Bendov R, Kapulnik Y, Galili G, et al. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *The Plant Cell*. 2003; 15: 439–447.
- Ahuja I, De Vos RCH, Bones AM, Hall RD. Plant molecular stress responses face climate change. *Trends in Plant Science*. 2010; 15:664–674.
- Alexandersson E, Frayssé L, Sjövall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, et al. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology*. 2005; 59(3): 469–484.
- Amorim LLB, Ferreira-Neto JRC, Bezerra-Neto JP, Pandolfi V, Araújo FT, Matos MKS. et al. Cowpea and abiotic stresses: Identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. *Plant Methods*. 2018; 14:88.
- Ariani A, Gepts P. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Genetics and Genomics*. 2015; 290: 1771–1785.
- Ariani A, Gepts P. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Genetics and Genomics*. 2015; 290(5):1771–85.
- Bienert GP, Bienert MD, Jahn TP, Boutry M, Chaumont F. Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *The Plant Journal*. 2011; 66: 306–317.
- Bienert GP, Møller AL, Kristiansen KA, Schulz A, Møller IM, Schjoerring JK, et al. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:1183–1192.
- Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006;1758(8):994–1003.
- Brand Y, Hovav R. Identification of Suitable Internal Control Genes for Quantitative Real-Time PCR Expression Analyses in Peanut (*Arachis hypogaea*). *Peanut Science*. 2010, 37(1):12–19.
- Cameron DF, Edye LA, Chakraborty S, Manners JM, Liu CJ, Date RA, et al. An integrated program to improve anthracnose resistance in *Stylosanthes* – a review. In: M. Asghar (Ed.), *Proc 8th Australian Agronomy Conference*. 1996; 112–115.

- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *The Plant Cell*. 2004; 16: 3285–3303.
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiology*. 2001; 125: 1206–1215.
- Chaumont F, Moshelion M, Daniels MJ. Regulation of plant aquaporin activity. *Biology of the Cell*. 2005; 97: 749–764.
- Coates DB, Miller CP, Hendricksen RE, Jones RJ. Stability and productivity of *Stylosanthes* pastures in Australia. I. Animal production from *Stylosanthes* pastures. *Tropical Grasslands*. 1997; 31: 494–502.
- Costa LC, Da-Valls JFM. *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29854>. Acesso em 14 de outubro de 2017.
- Costa NM de S. Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw. Tese, Universidade Técnica de Lisboa. 2006. Disponível em: <http://bibliotecas.utl.pt/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=299250>.
- Cria (Centro de Referência em Informação Ambiental). Species link. *Stylosanthes scabra*. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt>. Acessado Janeiro 2019.
- Danielson JA, Johanson U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biology*. 2008; 8(45): 1–15.
- Deokar AA, Tar'na B. Genome-Wide Analysis of the Aquaporin Gene Family in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Frontiers in Plant Science*. 2016; 7: 1802.
- Deshmukh RK, Vivancos J, Gue'rin V, Sonah H, Labbe C, Belzile F, et al. Identification and functional characterization of silicone transporters in soybean using comparative genomics of major intrinsic proteins in *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology*. 2013; 83: 303–315.
- Deshmukh RK, Vivancos J, Ramakrishnan G, Guérin V, Carpentier G, Sonah H, et al. A precise spacing between the NPA domains of aquaporins is essential for silicon permeability in plants. *Plant Journal*. 2015; 83: 489–500.
- Devi MJ, Sinclair TR, Jain M, Gallo M. Leaf aquaporin transcript abundance in peanut genotypes diverging in expression of the limited-transpiration trait when subjected to differing vapor pressure deficits and aquaporin inhibitors. *Physiologia Plantarum*. 2016; 156: 387–396.
- Dietz S, von Bülow J, Beitz E, Nehls U. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *The New Phytologist*. 2011; 197: 927–940.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998; 95(25):14863–14868.

Eriksson UK, Fischer G, Friemann R, Enkavi G, Tajkhorshid E, Neutze R. Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science*. 20013; 340: 1346–1349.

FAO. Bancos de germoplasma. Foa Fiat Panis. 2017; 1: 1. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/agp/agpc/doc/gbase/data/pf000068.htm>>.

Forrest KL, Bhavé M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Functional & Integrative Genomics*. 2007; 7: 263–289.

Fox AM, Maistriaux L, Chaumont F. Toward understanding of the high number of plant aquaporin isoforms and multiple regulation mechanisms. *Plant Science*. 2017; 264: 179–187.

Galmés J, Pou A, Alsina MM, Tomás M, Medrano H, Flexas J. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. *Planta*. 2007; 226:671–681.

Gomes D, Agasse A, Thiebaud P, Delrot S, Geros H, Chaumont F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009; 1788: 1213–1228.

Gowda BS, Miller JL, Rubin SS, Sharma DR, Timko MP. Isolation, sequence analysis, and linkage mapping of resistance-gene analogs in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). *Euphytica*. 2002; 126: 365–377.

Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin, JZ, Thompson DA, Amit I, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nature Biotechnology*. 2011; 29 (7): 644–652.

Guan XG, Su WH, Yi F, Zhang D, Hao F, Zhang HG, et al. NPA motifs play a key role in plasma membrane targeting of aquaporin4. *IUBMB life*. 2010; 62: 222–226.

Gupta AB, Sankararamakrishnan R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biology*. 2009; 9: 134.

Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, et al. De Novo Transcript Sequence Reconstruction from RNA-Seq Using the Trinity Platform for Reference Generation and Analysis. *Nature Protocols*. 2013; 8 (8): 1494–512.

Hachez C, Zelazny E, Chaumont F. Modulating the expression of aquaporin genes in plants: a key to understand their physiological functions? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1758: 1142–1156.

Hachez C, Zelazny EF. Chaumont modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2006; 1758:1142–56.

Heymann JB, Engel A. Aquaporins: Phylogeny, Structure, and Physiology of Water Channels. *News Physiology Science*. 1999; 14: 187–193.

Hove RM, Bhawe M. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. *Plant Molecular Biology*. 2011; 75: 413–430.

Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nature Methods*. 2015;12: 115–121.

Ivanchenko MG, den Os D, Monshausen GB, Dubrovsky JG, Bednářová A, Krishnan N. Auxin increases the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Annals of Botany*. 2013; 11(2):1107–1116.

Jang JY, Lee SH, Rhee JY, Chung GC, Ahn SJ, Kang H. Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*. 2007; 64: 621–632.

Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Frayssé L, et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*. 2001; 126: 1358–1369.

Kadam S, Abril A, Dhanapal AP, Koester RP, Vermerris W, Jose S. et al. Characterization and Regulation of Aquaporin Genes of Sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] in Response to Waterlogging Stress. *Frontiers in plant science*. 2017; 8:862.

Kirscht A, Kaptan SS, Bienert GP, Chaumont F, Nissen P, Groot BL, et al. Crystal Structure of an Ammonia-Permeable Aquaporin. *PLOS Biology*. 2016; 14: 1–19. e1002411.

Kjellbom P, Larsson C, Johansson II, Karlsson M, Johanson U. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*. 1999; 4: 308–314.

Krogh A, Larsson B, Von Heijne G, Sonnhammer EL. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*. 2001; 305: 567–580.

Lambing C, Franklin FC, Wang CR. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. *Plant Physiology*. 2017; 173:1530–42.

Lewis G, Schire B, Mackinder B, Lock M. Legumes of the World. The Royal Botanic Gardens. 2005; 1: 577.

Liu Q, Umeda M, Uchimiya H. Isolation and expression analysis of two rice genes encoding the major intrinsic protein. *Plant Molecular Biology*. 1994; 26: 2003–2007.

- Ludewig U, Dynowski M. Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet. *Cellular and molecular life sciences*. 2009; 66(19): 3161–75.
- Lux A, Luxová M, Hattori T, Inanaga S, Sugimoto Y. Silicification in sorghum (*Sorghum bicolor*) cultivars with different drought tolerance. *Physiol. Plant*. 2002; 115: 87–92.
- Ma JF, Tamai K, Yamaji N, Mitani N, Konishi S, Katsuhara M. et al. A silicon transporter in rice. *Nature*. 2006; 440: 688–691.
- Martins CPS, Pedrosa AM, Du D, Gonçalves LP, Yu Q, Gmitter FG Jr, et al. Genome-Wide Characterization and Expression Analysis of Major Intrinsic Proteins during Abiotic and Biotic Stresses in Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLOS ONE*. 2015; 10: 1–17.
- Maurel C, Chrispeels MJ. Aquaporins. A Molecular Entry into Plant Water Relations. *Plant Physiology*. 2001; 125(1):135–8.
- Meneses CHSG, Lima LHGM, Lima MMA, Vidal MS. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. *Revista Brasileira Oleaginosas e Fibrosas*. 2006; 10:1039–1072.
- Navarro-Ródenas A, Ruíz-Lozano JM, Kaldenhoff R, Morte A. The aquaporin TcAQP1 of the desert truffle *Terfezia clavaryi* is a membrane pore for water and CO₂ transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 2012; 25: 259–266.
- Navarro-Ródenas A, Xu H, Kemppainen M, Pardo AG, Zwiazek JJ. *Laccaria bicolor* aquaporin LbAQP1 is required for Hartig net development in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant, Cell & Environment*. 2015; 38(11):2475–86.
- Page RDM. TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*. 1996; 12: 357–358.
- Panchy N, Lehti-Shiu M, Shiu MH. Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiology*. 2016; 171(4): 2294–2316.
- Park W, Scheffler BE, Bauer PJ, Campbell BT. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biology*. 2010; 10: 142.
- Polhill RM, Raven PH. Advances in legume systematics: Part1. Royal Botanic Gardens. 1981. In: Costa NM de S. Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw. Tese, Universidade Técnica de Lisboa. 2006. Disponível em: <<http://bibliotecas.utl.pt/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=299250>>.
- Rasmussen, R. Quantification on the LightCycler. Book: Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. 2001, 21-34.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*. 2010; 26: 139–140.

- Sakurai J, Ishikawa F, Yamaguchi T, Uemura M, Maeshima M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology*. 2005; 46: 1568–1577.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature*. 2010; 463(7278): 178-183.
- Shivaraj S, Deshmukh RK, Rai R, Bélanger R, Agrawal PK, Dash PK. Genome-wide identification, characterization, and expression profile of aquaporin gene family in flax (*Linum usitatissimum*). *Front Plant Science*. 2017a; 7:46137.
- Shivaraj SM, Deshmukh R, Bhat JA, Sonah H, Bélanger RR. Understanding Aquaporin Transport System in Eelgrass (*Zostera marina* L.), an Aquatic Plant Species. *Frontiers in Plant Science*. 2017b; 7:467.
- Sonah H, Deshmukh RK, Bélanger CLRR. Analysis of aquaporins in Brassicaceae species reveals highlevel of conservation and dynamic role against biotic and abiotic stress in canola. *Nature*. 2017; 7: 2771.
- Stace HM, Cameron DF. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In Stace HM, Edye LA. *The biology and agronomy of Stylosanthes*. Academic Press. 1984; 49–72.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007; 24: 1596–1599.
- Tardieu F. Plant tolerance to water deficit: physical limits and possibilities for progress. *Comptes Rendus Geoscience*. 2005; 337: 57–67
- Tropical Forages. *Stylosanthes scabra*. Disponível em <http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Stylosanthes_scabra.htm> Acessado 10 de julho de 2017.
- Tuberosa R, Salvi S. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Tendes in Plant Science*. 2006; 11: 405–412.
- Tyerman SD, Niemietz CM, Bramley H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant, Cell & Environment*. 2002; 25: 173–194.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3–7.
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F: Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 2002; 3(7).
- Vieira A, Talhinhos P, Loureiro A, Duplessis S, Fernandez D. et al. Validation of RT-qPCR reference genes for in planta expression studies in *Hemileia vastatrix*, the causal agent of coffee leaf rust. *Fungal Biology*. 2011;115(9): 891–901

Wallace IS, Roberts DM. Homology Modeling of Representative Subfamilies of *Arabidopsis* Major Intrinsic Proteins. Classification Based on the Aromatic / Arginine Selectivity Filter. *Proteins*. 2004; 135: 1059–1068.

Wang L, Liu Y, Feng S, Yang J, Li D, Zhang J. Roles of Plasmalemma Aquaporin Gene StPIP1 in Enhancing Drought Tolerance in Potato. *Frontier Plant Science*. 2017; 1–14.

Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009; 10(1): 57–63.

Williams RJ, Reid R, Schultze-Kraft R, Sousa Costa NM, Thomas BD. Natural Distribution of *Stylosanthes*. 1984; 73–101.

Wudick MM, Luu DT, Maurel C. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*. 2009; 184: 289–302.

Yamada S, Komori T, Myers PN, Kuwata S, Kubo T, Imaseki H. Expression of plasma membrane water channel genes under water stress in *Nicotiana excelsior*. *Plant Cell Physiology*. 1997; 38:1226–1231.

Zardoya R, Ding X, Kitagawa Y, Chrispeels M.J. Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment *Proc. Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002; 99:14893–14896.

Zhang DY, Ali Z, Wang CB, Xu L, Yi JX, Xu ZL, et al. Genome-Wide Sequence Characterization and Expression Analysis of Major Intrinsic Proteins in Soybean (*Glycine max* L.). *PLOS ONE*. 2013; 8: 1-13.

Zhang Y, Xiao-Dong Z, Liu X, Yun-Sheng L, Jian-Ping D, Xiao-Rong Z, Yun-Hai Z. Reference Gene Screening for Analyzing Gene Expression Across Goat Tissue. *Asian-Australas Journal of Animal Sciences*. 2013; 26(12): 1665–1671.

Zhao L, Ding Q, Zeng J, Wang F-R, Zhang J, Fana S-J, et al. An Improved CTAB–Ammonium Acetate Method for Total RNA Isolation from Cotton. *Phytochemical Analysis*. 2012; 23: 647–650.

Zou Z, Gong J, An F, Xie G, Wang J, Mo Y, et al. Genome-wide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, arubber-producing tissue. *BMC Genomics*. 2015; 16: 1001.

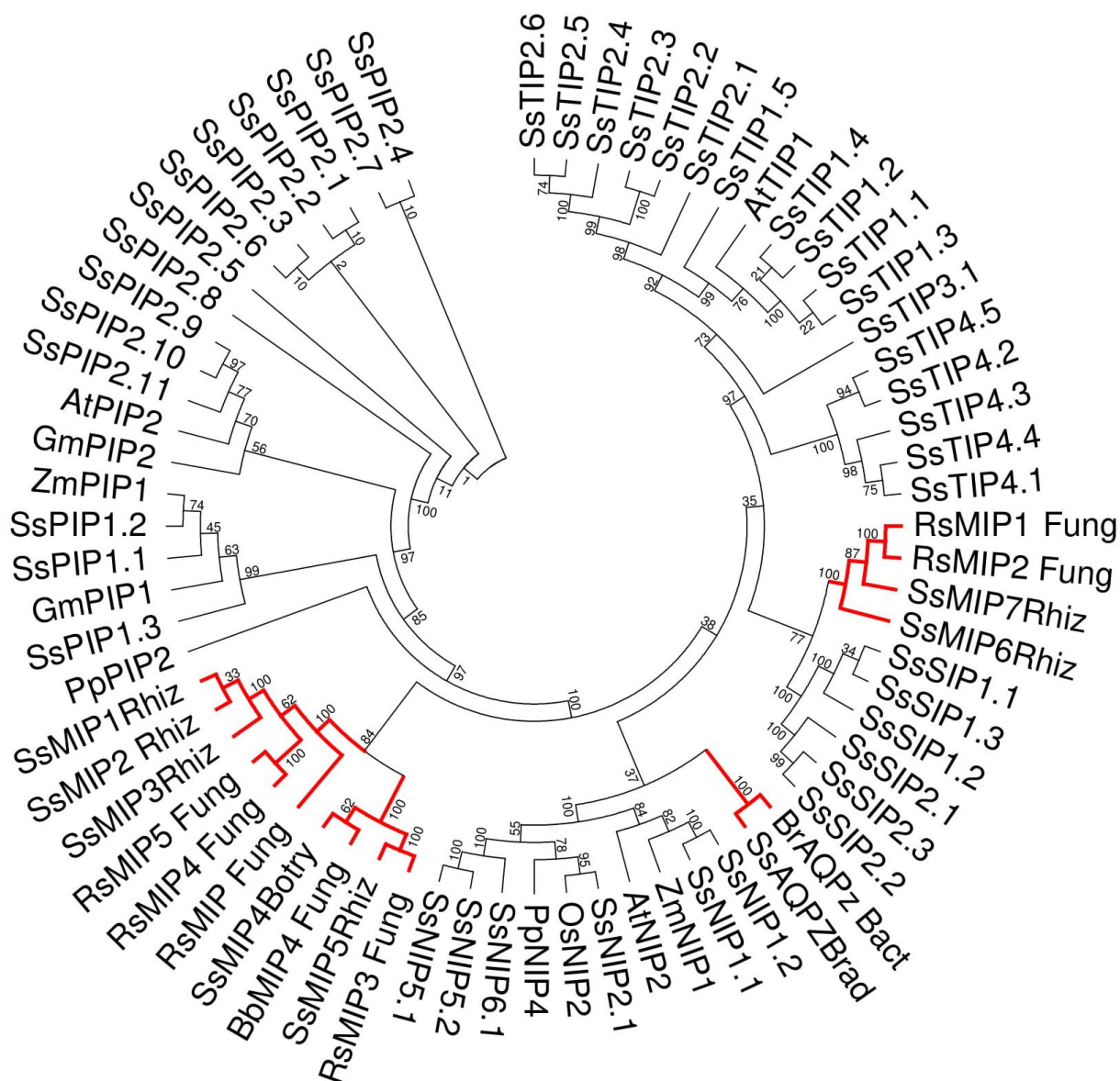


Figura suplementar 1: Avaliação NJ de 70 sequências proteicas de nove espécies, incluindo plantas e microrganismos. Sequências de aminoácidos foram alinhadas usando ClustalW, e a árvore foi construída com base no método *Neighbor-Joining*, utilizando o software MEGA 7.0, com valores de *bootstrap* de 1000 repetições. A árvore ilustra a classificação de aquaporinas vegetais de quatro subfamílias estruturais: PIP (Plasma Membrane Intrinsic Protein), TIP (Proteínas Intrínsecas Tonoplasto), NIP (Proteínas Intrínsecas do tipo Nodulin26) e SIP (Proteínas Intrínsecas Pequenas e Básicas). Abreviações: Ss (*Stylosanthes scabra*); At (*Arabidopsis thaliana*); Gm (*Glycine max*); Os (*Oryza sativa*); Pp (*Physcomitrella patens*); Zm (*Zea mays*); Br (*Bradyrhizobium*); Rs (*Rhizoctonia solani*). Destaque em vermelho estão as MIPs identificadas em *S. scabra* que apresentaram maior similaridade com MIPs de microrganismos.

Tabela suplementar 1. Sondas (*seed sequences*) correspondentes a 77 aquaporinas descritas na literatura para espécies vegetais, utilizadas na busca de homólogos no transcriptoma de *S. scabra*.

Espécie	Acesso GenBank	Referência	Espécie	Acesso	Referência
<i>A. hypogaea</i>	DQ450066.1	NCBI	<i>O. sativa</i>	BAA92991.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005
<i>A. hypogaea</i>	FJ231267.1	NCBI	<i>O. sativa</i>	BAA92993.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005
<i>A. hypogaea</i>	EE126655.1	NCBI	<i>P. patens</i>	AA983359.1	Danielson & Johanson, 2008
<i>A. hypogaea</i>	EZ751999.1	NCBI	<i>A. thaliana</i>	CAA20461.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>A. hypogaea</i>	EZ730756.1	NCBI	<i>A. thaliana</i>	CAB71073.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>A. hypogaea</i>	EZ725009.1	NCBI	<i>A. thaliana</i>	CAB67649.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>A. hypogaea</i>	EZ726202.1	NCBI	<i>A. thaliana</i>	AAD18142.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>A. hypogaea</i>	EZ733101.1	NCBI	<i>A. thaliana</i>	AAD18141.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD27715.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB09839.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAG13499.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAB41102.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAG13544.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAC79629.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAF21457.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAA17774.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAB32914.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAC64216.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAB61180.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAD31569.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAB63833.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB01832.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAK98737.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAC62778.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	CAD41442.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB01264.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAC15868.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAB10515.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAC16113.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB09071.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAC16116.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAG52132.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAC65382.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAF97261.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAP44741.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAC42249.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAC99758.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAB51216.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	CAE05657.2	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAA16760.2	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	CAE05002.2	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAA16748.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD16128.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAC26712.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAS98488.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAG50717.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAS98488.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB10360.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD22920.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB10361.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD23735.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAB39791.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD25765.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAF14664.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD28398.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAF30303.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD27715.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAF26804.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD37471.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	BAB09487.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD46581.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	CAB72165.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD53665.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAC28529.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD61899.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAF81320.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	AAV44140.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005	<i>A. thaliana</i>	AAF02782.1	Johanson <i>et al.</i> , 2001
<i>O. sativa</i>	BAD73177.1	Sakurai <i>et al.</i> , 2005			

Tabela suplementar 2: Características e propriedades físico-químicas das aquaporinas identificadas em *S. scabra*, incluindo o nome, ID do transcrito, tamanhos das sequências (nt - nucleotídeos e aa- aminoácidos), localização subcelular (LS); Membrana plasmática (MP), Vacúolo (V), número de domínios transmembranas (No. TM) e propriedades bioquímicas (pI – ponto isoelétrico; PM – peso molecular).

SsAQPs	Transcrito ID	Tamanho		LS	TMHMM	ProtParam	
		(nt)	(aa)		Nº TM	pI	PM (KDa)
PIPs							
SsPIP1.1	TRINITY_DN122638_c2_g4_i1	474	157	MP / V	3	8,85	16,21
SsPIP1.2	TRINITY_DN97814_c0_g1_i1	1.060	302	MP	6	8,99	32,23
SsPIP1.3	TRINITY_DN122638_c2_g2_i3	976	272	MP	5	8,56	29,17
SsPIP2.1	TRINITY_DN122014_c1_g1_i6	1.279	289	MP	6	7,72	31,14
SsPIP2.2	TRINITY_DN122014_c1_g1_i12	1.307	290	MP	6	7,11	31,19
SsPIP2.3	TRINITY_DN122014_c1_g1_i2	1.284	314	MP	6	7,86	34,08
SsPIP2.4	TRINITY_DN122014_c1_g1_i11	1.325	289	MP	6	7,72	31,14
SsPIP2.5	TRINITY_DN122014_c1_g1_i8	1.261	290	MP	6	7,11	31,19
SsPIP2.6	TRINITY_DN122014_c1_g1_i9	1.385	289	MP	6	7,71	30,99
SsPIP2.7	TRINITY_DN122014_c1_g1_i3	1.339	289	MP	6	7,71	30,99
SsPIP2.8	TRINITY_DN122014_c1_g1_i14	1.042	234	MP	6	9,16	24,66
SsPIP2.9	TRINITY_DN122014_c1_g2_i3	881	293	MP	6	8,08	31,53
SsPIP2.10	TRINITY_DN122014_c1_g2_i1	889	295	MP	5	8,61	31,81
SsPIP2.11	TRINITY_DN116001_c0_g1_i1	852	284	MP	6	8,27	30,13
TIPs							
SsTIP1.1	TRINITY_DN119865_c0_g2_i2	967	252	V	7	6,12	26,02
SsTIP1.2	TRINITY_DN119865_c0_g2_i3	981	264	V	7	7,96	27,34
SsTIP1.3	TRINITY_DN119865_c0_g2_i1	969	264	V	7	7,96	27,39
SsTIP1.4	TRINITY_DN119865_c0_g2_i4	983	252	V	7	6,12	25,97
SsTIP1.5	TRINITY_DN119865_c0_g1_i1	1.320	250	V	7	5,79	25,58
SsTIP2.1	TRINITY_DN119831_c1_g1_i1	1.158	249	V	6	4,83	25,21
SsTIP2.2	TRINITY_DN123301_c0_g2_i5	1.053	218	V	6	5,86	21,79
SsTIP2.3	TRINITY_DN123301_c0_g2_i4	1.068	227	V	7	5,57	22,79
SsTIP2.4	TRINITY_DN123301_c0_g1_i3	986	266	V	7	4,77	27,14
SsTIP2.5	TRINITY_DN123301_c0_g1_i1	948	248	V	7	5,08	25,00
SsTIP2.6	TRINITY_DN123301_c0_g1_i2	972	266	V	7	4,77	27,15
SsTIP3.1	TRINITY_DN20367_c0_g1_i1	638	212	V	6	7,27	22,30
SsTIP4.1	TRINITY_DN122983_c0_g1_i2	1.123	247	V	7	5,93	25,73
SsTIP4.2	TRINITY_DN122983_c0_g1_i7	941	223	V	6	6,22	23,24
SsTIP4.3	TRINITY_DN122983_c0_g1_i1	1.083	247	V	7	5,93	25,69
SsTIP4.4	TRINITY_DN122983_c0_g1_i4	1.137	247	V	7	5,93	25,73
SsTIP4.5	TRINITY_DN122983_c0_g1_i9	887	223	V	6	6,29	23,23
NIPs							
SsNIP1.1	TRINITY_DN112170_c0_g1_i1	811	226	MP / V	6	9	23,90
SsNIP1.2	TRINITY_DN112170_c0_g1_i3	1.085	228	MP / V	6	8,79	24,12
SsNIP2.1	TRINITY_DN107432_c0_g1_i1	997	320	MP	6	9,32	32,90

SsNIP5.1	TRINITY_DN123425_c1_g1_i7	1.198	304	MP	5	8,25	31,52
SsNIP5.2	TRINITY_DN123425_c1_g1_i8	1.671	306	MP	5	7,66	31,69
SsNIP6.1	TRINITY_DN124305_c0_g1_i1	1.387	324	MP	7	8,28	33,49

SIPs

SsSIP1.1	TRINITY_DN131761_c1_g3_i1	2.439	243	MP	6	9,75	26,38
SsSIP1.2	TRINITY_DN131761_c1_g3_i4	2.528	243	MP	6	9,75	26,38
SsSIP1.3	TRINITY_DN131761_c1_g3_i6	2.472	243	MP	6	9,75	26,38
SsSIP2.1	TRINITY_DN122841_c0_g1_i1	1.189	292	MP	4	9,84	31,92
SsSIP2.2	TRINITY_DN122841_c0_g1_i4	1.149	240	MP	4	9,62	26,15
SsSIP2.3	TRINITY_DN122841_c0_g1_i2	1.150	292	MP	4	9,9	31,93

MIPs

SsAQP_Z_Brad	TRINITY_DN42748_c0_g1_i1	849	282	MP	6	8,87	29,10
SsMIP1_Rhiz	TRINITY_DN116212_c0_g1_i5	629	209	MP / V	4	8,63	22,47
SsMIP2_Rhiz	TRINITY_DN116212_c0_g1_i3	844	250	MP	5	8,36	26,82
SsMIP3_Rhiz	TRINITY_DN116212_c0_g1_i1	494	164	MP / V	4	7,91	17,23
SsMIP4_Bot	TRINITY_DN124506_c0_g1_i4	1.217	358	MP	5	6,9	38,31
SsMIP5_Rhiz	TRINITY_DN102991_c0_g2_i1	1.312	396	MP	7	8,6	43,10
SsMIP6_Rhiz	TRINITY_DN114950_c0_g1_i1	1.222	304	MP	6	6,81	31,73
SsMIP7_Rhiz	TRINITY_DN110464_c0_g1_i1	1.055	304	MP	6	8,63	32,25

5 CONCLUSÕES

1. A planta forrageira *S. scabra* demonstrou uma plasticidade fisiológica e bioquímica frente ao regime hídrico, mantendo o teor de água, quando comparado o tratamento estressado (déficit hídrico) ao controle, em um curto período de tempo após a reidratação. Essas características confirmam ser essa espécie uma boa opção para cultivo em regiões semiáridas, fato que já vem ocorrendo no Brasil e em outros países.
2. Diversos transcritos de *S. scabra* tiveram a sua expressão modulada, para cima ou para baixo, em resposta ao déficit hídrico, incluindo transcritos associados ao metabolismo de carboidratos e ao sistema antioxidativo.
3. As 51 AQPs identificadas no transcriptoma de *S. scabra* puderam ser classificadas dentro das subfamílias PIP; TIP; NIP e SIP, onde 11 genes apresentaram sua expressão modulada em resposta ao déficit hídrico aplicado, apontando para a importância da regulação transcricional desta família para o movimento de água em estiloides;
4. Foram identificados três genes de referência para *S. scabra* submetida ao déficit hídrico, podendo os mesmos serem utilizados em análise de expressão gênica diferencial nas raízes dessa espécie através de PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR).
5. Os genes candidatos encontrados neste trabalho com uso de ferramentas de bioinformática e biologia molecular contribuem de forma direta para o aperfeiçoamento do conhecimento referente aos mecanismos fisiológicos e genéticos relacionados à tolerância ao déficit hídrico, disponibilizando informações novas para a biotecnologia e programas de melhoramento genético de leguminosas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. D. et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science**, v. 252, n. 5013, p. 1651-1656, 1991.
- AGRE, P. et al. Aquaporin water channels – from atomic structure to clinical medicine. **The Journal of Physiology**, v. 542, n. 1, p. 3-16, 2002.
- ALEMU, K. Real-Time PCR and Its Application in Plant Disease Diagnostics. **Advances in Life Science and Technology**, v. 27, n. 1, p. 39-50, 2014.
- ALEXANDERSSON, E. et al. Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. **Plant Molecular Biology**, v. 59, n. 3, p. 469-484, 2005.
- ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- ARAÚJO FILHO, J. A. Propuestas Tecnológicas para el manejo de la vegetación de la Caatinga com fines pastoriles. In: ROJAS, L. I. **La producción de rumiantes menores en las zonas áridas de Latinoamérica**. Brasília, Embrapa Caprinos e Ovinos, v. 12, n. 1, p.281-294, 2013.
- ASHRAF, M. Inducing drought tolerance in plants. **Biotechnological Advances**, v. 28, n. 1, p. 169-183, 2010.
- BARROSO, M.R. et al. Caracterização e avaliação de diferentes espécies de leguminosas grão na região de Trás-os-montes. **Coleção uma Agricultura com Norte**, 2007.
- BARTELS, D. SOUER, E. Molecular responses of higher plants to dehydration. In: Hirt H e Shinozaki K. **Plant Responses to Abiotic Stress**, Springer. Pp. 13-37, 2004.
- BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Prospecção de Genes de Resistência à Seca e à Salinidade em Plantas Nativas e Cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 4, n. 6, p. 1112-1134, 2011.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. GENOSOJA – The Brazilian Soybean Genome Consortium: High throughput omics and beyond. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. i-iv. 2012.
- BESSE, M. et al. Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves. **Journal of Experimental Botany**, v. 62, n. 12, p. 4127-4142, 2011.
- BEWLEY, J. D. Physiological aspects of desiccation-tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 30, n. 1, p. 195-238, 1979.
- BEZERRA-NETO, J. P. **Caracterização genética e análise evolutiva in silico de aquaporinas em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BIELA, A. et al. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercuryinsensitive and permeable for glycerol, **The Plant Journal**, v. 18, n. 5, p. 565-570, 1999.

BIO-RAD LABORATORIES. **Real-Time PCR Applications Guide**. 2006. Disponível em: <http://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>.

BLAIR M.W. et al., Inheritance of seed iron and zinc concentrations in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 23, p. 197-207, 2009.

BOLGUE, H. Pesquisadora descobre alternativa para o tratamento do câncer de mama Molécula extraída do feijão-de-corda teve boa resposta contra células cancerígenas. **UnB Agência (Universidade de Brasília)**, Brasília, 25 abr. 2011. Disponível em: <http://www.unb.br/noticias/unbagencia/unbagencia.php?id=4939>. Acesso em: 29 de outubro de 2017.

BOTS, M. et al. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. **Plant Physiology**, v. 137, n. 1, p. 1049-1056, 2005.

BOURSIAC, Y. et al. Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. **Plant Physiology**, v. 139, n. 2, p. 790-805, 2005.

BOYER, J. S. Plant productivity and environment. **Science**, v. 218, n. 4571, p. 443-448, 1982. BROUGHTON, W. J. et al. Beans (*Phaseolus* spp.) – model food legumes. **Plant and Soil**, v. 252, n. 1, p. 55-128, 2003.

BROUGHTON, W.J. et al. Flavonoid-inducible modifications to rhamnan O antigens are necessary for *Rhizobium* sp. Strain NGR234- Legume Symbioses. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 10, p. 3654-3663. 2006.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.

CALSA JUNIOR, T.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. O. Análise Serial da expressão Gênica. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 33, p. 86-98, 2004.

CAMERON, D. F. et al. An integrated program to improve anthracnose resistance in *Stylosanthes* – a review. In: M. Asghar (Ed.), **Proc 8th Australian Agronomy Conf, Toowoomba**. The Australian Institute of Agricultural Science, Carlton, Victoria, Australia. 1996. P. 112-115.

CARDOSO, D. et al. Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. **South African Journal of Botany**, v. 89, p. 58-75, 2013.

CASASSOLA, A. et al. Gene Expression: A Review on Methods for the Study of Defense-Related Gene Differential Expression in Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 4, n. 12, p. 64, 2013.

CAVALCANTI, N. B.; RESENDE, G. M. Consumo do mandacaru (*Cereus jamacaru* P. DC.) por caprinos na época da seca no Semiárido de Pernambuco. **Revista Caatinga**, v. 19, n. 4, p. 402-408, 2006.

CHAKRABORTY, K. et al. Physiological responses of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars to water deficit stress: status of oxidative stress and antioxidant enzyme activities. **Acta Botanica Croatica**, v. 74, n. 1, p. 123-142, 2015.

CHAKRABORTY, S. High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems. **Australian Centre for International Agricultural Research**. 2004.

CHANDRA, A. Diversity among *Stylosanthes* species: Habitat, edaphic and agro-climatic affinities leading to cultivar development. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 4, p. 471-478, 2009.

CHANDRA, A. et al. Variation in drought tolerance of different *Stylosanthes* accessions. **Biologia plantarum**, 48, n. 3, p. 457-460. 2004.

CHANDRA, A.; PATHAK, P. S.; BHATT, R. K. Stylo research in India: prospects and challenges ahead. **Current Science**, v. 90, p. 915-921, 2006.

CHAUMONT, F. et al. Aquaporins Constitute a Large and Highly Divergent Protein Family in Maize. **Plant Physiology**, v. 125, n. 3, p. 1206-1215, 2001.

CHAUMONT, F. et al. Regulation of plant aquaporin activity. **Biology of the Cell**, v. 97, n. 10, p. 749-764, 2005.

COATES, D. B. et al. Stability and productivity of *Stylosanthes* pastures in Australia. II. Animal production from *Stylosanthes* pastures. **Tropical Grasslands**, v. 35, n. 5, p. 494-502. 1997.

COSTA N. M. S.; FERREIRA M. B. Some Brazilian species of *Stylosanthes*. – p. 53–101 in: Stace H. M. & Edye L. A. (ed.), The biology and agronomy of *Stylosanthes*. – Sydney: **Academic Press**, 1984.

COSTA, L. C.; VALLS, J. F. M. *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil>. 2015.

COSTA, N. M. **Revisão do gênero *Stylosanthes* Sw.** Tese, Universidade Técnica de Lisboa. Disponível em: <http://bibliotecas.utl.pt/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=299250>. 2006.

CRIA (CENTRO DE REFERÊNCIA EM INFORMAÇÃO AMBIENTAL). **Species link. *Stylosanthes scabra***. Disponível em: <http://www.splink.org.br/index?lang=pt&action=openform>. Acessado jan. de 2019.

- DA COSTA, L. C.; SARTORI, A. L. B.; POTT, A. Estudo taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae – Papilionoideae – Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 1, p. 547-572, 2008.
- DANIELS, M. J. et al. Projection Structure of a Plant Vacuole Membrane Aquaporin by Electron Cryo-crystallography. **Journal of Molecular Biology**, v. 294, n. 5, p. 1337-1349, 1999.
- DANIELSON, J. A.; JOHANSON, U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 1, p. 45, 2008.
- DE SPIEGELAERE, W. et al. Reference Gene Validation for RT-qPCR, a Note on Different Available Software Packages. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0122515, 2015.
- DESHMUKH, R. K. et al. Identification and functional characterization of silicone transporters in soybean using comparative genomics of major intrinsic proteins in *Arabidopsis* and rice. **Plant Molecular Biology**, v. 83, n. 4-5, p. 303-315, 2013.
- DESHMUKH, R.; SONAH, H.; BELANGER, R. Plant Aquaporins: genome-wide identification, transcriptomics, proteomics, and advanced analytical tools. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.
- DEVI, M. J. et al. Leaf aquaporin transcript abundance in peanut genotypes diverging in expression of the limited-transpiration trait when subjected to differing vapor pressure deficits and aquaporin inhibitors. **Physiologia Plantarum**, v. 156, n. 4, p. 387-396, 2016.
- DHEDA, K. et al. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. **Biotechniques**, v. 37, n. 1, p. 112-119, 2004.
- DUELLI, D. M.; NOEL, K. D. Compounds exuded by *Phaseolus vulgaris* that induce a modification of *Rhizobium etli* lipopolysaccharide. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 7, p. 903-910, 1997.
- DURMIC, Z. et al. Differences in the nutrient concentrations, in vitro methanogenic potential and other fermentative traits of tropical grasses and legumes for beef production systems in northern Australia. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 12, p. 4075-4086, 2017.
- EGAN A. N., SCHLUETER J., SPOONER D. M. Applications of next-generation sequencing in plant biology. **American Journal of Botany**, v. 99, n. 1, p. 175-185, 2012.
- EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2014): área, produção e rendimento**. 2017.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). *Stylosanthes scabra* Vog. Disponível: www.fao.org/ag/AGP/AGPC/doc/Gbase/data/pf000068.htm. Acessado em: 20 jun. de 2017.

- FAROOQ, M.; WAHID, A.; KOBAYASHI, N. Plant drought Stress: Effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 29, n. 1, p. 185-212, 2009.
- FERY, F. L. New opportunities in *Vigna*. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), **Trends in new crops and new uses**, p. 424-428, 2002.
- FLOWERS, T. J. Improving crop salt tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, n. 396, p. 307-319, 2004.
- FORREST, K. L.; BHAVE, M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: a complex gene family with major impacts on plant phenotype. **Functional & Integrative Genomics**, v. 7, n. 4, p. 263, 2007.
- FORTIN, M. G.; Zelechowska, M.; Verma, D. P. Specific targeting of membrane nodulins to the bacteroid-enclosing compartment in soybean nodules, **The EMBO Journal**, v. 4, n. 1, p. 3041-3046, 1985.
- FORTUNA-PEREZ, A. P.; SILVA, M. J.; TOZZI, A. M. G. A. *Stylosanthes* (Leguminosae–Papilionoideae–Dalbergiae) no estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, n. 62, v. 3, p. 615-628, 2011.
- FOTIADIS, D. et al. Structural Characterization of Two Aquaporins Isolated from Native Spinach Leaf Plasma Membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 1707-1714, 2001.
- FOUQUET, R. et al. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. **Plant Cell Reports**, v. 27, n. 9, p. 1541-1550, 2008.
- FROGER, A. et al. B. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. **Protein Science**, v. 7, n. 6, p. 1458-1468, 1998.
- GALMÉS, J. et al. Aquaporin expression in response to different water stress intensities and recovery in Richter-110 (*Vitis* sp.): relationship with ecophysiological status. **Planta**, v. 226, n. 3, p. 671-681, 2007.
- GAMA LÓPEZ, S. **Estudio sistemático del género *Stylosanthes* (Leguminosae)**. Tesis de Maestría © Ciencias, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Mexico (UNAM): Iztacala, Mexico, pp. 56, 2002.
- GASPAR, M. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Revista brasileira de botânica**, v. 34, n. 4, 2011.
- GERBEAU, P. et al. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. **The Plant Journal**, v. 18, n. 6, p. 577-587, 1999.
- GILLIES, A. C. M.; ABBOTT, R. J. **Molecular analysis of genetic diversity and evolutionary relationships in *Stylosanthes* (Aubl.) Sw.** In Proceedings of Regional Workshop on the use of *Stylosanthes* in West Africa, Kaduna, Nigeria, pp. 37-53, 1994.

GOMES, D. et al. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p. 1213-1228, 2009.

GOMES, G. S. et al. Botanical Composition of Fabaceae Family in the Brazilian Northeast, Maranhão, Brazil. **Asian Journal of Environment & Ecology**, v. 6, n. 4, p. 1-10, 2018.

GUSTAVSSON, S. et al. A novel plant major intrinsic protein in *Physcomitrella patens* most similar to bacterial glycerol channels. **Plant Physiology**, v. 139, n. 1, p. 287-295, 2005.

HACHEZ, C. et al. The expression pattern of plasma membrane aquaporins in maize leaf highlights their role in hydraulic regulation. **Plant Molecular Biology**, v. 68, n. 1, p. 337-353, 2008.

HOVE, R. M.; BHAVE, M. Plant aquaporins with non-aqua functions: deciphering the signature sequences. **Plant Molecular Biology**, v. 75, n. 4-5, p. 413-430, 2011.

HOWLAD, C. et al. Combining RT-PCR-seq and RNA-Seq to Catalog All Genic Elements Encoded in the Human Genome, **Genome Research**, v. 22, n. 1, p. 1698-1710, 2012.

HUANG, C.; LIU, G.; BAI, C. Polymorphism analysis in identification of genetic variation and relationships among *Stylosanthes* species. **Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 39, 2017.

HUGGETT, J.; BUSTIN, S. Standardisation and reporting for nucleic acid quantification. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 16, n. 8-9, p. 399, 2011.

HUSSAIN, S.S. et al. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. **Biologia Plantarum**, v. 55, n. 1, p. 401-413, 2011.

ISHIBASHI, K.; HARA, S.; KONDO, S. Aquaporin water channels in mammals. **Clinical and Experimental Nephrology**, v. 13, n. 2, p. 107-117, 2009.

JAIN, M. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. Brief. FUNCT. **Genomics**, v. 11, N. 1, P. 63-70, 2012.

JAVOT, H.; MAUREL, C. The role of aquaporins in rootwater uptake. **Annals of Botany**, v. 90, n. 3, p. 301-313, 2002.

JOHANSON U.; GUSTAVSSON, S. A New Subfamily of Major Intrinsic Proteins in Plants. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19, n. 1, p. 456-461, 2002.

JOHANSON, U. et al. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. **Plant Physiology**, v. 126, n. 4, p. 1358-1369, 2001.

KALDENHOFF, R.; FISCHER, M. Functional aquaporin diversity in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 290, n. 1758, p. 1134-1141, 2006.

KARIA, C.T. et al. **Caracterização Morfológica de Acessos do Gênero *Stylosanthes* no Banco Ativo de Germoplasma da Embrapa Cerrados – Coleção 1994 / 1995**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 72. Embrapa Cerrados, pp. 24, 2002.

KASS, E.; WINK, M. Molecular evolution of the Leguminosae: Phylogeny of the three subfamilies based on *rbcL*-sequences. *Biochem. Biochemical Systematics and Ecology*, v. 24, n. 5, p. 365-378, 1996.

KIRSCHT, A. et al. Crystal Structure of an Ammonia-Permeable Aquaporin. *PLOS Biology*, v. 14, n. 1, p. 1-19, 2016.

KJELLBOM, P. et al. Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends in Plant Science*, v. 4, n. 1, p. 308-314, 1999.

KNEPPER, M. A.; NIELSEN, S. Peter Agre, 2003 Nobel Prize Winner in Chemistry. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 15, n. 4, p. 1093-1095, 2004.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 443, n. 4, p. 391-406, 2013.

LAVIN, M. et al. The Dalbergioid Legumes (Fabaceae): delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany*, v. 88, n. 30, p. 503-533, 2001.

LEWIS GP. Legumes of the World. *Royal Botanic Gardens*, v. 1, n. 1, p. 577, 2005.

LEWIS, G. P.; OWEN, P. E. Legumes of the Ilha de Maracá. Kew, *Royal Botanic Gardens*. p. 95. 1989.

LEWIS, G.P. Legumes of Bahia. *The Royal Botanic Garden*, Whitstasble. Pp. 369. 1987.

LI, G.; SANTONI, V.; MAUREL, C. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1840, p. 1574–1582, 2014.

LIAN, H. L. et al. The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant Cell Physiology*, v. 45, n. 29, p. 481-489, 2004.

LIU, C. J. Geographical distribution of genetic variation in *Stylosanthes scabra* revealed by RAPD analysis. *Euphytica*, v. 98, n. 1, p. 21-27, 1997.

LIU, C. J.; MUSIAL, J. M.; THOMAS, B. D. Genetic relationships among *Stylosanthes* species revealed by RFLP and STS analyses. *Theoretical and Applied Genetics*, v. 99, n. 1, p. 1179-1186, 1999.

LIU, L. H. et al. Urea Transport by Nitrogen-Regulated Tonoplast Intrinsic Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, v. 133, n. 1, p. 1220-1228, 2003.

LOCATELLI, M. et al. **Seleção de leguminosas para cultivo alley-cropping sob condições de Latossolo Amarelo em Porto Velho, Rondônia, Brasil**. Porto Velho: EMBRAPA-CPAF Rondônia, EMBRAPA. CPAF Rondônia. Pesquisa em Andamento, pp. 125, 1991.

LOPEZ, F. et al. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: contribution of PIP2 proteins. **Plant Cell Physiology**, v. 44, n. 1, p. 1384-1395, 2003.

LOQUÉ, D. et al. Tonoplast Intrinsic Proteins AtTIP2;1 and AtTIP2;3 Facilitate NH₃ Transport into the Vacuole. **Plant Physiol**, v. 137, n. 1, p. 671-680, 2005.

LPWG, LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.

LPWG, LEGUME PHYLOGENY WORKING GROUP. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013.

LUANG S., HRMOVA M. Structural Basis of the Permeation Function of Plant Aquaporins. In: CHAUMONT F.; TYERMAN S. (eds) Plant Aquaporins. Signaling and Communication in Plants. **Springer**, Cham. 2017.

LUDEWIG, U.; DYNOWSKI, M. Plant aquaporin selectivity: where transport assays, computer simulations and physiology meet. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 19, p. 3161-3175, 2009.

MACEY, R.I. Transport of water and urea in red blood cells. **American Journal of Physiology**, v. 246, n. 3, p. 195-203, 1984.

MAESHIMA, M.; ISHIKAWA, F. ER membrane aquaporins in plants. **Pflügers Archiv**, v. 456, n. 1, p. 709-716, 2008.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.

MAHDIEH, M.; MOSTAJERAN, A.; HORIE, T.; KATSUHARA, M. Plant Cell Physiol. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. **Plant Cell Physiology**, v. 49, n. 5, p. 801-13, 2008.

MANNETJE, L. Considerations on the taxonomy of the genus *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE, L. A. **The biology and agronomy of Stylosanthes**. Academic Press: Sydney, Australia, pp. 1-21, 1984.

MANSFIELD, T. J.; ATKINSON, C. J. Stomatal behavior in water stressed plants. In: ALSCHER, R. G.; CUMMING J.R. (Eds.). **Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms**. Nova York: **Wiley-Liss**, p. 241-264, 1990.

MARIONI, J. C. et al. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays, **Genome Research**, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2008.

MARQUES, A. et al. Origin and parental genome characterization of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. **Annals of Botany**, XX: 1-17, 00, 2018.

MATSUMURA, H. et al. SuperSAGE: **A Potent Transcriptome Tool for Eukaryotic Organisms**. In: San Ming Wang (eds) **Current Techn App**, p. 77-90, 2004.

MAUREL, C. et al. Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 1, p. 7103-7108, 1997.

MAUREL, C. et al. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water specific channels in *Xenopus oocytes*. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 6, p. 2241, 1993.

MAUREL, C. Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. **FEBS Letters**, v. 581, n. 12, p. 2227-2236, 2007.

MCKEY, D. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. In: SPRENT, J. I.; MCKEY, D. (Ed.). **Advances in legume systematics**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 211-228, 1994.

MCMAHON, M. M.; SANDERSON, M. J. Phylogenetic supermatrix analysis of GenBank sequences from 2228 papilionoid legumes. **Systematic Biology**, v. 55, n. 5, p. 818-836, 2006.

MENEGASSI A. **Identificação, caracterização estrutural e funcional de aquaporinas de soja (*Glycine max*) e seu envolvimento no metabolismo de ureia**. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

MENESES, C. H. S. G. et al. Aspectos genéticos e moleculares de plantas submetidas ao déficit hídrico. **Revista Brasileira de oleaginosas e fibrosas**, v. 10, n. 1, p. 1039-1072, 2006.

MOHORIANU, I. et al. Comparison of alternative approaches for analysing multi-level RNA-seq data. **PLOS ONE**, v. 12, n. 8, p. 0182694, 2017.

MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 1, p. 621-628, 2008.

MOURÃO, S. A.; KARAM, D.; SILVA, J. A. A. Uso de leguminosas no Semiárido mineiro. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, **Documento**, n. 135, p. 91, 2011.

NAGAICH, D. et al. Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3127-3136, 2013.

NIRNAJAN, K. P.; ARYA, R. L.; YADAVA, R. B. 1994. Increasing production potential of degraded lands through ley farming systems. In: SINGH. Et al. Agroforestry systems for degraded lands. Legumes and nitrogen: the evolutionary ecology of a nitrogen-demanding lifestyle. **Science Publishers**, v. 1, n. 1, p. 174-177, 1994.

NIU, X. et al. Ion Homeostasis in NaCl Stress Environments. **Plant Physiology**, v. 109, n. 3, p. 735, 1995.

NOFEL. **Leguminosae Family 1**. Disponível: <https://www.researchgate.net/publication/293488012>. 2016.

OLIVEIRA, R.S. et al. Genetic diversity in accessions of *Stylosanthes* spp. Using morphoagronomic descriptors. **Revista Caatinga**, v. 29, n. 1, p. 101-112, 2016.

OSHLACK, A.; ROBINSON, M. D.; YOUNG, M. D. From RNA-seq reads to differential expression results. **Genome Biology**, v. 11, n. 12, p. 220, 2010.

OZSOLAK, F. MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 2, p. 87-98, 2011.

PARK, W. et al. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **BMC Plant Biology**, v. 10, n. 1, p. 142, 2010.

PATEL, A. Isolation, characterization and production of a new recombinant lectin protein from leguminous plants. **Biochemical Compounds**, v. 2, n. 1, p. 2, 2014.

PFAFFL, M. W. et al. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes, and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, v. 26, n. 6, p. 509-515, 2004.

POLHILL, R. M.; RAVEN, P. H. Advances in legume systematics, part 1. Richmond, U.K.: **Royal Botanic Gardens**, Kew, p. 23, 1981.

PONNUSHA B.S. et al. Antioxidant and Antimicrobial properties of *Glycine Max*-A review. **International Journal of Biomedical Science**, v. 1, n. 2, p. 49-62. 2011.

PRESTON, G.M.; AGRE, P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 24, p. 11110-11114, 1991.

RAMESH, C. R. et al. Status of *Stylosanthes* development in other countries. III. *Stylosanthes* development and utilization in India. **Trop Grasslands**, v. 31, p. 467-475, 1997.

RUDD, V. E. Aeschynomeneae (Benth.) Hutch. In: POLHILL, R. M.; RAVEN P.H. Advances in Legume Systematics. **Royal Botanical Garden**, v. 1, p. 347-354, 1981.

SANCHITA; SHARMA, A. Computational gene expression profiling under salt stress reveals patterns of co-expression. **Genomics Data**, v. 7, p. 214-221, 2016.

SANTANA, A. S. et al. Divergência genética entre acessos de *Stylosanthes* Sw. (Fabaceae) coletados no Semiárido Baiano. **Magistra**, v. 24, p. 304-313, 2012.

SCHENA, M. et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 467-470, 1995.

SCHUURMANS, J. A. et al. Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies, **Plant Molecular Biology**, v. 53, n. 5, p. 655-667, 2003.

SECCHI, F.; LOVISOLO, C.; SCHUBERT, A. Expression of OePIP2.1 aquaporin gene and water relations of *Olea europaea* twigs during drought stress and recovery. **Annals of Applied Biology**, v. 150, n. 2, p. 163–167, 2007.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold, and high-salinity stresses using a full-length microarray. **The Plant Journal**, v. 31, n. 3, p. 279-292, 2002.

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.

SHIMKETS, R. A. Gene expression profiling. 1^o ed. Totowa: **Humana Press**, Inc, 2004.

SHIPLEY, G. L. An introduction to real-time PCR. In: DORAK, M. T. Real-Time PCR. **Taylor & Francis Group**, New York, pp. 1-31, 2006.

SIDDHURAJUB, P.; BECKER, K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 10-19, 2007.

SINGH, B.B. et al. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v.84, n.1-2, p. 169–177, 2003.

SINGH, R. J. et al. Landmark research in legumes. **Genome**, v. 50, n. 6, p. 525-537, 2007.

SINICROPI, D.; CRONIN, M.; LIU, M. L. Gene Expression Profiling Utilizing Microarray Technology and RT-PCR. In: FERRARI, M. E. C.; OZKAN, M.; HELLER, M. **BioMEMS and Biomedical Nanotechnology**, Volume II: Micro/Nano Technologies for Genomics and Proteomics, Springer, pp. 540, 2007.

SMART, L. B. et al. MIP genes are down-regulated under drought stress in *Nicotiana glauca*. **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 7, p. 686-693, 2001.

SONAH, H.; DESHMUKH, R. K.; BÉLANGER, C. L. R. R. Analysis of aquaporins in Brassicaceae species reveals high level of conservation and dynamic role against biotic and abiotic stress in canola. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

SONG, L. et al. Soybean TIP gene family analysis and characterization of GmTIP1;5 and GmTIP2;5 water transport activity. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n.1, p. 14-21, 2016.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. In STACE, H. M.; EDYE, L. A. The biology and agronomy of *Stylosanthes*. **Academic Press**, p. 49-72, 1984.

STAPPEN, J. V. et al. Phylogenetic analysis of *Stylosanthes* (Fabaceae) based on the internal transcribed spacer region (ITS) of nuclear ribosomal DNA. **Plant Systematics and Evolution**, v. 234, n. 1-4, p. 27-51, 2002.

SUI, H. et al. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 872-878, 2001.

SWARTZ, O. **Nova genera et species plantarum seu prodromus**. J. Cramer, Weinheim, Germany, 1788.

‘T HOEN, P. A. C. et al. Deep sequencing-based expression analysis shows major advances in robustness, resolution and inter-lab portability over five microarray platforms. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 21, p. 141-141, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Respostas e adaptações ao estresse abiótico. In: **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2013, cap. 26, p. 753-780.

TESTER, M.; BACIC, A. Abiotic stress tolerance in grasses. From model plants to crop plants. **Plant Physiology**, v. 137, n. 3, p. 791-793, 2005.

TESTER, M.; LANGRIDGE, P. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 818-822, 2010.

THELLIN, O. et al. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 75, n. 2, p. 291-295, 1999.

TYBURSKI, J. et al. PCR in real time: methods of data analysis. **Biotechnologia**, v. 1, p. 86-96, 2008.

TYERMAN, S. D.; NIEMIETZ, C. M.; BRAMLEY, H. Plant aquaporins: multifunctional water and solute channels with expanding roles. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 173-194, 2002.

TRIPATHI, R.; SHARMA, P.; CHAKRABORTY, P.; VARADWAJ, P.K. Next-generation sequencing revolution through big data analytics. **Frontiers in Life Science**, v. 9, n.2, p. 119-149, 2016

UEHLEIN, N. et al. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions, **Nature**, v. 425, n. 29, p. 734-737, 2003.

VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 34, 2002.

VANHAUWAERT, S. et al. Expressed Repeat Elements Improve RT-qPCR Normalization across a Wide Range of Zebrafish Gene Expression Studies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109091, 2014.

VOGEL, T. De Hedysareis Brasiliae. **Linnaea**, v. 12, p. 50-111, 1838.

WALLACE, I. S.; CHOI, W. G.; ROBERTS, D. M. The structure, function and regulation of the nodulin 26-like intrinsic protein family of plant aquaglyceroporins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1758, n. 8, p. 1165-1175, 2006.

WALLACE, I. S.; ROBERTS, D. M. Homology modeling of representative subfamilies of Arabidopsis major intrinsic proteins, Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter, **Plant Physiology**, v. 135, n. 2, p. 1059-1068, 2004.

WALZ, T. et al. The three-dimensional structure of human erythrocyte aquaporin CHIP. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 13, p. 2985, 1994.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WEAVER, C. D. et al. Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane-proteins from nitrogen-fixing soybean nodules — evidence for phosphorylation of nodulin-26. **Plant Physiology**, v. 95, n. 1, p. 222-227, 1991.

WILLIAMS R. J. et al. Natural distribution of *Stylosanthes*. In: STACE, H. M.; EDYE L. A. **The biology and agronomy of *Stylosanthes***. Sydney: Academic Press, pp 73-101, 1984.

WOJCIECHOWSKI, M. F.; LAVIN, M.; SANDERSON, M. J. A phylogeny of the legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene sequences resolves many well-supported subclades within the family. **American Journal of Botany**, v. 91, n. 11, p. 1846-1862, 2004.

WU, B.; BEITZ, E. Aquaporins with selectivity for unconventional permeants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64, n. 18, p. 2413-2421, 2007.

ZARDOYA, R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. **Biology of Cell**, v. 97, n. 6, p. 397-414, 2005.

ZHAO, C. X. et al. Aquaporin structure – function relationships: Water flow through plant living cells. **Colloids and Surfaces**, v. 62, n. 2, p. 163-172, 2008.

APÊNDICE A

PLANT AQUAPORINS: DIVERSITY, EVOLUTION AND BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS

*Artigo publicado na Revista **Current Protein and Peptide Science** – Nov/ 2018 (FI: 2.696)*

João Pacifico Bezerra-Neto^{a#}, **Flávia Czekalski de Araújo^{a#}**, José Ribamar Costa Ferreira-Neto^a, Manassés Daniel da Silva^a, Valesca Pandolfi^a, Flavia Figueira Aburjaile^a, Tetsu Sakamoto^b, Roberta Lane de Oliveira Silva^a, Ederson Akio Kido^a, Lidiane Lindinalva Barbosa Amorima^c, José Miguel Ortega^b and Ana Maria Benko-Iseppon^{a*}.

^a Universidade Federal de Pernambuco, Genetics Department, Center of Biosciences, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, 50.670-423, Recife, Pernambuco, Brazil;

^b Universidade Federal de Minas Gerais, Department of Biochemistry and Immunology, Belo Horizonte, Brazil;

^c Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Oeiras, Avenida Projetada, s/n, 64.500-000, Oeiras, Piauí, Brazil.

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author.

E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq;

REVIEW ARTICLE

Plant Aquaporins: Diversity, Evolution and Biotechnological Applications

João Pacifico Bezerra-Neto^{a,#}, Flávia Czekalski de Araújo^{a,#}, José Ribamar Costa Ferreira-Neto^a, Manassés Daniel da Silva^a, Valesca Pandolfi^a, Flavia Figueira Aburjaile^a, Tetsu Sakamoto^b, Roberta Lane de Oliveira Silva^a, Ederson Akio Kido^a, Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim^{a,c}, José Miguel Ortega^b and Ana Maria Benko-Iseppon^{a,*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Genetics Department, Center of Biosciences, Av. Prof. Moraes Rêgo, 1235, 50.670-423, Recife, Pernambuco, Brazil; ^bUniversidade Federal de Minas Gerais, Department of Biochemistry and Immunology, Belo Horizonte, Brazil; ^cInstituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí, Campus Oeiras, Avenida Projetada, s/n, 64.500-000, Oeiras, Piauí, Brazil

Abstract: The plasma membrane forms a permeable barrier that separates the cytoplasm from the external environment, defining the physical and chemical limits in each cell in all organisms. The movement of molecules and ions into and out of cells is controlled by the plasma membrane as a critical process for cell stability and survival, maintaining essential differences between the composition of the extracellular fluid and the cytosol. In this process aquaporins (AQPs) figure as important actors, comprising highly conserved membrane proteins that carry water, glycerol and other hydrophilic molecules through biomembranes, including the cell wall and membranes of cytoplasmic organelles. While mammals have 15 types of AQPs described so far (displaying 18 paralogs), a single plant species can present more than 120 isoforms, providing transport of different types of solutes. Such aquaporins may be present in the whole plant or can be associated with different tissues or situations, including biotic and especially abiotic stresses, such as drought, salinity or tolerance to soils rich in heavy metals, for instance. The present review addresses several aspects of plant aquaporins, from their structure, classification, and function, to *in silico* methodologies for their analysis and identification in transcriptomes and genomes. Aspects of evolution and diversification of AQPs (with a focus on plants) are approached for the first time with the aid of the LCA (Last Common Ancestor) analysis. Finally, the main practical applications involving the use of AQPs are discussed, including patents and future perspectives involving this important protein family.

ARTICLE HISTORY

Received: August 20, 2018
Revised: October 24, 2018
Accepted: October 30, 2018

DOI: 10.2174/1389203720666181102095910

Keywords: Water channel, membrane intrinsic protein MIP, plasma membrane intrinsic protein PIP, tonoplast intrinsic protein TIP, Nodulin-like intrinsic protein NIP, small intrinsic protein, SIP, *Ananas comosus*

1. INTRODUCTION

Aquaporins (AQPs) are membrane intrinsic proteins (MIPs) that facilitate the passive movement of water and small solutes across biological membranes [1-3]. It regards an ancient family of water channel proteins present in all kingdoms of life (archaea, eubacteria, fungi, plants, and animals), suggesting their essential role in basal life functions [3-5].

The first AQP was discovered in the early 1990s, by Peter Agre and coworkers [6] at the Johns Hopkins University (Baltimore, USA) while working on the mammalian red blood cells from which they purified a membrane protein named CHIP28 (channel integral membrane protein, with 28

kDa). Later, this molecule was renamed as AQP1, with recognized activity to increase the permeability of water [7]. Peter Agre was awarded the 2003 Nobel Prize in Chemistry for the discovery and characterization of AQPs (www.nobel.se/chemistry/laureates/2003) [8]. This pioneering work opened unique perspectives on the studies of water permeation across biomembranes.

The first plant aquaporin (Nodulin-26, GmNOD26) was isolated from soybean (*Glycine max*) and was described by Fortin *et al.* in 1987 [9]. However, their water transport activity in plants was not evidenced until Maurel *et al.* (1993) demonstrated the functionality of an *Arabidopsis thaliana* tonoplast intrinsic protein homolog (AtTIP1), expressed in *Xenopus laevis* oocytes [10]. Since then, an increasing number of studies concerning structure, transport, regulatory mechanisms and evolution of AQPs was carried out. Including their annotation in genomes and transcriptomes under different situations, helping the elucidation of their roles in cell biology at tissue/organ/taxon levels [5, 11].

*Address correspondence to this author at the Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brazil; Tel.: +55-81-2126-8569;
E-mail: ana.iseppon@gmail.com

[#]Contributed equally to this work.

Plant and animal AQPs are the most studied, mainly species with economic importance [5, 12]. On the other hand, recent reports have suggested that plants show a significantly higher diversity and abundance than any other forms of life [11, 13, 14]. This higher and differential number of AQPs in plants is probably due to gene duplication and polyploidy [15-18]. The increasing adaptation potential brought by AQP diversity in plants has also been highlighted, possibly due to the sessile lifestyle of plants [14]. For example, a genome-wide identification performed by Sonah *et al.* (2017) in seven Brassicaceae species revealed a total of 380 AQPs, a study that included the first fully sequenced polyploid genome of canola (*Brassica napus*) with 121 AQPs identified [19]. The authors indicated recent genome-wide duplications in the genesis of such high number of AQPs in canola (with no loss after duplication), actually recognized as the taxon with the highest AQP number in plants (Table 1).

The diversity of AQPs found in a single plant species presents different ranges of types and isoforms. Most basal taxa as *Physcomitrella patens* (Bryophyta) [35] and *Selaginella moellendorffii* (Pteridophyta) [38] present 23 and 19 AQPs, respectively (Table 1). Despite these low number of AQPs, both groups present particular AQP classes, as discussed later in this review. In turn, the number of AQPs within a single dicot species at the diploid level may vary from 28 in Beet (*Beta vulgaris*) [21] up to 57 in *Brassica rapa* [19]. Considering the previously analyzed monocots with sequenced genomes, the species with the highest number of AQPs is the tetraploid switchgrass (*Panicum virgatum*, Poaceae) [22] with 68 AQPs, while in the diploid eelgrass (*Zostera marina*, Zosteraceae) [44] only 25 AQPs were recognized so far (Table 1).

7 AQUAPORINS ORIGIN AND DIVERSIFICATION

After early ground-breaking studies with human cells, AQPs have been reported in all kingdoms of life including archaea, bacteria, protozoa, yeast, plants, invertebrates and vertebrates. They show sequence homology and share functional and structural similarities, suggesting an essential role in basal life functions, with several thousand sequences now available in public databases [5, 45]. More than 300 of these proteins have been discovered, and their proposed role is not restricted to water molecule movement but also to the transport of non-ionic, small neutral solutes and ions, such as nitrate, chloride, and ammonia [46]. The distribution and main categorization of AQPs from bacteria to humans are summarized in Table 2.

The earliest evolutionary studies of diverse AQPs revealed two major phylogenetic divisions: the water-selective type channels (AQPs), with small channel openings and aquaglyceroporins (GLPs) with channel large enough for molecules as big as glycerol, also permeable to urea and other small solutes in addition to water [52, 77]. This division is based on the distinct primary sequences which show little conservation of amino acid sequences around the NPA (asparagine-proline-alanine) boxes, to form a large or small pore. The signature sequence for Aquaglyceroporins is given by the presence of an aspartic acid residue (D) in the second NPA box, while its absence indicates a classical AQP. This dichotomy (water-selective vs. solute-permeable) suggests

that some early gene duplication event probably led to the evolution of these two major functional forms in Prokaryotes. Thus it is proposed that these genes emerged early in evolution, possibly due to their critical roles in water and solute homeostasis for survival, since water is vital for every living organism [4, 78]. Recently, a third group was isolated in vertebrate species, the so-called unorthodox AQP (Table 2), which shares few conserved amino acid sequences around the NPA box, and was unclassifiable within the two previously described AQP subfamilies [79].

Like all living organisms, microorganisms need available water to support life. Bacteria or fungi require varying amounts of water to reproduce and grow, and the production of enzymes and other essential metabolites may be sensitive to alterations in the water content [80]. During the last years, few reports have focused on understanding the structure and function of microorganisms AQPs and their role in water transport and stress responses. In bacteria, recent results from genome projects suggest a limited importance of AQP due to the absence of these proteins in many studied archaeobacteria including thermophilic archaea [78]. Besides, only ~10% of the studied bacterial genomes contain AQPs. Eubacteria AQPs were first identified in *Escherichia coli* as AqpZ and GpfF, a water-selective channel and a water-, urea-, glycerol-transporting channel, respectively [48, 81-83]. The roles of AqpZ and GpfF in bacteria may be associated with their ability to survive and grow at high osmotic pressure by regulating the cytoplasm composition through the accumulation of compatible solutes and extrusion/incorporation of mineral ions or water [48, 84]. In addition, some bacterial genomes contain AQP homologs, as in the case of *Haemophilus influenzae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Lactobacillus plantarum*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas aeruginosa* [85].

Surprisingly, a classical AQP termed AqpM has been identified in *Methanothermobacter marburgensis*, a methanogenic thermophile archaea that grows under anaerobic conditions. Apparently, AqpM is the only MIP in archaea, exhibiting a wider pore structure to accept larger molecules, being able to transport both water and glycerol at low rates, as well as CO₂ [51, 86]. Nevertheless, AqpZ appears to be more efficiency in water conductance compared to AqpM, suggesting that AqpM may be a multifunctional channel rather than a simple water pore [87].

Fungal orthodox AQPs regard an amazingly diverse group of proteins. Whole-genome annotation of AQPs in 480 fungal genomes revealed 639 predicted orthodox AQPs (41.2% of the deduced fungal MIPs). Almost half of the considered genomes belonged to *Ascomycota* and *Basidiomycota*. However, AQPs are clearly under represented in *Zygomycota*, while no AQPs could be identified in the genomes of *Blastocladiomycota*, *Chytridiomycota*, *Neocallimastigomycota*, *Microsporidia* and *Cryptomycota* [88]. Taken together, yeasts and filamentous fungi bear potential to harbor new principles of AQP regulation, evolution, and physiological function. Interestingly, AQPs from yeasts appear to be more similar to plant MIPs than to animal water channels, while the situation is just the opposite for those of filamentous fungi [56].

Table 1. Distribution and classification of aquaporins in plant species. Abbreviations: PIP (Plasma membrane intrinsic protein); TIP (Tonoplast intrinsic protein); NIP (Nodulin-26 like intrinsic protein); SIP (Small intrinsic protein); XIP (Uncharacterized X Intrinsic Protein); GIP (GlpF-Like Intrinsic Protein); HIP (Hybrid Intrinsic Protein); AQP (Aquaporin).

Species	Family	Higher group	Common Name	PIP	TIP	NIP	SIP	XIP	GIP	HIP	AQPs	Data Source	Refs.
<i>Ananas comosus</i>	Bromeliaceae	Monocot	Pineapple	7	8	7	1	-	-	-	23	Genome	Present work
<i>Arabidopsis lyrata</i>	Brassicaceae	Dicot	Northern rock- cress	13	12	10	3	-	-	-	38	Genome	[19]
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	Dicot	Mouse-ear cress	13	10	9	3	-	-	-	35	Genome	[20]
<i>Beta vulgaris</i>	Amaranthaceae	Dicot	Beet	7	8	9	3	1	-	-	28	Genome	[21]
<i>Brachypodium distachyon</i>	Poaceae	Monocot	Brachypodium	10	10	7	1	-	-	-	28	Genome	[22]
<i>Brassica napus</i>	Brassicaceae	Dicot	Canola	43	35	32	11	-	-	-	121	Genome	[23]
<i>Brassica oleracea</i>	Brassicaceae	Dicot	Broccoli	24	15	14	4	-	-	-	57	Genome	[19]
<i>Brassica rapa</i>	Brassicaceae	Dicot	Turnip	22	16	13	6	-	-	-	57	Genome	[19]
<i>Capsella grandiflora</i>	Brassicaceae	Dicot	Grand shepherd's-purse	13	9	9	3	-	-	-	34	Genome	[19]
<i>Capsella rubella</i>	Brassicaceae	Dicot	Pink shepherd's-purse	14	11	9	3	-	-	-	37	Genome	[19]
<i>Cicer arietinum</i>	Fabaceae	Dicot	Chickpea	8	13	15	4	-	-	-	40	Genome	[24]
<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	Dicot	Orange	8	11	9	3	3	-	-	34	Genome	[25]
<i>Eutrema salsugineum</i>	Brassicaceae	Dicot	Saltwater cress	14	11	9	3	-	-	-	37	Genome	[19]
<i>Glycine max</i>	Fabaceae	Dicot	Soybean	22	23	13	6	2	-	-	66	Genome	[17]
<i>Gossypium hirsutum</i>	Malvaceae	Dicot	Cotton	28	23	12	7	1	-	-	71	Transcriptome	[26]
<i>Hevea brasiliensis</i>	Euphorbiaceae	Dicot	Rubber tree	15	17	9	4	6	-	-	51	Genome	[27]
<i>Hordeum vulgare</i>	Poaceae	Monocot	Barley	11	7	4	-	-	-	-	22	Transcriptome	[28]
<i>Jatropha curcas</i>	Euphorbiaceae	Dicot	Physic nut	9	9	7	4	3	-	-	32	Genome	[29]
<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	Dicot	Flax	16	17	13	2	3	-	-	51	Genome	[30]
<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	Monocot	Banana	18	17	9	3	-	-	-	47	Genome	[31]
<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	Monocot	Rice	11	10	10	2	-	-	-	33	Genome	[32]
<i>Panicum virgatum</i>	Poaceae	Monocot	Switchgrass	21	20	23	4	-	-	-	68	Genome	[22]
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	Dicot	Common bean	12	13	10	4	2	-	-	42	Genome	[33]
<i>Phyllostachys edulis</i>	Poaceae	Monocot	Bamboo	10	6	8	2	-	-	-	26	Genome	[34]
<i>Physcomitrella patens</i>	Funariaceae	Bryophyte	Moss	8	4	5	2	2	1	1	23	Genome	[35]
<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	Dicot	Poplar	15	17	11	6	6	-	-	55	Genome	[16]
<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	Dicot	Castor bean	10	9	8	4	6	-	-	37	Genome	[36]
<i>Saccharum officinarum</i>	Poaceae	Monocot	Sugarcane	24	13	3	2	-	-	-	42	Transcriptome	[37]
<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	Pteridophyta	Spike Moss	3	2	8	1	3	-	2	19	Genome	[38]

(Table 1) contd....

Species	Family	Higher group	Common Name	PIP	TIP	NIP	SIP	XIP	GIP	HIP	AQPs	Data Source	Refs.
<i>Setaria italica</i>	Poaceae	Monocot	Foxtail millet	12	15	12	3	-	-	-	42	Genome	[22]
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solanaceae	Dicot	Tomato	14	11	12	4	6	-	-	47	Genome	[39]
<i>Solanum tuberosum</i>	Solanaceae	Dicot	Potato	15	11	10	3	8	-	-	41	Genome	[40]
<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	Monocot	Sorghum	14	13	11	3	-	-	-	41	Genome	[41]
<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	Dicot	Grape	8	11	8	2	-	-	-	29	Transcriptome	[42]
<i>Zea mays</i>	Poaceae	Monocot	Maize	13	11	4	3	-	-	-	31	Transcriptome	[43]
<i>Zostera marina</i>	Zosteraceae	Monocot	Eelgrass	4	8	8	5	-	-	-	25	Genome	[44]

Table 2. Distribution and types of aquaporins through distinct groups of organisms with different complexity levels, including bacteria, fungi, protozoa, nematodes, plants, insects, and vertebrates.

Organism	Classical AQP	Aquaglyceroporins	Unorthodox	Refs.
Bacteria				
<i>Brucella abortus</i>	AqpX	-		[47]
<i>Escherichia coli</i>	AqpZ	GlpF	-	[48, 49]
<i>Haemophilus influenzae</i>	HI1017	HI0690	-	[50]
<i>Methanothermobacter marburgensis</i>	AqpM	-	-	[51]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	GLPF-PA0	-	[52]
Fungi				
<i>Aspergillus nidulans</i>	aqpA	aqpB~E	-	[53]
<i>Laccaria bicolor</i>	Lacbi1:392091	Lacbi1:391485, Lacbi1:317173, Lacbi1:247946	-	[54]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	-	glpF1 – glpF6	-	[55]
<i>Magnaporthe grisea</i>	-	MG03904.4, MG04162.4, MG10783.4, MG05880.4	-	[56]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Saqy1, Saqy2	FPS1, YFL054C	-	[57]
<i>Salmonella typhimurium</i>	-	PDUF-SALTY	-	[58]
<i>Terfezia clavaryi</i>	TcAQP1	-	-	[59]
<i>Ustilago maydis</i>	-	UM01508.1, UM02169.1, UM01930.1, UM00223.1, UM02842.1	-	[56]
Protozoa				
<i>Dictyostelium discoideum</i>	AqpA, AqpB, AqpC, AqpD	-	-	[60-63]
<i>Leishmania major</i>	LmAQP1	-	-	[64]
<i>Plasmodium falciparum</i>	PfAQP	-	-	[65]
<i>Trypanosoma cruzi</i>	TcAQP	-	-	[66]
<i>Trypanosoma brucei</i>	-	TbAQP1, TbAQP2, TbAQP3	-	[67, 68]
<i>Toxoplasma gondii</i>	TgAQP	-	-	[69]

(Table 2) contd....

Organism	Classical AQP	Aquaglyceroporins	Unorthodox	Refs.
Nematode				
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CeAQP2, 4, 6	CeAQP1, 3, 7	-	[70]
Insect				
<i>Drosophila melanogaster</i>	DRIP	-	-	[71]
Vertebrates				
<i>Danio rerio</i>	AQP0, -1 and -4	AQP3 and AQP7-10	AQP11, 12	[72]
<i>Homo sapiens</i>	AQP10, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 14	AQP3, 7, 9, 10, 13	AQP11, 12	[73-76]

The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two similar AQP genes (ScAqy1 and ScAqy2), which differ in their regulation [89, 90]. It is now apparent that ScAqy1 is essential for the decrease of water content in the newly formed spore [91]. On the other hand, the ScAqy2 is expressed in the endoplasmic reticulum and plasma membrane, and their expression level was lower in cells grown in high-osmolarity medium, as the ScAqy2 expression is down-regulated by a high osmolarity. The essential roles of both Saqy1 and Saqy2 in abiotic stress response suggest that these AQPs can regulate freezing tolerance [56, 92, 93]. Cells with deletion of these genes became sensitive to freezing under *in vitro* condition. In turn, overexpression of Saqy2 improved freeze tolerance [92, 94]. Certain fungal AQPs are also permeable to gases, and many of the characterized aquaglyceroporins provide a better water permeability of plasma membranes than AQPs [88].

In protists, particularly in pathogenic protists, the number of AQPs varies among species. For instance, there are five genes in *Leishmania major* [95], four in *Trypanosoma cruzi* [96, 97], three in *Trypanosoma brucei* [67], one in *Plasmodium falciparum* [65] and one in *Schistosoma mansoni* [98]. Evidences have pointed out that protozoan AQPs contribute to adaptation in changing environments. Water permeability may be essential for coping with osmotic stress during transmission between the host and vector and during passages in mammal hosts. Besides that, AQPs supply access to metabolic precursors and nutrition, also providing the exclusion of toxic metabolites [99]. The deduced protozoan AQPs appear to be phylogenetically related to plant AQPs.

It is usually said that plants show a much higher diversity of AQPs than animals. This statement is supported by the fact that there are only 15 AQP types (AQP0-14) displaying 18 paralogs in mammals [100], with AQPs 13 and 14 just found in older mammal lineages (Metatheria and Prototheria) [5, 75, 101], while specific plant species, present an isoform number varying from 19 in *S. moellendorffii* [38] to 121 in canola [23] (Tables 1 and 2). Such differences can be due to a high multiplicity of isoforms in plants in relation to a high diversity of subcellular localizations, including the plasma membrane (PM) and various intracellular compartments, besides that the number of isoforms is species-dependent [14, 102]. Moreover, this elevated expansion rate of AQPs in higher plants is not merely due to higher duplication rates of plant genomes but also to the adaptive potential brought by

AQPs, what can be particularly relevant given the sessile lifestyle of plants [14].

Animal AQPs are usually classified into four groups based on their structural and functional characteristics: (i) classical or orthodox AQPs (AQP10, 1, 2, 4, 5, 6, and 14), associated with water transport; (ii) aquaglyceroporins (AQP3, 7, 9, 10, and 13) permeable to glycerol, urea and other small solutes in addition to water; (iii) unorthodox AQPs (also called supraaquaporins) a group that was recently isolated (AQP11 and AQP12), which share low homology with other AQPs; and (iv) aqua-ammoniaporins (AQP8 and AQP6) sometimes included in the orthodox AQP group [73-76].

In invertebrates, a systematic review demonstrated that the AQPs are involved in regulating the movement of a high volume of liquid diets, osmoregulation, respiration, cryoprotection, and anhydrobiosis [103-105]. Many functional AQPs have been identified in diverse insect species, including three from *Aedes aegypti* [106, 107] and *Bombyx mori* [108], besides two shared by *Acyrtosiphon pisum* [109], *Polypedilum vanderplanki* [110] and *Drosophila melanogaster*, this last species presenting two genes encoding for proteins similar to MIPs: DRIP (*Drosophila* integrin protein) and BIB (*Drosophila* big brain) [71].

8 AQUAPORIN CLASSIFICATION

Since their discovery AQPs have been extensively studied, being categorized into subfamilies based on sequence similarity. In plants, four AQP subfamilies are well characterized: PIP (Plasma Membrane Intrinsic Protein); TIP (Tonoplast Intrinsic Proteins); NIP (Nodulin 26-like Intrinsic Proteins) and SIP (Small and Basic Intrinsic Proteins) [4, 19, 20, 111, 112]. Later, a fifth subfamily, called XIP (Uncharacterized X Intrinsic Protein) was identified in bryophytes and some higher plant species [26, 35, 113]. Also, two additional subfamilies GIP (Glucose-Like Intrinsic Protein) and HIP (Hybrid Intrinsic Protein) have been described in more primitive plant groups as the bryophyte *P. patens* [35] and the lycophyte *S. moellendorffii* [38]. Due to their absence in higher plants, it has been proposed that these genes were lost during evolution [35, 38].

The subfamily PIP is subdivided into two subgroups, PIP1 and PIP2, generally representing the highest abundance of AQPs in plants, with different isoform number, varying

from three members in *S. moellendorffii* [38], 13 members in *A. thaliana* [20], 28 in cotton [26] until 43 PIP isoforms in canola [23] (Table 1). PIP1 shows a distinct structure than PIP2, due to a longer extension in the N-terminal region, whereas PIP2 exhibits a more elongated C-terminal [26]. In PIP members the amino acid residues present an NPA motif and a selectivity filter (Phe-His-Thr-Arg), a highly conserved region present in PIPs of all studied plant species [19, 40, 43]. Regarding the four amino acids present in the aromatic/arginine (ar/R) filter, the residues located in helix 5, Loop E (positions 1 and 2) are of hydrophilic nature [40]. These AQP are located exclusively on plasma membranes and have a molecular weight (MW) of approximately 30 kDa [19] and an isoelectric point (pI) of 9.0, due to the presence of several basic amino acids at the carboxyl-terminal [46]. Additionally, PIP1 can act in the transport of small solutes or gases and may exhibit water channel activity mediated by modifications or interactions with other AQPs [114, 115]. The PIP2 members play a role in different physiological processes involved in the transport of water to roots, leaves, reproductive organs and seed germination [116, 117].

Members of TIP subfamily can be grouped into five subgroups (TIP1; TIP2; TIP3; TIP4 and TIP5) [20, 43, 46]. The NPA motifs are highly conserved, whereas selectivity filters have a higher level of variation across different subgroups [19, 40]. TIP representatives are located preferentially in the vacuole membrane and are responsible for the flow of water and small solutes through membranes, besides acting on turgor regulation, signaling, and cellular degradation processes [118]. The MW ranges between 25 and 28 kDa, and the pI is more acid, ranging from 4.0 to 6.7 [19, 119]. In addition to their high capacity in water transport [120], many TIP isoforms carry small molecules, as glycerol [121], CO₂ [115], urea and NH₃ [122].

The AQPs belonging to NIP subfamily can be classified into seven subgroups (NIP1; NIP2; NIP3; NIP4; NIP5; NIP6; NIP7) [19, 20]. It has been proposed that this subfamily was acquired from a single horizontal gene transfer event from bacteria to land plants [4]. NIP isoforms are found in the plasma membrane and the endoplasmic reticulum (ER), constituting a group of multifunctional AQPs [123]. When compared to PIPs and TIPs, the expression of NIPs is lower, being associated with cell specializations, such as the root elongation zone [46]. Experiments of heterologous expression showed that NIP members are functional for water and glycerol transport but exhibit lower permeability to water [46, 118].

The SIP subfamily is structurally classified into two subgroups: SIP1 and SIP2. NIPs comprise small proteins (26 kDa), are similar to TIP members but with a highly basic characteristic presenting pI values around 9.0 [19, 118]. This high pI value may be a consequence of the lysine series present in its C-terminal region [119]. Among the MIPs, this is the subfamily with the lowest member's number, initially identified through data mining in sequence databases and phylogenetic analyses [40, 118]. *In vitro* studies indicated that SIPs act to transport water through the endoplasmic reticulum membrane and are involved in the regulation of water volume and ionic concentration in ER lumen, as well as in organelle morphology [124].

The most recent AQP subfamily discovered in the 'omics age' is XIP. This group is subdivided into four subgroups (XIP1, XIP2, XIP3, and XIP4) [16, 40]. Its members were identified in different vascular and non-vascular plants including *P. patens* (with two isoforms) [35], and *S. moellendorffii* (three isoforms) [38]. Later, AQPs from this category were observed in angiosperms, including reports from potato (with eight isoforms), *Populus trichocarpa* (six isoforms) [16], and three species with one isoform each: tomato [39], *Gossypium hirsutum* [26] and *Vitis vinifera* [42]. It is interesting to note that although XIPs were identified in a variety of dicotyledonous plants, no homologs were found neither in Brassicaceae, including its most known member *A. thaliana* [19, 20] nor in other monocots sequenced so far [35] (Table 1). These proteins are located on the plasma membrane, presenting high transport activity for small solutes but not water, as validated during heterologous expression experiments using *X. oocytes* or yeast models [125]. The most highly conserved feature of XIP is the NPARC motif, which is the signature pattern for this subfamily, where a cysteine residue is located just after the second NPA motif [16, 35], as can be seen in the multiple alignment generated in the present work (Supplementary Fig. S1). This occurs because plant XIPs exhibit a high level of variation in the third amino acid of the NPA motif present in Loop B. A similar variability is observed in NIPs, thus suggesting that XIPs have diversified substrate specificity, while maintaining other specific regions and features of AQPs [16, 125].

9 AQUAPORIN STRUCTURE

The generation of many sequenced plant genomes and transcriptomes allowed identification and characterization of AQPs in a variety of plant species (Table 1), allowing analysis with bioinformatic tools multiple alignments, and analysis of sequence similarity, aiming at protein classification [20, 24, 39, 40, 113]. In the present review, a phenogram (Supplementary Fig. S2) was constructed including 146 plant amino acid sequences available from NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for 13 distinct taxa with complete sequenced genomes (Supplementary Table S1). The Neighbor-Joining tree, five distinct branches are evident, reflecting the AQP subfamilies described in plants: PIP; TIP; NIP; SIP and XIP as proposed by Venkatesh *et al.* (2013) [40] and Shivaraj *et al.* (2017) [30].

In the generated multiple alignment (Supplementary Fig. S2) the majority (111 of 146) of the AQPs presented the NPA motif in loop B (LB), which is absent only in a cotton AQP (GhTIP2). The Loop E (LE) of the alignment was still more conserved with only 17 AQPs exhibiting variations in their amino acid composition. In AQP members ZmPIP2 (maize) and EgNIP1 (*Eucalyptus grandis* L.) this conserved motif was absent (Supplementary Table S2). In both loops, the most frequent mutations occurred in the third amino acid, similar to other previous reports [18 19, 30, 46], where the alanine was replaced by a valine (V), a leucine (L), a serine (S), a threonine (T), a glycine (G) or an isoleucine (I) in the subfamilies NIP, SIP and XIP. These motifs are highly conserved in PIP and TIP subfamilies. According to Forrest and Bhavé (2007) substitutions in NPA residues may affect water transport capacity more intensely [124], showing little effect on solute selectivity. In contrast, a directed mutagenesis assay with AtNIP5 revealed no significant

consequence on solutes transport (Silicon and Arsenate) by replacing alanine with a serine or a valine [126].

The NPA motif identified in AQPs plays a role in the regulation of membrane transport and protein localization [127, 128]. Human mutant AQP1s (exhibiting one or two NPA motifs) with specific deletions were generally expressed in plasma membrane, maintaining their function in water transport [129]. Furthermore, AQP4 mutants from rat showed that a substitution in the first NPA motif resulted in incorrect subcellular localization. These results suggest that NPA motifs play a crucial role in plasma membrane expression but are not involved in AQP4 protein synthesis and degradation. So, NPA motifs may interact with other structural domains in the regulation of membrane traffic during aquaporin biogenesis [128].

The selectivity filters (ar/R) of PIP AQPs (PIP1 and PIP2) showed the FHTR [phenylalanine – histidine – threonine – arginine] standard, except for PIP2 of maize (ZmPIP2) which did not exhibit the T and R amino acid residues, exhibiting a substitution of histidine for an alanine (Supplementary Table S2). This conserved pattern in most PIP members represents a highly hydrophilic ar/R selectivity filter, a feature recorded in water carrier AQPs, in contrast to other subfamilies [44]. The TIP, NIP, SIP, and XIP subfamilies presented a higher level of changes in the selectivity filters, varying according to different subgroups. Major variations are related to NIP and SIP subfamilies [19, 24, 30, 44] being these mutations associated to changes in solute transport efficiency [33]. For plants, few AQP crystallographic studies are available, and the current understanding of selectivity filters is based mainly on AQPs of microbial and animal origin [130]. Currently, the PDB (Protein Data Bank) only seven plant AQP X-ray structures are available, six of *Spinacia oleracea* (4JC6, 4IA4, 3CLL, 3CN5, 3CN6, 1Z98 and 2B5F), and one (5I32) of *A. thaliana*.

Literature reports uncovered several structures at atomic resolution, showing that AQPs exhibit a conserved folding and membrane topology [131, 132]. AQPs are organized as tetrameric pores in cell membranes, and the tetramers are stabilized by hydrogen bonds and interactions among the monomer loops (Fig. 1B). Each AQP monomer acts as an individual pore, consisting of six transmembrane helices (H1 to H6) (Fig. 1A) and five Loops (A to E), with amino and carboxyl-terminal domains located on the cytosolic side. The Loops B and D are intra-cytoplasmic, and Loops A, C, and E are extra-cytoplasmic [133, 134]. In Loops B and E intracellular and extracellular sides respectively, fold inward to span the membrane as short helices, both containing the NPA pattern, which is extended into the pore from both sides of the membrane, a feature considered the most critical in all AQPs to maintain their function. Additionally, Loop C also connects Loop B and E, being functionally necessary for water permeability, folding back into the membrane from the opposite directions [111, 135]. The AQP structure can be compared with an hourglass (Fig. 1B), where both hemipores face each other in reverse positions within the membrane [46, 124].

The molecular basis for substrate specificity has been extensively studied, showing that although the overall structure

is conserved, there are specific points in MIPs that determine differences in selectivity channels. NPA motifs are widely recognized as necessary in transport activity due to their conservation in several MIPs of animals, plants, protozoa, fungi, eubacteria and archaea [4, 124]. While, B and E loops contain highly conserved NPA, the ar/R region is formed by one residue from helix 2 (H2) and helix 5 (H5), while two residues from loop E (LE1 and LE2) represent the other constriction that regulates transport activity (Fig. 1B). Both NPA and ar/R determine the substrate permeability [86, 136, 137]. Variability at the ar/R selectivity filter, at NPA motifs, and the spacing between NPA motifs are proposed to affect substrate specificity of plant AQPs [127, 138]. Such variability in conserved residues forms the basis of the broad spectrum of substrate conductance [16, 139]. All plant PIP homologs present ar/R selectivity filters that are similar to mammalian water-specific AQP1. In turn, TIPs show significant diversity related to the ar/R region, suggesting a more diverse transport function when compared to PIPs [140].

Recently, another selectivity filter (TIP2-specific LCP-His131) was described in *A. thaliana* associated with ammonia permeability, acting in the modulation of ammonia losses from the plasma membrane to atmosphere during photorespiration, also influencing plant nitrogen use efficiency [141]. The ar/R region is positioned on the center of the pore, forming a second constriction, separated from the NPA motif, responsible for providing hydrogen bonds for the transport of water molecules or glycerol, or for repelling cations from the pore [137, 142].

In addition to the mentioned filters and NPA motifs, there is another conserved region that also plays a role in AQP specificity to solutes, known as Froger's residues. This region is known to discriminate aquaglyceroporins that transport glycerol (GLPs) from AQPs that conduct water [52]. These five conserved residues are designated as P1 to P5 and play roles in substrate selectivity. Recently, some specificity-determining positions have been suggested by analyzing MIP protein sequences that transport non-aqua substrates in wet-lab experiments [140, 143, 144]. The diversity of pore configurations indicated that plant MIPs could transport many more diverse solutes than their mammal counterparts [16], and possibly also than any other organisms.

The three-dimensional plant AQP structure was visualized by cryoelectron microscopy of bi-dimensional (2d) crystal for AQP PvTIP3-1 from common bean [145-149] and for the SoPIP2-1 member of spinach (*S. oleracea*) [150] and more recently for SoPIP2-1 using X-ray crystallography on 3D crystals [136]. Changes in water availability require rapid regulation of membrane water permeability, involving opening and closing of water channel pore. In this scenario, phosphorylation and dephosphorylation of AQPs, mediated by kinases and phosphatases, are considered essential mechanisms for activity regulation, together with gating regulated by protons (H⁺) and divalent cations. Previous works have shown that phosphorylation enhances AQP activity [111, 151, 152], keeping the pores in the open state [133, 136]. Mass spectrometry analyses and the use of antibodies for phosphorylated AQP peptides revealed that they present different phosphorylation sites in subfamilies PIP,

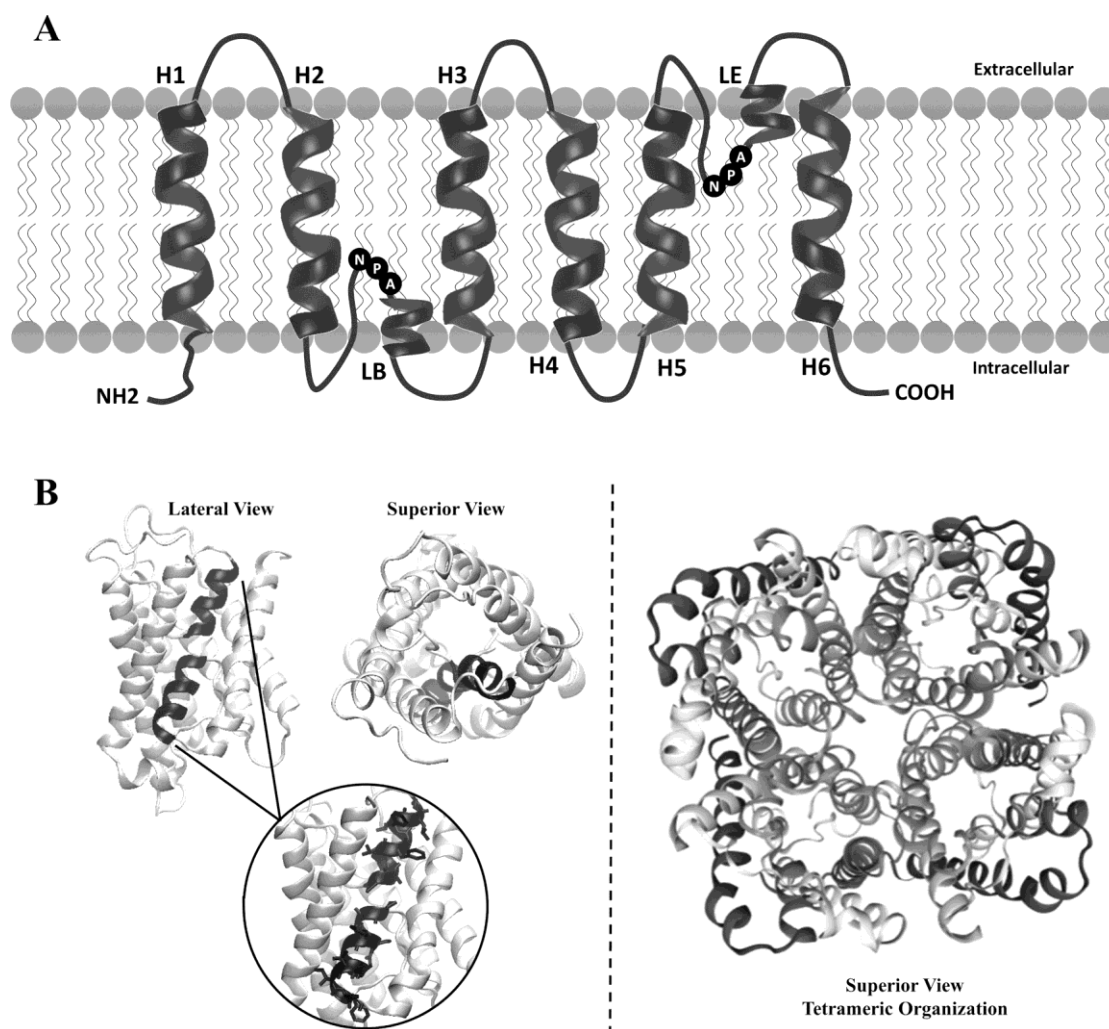


Fig. (1). (A) Schematic aquaporin structure, showing main characteristics. Six transmembrane domains (Alfa-helices) are represented in dark grey helix (H1 to H6), five connecting loops (A to E), and NH₂ and COOH-terminal tails bathing in the cytosol. Two alpha-helix domains on Loops B and E containing NPA (asparagine-proline-alanine) motifs that are the main pore formers. (B) X-ray structure for SoPIP2-1 aquaporin from spinach (*Spinacia oleracea*) [PDB: 2B5F]. Left: Lateral and superior view of aquaporin monomer, with NPA motif (Loop B and E) in black and zoomed circle; Right: tetrameric arrangement in superior view, showing the four aquaporin monomers, forming individual pores.

TIP, and NIP [153]. Phosphorylation of serine residues in N- and C-termini have been reported for some plant species and in the cytoplasmic loop close to the first NPA motif. The serine residue is highly conserved in PIPs and TIPs from plants and is recognized by protein kinases, like calcium- dependent protein kinases [135, 154]. The exact process associated with each serine residue remains still not elucidated, but Ser256 phosphorylation was demonstrated as necessary for correct water transport across the plasma membrane, while phosphorylation of Ser264 and Ser269 are not strictly required [14, 155].

10 AQUAPORIN FUNCTIONS IN PLANTS

From a functional point of view, more evidences have been unveiled regarding the multifaceted roles of plant AQPs. In the last two decades, numerous studies have shown that, in addition to their function as essential water transporters, some plant AQPs can also facilitate the transport across

membranes of other solutes of considerable physiological importance [118, 156-158]. Water and CO₂ transport in the chloroplast, for example, are essential for the successful operation of photosynthesis [159-161]. Moreover, the N status in plants is also influenced by AQPs either through regulating water flow or by facilitating urea and NH₄⁺/NH₃ uptake [161]. Specific AQPs also facilitate H₂O₂ diffusion and control permeability and signaling [162]. Distinct AQP subfamilies are also a multifaceted channel for metalloids (some essential for plant growth as boron and silicon, while others are toxic, like arsenic and antimony), ensuring their homeostasis [163]. Plant AQPs are also dependent upon different environmental stimuli, organ, and developmental stage. Additionally, a single isoform can have multiple functions depending upon its tissue or subcellular localization [164-166].

Selectivity profiles and regulatory AQP properties are essential in multiple plant physiological mechanisms, including seed germination, growth, development, reproduction, and

resistance to abiotic and biotic stresses [18, 167, 168]. Such selectivity for a specific substrate is attributed to two regions forming the pore in the central channel: the conserved NPA motifs and amino acid residues including the ar/R selectivity filter which allow charge and size exclusion of the entering molecules [124, 138, 156, 159].

Our understanding of AQP-mediated transport system in plants has expanded rapidly with the help of different omics approaches accompanied by nucleotide next-generation sequencing (NGS) and analytical bioinformatic tools [169]. Various abiotic stress conditions have shown a differential response of distinct AQP homologs in diverse plant tissues. Studies of gene expression have already detected the induction of these proteins even under disease conditions, showing that they play an essential role in the regulatory mechanisms of the organism [170]. However, the precise role of individual AQP response to a given environmental stress is difficult to define because integrated responses may vary among different plant species [168]. Additionally, the mode of regulation is not only dependent upon the plant species and nature of stress but can also be specific to organ, tissue and developmental stage [166].

11 IN SILICO FOR IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AQUAPORINS

The advent of NGS technologies, optimized assay systems, and has enabled comprehensive studies of plant genomes in a quick and economically viable manner, allowing the characterization of entire gene families and understanding of plant stress response mechanisms [171-173]. In this context, bioinformatics encompasses many tools to help in data evaluation, essential for biological sciences. New databases related to genomes, proteins, metabolites, and metabolic pathways appear almost daily. In this sense, bioinformatics together with NGS and omics approaches can provide tools for plant breeding and genetic engineering [174, 175]. The identification based on computational methods is faster when compared to traditional molecular biological methods, with its efficiency related to data integration from public databases, associated with prediction algorithms, improving new approaches for the characterization of different gene families [176].

The available number of plant sequences and genome databases have grown up around different clades, like TAIR for *Arabidopsis* [177], Gramene for grasses [178], LIS for legumes [179], Phytozome [180], Plaza [181], and PlantGDB [182], for instance. These databases and web portals provide a set of tools and automated analyses across plant genomes, providing the identification of putative gene families, transferring functional information from model plants to plants of agricultural, industrial and environmental importance [183, 184].

This acceleration resulted in more than 150 available plant genomes, presenting differences in terms of both assembly and annotation, representing a wide range of taxonomic groups. For example, in PLAZA 4.0 platform 71 genomes were retained and distributed over dicots and monocots, comprising species with commercial, ecological and academic interest. This version offers a solution to elucidate phylogeny of complex and large gene families, allowing

opportunities for bioinformaticians to retrieve and analyze sequence data [185]. Larger databases providers such as NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and TIGR (<http://www.tigr.org/>) function as both repositories and specific resources. The PlantGDB is a web-based research tool that includes EST (Expressed Sequence Tag) clusters and assemblies for studied plant species like the TIGR gene indices

[186] available for some species. PlantGDB provides domain-specific database implementations that are entirely portable, enabling genome-scale biological research on alternative splicing, sequence distribution and conservation [187]. More recently the Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) has gained prominence since it was first released in 2008. Now Phytozome provides a centralized hub that enables users with varying degrees of computational skill to access annotated plant gene families, evolutionary history of individual genes or gene families, to examine plant genes in genomic context, assign putative function to uncharacterized sequences and to provide uniform access to complete genomes, with custom visualization code for gene family search, inspection and evaluation [180].

During the last years, intensive research has focused on understanding the structure and function of plant AQPs in the transport of water, solutes and under stress. The availability of whole genome sequences and transcriptomic approaches for animal and plant species has facilitated genome-wide identification and classification of AQPs (Table 1). Global identification of AQPs contributes to the understanding of AQP distribution and evolution in plants, its phylogeny and subsequent categorization into sub-families and groups. Additionally, to the identification of novel AQP genes, genome-wide studies have contributed to a better comprehension of the AQP molecular evolution. Precise identification of conserved features in sequences and their functional relevance has progressed rapidly with bioinformatic approaches, favoring the discovery of AQPs plant repertory [16, 130]. Predictions based on sequence alignments using well-known AQPs sequences or motifs (HMM pattern) are the most precise method to generate a genome-wide AQP identification using available plant genomic data in currently available databases (see workflow in Supplementary Fig. S3). Because of AQP conservation, a simple alignment using well-described plant AQPs as queries against a plant complete genome can uncover members of this family [188]. This is also true for transcriptomes with good coverage. For more divergent plant AQPs, the PSI-BLAST (NCBI; Bioinformatics Toolkit server at http://toolkit.tuebingen.mpg.de/psi_blast) [189] or the HMMER package (<http://hmmer.org/>) [190] can be used to detect significant hits, detecting even rare plant AQP members [191-193].

6.1. Identification and Characterization of Aquaporin Gene Family in *Ananas comosus* – A Case Study

Pineapple (*Ananas comosus*) is a tropical plant with edible infructescences, consumed in various ways (fresh, cooked, juiced, etc.) and is the most economically significant plant of the Bromeliaceae family [194, 195]. Pineapple is an important source of vitamins and contains the proteindigesting enzyme bromelain [196]. This species is an interesting material for studying the evolution of crassulacean acid metabolism (CAM) photosynthesis, useful as outgroup for investigating cereal genome evolution [197].

The available genome is the result of an assembly of two sequenced genomes from varieties ‘F153’ and ‘MD2’, presenting a genome size of approximate $1\text{C} = 526\text{ Mb}$ [198]. The pineapple reference genome assembly incorporated data from a mixture of sequencing technologies, including Illumina whole genome shotgun, 454, PacBio, and Moleculo sequencing, as well as BAC pools sequenced with Illumina, generating 8986 contigs and 3133 scaffolds after assembly (Ming *et al.*, 2015 [197]).

We conduct a search based on BLAST alignment against pineapple (*Ananas comosus* v3 genome) on Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) as described in the workflow presented in Supplementary Fig. S3. First, a set of plant AQP sequences covering all AQP diversity (Supplementary Table S1) was used as a query in a tBLASTn search against the reference genome database (cut off of e^{-05}). After recovering all putative pineapple AQP candidates, the sequences were evaluated by BATCH CD-search (interface to the RPS-BLAST algorithm and the CDART database) for domain integrity evaluation [191]. Next, a multiple alignment for complete sequences was conducted using ClustalW [192] for functional (NPA) motifs and amino acid residues identification (ar/R and Froger’s positions).

To determine pineapple AQP nomenclature and classification in different subfamilies, a dendrogram was constructed using the NJ method, with a bootstrap of 1000 replications [25, 34, 201], using the program MEGA6 [193]. For dendrogram construction, in addition to pineapple AQPs sequences, complete AQP sequences from *A. thaliana* [20] were used as a reference to classify pineapple sequences. The BLAST output after tBLASTn alignment (using as query 146 AQPs from 13 plant species) led to the identification of 36 putative AQPs on pineapple genome (Supplementary Table S3). Hereafter, domain integrity analyses were carried out using the conserved domain database (CDD) tool hosted in NCBI and functional annotations against the Pfam database. Gene ontology was used to confirm the function of AQP-candidates, with 23 sequences presenting a complete domain. The Neighbor-Joining tree for pineapple (Ac) and available *A. thaliana* (At) AQPs (Fig. 2) includes four distinct clusters, representing different classes of AQPs, considering the 23 AQPs that present complete domain. As expected, no member of the XIP subfamily was identified, as for all previously studied monocots. Pineapple AQPs were named according to their classification into 7 AcPIPs, 8 AcTIPs, 7 AcNIPs, and 1 AcSIP. The PIP branch presented a high bootstrap (100) with a single pineapple member (AcPIP) in a basal position followed by a node with good bootstrap (94) with four subgroups, sometimes including sequences of pineapple, of *Arabidopsis* or both, probably reflecting functional specialization. In turn, AcTIPs formed clusters including both, Ac and At AQPs, also reflecting their functionalities.

Of 36 putative pineapple AcAQPs identified, 23 presented complete domain (Supplementary Table S3). This number is similar to those observed in other species like the *A. thaliana* with 35 AQPs [20], rice with 33 [32] and maize with 33 aquaporins [43]. The pineapple AQPs identified were named according to nomenclature proposed in gene

classification of *Arabidopsis*, *i.e.*, includes genus (one letter), species (one letter), and gene name using three letters for each AQP subfamily (PIP, TIP, NIP, and SIP) [199].

Pineapple AQPs displayed particularities in NPA motifs and residues at ar/R selectivity filters and Froger’s positions (Supplementary Fig. S4 and Table 3). All sequences contained dual NPA motifs, with members showing typical NPA motif, except AcTIP3-1, AcNIP5-1, AcNIP6-1, AcNIP6-2, and AcSIP2-1, presenting different residues in at least one position. Almost all PIP members showed the conserved ar/R filter residue with phenylalanine in H2, histidine at H5, threonine at LE1 and arginine at LE2 (Table 3), with exception AcPIP1.1 that presented an incomplete sequence in H2 region. In TIP sub-family H2 position of the ar/R filter comprised a histidine, except AcTIP5-1 (glutamine – Q), H5 position comprised one isoleucine, and for AcTIP5-1 and AcTIP4-1, which included a valine residue. The LE1 and LE2 positions were found to be specific for each subgroup of AcTIPs. In NIP subfamily, the NIP1 members were characterized by tryptophan (H2), valine (H5), alanine (LE1) and arginine (LE5) whereas the SIP members showed serine/histidine/glycine/serine (data summarized in Table 3).

Functional characterization of AQPs in plant genomes has shown that some members are not limited to water transport but can also be involved in the transport of non-aqua substrates, such as glycerol, CO_2 , $\text{NH}_4^+/\text{NH}_3$, urea, silicon, H_2O_2 , arsenic, antimony, lactic acid, and boron [24]. Some point modifications in NPA motifs appear to have little effect on substrate selectivity, but the substitution of an alanine (A) for a valine (V) in the motif present in Loop E, like observed in some pineapple aquaporins, is compatible with the transport of formamide, urea, and glycerol, presenting low levels of water transport [124]. Despite that, in general, only significant modifications led to differences in selectivity and efficiency in transport [123]. Highly conserved residues in the ar/R region have been shown to be functionally important in determining substrate affinity and passage through biological membranes [159]. Thus, evidence indicates that ar/R regions are the critical points for transport selectivity, whereas plants generally have more than one composition for this filter, like observed in Table 3 for pineapple, indicating significant structural diversity and functional properties for each AQP protein [139].

Some subfamilies, like PIP, are most conserved, presenting a histidine (H) residue at the H5 position that provides high specificity for water transport, providing hydrogen bonds to water transport [124, 139, 147, 159]. Besides the NPA motif and ar/R selectivity filter, we also analyzed Froger’s position P1-P5 the five conserved amino acid residues in AcPIP candidates, which allow discrimination of GLPs from water-conducting AQPs [52]. The P2, P3, P4 and P5 Froger’s positions in the AcPIPs were highly conserved (S-A-F-W), whereas the P1 position varied with either R/Q/M amino acid residue. Froger’s positions in the AcNIP subfamily were highly variable in comparison to other subfamilies, but subfamily groups showed a conserved pattern, with AcNIP1 group presenting F-S-A-Y-I residue in the P1- P5 positions, which has been predicted as conserved motifs in urea and H_2O_2 transporter NIPs. In the subfamilies Ac- TIP1 and AcTIP2 at the Froger’s positions, the residues T-S- A-Y-W were found in P1-P5 positions, being highly conserved and reported to be involved in urea and H_2O_2 transport [156].

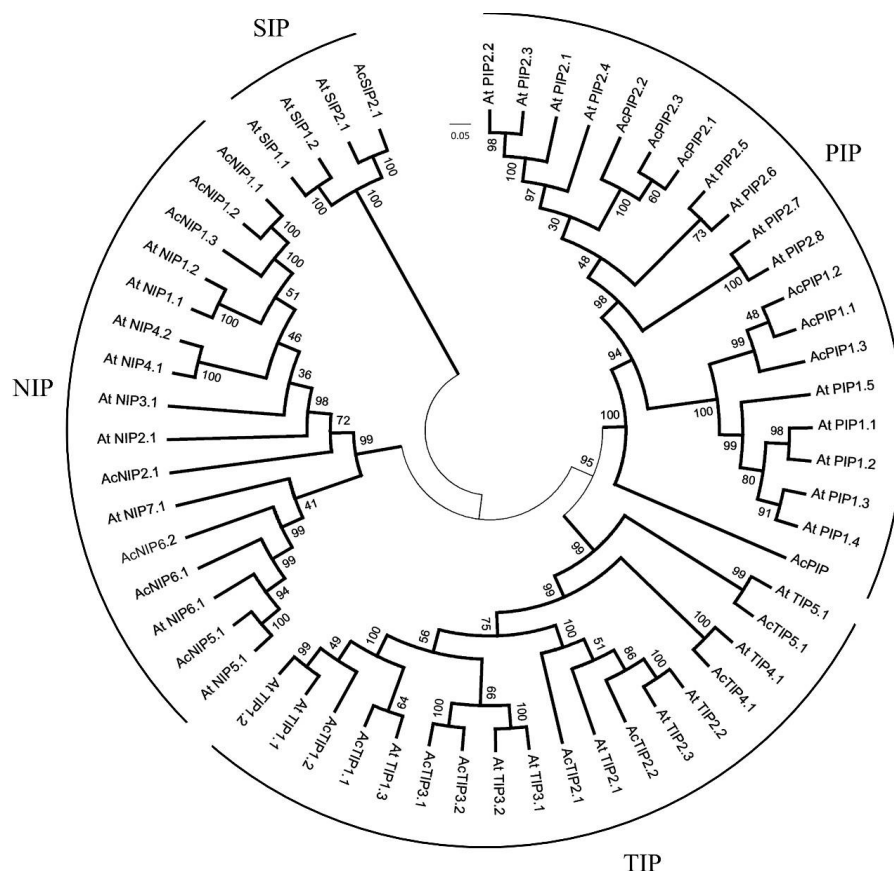


Fig. (2). Neighbor-Joining tree generated with aquaporins identified in pineapple *Ananas comosus* (Bromeliaceae, Monocot) and *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae, Dicot) (bootstrap 1000 replicates). The tree includes 23 complete *A. comosus* (Bromeliaceae, Monocot) together with 35 *A. thaliana* AQP. The four subfamilies (PIP, TIP, NIP, and SIP) were found in pineapple. No representative of the XIP family was identified. Abbreviations: Ac *Ananas comosus*; At – *Arabidopsis thaliana*; PIP (Plasma membrane intrinsic protein); TIP (Tonoplast intrinsic protein); NIP (Nodulin-26 like intrinsic protein); SIP (Small intrinsic protein); XIP (Uncharacterized X-Intrinsic Proteins).

Table 3. Conserved NPA (asparagine-proline-alanine) motifs and selectivity filter patterns (ar/R filter and Froger's residues) of predicted pineapple aquaporins. Abbreviations: Ac *Ananas comosus*; PIP (Plasma membrane intrinsic protein); TIP (Tonoplast intrinsic protein); NIP (Nodulin-26 like intrinsic protein); SIP (Small intrinsic protein).

Aquaporins	NPA (LB)			NPA (LE)			H2	H5	LE1	LE2	P1	P2	P3	P4	P5
AcPIP1.3	N	P	A	N	P	A	Q	F	H	T	R	S	A	F	W
AcPIP1.2	N	P	A	N	P	A	R	F	H	T	R	S	A	F	W
AcPIP2.3	N	P	A	N	P	A	Q	F	H	T	R	S	A	F	W
AcPIP2.1	N	P	A	N	P	A	Q	F	H	T	R	S	A	F	W
AcPIP2.2	N	P	A	N	P	A	Q	F	H	T	R	S	A	F	W
AcPIP1.1	N	P	A	N	P	A	Q	-	H	T	R	S	A	F	W
AcPIP	N	P	A	N	P	A	M	F	H	T	R	S	A	F	W
AcTIP2.1	N	P	A	N	P	A	T	H	I	G	R	S	A	Y	W
AcTIP2.2	N	P	A	N	P	A	T	H	I	G	R	S	A	Y	W
AcTIP1.2	N	P	A	N	P	A	T	H	I	A	V	S	A	Y	W
AcTIP1.1	N	P	A	N	P	A	T	H	I	A	V	S	A	Y	W

(Table 3) contd....

Aquaporins	NPA (LB)			NPA (LE)			H2	H5	LE1	LE2	P1	P2	P3	P4	P5
AcTIP3.2	N	P	A	N	P	A	T	H	I	A	R	A	A	Y	W
AcTIP3.1	N	P	A	N	L	A	T	H	I	A	R	A	A	Y	W
AcTIP5.1	N	P	A	N	P	A	S	Q	V	G	R	S	A	Y	W
AcTIP4.1	N	P	A	N	P	A	T	H	V	A	R	S	A	Y	W
AcNIP5.1	N	P	S	N	P	V	Y	A	I	G	R	T	A	Y	L
AcNIP2.1	N	P	A	N	P	A	L	G	S	G	R	T	A	Y	F
AcNIP1.3	N	P	A	N	P	A	F	W	V	A	R	S	A	Y	I
AcNIP1.2	N	P	A	N	P	A	F	W	V	A	R	S	A	Y	I
AcNIP1.1	N	P	A	N	P	A	F	W	V	A	R	S	A	Y	I
AcNIP6.2	N	P	S	N	P	V	F	A	V	G	R	T	A	Y	M
AcNIP6.1	N	P	S	N	P	V	F	A	A	A	K	T	A	Y	F
AcSIP2.1	N	P	L	N	P	A	F	S	H	G	S	A	A	Y	W

12 AQUAPORIN EVOLUTION

Despite extensive investigation in characterizing the role of AQPs subfamilies in different organisms, there are AQP candidates with still unknown functions [200, 201]. Due to their diversity and abundance, bioinformatics analyzes have the potential to help the study of structure and function of AQPs. In this review, Lowest Common Ancestor (LCA) analysis is applied to the study of AQPs for the first time. The LCA [202, 203] corresponds to the most recent common ancestor between two or more distinct organisms based on a taxonomic tree, such as the one provided by the NCBI Taxonomy. The LCA is an evolutionary method based on groups of orthologues. For this analysis, it is necessary to apply this concept in a binary tree and LCA is a part of Ukkonen's Algorithm to construct Suffix Trees. This is important to elucidate the evolution and origin of AQPs, allowing, for example, inferences on how recent or ancient a particular protein is.

For our analysis sequences of AQPs available in the Pfam database [204] (<http://pfam.xfam.org>) were used to identify and retrieve UniProt [205] (<http://www.uniprot.org/>) accession of AQP homolog proteins. In this database, AQPs can be identified as those that significantly match with the HMM (Hidden Markov Model) profile of MIP family (PF00230). Protein accessions from different Viridiplantae species matching this profile were retrieved, and their portions that aligned with this profile were extracted. This is important, because of the high number of AQPs accessions retrieved. Therefore, we selected 23 Viridiplantae species (Supplementary Table S4) with complete reference proteome and considered the accessions from those species for further analysis. The extracted sequences were aligned using the software hmmlalign, from HMMER package [206], based on the MIP profile and submitted to FastTree [207] for phylo

-genetic inference. Human AQPs (*Homo sapiens*; taxonomy ID: 9606) were also retrieved and included in the phylogenetic analysis to serve as outgroups. The resulting tree was rooted at the midpoint and submitted to TaxOnTree (bioinfo.icb.ufmg.br/taxontree) for automatic tree colorization according to the taxonomic relationship of each sample with the species *A. thaliana* measured by LCA level. These procedures allowed the generation of a phylogenetic tree (Fig. 3 and Supplementary Fig. S5) including all plant AQP categories from diverse complexity levels.

The sequence alignments used to generate the tree (Fig.3) grouped the AQPs in taxonomic / functional categories including: Basal Magnoliophyta (16 matches), Bryopsida (14 matches), Chlorophyceae (10 matches), 3 Klebsormidiophyceae (3 matches), Liliopsida (226 matches), Lycopodiopsida (26 matches), Mamiellophyceae (1 matches) and Trebouxiophyceae (19 matches). Also, the GIP subfamily appeared isolated in the bryophyte *P. patens*, while a HIP orthologous gene was found exclusively in *S. moellendorffii*, a heterosporous plant of Lycopodiopsida class.

Molecular evolution by gene duplication and structural diversification are the basis for the AQP phylogenetic framework, but the presence of horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes and vice-versa has been suggested [15, 51, 157]. Primitive plants (green algae) evolved in the water environment and are among the oldest lineages documented. In turn, land plants have been dated only since about 450- 500 million years ago (MYA) and are currently responsible for the clear majority of land cover and biomass, with high biological diversity [208]. In Fig. 3 and Supplementary Fig. S5, one may propose that the multiple AQPs duplications identifiable within Viridiplantae are possibly associated with the conquest of the terrestrial environment by land plants. After the first land plants have occupied wetlands, some taxa evolved, culminating in the colonization of challenging environments, including salinized, toxic soils and semi-arid regions [209, 210]. The doubling nodes are marked with a black dot in Fig. S5, indicating shared AQPs among related groups.

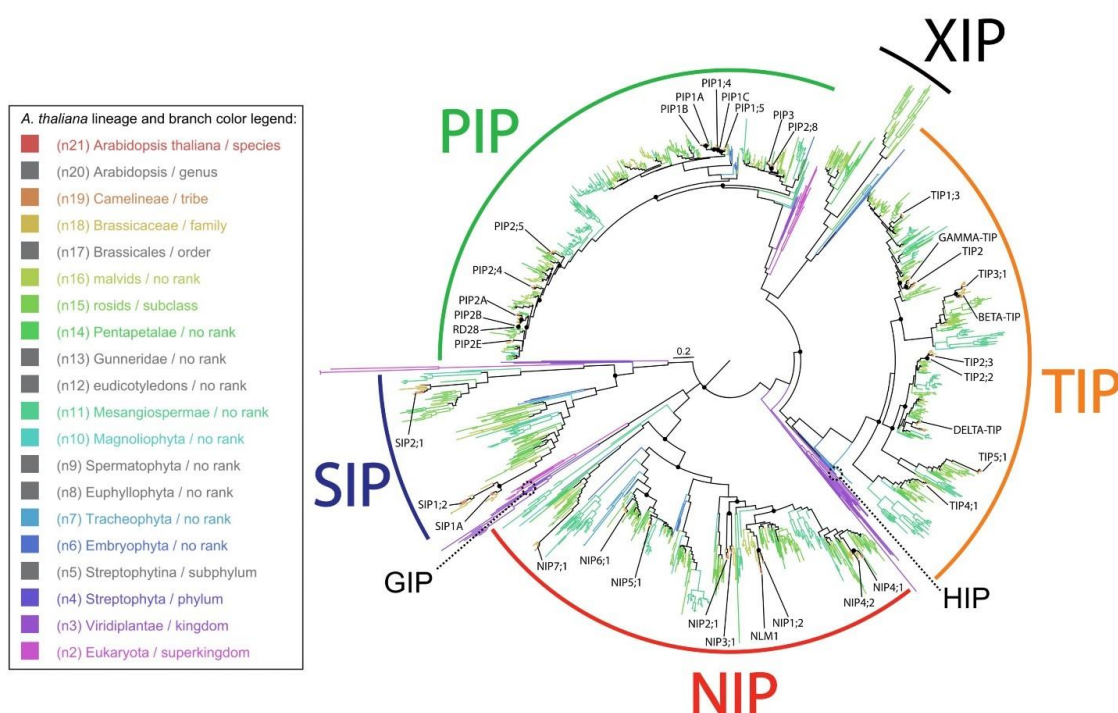


Fig. (3). Dendrogram representing structure–function relationships divided into of aquaporin subfamilies from the 23 different Viridiplantae species. The evolutionary classification is performed by the LCA (Last Common Ancestor analysis). **Legend:** PIP, Plasma membrane Intrinsic Proteins; TIP, Tonoplast Intrinsic aquaporin; NIP, Nodulin 26-like Intrinsic Protein; SIP, Small and basic Intrinsic Proteins; XIP, Uncharacterized X-Intrinsic Proteins.

LCA analysis confirmed the presence of seven aquaporin classes in plants: PIP, XIP, TIP, HIP, NIP, GIP, and SIP. Despite this diversity, only four major AQP subfamilies (PIP, TIP, NIP, and SIP) are widely distributed among higher plants [211], being also recognized in the common ancestor between plants and animals after LCA analysis (Supplementary Fig. S5). In turn, non-vascular plants, like the moss *P. patens* exhibit exclusive AQPs, as GIP and HIP, besides also presenting XIP [35].

Considering the distribution of AQP classes, some questions arise. First, why do primitive and less complex groups present exclusive classes not present in vascular/land plants? It has been proposed that GIP and HIP were lost in the course of the conquest of the terrestrial environment by primitive angiosperms [35]. It may be speculated that these classes were no longer fundamental in the presence of a developed vascular system.

Another noteworthy event regards a second loss of the XIP subfamily. As already highlighted in previous reports, XIP is absent in *A. thaliana* (Fig. 4), and there are still few descriptive properties regarding this class in literature. The subfamily XIP has been described in cotton [26], *Populus* [212], and tomato [213], among a few other plants. XIPs are commonly associated with dicot plant species and are absent in all monocots studied so far [35]. According with LCA XIP is also absent in *Amborella trichopoda*, considered a basal flowering plant (Fig. 3). Considering dicots, XIP is absent Brassicaceae family and this was considered to be a recent loss. In our LCA analysis, other dicots evaluated so far (Fig. 4), XIP subclass seems to be not fundamental, since

it is absent in some dicots, as for instance in the Brassicaceae, while in other species (for example soybean, pigeon pea, cucumber and spinach) a single representative was detected (Fig. 4). XIP is possibly not membrane-anchored, and its specific function remains unresolved. Further hypothesis considers that XIPs functions were shared with other AQPs [19].

The second question regards the paradox of more complex angiosperms (including herbaceous ones) presenting fewer AQP subfamilies as compared to non-vascular plants. Possibly the greater diversification of isoforms within the four prevalent AQP subfamilies (PIP, TIP, NIP, and SIP) provided new functionalities, replacing GIP, HIP and sometimes XIP. Especially in the case of PIP, NIP and TIP the formation of clusters in LCA tree is evident within each category (Fig. 3), indicating functional speciation probably associated with the type of molecules that their channels can permeate. Such a neofunctionalization of new AQP protein isoforms was also proposed before and there are evidences that this expansion probably allowed the association to a diversity of membranes and substrates to be transported through these channels, in agreement with the functional AQP analysis [14, 118].

Although highly conserved, the PIP subfamily presents a branch with duplications (Fig. 3), where multiple clustering PIPs (PIP1B, PIP1A, PIP1;4, PIP1C, PIP1;5) are visible. These PIP homologs have different regulatory functions in the organism, indicating an apomorphic phenomenon, indicating neofunctionalization and recent origin. In previous studies, the interaction between PIP1A and PIP1B members

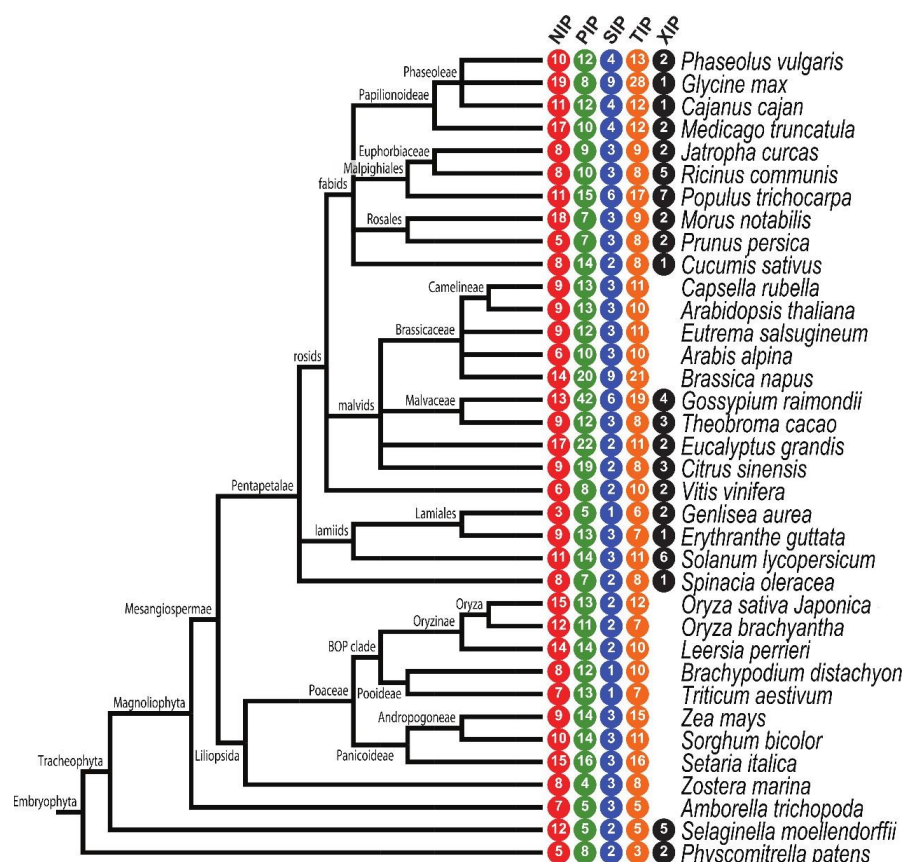


Fig. (4). Taxonomic tree of the main Viridiplantae species and the Number of aquaporins (in accordance with their subfamilies highlighted in Fig. 3) present in each of the main Viridiplantae species performed by the LCA (Lowest Common Ancestor). Upper taxonomic classification is given at the basis of the main nodes. Legend: NIP, Nodulin-26 like Intrinsic Protein; PIP, Plasma membrane Intrinsic Proteins; SIP, Small and basic Intrinsic Proteins; TIP, Tonoplast Intrinsic Protein; XIP, X-Intrinsic Proteins.

Was observed in *A. thaliana*. The new function of this PIP1B was associated with defense against the bacterium *Pseudomonas syringae*, while PIP1C was proposed to interact with PIP2E during plant response to nematode colonization [214].

The MIP superfamily is considered an ancient and diverse group of channel proteins present in all three domains of life. The selective pressure from environmental factors and biophysical strategies changed its functions, allowing the transport of specific molecules [79, 215]. This fact indicates a preponderant role of MIPs in basal cell functions. At the same time, it indicates that MIPs appeared at the beginning of the evolutionary history of life [14]. An ancient horizontal gene transfer (HGT) from bacteria to eukaryote has been proposed, involving microorganisms that are part of the plant microbiome (especially in the roots). In this context, it is possible that an HGT event provided the glycerol transporter to certain plants, where a specific glycerol transporter was absent. This hypothesis – suggested by Zardoya *et al.* (2002) – was supported by the phylogenetic similarity between glyceroporins (GLPs) of eukaryotes and bacteria [216], when compared to the respective paralogs in animals and plants, according to tree generated using Bayesian inferences [4, 5].

The molecular evolution of plant AQPs evidenced on LCA results (Fig. 3) shows that AQP diversification is mainly based on gene duplications [4, 217, 218], followed by structural changes, and neofunctionalization events based on

novel expression patterns and functional properties [215]. In fact, the phylogenetic analysis performed by Liu *et al.* (2009) with over 80 NIPs revealed an expansion of AQPs members in association with chromosomal segmental duplications resulted from tandem duplications, polyploidy and gene losses throughout the evolutionary process. These events probably allowed that three ancestral NIPs (after a subsequent species-specific expansion) to generate the classes NIP1, II and III. Additionally, the LCA results indicate that plant NIPs present at least eight duplication events in different moments (Fig. 3). Also, this expansion allowed the separation of plant NIPs into distinct clades, composed by monocot or dicot species [215].

Another robust phylogenetic study involving 1,489 AQPs protein sequences (of different subfamilies) from more than 170 proteomes including bacterial, archaeal, fungal, animal and plant AQPs, performed by Abascal, Irisarri, and Zardoya (2015) shed light on the AQP evolutionary diversification [218]. Based on the tree generated, the TIP subfamily included up to five paralog groups (TIP1-5) identified in seed plants (Spermatophytes), indicating internal family-specific gene duplications. In parallel, TIP independent expansions were also detected in the genera *Selaginella* (division Lycopodiophyta) and *Physcomitrella* (division Bryophyta), where at least eight duplication events were detected (Fig. 3). The gene duplication also directed the AQP diversity comprising the SIP subfamily members. According to the recon-

struction of this group, two SIPs resulting from a recent species-specific duplication (moss-specific duplication) functioned as an outgroup for seed plant SIP1 and SIP2 [219]. Probably this duplication event led to the emergence of paralogues occurred in a seed plant ancestor. More recently, a subgroup SIP1 presented another duplication event in some angiosperm based on LCA analysis (Fig. 3).

13 PHYSICAL DISTRIBUTION OF AQPS IN PLANT GENOMES

As told, *B. napus* (canola) of the Brassicaceae family is known as the plant genome with the highest number of AQPs described so far, with 121 AQPs [23]. RNA-Seq analysis with *B. napus* under biotic (infection with the fungal pathogen *Leptosphaeria maculans*) and abiotic (drought) stress conditions allowed identifying AQPs involved in different stress tolerance mechanisms [19]. The results comparing different ploidy levels and combinations of *Brassica* A and C genomes showed a higher expression of the AQP genes in the triploid hybrids CCA ($2n = 28$) and AAC ($2n = 29$) when compared to the parental diploid line AC ($2n = 19$) or even in the allotetraploid AACC ($2n = 38$). In fact, more than 70% of AQPs were dose-independent. The plant model *A. thaliana* (Brassicaceae family, Camelinae tribe) showed significant similarity with AQPs of the Brassicaceae tribe, which includes canola. This genetic conservation enables the knowledge transfer among these taxonomically related species [220]. Indeed, the *Brassica* genomes are composed basically of three subgenomes, which can be compared with that of *A. thaliana*, from which they diverged at about 22.5 MYA [221]. Thus, different analyzes of genome-wide identification of AQPs encoding genes covering species of the Brassicaceae tribe presented the total number of AQP members (comprising the four major subfamilies: PIP, TIP, SIP and NIP) clearly expanded when compared with *Arabidopsis* species (35 AQPs of *A. thaliana* [20] and 38 of *A. lyrata* [19]). In those studies, *B. rapa* totalized 53 AQPs [222]; *B. oleracea*, 67 [220], and *B. napus*, 121 [23].

To illustrate synteny and collinearities comprising 35 AQP homologs of *A. thaliana* with their potential orthologs predicted in *B. rapa* (Turnip) and *B. oleracea* (Broccoli), available in the public *Brassica* database (BRAD; <http://brassicadb.org/brad/index.php>) [223], a circular ideogram was generated in the present review (Fig. 5A) using the Circos software [224]. The same was done with the *A. thaliana* AQPs and the 118 potential orthologs identified in the canola transcriptome (Fig. 5B), after selection of the best-hit from each BLASTn alignment. The ideograms show the high number of AQPs predicted for canola [23], similar to those expected to combine *B. rapa* and *B. oleracea*. In fact, the higher abundance of AQPs in canola is because *B. rapa* and *B. oleracea* correspond to the parental species of *B. napus*, which is an allopolyploid hybrid that contains the diploid chromosomal sets of both parental genomes [225]. These results explain the conservation and distribution of canola's AQP genes in the respective chromosomes originated from the genomes A and C of *Brassica*, not followed by AQP losses, reinforcing the central driver of plant AQP diversification: chromosome duplication, and polyploidy in this classic example. This fact should provide the basis for

the duplicated canola AQPs to differ in primary structure and function in the future, driving neofunctionalization.

Polyploidy has also been referred to as Whole Genome Duplication (WGD) and is recognized as an efficient mechanism of gene duplication that results in a sudden increase in genome size and subsequently in the set of genes. However, it is not the only mechanism that gives rise to duplicated genes. In general, gene duplication generates duplicated gene copies and theoretically allows one (or both) to evolve under reduced selective constraint and (under given conditions) to acquire novel functions, thus allowing adaptation. There is little doubt that duplicated genes contributed to novel traits in the course of plant evolution. After WGD a process of duplicate loss has been identified and can involve entire or partial deletion of the duplicate sequence as well as pseudogenization through loss-of-function mutations (revised by Panchy *et al.*, 2016) [226]. In this way, AQP genes can be considered interesting models for evolutionary studies of plant genomes. Such studies may enable the identification of paralogs, the comparison of primary structure changes, amino acid substitution rates, functional assays, and sometimes novel expression patterns (*e.g.*, restricted tissues), highlighting the AQP neofunctionalization event. AQP number and abundance may also be useful to discriminate young polyploids (with few or no loss after duplication, as is proposed to be the case of canola) from species that suffered ancient WGD followed by diploidization (as proposed for *A. thaliana*).

14 AQUAPORIN GENE EXPRESSION STUDIES IN PLANTS: TEN YEARS IN A RETROSPECTIVE

AQP relevance is reflected in a relatively large number of scientific manuscripts addressing this protein group. AQPs studies cover many fields of plant biology, from molecular membrane biophysics [227] to cell biology and signaling [228]. In addition, expression analyzes of their coding genes under specific environmental conditions results in modulation of the plant transcriptome. Regarding this last issue, a survey covering the PubMed database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) resource using the keywords “aquaporins AND plants AND gene expression,” revealed 512 scientific manuscripts from 1992 until March 2018 (data not shown). For the last decade (considering 2008-2018) 330 articles were identified (Fig. 6A). The manual inspection of these articles showed that 184 of them covered the functional characterization of AQPs (*e.g.* Yaneff *et al.*, 2016 [229]), SNP detection (*e.g.* Pandey *et al.*, 2013 [230]), reviews (*e.g.* Kapilan *et al.*, 2018 [135]), or even the expression analysis of AQPs in symbiotic organisms interacting with plants (*e.g.* Navarro-Ródenas *et al.*, 2015 [231]). Also, some manuscripts addressed the characterization of AQPs in transgenic plants (*e.g.*, Martins *et al.*, 2017 and Sun *et al.*, 2017 [232, 233]) or mutants (*e.g.*, Rhee *et al.*, 2017 and Song *et al.*, 2016 [234, 235]), whose issues will be discussed in a separate topic.

The remained 146 articles focused on the regulation of genes encoding AQPs responding to environmental stimuli or stress. Due to the intimate relationship between AQPs and the transport of water, solutes, and ions into the cells, this gene family has been approached in crop transcriptomics

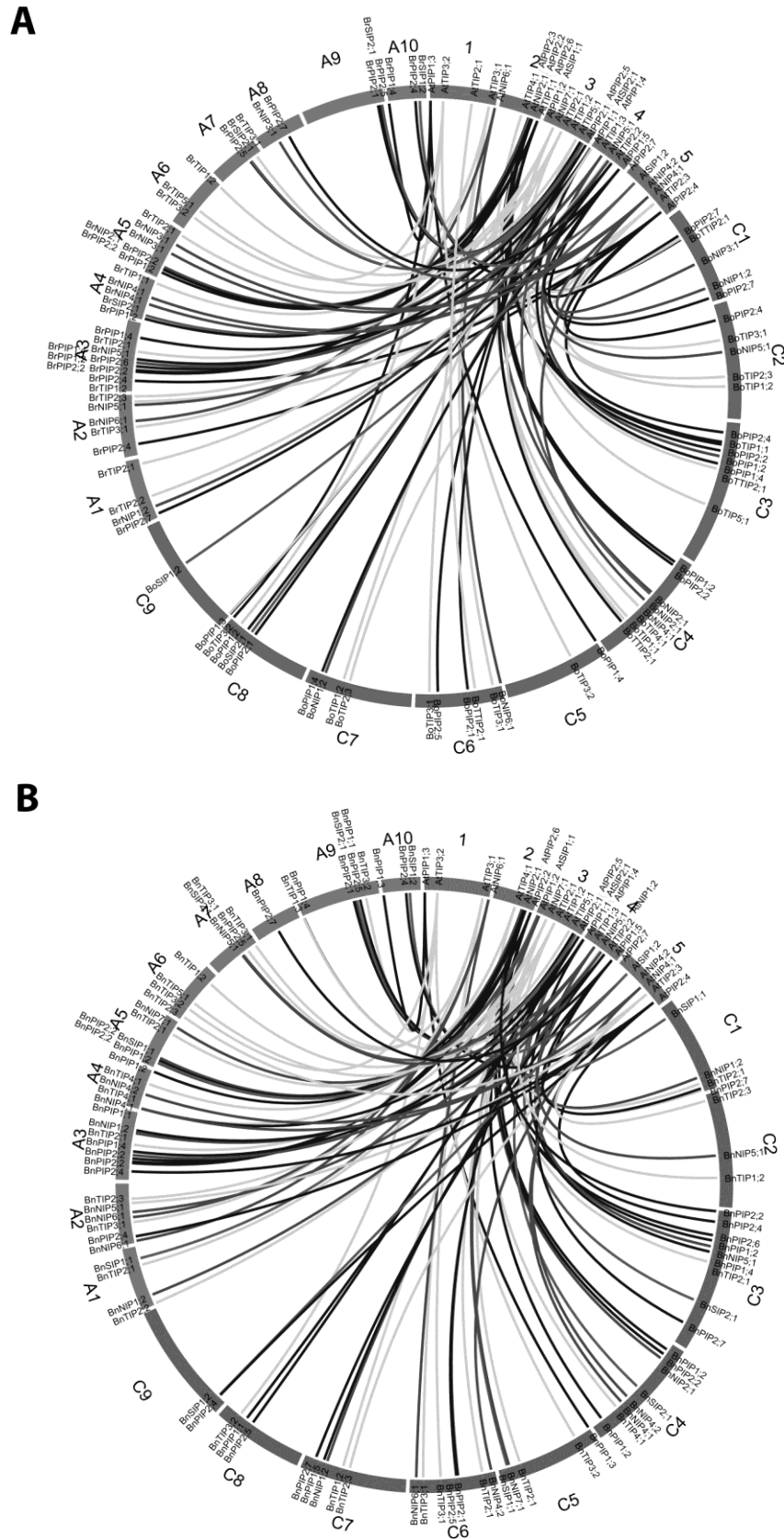


Fig. (5). Circular ideograms showing the conserved syntenies and collinearities covering AQP encoding genes in the Brassicaceae family. **(A)** Chromosomes of *Arabidopsis thaliana* (At, chromosomes 1-5) versus *Brassica oleracea* (Bo, C1-C9) and *B. rapa* (Br, A1-A10). **(B)** Chromosomes of *A. thaliana* (At, 1-5) versus *B. napus* (Bn, A1-A10 and C1-C9). *AQP genes are named according the similarities with *A. thaliana* sequences. (At – *A. thaliana*, Bn – *B. napus*, Bo – *B. oleracea*, Br – *B. rapa*).

Under abiotic stresses that negatively influence the plant osmoregulation (Fig. 6). Among those, drought simulation (Fig. 6B), based on root dehydration (e.g., Conde *et al.*, 2018 [236]) or PEG treatment (e.g., Rodrigues *et al.*, 2013 [237]) were the most prevalent. The second most studied abiotic stress regarding AQPs transcript modulation is high salt stress (Fig. 6B), mostly NaCl (e.g., Lee and Zwiazek, 2015 [238]). Additionally, other abiotic stresses were also studied to evaluate the regulation of genes encoding AQPs, including exposure to arsenite (e.g., Srivastava *et al.*, 2013 [239]), cold (e.g., Li *et al.*, 2009 [240]), and light (e.g., Baaziz *et al.*, 2012 [241]), among other situations (Fig. 6B).

Regarding plant biotic interactions, AQP expression has been studied in response to both pathogenic and symbiotic organisms (Fig. 6B). The first approach is still scarcely studied, but it is worth mentioning some assays with pathogenic fungi (e.g., *Phytophthora capsici*; Yin *et al.*, 2015 [242]) or under bacterial infection (e.g., *P. syringae*; Tian *et al.*, 2016 [243]). These studies shed light on an underexplored topic, combining AQP activity with the plant's immune system. The successful recognition of the pathogen infection and pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) involves, among other mechanisms, the H₂O₂ production in plants, which is a stable component of reactive oxygen species. In this context, Tian *et al.* (2016) observed that AQP AtPIP1-4 (from *A. thaliana*) functions as a facilitator of H₂O₂ transport across plasma membranes, mediating its translocation from the apoplast to the cytoplasm. With the increasing of cytoplasmic H₂O₂, the systemic acquired resistance and the PAMP-triggered immunity are activated to repress the bacterial pathogenicity. Thus, AtPIP1-4 links the H₂O₂ induction to the plant's immune system. Also, the expression of the AtPIP1-4 gene in plant leaves is inducible by the bacterial pathogen, and such expression accompanies the H₂O₂ accumulation in the cytoplasm [243].

Concerning the second approach 'symbiotic organisms' (Fig. 6B), basically, the totality of manuscripts dealt with the symbiotic association of plants with mycorrhizae (e.g., Quiroga *et al.*, 2017 [244]) or with *Rhizobium* spp. (e.g., Gond *et al.*, 2015 [245]). These studies show the plant-microbe symbiosis regulating a vast number of AQPs, involving several subfamilies in the host plant. Such a strategy, when increasing the plant tolerance to several unfavorable conditions, may be adopted as a new tool applied to plant breeding programs.

Additionally, there is a miscellaneous of other analyzed conditions (see "other", 26%, in the Fig. 6B), such as: the transcriptional response of AQPs to phytohormones (e.g., ABA, Kayum *et al.*, 2017 [246]; ethylene, Chen *et al.*, 2013 [247]); or even the influence of the circadian clock (e.g., Vera-Estrella *et al.*, 2012 [248]); besides association to plant developmental stages (e.g., Fouquet *et al.*, 2008 [249]).

About the plant tissues, the root was the most scrutinized one (Fig. 6C). For plants, roots are the gateway for water uptake from the soil. Because AQPs are actively involved in the transport of solvents, ions, and low molecular weight solutes, the "root / AQPs" duet is widely exploited. The second most commonly identified tissue was the leaf (Fig. 6C).

In normal conditions, the AQP expression and activity regulate the leaf water balance, modifying the cell membrane water permeability in response to environmental stimuli, such as solar irradiance, temperature, and water supply, among other factors [250]. The role of AQPs in the leaf growth and their involvement with the CO₂ transport was also addressed [250]. There are also other tissues or organs under analysis showing AQP activities in several plants, including cotyledons (e.g. Zhang *et al.*, 2013 [17]), fruits (e.g. Shi *et al.*, 2015 [251]), latex and soft inner bark (e.g. Tungngoen *et al.*, 2011 [252]), among other tissues (in "other"; Fig. 6C).

Concerning the five AQP subfamilies, the PubMed data mining showed PIP standing out, with around 44% (Fig. 6D). Those papers covered 36 plant species (data not shown) and different environmental situations: abiotic stresses (e.g. cold, drought, salt, waterlogging stresses) [246], biotic interactions with pathogens (e.g. *P. syringae* [243]), symbiosis with rhizobacteria (e.g. Gond *et al.*, 2015 [245]) or arbuscular mycorrhizae (e.g. *Laccaria bicolor* [253]). It is worth mentioning that some manuscripts evaluated the expression of PIPs and other families simultaneously (Fig. 6D), what further increases the availability of information for this AQP group.

Transcriptomic regulation of TIP subfamily members (Fig. 6D) referred to 18 plant species (data not shown), whereas 10 of them were based on genome-wide comparative analysis: *A. thaliana*, *Brachypodium distachyon*, orange (*Citrus sinensis*), strawberry (*Fragaria vesca*), (*Medicago truncatula*), *O. sativa*, castor bean (*Ricinus communis*), *S. bicolor*, cacao (*Theobroma cacao*) and *Z. mays*, performed by Regon *et al.* (2014) [254]. These authors studied TIPs expressed by plants under drought or salinity conditions, in addition to different stages of plant development.

The other three AQP subfamilies were less studied individually, but either compared with PIP or TIP (Fig. 6D). Only two manuscripts were identified, in the present survey, focusing only on XIP subfamily [212, 255]. In the same way, only five scientific articles focused only on the NIP subfamily, among them Di Giorgio *et al.* (2016) [256] and Sadhukhan *et al.* (2017) [257]. Regarding SIP, a single article [258] focused only on this subfamily. These results are contained in "other" category (Fig. 6D) and emphasize the importance of further studies in AQP subfamilies with limited functional studies.

In general, 82% of the identified manuscripts studied few AQP genes/isoforms (Supplementary Fig. S6A). However, the remained identified articles (18%; Supplementary Fig. S6A) presented AQP data-mining and gene expression analysis at a genome-wide scale. Also, not only one specific AQP subfamily was studied, such as PIP, in *F. vesca* [259], or XIP, in poplar [212], but several AQP subfamilies in a global overview [e.g., PIP, TIP, NIP, SIP, and XIP, in *Phaseolus vulgaris* [33]; PIP, TIP, NIP, and SIP, in banana [31]. Taking this into account, about 52% of the AQP genome-wide manuscripts presented data-mining covering the five subfamilies (P|T|N|S|X; Supplementary Fig. S6B). These articles comprised 19 plant species (data not shown), among them soybean [17], physic nut (*J. curcas*) [29], rubber tree [27], and potato [40]. On the other hand, the set

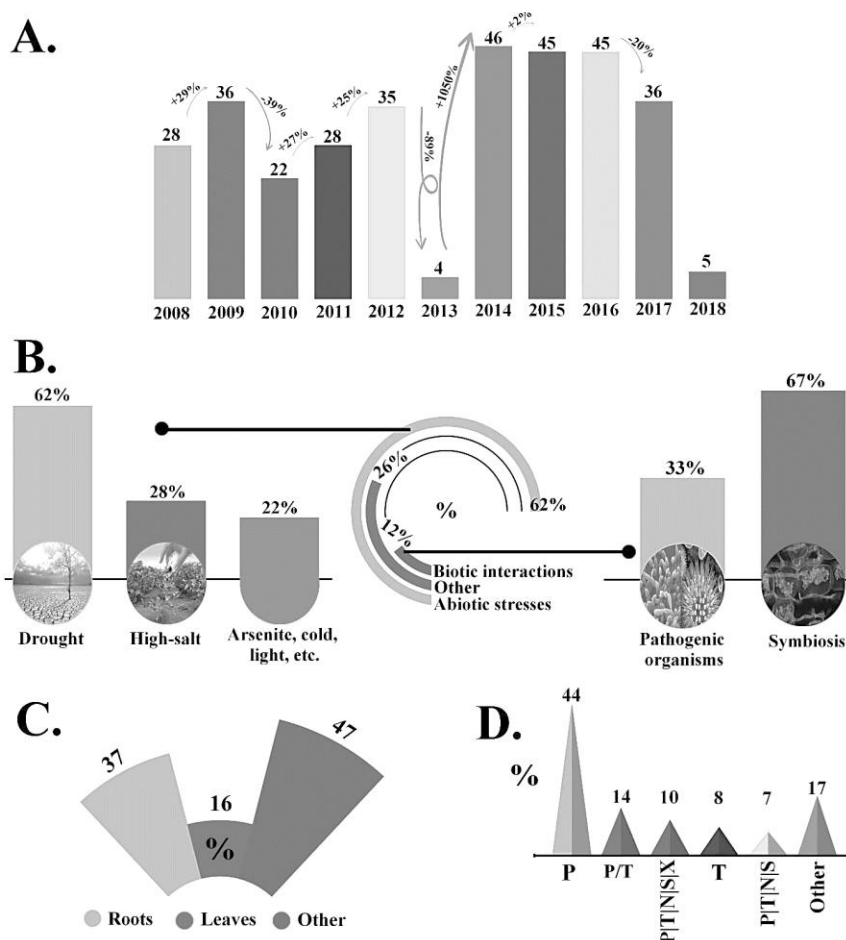


Fig. (6). Data survey on scientific manuscripts using the keywords “aquaporins AND plants AND gene expression”. The sampling was carried out in March 2018 at the PubMed database. **(A).** Quantitative variation detected over the years (percentage of increase or decrease). **(B)** The environmental stimuli analyzed (abiotic stresses, biotic interactions; or other conditions). **(C)** Plant tissues with reported AQP gene expression. **(D)** Percentage of data (manuscripts) available covering the AQPs subfamilies (P=PIP, Plasma membrane Intrinsic Proteins; T=TIP, Tonoplast Intrinsic aquaporin; N=NIP, Nodulin 26-like Intrinsic Protein; S=SIP, Small and basic Intrinsic Proteins; X=XIP, Uncharacterized X-Intrinsic Protein).

“PIP, TIP, NIP, SIP” (P| T| N| S, Supplementary Fig. **S6B**) was observed in ten plant species (data not shown), among them barley [260] and *A. thaliana* [261]. It is uncertain whether in part of these organisms the XIP subfamily does not exist or has not been successfully mined.

As expected, *A. thaliana* presented the highest number of studied AQPs available (Supplementary Fig. **S7**), followed by two other reference plant species rice and maize – both considered key species in grasses and cereal biology. Also, worth mentioning is the AQP data available for non-model woody species, such as rubber tree and cotton (Supplementary Fig. **S7**).

Thus, based on the present survey and the crucial importance of AQPs in plant physiology and homeostasis, acting in several processes and in different plant organs, the biotechnological use of AQPs as a potential tool to be applied to

plant breeding is relevant. This stems from the fact that proteins were associated with response to the most diverse stimuli, including abiotic stresses, biotic interactions, and developmental process.

15 BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES USING AQUAPORINS

The discovery and first description of AQPs in humans was made from erythrocytes and renal tubules [262]. At present 13 AQPs have been described in various organs and cell types of the three germ lines with tissue-specific expression profile, with the main functions of mediating the transport of water and other molecules such as glycerol and urea [100, 263]. As highlighted, AQP paralogs are much more abundant in higher plants (Table 1) than in human and include isoforms that are able to transport many solutes, arousing biotechnological interest.

Most approaches on expression analysis of AQPs include reverse genetics, RNA interference (RNAi), loss of gene function (knockout) and gene overexpression [264]. These technologies allow understanding how a given AQP isoform contributes to the hydric homeostasis, especially under abiotic stresses. Several studies of functional genomics have shown that AQP modulation may increase plant tolerance to stress conditions [246, 261, 265–267]. These studies are mostly related to the development of transgenic plants using specific AQPs to accentuate characteristics of agronomic interest for crop improvement (Table 4).

Aiming to increase tolerance to salinity, AN *et al.* (2017) investigated the heterologous expression and physiological effects of TIP1 from *Panax ginseng* on roots of transgenic soybean plants mediated by *Agrobacterium rhizogenes* [267]. The transgenic plants expressing *PgTIP1* presented higher root vigor, less damage to the cell membrane of roots and leaves, increase of the physiological variables and increased antioxidative activity when exposed to saline stress in relation to the wild type. Transgenic tobacco plants expressing *CsTIP2;1* (from *C. sinensis*) exhibited growth under water deficit and saline stress, also improving their antioxidant capacity and physiological adaptation when submitted to progressive drought, demonstrating an active role of *CsTIP2;1* in the regulation of such stresses [232]. Similarly, Khan *et al.* (2015) reported the role of two AQPs (*PIP2;7* and *TIP1;3*) of *J. curcas* in *Arabidopsis* and observed that seed germination of transgenic lines was improved under high salt and mannitol [268]. Under drought conditions (20 days of irrigation suppression) transgenic plants withstood water deficit and reached normal growth after rehydration while the control plants did not survive.

Pang *et al.* (2010) reported the role of *TIP5;1* in the tolerance to high boron toxicity in *A. thaliana* transformed plants, which exhibited longer hypocotyls, accelerated development and increased silique production under treatment with high levels of boron [269]. Similar results were verified by Takano *et al.* (2006), who carried out assays using the transient expression of a construct containing an AQP under the control of a promoter aiming to evaluate the role of *NIP5;1* as a facilitator in the absorption of boron in *A. thaliana* [270]. Initially, the authors observed that the expression of AQP in oocytes of *X. laevis* facilitated the boron transport in addition to water. After knockout of *Nip5;1*, *A. thaliana* plants presented lower biomass production and lower growth in soil with boron deficiency.

Using *Agrobacterium*-mediated transformation method, Noronha *et al.* (2016) transferred the *VvXIP1* (from *V. vinifera* Cabernet Sauvignon) to *Nicotiana benthamiana* and observed negative regulation in their expression in grapevine cells cultured in response to ABA and salt, in addition to increased sensitivity to osmotic stress [271]. Bienert *et al.* (2011) evaluated the heterologous expression of *XIP1;1α* and *β* isoforms of Solanaceae (*Nicotiana tabacum*; *S. lycopersicum*, *S. tuberosum*) and *Ipomoea nil* (Convolvulaceae) in *X. laevis*, *S. cerevisiae* and transgenic tobacco plants [125]. The authors demonstrated that XIPs facilitated the transport of glycerol, urea and boric acid in oocytes of *X. laevis* and in several mutants of *S. cerevisiae*. When these isoforms were expressed in tobacco plants labeled with fluo-

rescent proteins, they were localized to the plasma membrane. Also, transgenic plants were evaluated by RT-PCR for the expression of the *NtXIP1;1* construct under the control of the promoter, whereas gene activity was demonstrated in all organs investigated.

a. Data Mining in the US Patent and Trademark Office

After searches, 98 patents associated with the terms “aquaporin” OR “AQP” in the title or claims of the US Patent and Trademark Office (USPTO) database (<http://patft.uspto.gov/netahtml/PTO/searchbool.html>; accessed in March 2018) could be identified. From these, 94 patents were selected taking into account their descriptions, summaries, and claims. The selected patents were categorized into nine main groups according to their applications: (1) Pharmacological or cosmetic applications; (2) Biomarkers; (3) Characterization and modulation of AQPs; (4) Disease diagnosis; (5) Plant biotechnology; (6) Artificial membranes; (7) Cell multiplication and differentiation (8) Vaccine production and (9) Other applications (Fig. 7A).

The first patents related to AQPs were deposited in the late 1990s and referred to methods of isolation, cloning, and expression of different AQP isoforms (Fig. 7B). In 2001, a patent was deposited involving monitoring of intracellular protein trafficking using different molecules including mammals AQP1 and AQP5. The knowledge about the functions of AQPs in the development and viability of mammals [100, 272, 273] allowed the recognition of the potential biotechnological applications mediated by AQPs [273, 274]. The most representative group, with 22 patents deposited, was the “Diagnosis of human diseases” involving the identification and monitoring of patients presenting various pathologies (renal, neuronal, cardiac, infectious, diabetes, among others) as compared with healthy patients. Renal diseases and optic neuromyelitis appear among the target diseases. In particular, diagnostic and monitoring trials of human AQP4 figure among the most identified.

The 14 patents related to “Biomarkers” presented emphasis on the early diagnosis of different diseases from the blood plasma composition or at the molecular level through the expression of candidate genes using several molecules, as AQP4 [274]. Regarding “Pharmacological or cosmetic applications” the ten patents deposited were mostly intended for applications in the production of cosmetics. AQPs are abundant proteins in the skin and participate in their homeostasis through processes such as control of water content and epidermis healing [275, 276]. Considering this application, AQP3 is the main target protein used as an active principle in cosmetics [275].

The modulation of AQP activity presents excellent biotechnological and therapeutic potential [274], opening possibilities for the development of technologies with potential for intellectual protection. The groups “Characterization and Modulation of AQPs”, “Plant Breeding and Biotechnology” and “Vaccine Production” together comprised 14 patents dealing with different approaches for molecular characterization and use of AQPs as, for example, in the osmotic control of water deficit in plants and immunological properties in animals aiming to disease treatment [274, 277].

Table 4. Examples of biotechnological approaches using aquaporins. Abbreviations: PIP (Plasma membrane intrinsic protein); TIP (Tonoplast intrinsic protein); NIP (Nodulin-26 like intrinsic protein); SIP (Small intrinsic protein); XIP (Uncharacterized X Intrinsic Protein).

Subfamily	Name	Species	Method	Promoter	Expression in	Features	Refs.
TIP	TIP2-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Knockout	-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Mutants more tolerant to abiotic stresses	[261]
TIP	TIP1	<i>Panax ginseng</i>	Transgeny	35S +pUbi	<i>Glycine max</i>	Higher tolerance to salinity	[267]
TIP	TIP2-1	<i>Citrus</i> spp.	Transgeny	35S-P	<i>Nicotiana tabacum</i>	Increased plant growth and tolerance to drought and salinity	[232]
PIP	PIP2-5	<i>Hordeum vulgare</i>	Transgeny	GAL1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tolerance to salinity and to osmotic stress	[266]
XIP	XIP1	<i>Vitis vinifera</i>	Transgeny	35S	<i>Nicotiana benthamiana</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Role of XIP1 and its involvement with osmotic stress	[271]
PIP	PIP2-7 and TIP1-3	<i>Jatropha curcas</i>	Transgeny	35S	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Increased tolerance to drought and salinity	[268]
XIP	XIP1-1 α and β	<i>Nicotiana tabacum</i> ; <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>S. tuberosum</i> , <i>Ipomoea nil</i>	Transgeny	GUS	<i>Xenopus laevis</i> ; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ; <i>Nicotiana tabacum</i>	Increased transport of glycerol, urea and boric acid	[125]
TIP	TIP5-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Cisgeny	35S::TIP5;1EGFP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Increased tolerance to boron toxicity	[269]
PIP	PIP2-1 and PIP2-2	<i>Tulipa gesneriana</i>	Transgeny	AOX1	<i>Pichia pastoris</i>	Monitoring of the channel activation mechanism mediated by AQP	[22]
NIP	NIP5-1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transient expression of fusion gene	GUS+35S	<i>Xenopus laevis</i>	Facilitated boron absorption of boron under the limitation of this element in the substrate	[270]
SIP	SIP1-1 and SIP1-2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Transient expression of fusion gene	GUS	<i>S. cerevisiae</i> ; <i>A. thaliana</i>	Description of SIP1 as water channel protein in the endoplasmic reticulum	[123]

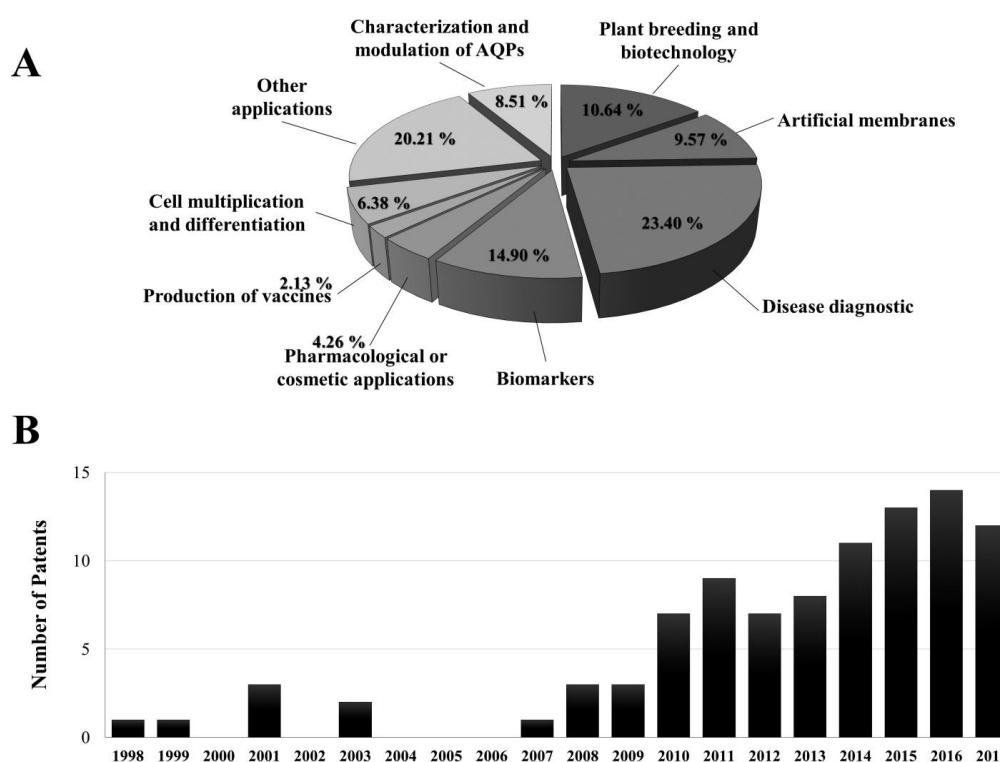


Fig. (7). (A) Patents associated with aquaporins available from the US Patent and Trademark Office (USPTO) database (from 1998 to 2017) in March/2018. **(B)** Number of patents related to aquaporins deposited in the USPTO.

The “Artificial Membranes” group, with nine patents deposited, includes the description of membranes with different compositions (biopolymers, lipoproteins, and nanoparticles) that could contain AQPs for filtration and control of water flow or other solutions. The six patents of the group “Cell multiplication and differentiation” are intended to establish conditions for obtaining progenitor or differentiated cell cultures (lung, heart, kidneys, and bones). In this context, the quantification of cell differentiation procedures can be correlated to AQPs expression level [278-280].

CONCLUSION

As highlighted, plants have a greater diversity of aquaporin subfamilies and isoforms when compared to animals and invertebrates, including exclusive AQP subfamilies. Plants also exhibit exclusive AQP subfamilies, some restricted to basal plant groups, possibly associated with the conquest of the terrestrial habitat, some lost during evolution, being absent in higher plants. Nevertheless, research with plant AQPs is mostly limited to their genome and transcriptome prospecting, with few phenotype-genotype association studies involving individuals with different abilities and given AQP isoforms.

The role of AQPs has been more associated with response to abiotic stresses (with emphasis on drought and salinity), although evidence of several other associations exists, including biotic stresses and specialization in regard to tissue specificity and transport of specific water, solutes or ions.

Despite the recognition of molecular signatures in critical positions, few protein models are still available for plant AQPs. The few existing models have been used for comparative modeling that may not reflect the real folding conditions. Thus, there is a high demand for additional insights from crystallographic studies to improve the understanding of the highly diverse plant AQP isoforms.

It is clear that biotechnological applications involving the use of plant AQPs are still far below their potential, especially taking into account the considerable diversity of isoforms and classes with permeability to different substances when compared to mammal AQPs. Plants living in extreme environmental conditions (extremophile plants) potentially present unique isoforms with interesting capacities and should be targeted for new AQPs. In addition to the obvious applications related to the improved use of water, the ability to tolerate drought, salinity and toxic soils, the use of plant AQPs in bioremediation of soils and aquatic sources has great potential. In addition, membranes containing plant AQPs may be useful to the purification of solutes or gases (*i.e.*, carbon dioxide, ammonia) for various applications including food processing, improvement of industrial routines and environmental recovery.

LIST OF ABBREVIATIONS

3D	= Tri-Dimensional
2d	= Bi-Dimensional
ABA	= Absciscic Acid
AQGP	= Aquaglyceroporins

AQP	= Aquaporin
ar/R	= Aromatic/Arginine
BLAST	= Basic Local Alignment Search Tool
BRAD	= Brassica Database
CAM	= Crassulacean Acid Metabolism
CDD	= Conserved Domain Database
CHIP28	= Channel Integral Membrane Protein of 28kDa
CO ₂	= Carbon Dioxide
ER	= Endoplasmic Reticulum GIP
	= GlpF-like Intrinsic Protein
H ⁺	= Protons
HIP	= Hybrid Intrinsic Protein
HMM	= Hidden Markov Model
kDa	= Kilodalton
LCA	= Lowest Common Ancestor
LIP	= Large intrinsic protein
LIS	= Legume Information System
MEGA	= Molecular Evolutionary Genetics Analysis
MIP	= Major Intrinsic Protein
MW	= Molecular weight
MYA	= Million Years Ago
NAP	= Asparagine-Proline-Alanine
NCBI	= National Center for Biotechnology Information
NGS	= Next Generation Sequencing
NH ₃	= Ammonia
NIP	= Nodulin26-like Intrinsic Proteins PAMPs
	= Pathogen-Associated Molecular Patterns
Pfam	= Protein Families Database
pI	= Isoelectric Point
PIP	= Plasma Membrane Intrinsic Protein
RNA-Seq	= RNA sequencing
RT-PCR	= Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SIP	= Small Basic Intrinsic Proteins
SNPs	= Single Nucleotide Polymorphism
TAIR	= International Arabidopsis Informatics Consortium
TIGR	= Theoretical Informatics Group
TIP	= Tonoplast Intrinsic Proteins
UniProt	= Universal Protein Database
USA	= United States of America
USPTO	= US Patent and Trademark Office
XIP	= Uncharacterized X Intrinsic Protein

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CAPES (Brazilian Coordination of Improvement of Higher Education Personnel) Biologia Computacional, FACEPE (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco), and CNPq (Brazilian Council of Scientific and Technological Development) for important financial support and fellowships.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary material is available on the publisher's web site along with the published article.

REFERENCES

- Maurel, C.; Chrispeels, M.J. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiol.*, **2001**, *125*, 135-138.
- Baiges, I.; Schäffner, A.R.; Affenzeller, M.J.; Mas, A. Plant aquaporins. *Physiol. Plant.*, **2002**, *115*, 175-182.
- Kruse, E.; Uehlein, N.; Kaldenhoff, R. Protein family review: The aquaporins. *Genome Biol.*, **2006**, *7*(2), 206.
- Zardoya, R. Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family. *Biol. Cell.*, **2005**, *97*, 397-414.
- Finn, R.N.; Cerdà, J. Evolution and functional diversity of aquaporins evolution and functional diversity of aquaporins, *Biol. Bull.*, **2015**, *229*(1), 6-23.
- Preston, G.M.; Agre, P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1991**, *88*, 11110-11114.
- Finn, R.N.; Cerdà, J. Aquaporin. In: Choi, S.; (eds.) Encyclopedia of Signaling Molecules. Springer, New York, NY, **2016**.
- Knepper, M.A.; Nielsen, S'. Peter agre, 2003 nobelprize winner in chemistry. *Am. Soc. Nephrol.*, **2004**, *15*, 1093-1095.
- Fortin, M.G.; Morrison, N.A.; Verma, D.P. Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucleic Acids Res.*, **1987**, *15*, 813-824.
- Maurel, C.; Reizer, J.; Schroeder, J.I.; Chrispeels, M.J. The vacuolar membrane protein γ -TIP creates water-specific channels in *Xenopus oocytes*. *EMBO J.*, **1993**, *12*(6), 2241-2247.
- Sutka, M.; Amodeo, G.; Ozu, M. Plant and animal aquaporins crosstalk: what can be revealed from distinct perspectives *Biophys. Rev.*, **2017**, *9*(5), 545-62.
- Hachez, C.; Chaumont, F. Aquaporins: A family of highly regulated multifunctional channels. In: Jahn, T.P.; Bienert, G.P.; (eds.) MIPs and Their Role in the Exchange of Metalloids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2010**, *679*, 146-157.
- Benga, G. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: Past, present, and future. *IUBMB Life*, **2009**, *61*, 112-133.
- Laloux, T.; Junqueira, B.; Maistriaux, L.C.; Ahmed, J.; Jurkiewicz, A.; Chaumont, F. Plant and mammal aquaporins: Same but different. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *9*(2), 521.
- Adams, K.L.; Wendel, J.F. Polyploidy and genome evolution in plants. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **2005**, *8*(2), 135-141.
- Gupta, A.B.; Sankararamakrishnan, R. Genome-wide analysis of major intrinsic proteins in the tree plant *Populus trichocarpa*: characterization of XIP subfamily of aquaporins from evolutionary perspective. *BMC Plant Biol.*, **2009**, *9*, 134.
- Zhang, D.Y.; Ali, Z.; Wang, C.B.; Xu, L.; Yi, J.X.; Xu, Z.L.; Liu, X.Q.; He, X.L.; Huang, Y.H.; Khan, I.A.; Trethowan, R.M.; Ma, H.X. Genome-wide sequence characterization and expression analysis of major intrinsic proteins in soybean (*Glycine max* L.). *PLoS One*, **2013**, *8*, e56312.
- Park, W.J.; Campbell, B.T. Aquaporins as targets for stress tolerance in plants: Genomic complexity and perspectives. *Turk. J. Bot.*, **2015**, *39*(6), 879-886.
- Sonah, H.; Deshmukh, R.K.; Labbé, C.; Bélanger, R.R. Analysis of aquaporins in brassicaceae species reveals high-level of conservation and dynamic role against biotic and abiotic stress in canola. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*(1), 1-17.
- Johanson, U.; Karlsson, M.; Johansson, I.; Gustavsson, S.; Sjövall, S.; Frayssé, L.; Weig, A.R.; Kjellbom, P. The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol.*, **2001**, *126*, 358-1369.
- Kong, W.; Yang, S.; Wang, Y.; Bendahmane, M.; Fu, X. Genomewide identification and characterization of aquaporin gene family in *Beta vulgaris*. *Peer J.*, **2017**, *5*, e3747.
- Azad, A.K.; Sawa, Y.; Ishikawa, T.; Shibata, H. Heterologous expression of tulip petal plasma membrane aquaporins in *Pichia pastoris* for water channel analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, *75*(9), 2792-2797.
- Yuan, D.; Li, W.; Hua, Y.; King, G.J.; Xu, F.; Shi, L.; Norton, G.J. Genomewide identification and characterization of the aquaporin gene family and transcriptional responses to boron deficiency in *Brassica napus*. *Front. Plant Sci.*, **2017**, *8*, 1-17.
- Deokar, A.A.; Tar'na, B. Genome-wide analysis of the aquaporin gene family in Chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 1802.
- Martins, C.P.; Pedrosa, A.M.; Du, D.; Gonçalves, L.P.; Yu, Q.; Gmitter, F.G.Jr.; Costa, M.G. Genome-wide characterization and expression analysis of major intrinsic proteins during abiotic and biotic stresses in sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osb.). *PLoS One*, **2015**, *10*(9), e0138786.
- Park, W.; Scheffler, B.E.; Bauer, P.J.; Campbell, B.T. Identification of the family of aquaporin genes and their expression in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *BMC Plant Biol.*, **2010**, *10*, 1-17.
- Zou, Z.; Gong, J.; An, F.; Xie, G.S.; Wang, J.K.; Mo, Y.Y.; Yang, L. Genomewide identification of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) aquaporin genes and their response to ethephon stimulation in the laticifer, a rubber-producing tissue. *BMC Genomics*, **2015**, *16*, 1001.
- Hove, R.M.; Ziemann, M.; Bhavé, M. Identification and expression analysis of the barley (*Hordeum vulgare* L.) aquaporin gene family. *PLoS One*, **2015**, *10*, e0128025.
- Zou, Z.; Yang, L.; Gong, J.; Mo, Y.; Wang, J.; Cao, J.; An, F.; Xie, G. Genomewide identification of *Jatropha curcas* aquaporin genes and the comparative analysis provides insights into the gene family expansion and evolution in *Hevea brasiliensis*. *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 395.
- Shivaraj, S.; Deshmukh, R.K.; Rai, R.; Bélanger, R.; Agrawal, P.K.; Dash, P.K. Genome-wide identification, characterization, and expression profile of aquaporin gene family in flax (*Linum usitatissimum*). *Sci Rep.*, **2017**, *7*, 46137.
- Hu, W.; Hou, X.; Huang, C.; Yan, Y.; Tie, W.; Ding, Z.; Wei, Y.; Liu, J.; Miao, H.; Lu, Z.; Li, M.; Xu, B.; Jin, Z. Genome-wide identification and expression analyses of aquaporin gene family during development and abiotic stress in banana. *Int. J. Mol. Sci.*, **2015**, *16*(8), 19728-19751.
- Sakurai, J.; Ishikawa, F.; Yamaguchi, T.; Uemura, M.; Maeshima, M. Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant Cell. Physiol.*, **2005**, *46*(9), 1568-1577.
- Ariani, A.; Gepts, P. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Mol. Genet. Genomics*, **2015**, *290*, 1771-1785.
- Sun, H.; Li, L.; Lou, Y.; Zhao, H.; Gao, Z. Genome-wide identification and characterization of aquaporin gene family in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Mol. Biol. Rep.*, **2016**, *43*(5), 437-450.
- Danielson, J.A.H.; Johanson, U. Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.*, **2008**, *8*, 1-15.
- Zou, Z.; Gong, J.; Huang, Q.; Mo, Y.; Yang, L.; Xie, G. Gene structures, evolution, classification and expression profiles of the aquaporin gene family in castor bean (*Ricinus communis* L.). *PLoS One*, **2015**, *10*, 1-25.

- [37] Da Silva, M.D.; Silva, R.L.O.; Ferreira-Neto, J.R.C.; Guimarães, A.C.R.; Veiga, D.T.; Chabregas, S.M.; Burnquist, W.L.; Kahl, G.; Benko-Iseppon, A.M.; Kido, E.A. Expression analysis of sugarcane aquaporin genes under water deficit. *J. Nucleic Acids*, **2013**, Article ID 763945, 1-14.
- [38] Anderberg, H.I.; Kjellbom, P.; Johanson, U. Annotation of *Selaginella moellendorffii* major intrinsic proteins and the evolution of the protein family in terrestrial plants. *Front. Plant Sci.*, **2012**, *3*, 1-14.
- [39] Reuscher, S.; Akiyama, M.; Mori, C.; Aoki, K.; Shibata, D.; Shiratake, K. Genome-wide identification and expression analysis of aquaporins in tomato. *PLoS One*, **2013**, *8*, e79052.
- [40] Venkatesh, J.; Yu, J.W.; Park, S.W. Genome-wide analysis and expression profiling of the *Solanum tuberosum* aquaporins. *Plant Physiol. Biochem.*, **2013**, *73*, 392-404.
- [41] Reddy, P.S.; Rao, T.S.R.B.; Sharma, K.K.; Vadez, V. Genome-wide identification and characterization of the aquaporin gene family in *Sorghum bicolor* (L.). *Plant Gene*, **2015**, *1*, 18-28.
- [42] Shelden, M.C.; Howitt, S.M.; Kaiser, B.N.; Tyerman, S.D. Identification and functional characterisation of aquaporins in the grapevine, *Vitis vinifera*. *Funct. Plant Biol.*, **2009**, *36*, 1065-1078.
- [43] Chaumont, F.; Barrieu, F.; Wojcik, E.; Chrispeels, M.J.; Jung, R. Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.*, **2001**, *125*, 1206-1215.
- [44] Shivaraj, S.M.; Deshmukh, R.; Bhat, J.Á.; Sonah, H.; Bélanger, R.R. Understanding aquaporin transport system in eelgrass (*Zostera marina* L.), an aquatic plant species. *Front. Plant Sci.*, **2017**, *8*, 1334.
- [45] Engel, A.; Fujiyoshi, Y.; Agre, P. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.*, **2000**, *19*(5), 800-806.
- [46] Gomes, D.; Agasse, A.; Thiebaud, P.; Delrot, S.; Geros, H.; Chaumont, F. Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1788*, 1213-1228.
- [47] Rodríguez, M.C.; Froger, A.; Rolland, J.P.; Thomas, D.; Agüero, J.; Delamarche, C.; García-Lobo, J.M. A functional water channel protein in the pathogenic bacterium *Brucella abortus*. *Microbiology*, **2000**, *12*, 3251-3257.
- [48] Calamita, G.; Bishai, W.R.; Preston, G.M.; Guggino, W.B.; Agre, P. Molecular cloning and characterization of *AqpZ*, a water channel from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, **1995**, *270*, 29063-29066.
- [49] Maurel, C.; Reizer, J.; Schroeder, J.I.; Chrispeels, M.J.; Saier, M.H.Jr. Functional characterization of the *Escherichia coli* glycerol facilitator, GlpF, in *Xenopus oocytes*. *J. Biol. Chem.*, **1994**, *269*(16), 11869-11872.
- [50] Iskander, M.; Hayden, K.; Van Domselaar, V.; Tsang, R. First complete genome sequence of *Haemophilus influenzae* serotype a. *Genome Announc.*, **2017**, *5*(3), e01506-e01516.
- [51] Kozono, D.; Ding, X.; Kwasaki, I.; Meng, X.; Kamagata, Y.; Agre, P.; Kitagawa, Y. Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278*, 10649-10656.
- [52] Froger, A.; Tallur, B.; Thomas, D.; Delamarche, C. Prediction of functional residues in water channels and related proteins. *Protein Sci.*, **1998**, *7*, 1458-1468.
- [53] Oh, D.S.; Lu, H.; Han, K.H. Identification and characterization of the aquaporin gene *aqpA* in a filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Kor. J. Microbiol.*, **2011**, *47*, 295-301.
- [54] Dietz, S.; von Bülow, J.; Beitz, E.; Nehls, U. The aquaporin gene family of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor*: lessons for symbiotic functions. *New Phytol.*, **2011**, *190*(4), 927-940.
- [55] Bienert, G.P.; Desguin, B.; Chaumont, F.; Hols, F. Channel-mediated lactic acid transport: A novel function for aquaglyceroporins in bacteria. *J. Biochem.*, **2013**, *454*, 559-570.
- [56] Pettersson, N.; Filipsson, C.; Becit, E.; Brive, L.; Hohmann, S. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biol. Cell*, **2005**, *97*, 487500.
- [57] Carbrey, J.M.; Bonhivers, M.; Boeke, J.D.; Agre, P. Aquaporins in *Saccharomyces*: Characterization of a second functional water channel protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2001**, *98*(3), 1000-1005.
- [58] Chen, P.; Andersson, D.I.; Roth, J.R. The control region of the *pdu/cob* regulon in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, **1994**, *176*(17), 5474-5482.
- [59] Navarro-Ródenas, A.; Barzana, G.; Nicolas, E.; Carra, A.; Schubert, A.; Morte, A. Expression analysis of aquaporins from desert truffle mycorrhizal symbiosis reveals a fine-tuned regulation under drought. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **2013**, *26*(9), 1068-1078.
- [60] Mitra, B.N.; Yoshino, R.; Morio, T.; Yokoyama, M.; Maeda, M.; Urushihara, H.; Tanaka, Y. Loss of a member of the aquaporin gene family, *aqpA* affects spore dormancy in *Dictyostelium*. *Gene*, **2000**, *251*(2), 131-139.
- [61] Bülow, J.; Müller-Lucks, A.; Kai, L.; Bernhard, F.; Beitz, E. Functional characterization of a novel aquaporin from *Dictyostelium discoideum* amoebae implies a unique gating mechanism. *J. Biol. Chem.*, **2012**, *287*, 7487-7494.
- [62] Flick, K.M.; Shaulsky, G.; Loomis, W.F. The *wacA* gene of *Dictyostelium discoideum* is a developmentally regulated member of the MIP family. *Gene*, **1997**, *195*(2), 127-130.
- [63] Bülow, J.; Gollack, A.; Albers, T.; Beitz, E. The amoeboid *Dictyostelium* aquaporin *AqpB* is gated via Tyr216 and *aqpB* gene deletion affects random cell motility. *Biol. Cell*, **2015**, *107*, 78-88.
- [64] Gourbal, B.; Sonuc, N.; Bhattacharjee, H.; Legare, D.; Sundar, S.; Ouellette, M.; Rosen, B.P.; Mukhopadhyay, R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*(30), 31010-31017.
- [65] Hansen, M.; Kun, J.F.; Schultz, J.E.; Beitz, E. A single, bifunctional aquaglyceroporin in blood-stage *Plasmodium falciparum* malaria parasites. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 4874-4882.
- [66] Rohloff, P.; Montalvetti, A.; Docampo, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 52270-52281.
- [67] Uzcátegui, N.L.; Szallies, A.; Pavlovic-Djuranovic, S.; Palmada, M.; Figarella, K.; Boehmer, C.; Lang, F.; Beitz, E.; Duszzenko, M. Cloning, heterologous expression, and characterization of three aquaglyceroporins from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 42669-42676.
- [68] Uzcátegui, N.L.; Figarella, K.; Bassarak, B.; Meza, N.W.; Mukhopadhyay, R.; Ramirez, J.L.; Duszzenko, M. *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporins facilitate the uptake of arsenite and antimonite in a pH dependent way. *Cell. Physiol. Biochem.*, **2013**, *32*(4), 880-888.
- [69] Zeuthen, T.; Wu, B.; Pavlovic-Djuranovic, S.; Holm, L.M.; Uzcátegui, N.L.; Duszzenko, M.; Kun, J.F.; Schultz, J.E.; Beitz, E. Ammonia permeability of the aquaglyceroporins from *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.*, **2006**, *61*(6), 1598-1608.
- [70] Huang, C.G.; Lamitina, T.; Agre, P.; Strange, K. Functional analysis of the aquaporin gene family in *Caenorhabditis elegans*. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **2007**, *292*(5), C1867-C1873.
- [71] Kaufmann, N.; Mathai, J.C.; Hill, W.G.; Dow, J.A.T.; Zeidel, M.L.; Brodsky, J.L. Developmental expression and biophysical characterization of a *Drosophila melanogaster* aquaporin. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **2005**, *10*(38), 1-18.
- [72] Tingaud-Sequeira, A.; Calusinska, M.; Finn, R.N.; Chauvigné, F.; Lozano, J.; Cerdà, J. The zebrafish genome encodes the largest vertebrate repertoire of functional aquaporins with dual paralogy and substrate specificities similar to mammals. *BMC Evol. Biol.*, **2010**, *10*, 38.
- [73] Soto, G.; Alleva, K.; Amodeo, G.; Muschietti, J.; Ayub, N.D. New insight into the evolution of aquaporins from flowering plants and vertebrates: orthologous identification and functional transfer is possible. *Gene*, **2012**, *503*, 165-176.
- [74] Litman, T.; Søgaard, R.; Zeuthen, T. Ammonia and urea permeability of mammalian aquaporins. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2009**, *190*, 327-358.
- [75] Finn, R.N.; Chauvigné, F.; Hlidberg, J.B.; Cutler, C.P.; Cerdà, J. The lineage-specific evolution of aquaporin gene clusters facilitated tetrapod terrestrial adaptation. *PLoS One*, **2014**, *9*, e113686.
- [76] Finn, R.N.; Cerdà, J. Evolution and functional diversity of aquaporins. *Biol. Bull.*, **2015**, *229*, 6-23.
- [77] Heymann, J.B.; Engel, A. Aquaporins: Phylogeny, structure and physiology of water channels. *News Physiol. Sci.*, **1999**, *14*, 187-193.
- [78] Ishibashi, K.; Morishita, Y.; Tanaka, Y. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2017**, *969*, 35-50.
- [79] Ishibashi, K.; Kondo, S.; Hara, S.; Morishita, Y. The evolutionary aspects of aquaporin family. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **2011**, *300*, R566-R576.

- [80] Jordan, H.; Tomberlin, J. Abiotic and biotic factors regulating inter-kingdom engagement between insects and microbe activity on vertebrate remains. *Insects*, **2017**, *8*(2), 54.
- [81] Fu, D.; Libson, A.; Miercke, L.J.; Weitzman, C.; Nollert, P.; Krucinski, J.; Stroud, R.M. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, **2000**, *290*, 481–486.
- [82] Savage, D.F.; Egea, P.F.; Robles-Colmenares, Y.; O'Connell III, J.D.; Stroud, R.M. Architecture and selectivity in aquaporins: 2.5 Å X-ray structure of aquaporin z. *PLoS Biol.*, **2003**, *1*, 334–340.
- [83] Jiang, J.; Daniels, B.V.; Fu, D. Crystal structure of AqpZ tetramer reveals two distinct Arg-189 conformations associated with water permeation through the narrowest constriction of the water-conducting channel. *J. Biol. Chem.*, **2006**, *281*, 454–460.
- [84] Hubert, J.F.; Duchesne, L.; Delamarche, C.; Vaysse, A.; Gueuné, H.; Raquénès-Nicol, C. Pore selectivity analysis of an aquaglyceroporin by stopped-flow spectrophotometry on bacterial cell suspensions. *Biol. Cell.*, **2005**, *97*(9), 675–686.
- [85] Chrispeels, M.J.; Morillon, R.; Maurel, C.; Gerbeau, P.; Kjellbom, P.; Johansson, I. Aquaporins in plants: structure, function, regulation, and roles in plant water relations. *Curr. Top. Membr.*, **2001**, *51*, 277–334.
- [86] Lee, J.K.; Kozono, D.; Remis, J.; Kitagawa, Y.; Agre, P.; Stroud R.M. Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2005**, *102*(52), 18932–18937.
- [87] Gonen, T.; Sliz, P.; Kistler, J.; Cheng, Y.; Walz, T. Aquaporin-0 membrane junctions reveal the structure of a closed water pore. *Nature*, **2004**, *429*, 193–197.
- [88] Nehls, U.; Dietz, S. Fungal aquaporins: Cellular functions and ecophysiological perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **2014**, *98*, 8835–8851.
- [89] Andre, B. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **1995**, *11*, 1575–1611.
- [90] Hohmann, S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2002**, *66*(2), 300–372.
- [91] Sidoux-Walter, F.; Pettersson, N.; Hohmann, S. The *Saccharomyces cerevisiae* aquaporin Aqp1 is involved in sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2004**, *101*(50), 17422–17427.
- [92] Tanghe, A.; Van Dijck, P.; Dumortier, F.; Teunissen, A.; Hohmann, S.; Thevelein, J. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in yeast and overexpression improves freeze tolerance in industrial yeast. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2002**, *68*, 5981–5989.
- [93] Soveral, G.; Veiga, A.; Loureiro-Dias, M.C.; Tanghe, A.; Van Dijck, P. Water channels are important for osmotic adjustments of yeast cells at low temperature. *Microbiology*, **2006**, *152*, 1515–1521.
- [94] Tanghe, A.; Carbrey, J.M.; Agre, P.; Thevelein, J.M.; Van Dijck, P. Aquaporin expression and freeze tolerance in *Candida albicans*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, *71*(10), 6434–6437.
- [95] Beitz, E. Aquaporins from pathogenic protozoan parasites: Structure, function and potential for chemotherapy. *Biol. Cell*, **2005**, *97*, 373–383.
- [96] Montalvetti, A.; Rohloff, P.; Docampo, R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 3867–3882.
- [97] Song, J.; Mak, E.; Wu, B.; Beitz, E. Parasite aquaporins: Current developments in drug facilitation and resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1840*, 1566–1573.
- [98] Faghiri, Z.; Skelly, P.J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. *FASEB J.*, **2009**, *23*, 2780–2789.
- [99] Von Bülow, J.; Beitz, E. Number and regulation of protozoan aquaporins reflect environmental complexity. *Biol. Bull.*, **2015**, *229*(1), 38–46.
- [100] Verkman, A.S.; Anderson, M.O.; Papadopoulos, M.C. Aquaporins: Important but elusive drug targets. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2014**, *13*(4), 259–277.
- [101] Ishibashi, K.; Hara, S.; Kondo, S. Aquaporin water channels in mammals. *Clin. Exp. Nephrol.*, **2009**, *13*, 107–117.
- [102] Luu, D.T.; Maurel, C. Aquaporin trafficking in plant cells: an emerging membrane-protein model. *Traffic*, **2013**, *14*, 629–635.
- [103] Campbell, E.M.; Ball, A.; Hoppler, S.; Bowman, A.S. Invertebrate aquaporins: A review. *J. Comp. Physiol. B.*, **2008**, *178*(8), 935–955.
- [104] Spring, J.H.; Robichaux, S.R.; Hamlin, J.A. The role of aquaporins in excretion in insects. *J. Exp. Biol.*, **2009**, *212*, 358–362.
- [105] Cohen, D.; Bogeat-Triboulot, M.B.; Viallet-Chabrand, S.; Merret, R.; Courty, P.E.; Moretti, S.; Bizet, F.; Guillot, A.; Hummel, I. Developmental and environmental regulation of Aquaporin gene expression across *Populus* species: Divergence or redundancy? *PLoS One*, **2013**, *8*, e55506.
- [106] Duchesne, L.; Hubert, J.F.; Verbavatz, J.M.; Thomas, D.; Pietrantonio, P.V. Mosquito (*Aedes aegypti*) aquaporin, present in tracheolar cells, transports water, not glycerol, and forms orthogonal arrays in *Xenopus* oocyte membranes. *Eur. J. Biochem.*, **2003**, *270*, 422–429.
- [107] Drake, L.L.; Drake, Boudko, D.Y.; Marinotti, O.; Carpenter, V.K.; Dawe, A.L.; Hansen, I.A. The aquaporin gene family of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS One*, **2010**, *5*, e15578.
- [108] Kataoka, N.; Miyake, S.; Azuma, M. Aquaporin and aquaglyceroporin in silkworms, differently expressed in the hindgut and midgut of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, **2009**, *18*, 303–314.
- [109] Shakesby, A.J.; Wallace, I.S.; Isaacs, H.V.; Pritchard, J.; Roberts, D.M.; Douglas, A.E. A water-specific aquaporin involved in aphid osmoregulation. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **2009**, *39*, 1–10.
- [110] Kikawada, T.; Saito, A.; Kanamori, Y.; Fujita, M.; Snigorska, K.; Watanabe, M.; Okuda, T. Dehydration-inducible changes in expression of two aquaporins in the sleeping chironomid, *Polypedium vanderplanki*. *Biochim. Biophys. Acta*, **2008**, *1778*, 514–520.
- [111] Maurel, C. Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Lett.*, **2007**, *581*, 2227–2236.
- [112] Zhao, C.X.; Shao, H.B.; Chu, L.Y. Aquaporin structure – function relationships: Water flow through plant living cells. *Colloids Surf. B. Biointerfaces.*, **2008**, *62*, 163–172.
- [113] Deshmukh, R.K.; Vivasco, J.; Guérin, V.; Sonah, H.; Labbé, C.; Belzile, F.; Bélanger, R.R. Identification and functional characterization of silicone transporters in soybean using comparative genomics of major intrinsic proteins in *Arabidopsis* and rice. *Plant Mol. Biol.*, **2013**, *83*, 303–315.
- [119] Biela, A.; Grote, K.; Otto, B.; Hoth, S.; Hedrich, R.; Kaldenhoff, R. The *Nicotiana tabacum* plasma membrane aquaporin NtAQP1 is mercuryinsensitive and permeable for glycerol. *Plant J.*, **1999**, *18*, 565–570.
- [115] Uehlein, N.; Lovisolo, C.; Siefritz, F.; Kaldenhoff, R. The tobacco aquaporin NtAQP1 is a membrane CO₂ pore with physiological functions. *Nature*, **2003**, *425*, 734–737.
- [116] Lopez, F.; Bousser, A.; Sissoëff, I.; Gaspar, M.; Lachaise, B.; Hoarau, J.; Mahé, A. Diurnal regulation of water transport and aquaporin gene expression in maize roots: Contribution of PIP2 proteins. *Plant Cell. Physiol.*, **2003**, *44*, 1384–1395.
- [117] Bots, M.; Vergeldt, F.; Wolters-Arts, M.; Weterings, K.; van As, H.; Mariani, C. Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiol.*, **2005**, *137*, 1049–1056.
- [118] Kaldenhoff, R.; Fischer, M. Functional aquaporin diversity in plants. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **2006**, *1758*, 1134–1141.
- [119] Johanson, U.; Gustavsson, S. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol. Biol. Evol.*, **2002**, *19*, 456–461.
- [120] Maurel, C.; Tacnet, F.; Güclü, J.; Guern, J.; Ripoche, P. Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1997**, *94*, 7103–7108.
- [121] Gerbeau, P.; Güclü, J.; Ripoche, P.; Maurel, C. Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.*, **1999**, *18*, 577–587.
- [122] Loqué, D.; Ludwig, U.; Yuan, L.; von Wirén, N. Tonoplast intrinsic proteins ATTIP2;1 and ATTIP2;3 facilitate NH₃ transport into the vacuole. *Plant Physiol.*, **2005**, *137*, 671–680.
- [123] Maeshima, M.; Ishikawa, F. ER membrane aquaporins in plants. *Pflügers Arch.*, **2008**, *456*, 709–716.
- [124] Forrest, K.L.; Bhavé, M. Major intrinsic proteins (MIPs) in plants: A complex gene family with major impacts on plant phenotype. *Funct. Integr. Genomics*, **2007**, *7*, 263–289.
- [125] Bienert, G.P.; Bienert, M.D.; Jahn, T.P.; Boutry, M.; Chaumont, F. Solanaceae XIPs are plasma membrane aquaporins that facilitate the transport of many uncharged substrates. *Plant J.*, **2011**, *66*, 306–317.
- [126] Mitani-Ueno, N.; Yamaji, N.; Zhao, F.J.; Ma, J.F. The aromatic/arginine selectivity filter of NIP aquaporins plays a critical role in substrate selectivity for silicon, boron, and arsenic. *J. Exp. Bot.*, **2011**, *62*, 4391–4398.

- [127] Eriksson, U.K.; Fischer, G.; Friemann, R.; Enkavi, G.; Tajkhorshid, E.; Neutze, R. Subangstrom resolution X-ray structure details aquaporin-water interactions. *Science*, **2013**, *340*, 1346-1349.
- [128] Guan, X.G.; Su, W.H.; Yi, F.; Zhang, D.; Hao, F.; Zhang, H.G.; Liu, Y.J.; Feng, X.C.; Ma, T.H. NPA motifs play a key role in plasma membrane targeting of aquaporin-4. *IUBMB Life*, **2010**, *62*, 222-226.
- [129] Jiang, Y. Expression and functional characterization of NPA motif- null aquaporin-1 mutations. *IUBMB Life*, **2009**, *61*, 651-657.
- [130] Deshmukh, R.K.; Sonah, H.; Bélanger, R.R. Plant aquaporins: Genome-wide identification, transcriptomics, proteomics, and advanced analytical tools. *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 896.
- [131] Fujiyoshi, Y.; Mitsuoka, K.; de Groot, B.L.; Philippsen, A.; Grub- müller, H.; Agre, P.; Engel, A. Structure and function of water channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2002**, *12*(4), 509-515.
- [132] Hedfalk, K.; Törmroth-Horsefield, S.; Nyblom, M.; Johanson, U.; Kjellbom, P.; Neutze, R. Aquaporin gating. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2006**, *16*(4), 447-456.
- [133] Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann, J.B.; Engel, A.; Fujiyoshi, Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, **2000**, *407*(6804), 599-605.
- [134] Chaumont, F.; Moshelion, M.; Daniels, M.J. Regulation of plant aquaporin activity. *Biol. Cell*, **2005**, *97*(10), 749-764.
- [135] Kapilan, R.; Vaziri, M.; Zwiazek, J.J. Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biol. Res.*, **2018**, *51*(1), 4.
- [136] Törmroth-Horsefield, S.; Wang, Y.; Hedfalk, K.; Johanson, U.; Karlsson, M.; Tajkhorshid, E.; Neutze, R.; Kjellbom, P. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, **2006**, *439*(7077), 688-694.
- [137] Sui, H.; Han, B.G.; Lee, J.K.; Walian, P.; Jap, B.K. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature*, **2001**, *414*(6866), 872-878.
- [138] Deshmukh, R.K.; Vivanco, J.; Ramakrishnan, G.; Guérin, V.; Carpentier, G.; Sonah, H.; Labbé, C.; Isenring, P.; Belzile, F.J.; Bélanger, R.R. A Precise spacing between the NPA domains of aquaporins is essential for silicon permeability in plants. *Plant J.*, **2015**, *83*, 489-500.
- [139] Wallace, I.S.; Roberts, D.M. Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic / arginine selectivity filter 1 [w]. *Proteins*, **2004**, *135*, 1059-1068.
- [140] Azad, A.K.; Yoshikawa, N.; Sawa, Y.; Ishikawa, T.; Shibata, H. Substitution of a single amino acid residue in the aromatic/arginine selectivity filter alters the transport profiles of tonoplast aquaporin homologues. *Biochim. Biophys. Acta*, **2012**, *1818*, 1-11.
- [141] Kirscht, A.; Survery, S.; Kjellbom, P.; Johanson, U. Increased permeability of the aquaporin SoPIP2;1 by mercury and mutations in loop A. *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*(1249), 1-11.
- [142] Ludewig, U.; Dynowski, M. Plant aquaporin selectivity: Where transport assays, computer simulations and physiology meet. *Cell. Mol. Life Sci.*, **2009**, *66*(19), 3161-3175.
- [143] Tajkhorshid, E.; Nollert, P.; Jensen, MØ.; Miercke, L.J.; O'Connell, J.; Stroud, R.M.; Schulten, K. Control of the selectivity of the aquaporin water channel family by global orientational tuning. *Science*, **2002**, *296*(5567), 525-530.
- [144] Klebl, F.; Wolf, M.; Sauer, N. A defect in the yeast plasma membrane urea transporter Dur3p is complemented by CpNIP1, a Nod26-like protein from zucchini (*Cucurbita pepo* L.), and by *Arabidopsis thaliana* delta-TIP or gamma-TIP. *FEBS Lett.*, **2003**, *547*, 69-74.
- [145] Holm, L.M.; Jahn, T.P.; Möller, A.L.; Schjoerring, J.K.; Ferri, D.; Klaerke, D.A.; Zeuthen, T. NH₃ and NH₄⁺ permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Arch.*, **2005**, *450*(6), 415-428.
- [146] Fetter, K.; Van Wilder, V.; Moshelion, M.; Chaumont, F. Interactions between plasma membrane aquaporins modulate their water channel activity. *Plant Cell*, **2004**, *16*(1), 215-228.
- [147] Chaumont, F.; Barrieu, F.; Jung, R.; Chrispeels, M.J. Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiol.*, **2000**, *122*, 1025-1034.
- [148] Zelazny, E.; Borst, J.W.; Muylaert, M.; Batoko, H.; Hemminga M.A.; Chaumont, F. FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localisation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2007**, *104*, 12359-12364.
- [149] Daniels, M.J.; Chrispeels, M.J.; Yeager, M. Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo- crystallography. *J. Mol. Biol.*, **1999**, *294*, 1337-1349.
- [150] Kukulski, W.; Schenk, A.D.; Johanson, U.; Braun, T.; de Groot, B.L.; Fotiadis, D.; Kjellbom, P.; Engel, A. The 5 Å structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *J. Mol. Biol.*, **2005**, *350*, 611-616.
- [151] Li, C.; Wang, W. Molecular biology of aquaporins. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2017**, *969*, 1-34.
- [152] Santoni, V. Plant aquaporin posttranslational regulation. In: *Plant Aquaporins*; Chaumont, F.; Teyman, S., Ed.; Springer, Cham, **2017**, 83-105.
- [153] Azad, A.K.; Sawa, Y.; Ishikawa, T.; Shibata, H. Phosphorylation of plasma membrane aquaporin regulates temperature-dependent opening of tulip petals. *Plant Cell Physiol.*, **2004**, *45*, 608-617.
- [154] Aroca, R.; Amodeo, G.; Fernández-Illescas, S.; Herman, E.M.; Chaumont, F.; Chrispeels, M.J. The role of aquaporins and membrane damage in chilling and hydrogen peroxide induced changes in the hydraulic conductance of maize roots. *Plant Physiol.*, **2005**, *137*(1), 341-353.
- [155] Fushimi, K.; Sasaki, S.; Marumo, F. Phosphorylation of serine 256 is required for cAMP-dependent regulatory exocytosis of the aquaporin-2 water channel. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*(23), 14800-14804.
- [156] Hove, R.M.; Bhavé, M. Plant aquaporins with non-aqua functions: Deciphering the signature sequences. *Plant Mol. Biol.*, **2011**, *75*, 413-430.
- [157] Deshmukh, R.; Bélanger, R.R. Molecular evolution of aquaporins and silicon influx in plants. *Func. Ecol.*, **2016**, *8*, 1277-85.
- [158] Mudumbi, J.B.N.; Ntwampe, S.K.O.; Mekuto, L.; Itoba-Tombo, E.F.; Matsha, T.E. Are Aquaporins (AQPs) the gateway that conduits nutrients, persistent organic pollutants and perfluoroalkyl substances (PFASs) into plants? *Springer Sci. Ver.*, **2017**, *5*, 31-48.
- [159] Maurel, C.; Verdoucq, L.; Luu, D.T.; Santoni, V. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **2008**, *59*(1), 595-624.
- [160] Heckwolf, M.; Pater, D.; Hanson, D.T.; Kaldenhoff, R. The *Arabidopsis thaliana* aquaporin AtPIP1;2 is a physiologically relevant CO₂ transport facilitator. *Plant J.*, **2011**, *67*(5), 795-804.
- [161] Gao, L.; Lu, Z.; Ding, L.; Guo, J.; Wang, M.; Ling, N.; Guo, S.; Shen, Q. Role of aquaporins in determining carbon and nitrogen status in higher plants. *Int. J. Mol. Sci.*, **2018**, *19*, 35.
- [162] Bienert, G.P.; Chaumont, F. Aquaporin-facilitated transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1840*, 1596-1604.
- [163] Bienert, G.P.; Schüssler, M.D.; Jahn, T.P. Metalloids: Essential, beneficial or toxic? Major intrinsic proteins sort it out. *Trends Biochem. Sci.*, **2008**, *33*, 20-26.
- [164] Sakurai, J.; Ahamed, A.; Murai, M.; Maeshima, M.; Uemura, M. Tissue and cell-specific localization of rice aquaporins and their water transport activities. *Plant Cell. Physiol.*, **2008**, *49*(1), 30-39.
- [165] Knipfer, T.; Besse, M.; Verdeil, J.-L.; Fricke, W. Aquaporin- facilitated water uptake in barley (*Hordeum vulgare* L.) roots. *J. Exp. Bot.*, **2011**, *62*, 4115-4126.
- [166] Srivastava, A.K.; Penna, S.; Nguyen, D.V.; Tran, L.S.P. Multifac- eted roles of aquaporins as molecular conduits in plant responses to abiotic stresses. *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2014**, *8551*(3), 389-398.
- [167] Li, G.; Santoni, V.; Maurel, C. Plant aquaporins: Roles in plant physiology. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1840*(5), 1574-1582.
- [168] Afzal, Z.; Howton, T.; Sun, Y.; Mukhtar, M. The roles of aquaporins in plant stress responses. *J. Dev. Biol.*, **2016**, *4*(1), 9.
- [169] Deshmukh, R.; Sonah, H.; Belanger, R. Plant aquaporins: Genome- wide identification, transcriptomics, proteomics, and advanced analytical tools. *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 1896.
- [170] Verkman, A.S. Aquaporins: Translating bench research to human disease. *J. Exp. Biol.*, **2009**, *212*, 1707-1715.
- [171] Egan, A.N.; Schlueter, J.; Spooner, D.M. Applications of next- generation sequencing in plant biology. *Am. J. Bot.*, **2012**, *99*, 175-185.
- [172] Ray, S.; Satya, P.N. Next generation sequencing technologies for next generation plant breeding. *Front. Plant Sci.*, **2014**, *5*, 367.
- [173] Amorim, L.L.B.; Bezerra-Neto, J.P.; Santos, R.F.; Ferreira-Neto, J.R.C.; Kido, E.A.; Matos, M.; Benko-Iseppon, A.M. Transcription factors involved in plant drought tolerance regulation. *Drought Stress Tolerance Plants*, **2016**, *2*, 315-358.

- [174] Gomez-Casati, D.F.; Busi, M.V.; Barchiesi, J.; Peralta, D.A.; He- din, N.; Bhaduria, V. Applications of bioinformatics to plant biotechnology. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **2018**, *27*, 89-104.
- [175] Ambrosino, L.; Colantuono, C.; Monticolo, F.; Chiusano, M.L. Bioinformatics resources for plant genomics: Opportunities and bottlenecks in the -omics era. *Curr. Issues. Mol. Biol.*, **2018**, *27*, 71-88.
- [176] Amorim, L.L.B.; Santos, R.F.; Bezerra-Neto, J.P.; Guida-Santos, M.; Crovella, S.; Benko-Iseppon, A.M. Transcription factors involved in plant resistance to pathogens. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2017**, *18*(4), 335-351.
- [177] Swarbreck, D.; Wilks, C.; Lamesch, P.; Berardini, T.Z.; Garcia- Hernandez, M.; Foerster, H.; Li, D.; Meyer, T.; Muller, R.; Ploetz, L.; Radenbaugh, A.; Singh, S.; Swing, V.; Tissier, C.; Zhang, P.; Huala, E. The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): Gene structure and function annotation. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36*, D1009-D1014.
- [178] Liang, C.; Jaiswal, P.; Hebbard, C.; Avraham, S.; Buckler, E.S.; Casstevens, T.; Hurwitz, B.; McCouch, S.; Ni, J.; Pujar, A.; Ravenscroft, D.; Ren, L.; Spooner, W.; Tecle, I.; Thomson, J.; Tung, C.W.; Wei, X.; Yap, I.; Youens-Clark, K.; Ware, D.; Stein, D. Gramene: A growing plant comparative genomics resource. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36*, D947-D953.
- [179] Gonzales, M.D.; Archuleta, E.; Farmer, A.; Gajendran, K.; Grant, D.; Shoemaker, R.; Beavis, W.D.; Waugh, M.E. The Legume Information System (LIS): An integrated information resource for comparative legume biology. *Nucleic Acids Res.*, **2005**, *33*, D660- D665.
- [180] Goodstein, D.M.; Shu, S.; Howson, R.; Neupane, R.; Hayes, R.D.; Fazo, J.; Mitros, T.; Dirks, W.; Hellsten, U.; Putnam, N.; Rokhsar, D.S. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, **2012**, *40*, D1178-D1186.
- [181] Proost, S.; Van Bel, M.; Sterck, L.; Billiau, K.; Van Parys, T.; Van de Peer, Y.; Vandepoele, K. PLAZA: A comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *Plant Cell*, **2009**, *21*, 3718-3731.
- [182] Duveck, J.; Fu, A.; Muppirala, U.; Sabharwal, M.; Wilkerson, M.D.; Lawrence, C.J.; Lushbough, C.; Brendel, V. PlantGDB: A resource for comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36*, D959-D965.
- [183] Bräutigam, A.; Gowik, U. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. *Plant Biol.*, **2010**, *12*, 831-841.
- [184] Mochida, K.; Shinozaki, K. Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. *Plant Cell Physiol.*, **2011**, *52*, 2017-2038.
- [185] Van Bel, M.; Diels, T.; Vancaester, E.; Kreft, L.; Botzki, A.; Van de Peer, Y.; Coppens, F.; Vandepoele, K. PLAZA 4.0: An integrative resource for functional, evolutionary and comparative plant genomics. *Nucleic Acids Res.*, **2018**, *46*, D1190-D1196.
- [186] Quackenbush, J.; Cho, J.; Lee, D.; Liang, F.; Holt, I.; Karamycheva, S.; Parvizi, B.; Perte, G.; Sultana, R.; White, J. The TIGR gene indices: Analysis of gene transcript sequences in highly sampled eukaryotic species. *Nucleic Acids. Res.*, **2003**, *29*, 159-164.
- [187] Dong, Q.; Schlueter, S.D.; Brendel, V. PlantGDB, plant genome database and analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, 354D- 359D.
- [188] Zardoya, R.; Irisarri, I.; Abascal, F. Aquaporin Discovery in the Genomic Era. In: Soveral, G.; Nielsen, S.; Casini, A.; Eds.; Aq- uaporins in Health and Disease. Boca Raton: CRC Press., **2015**, 19- 31.
- [189] Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.; Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **1990**, *215*, 403-410.
- [190] Eddy, S.R. Accelerated profile HMM searches. *PLoS Comp. Biol.*, **2011**, *7*, e1002195.
- [191] Marchler-Bauer, A.; Derbyshire, M.K.; Gonzales, N.R.; Lu, S.; Chitsaz, F.; Geer, L.Y.; Geer, R.C.; He, J.; Gwadz, M.; Hurwitz, D.I.; Lanczycki, C.J.; Lu, F.; Marchler, G.H.; Song, J.S.; Thanki, N.; Wang, Z.; Yamashita, R.A.; Zhang, D.; Zheng, C.; Bryant, S.H. CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43*(D), 222-226.
- [192] Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, J.; Hig- gins, D.G. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, **1997**, *25*, 4876-4882.
- [193] Tamura, K.; Stecher, G.; Peterson, D.; Filipinski, A.; Kumar, S. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, **2013**, *30*, 2725-2729.
- [194] Firoozabady, E.; Gutterson, N. Cost-effective *in vitro* propagation methods for pineapple. *Plant Cell Rep.*, **2003**, *21*, 844-850.
- [195] Gangopadhyay, S.; Harding, B.L.; Rajagopalan, B.; Lukas, J.J.; Fulp, T.J. A nonparametric approach for paleohydrologic reconstruction of annual streamflow ensembles. *Water Resour. Res.*, **2009**, *45*, W06417.
- [196] Escalona, M.; Lorenzo, J.C.; González, B.; Daquinta, M.; González, J.L.; Desjardins, Y.; Borroto, C.G. Pineapple (*Ananas comosus* L. Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Rep.*, **1999**, *18*, 743-748.
- [197] Ming, R.; VanBuren, R.; Wai, C.M.; Tang, H.; Schatz, M.C.; Bowers, J.E.; Lyons, E.; Wang, M.L.; Chen, J.; Biggers, E.; Zhang, J.; Huang, L.; Zhang, L.; Miao, W.; Zhang, J.; Ye, Z.; Miao, C.; Lin, Z.; Wang, H.; Zhou, H.; Yim, W.C.; Priest, H.D.; Zheng, C.; Woodhouse, M.; Edger, P.P.; Guyot, R.; Guo, H.B.; Guo, H.; Zheng, G.; Singh, R.; Sharma, A.; Min, X.; Zheng, Y.; Lee, H.; Gurtowski, J.; Sedlazeck, F.; Harkess, A.; McKain, M.R.; Liao, Z.; Fang, J.; Liu, J.; Zhang, X.; Zhang, Q.; Hu, W.; Qin, Y.; Wang, K.; Chen, L.Y.; Shirley, N.; Lin, Y.R.; Liu, L.Y.; Hernandez, A.G.; Wright, C.L.; Bulone, V.; Tuskan, G.A.; Heath, K.; Zee, F.; Moore, P.H.; Sunkar, R.; Leebens-Mack, J.H.; Mockler, T.; Bennetzen, J.L.; Freeling, M.; Sankoff, D.; Paterson, A.H.; Zhu, X.; Yang, X.; Smith, J.A.; Cushman, J.C.; Paull, R.E.; Yu, Q. The pineapple genome and the evolution of CAM photosynthesis. *Nat. Genet.*, **2015**, *47*(12), 1435-1442.
- [198] Arumuganathan, K.; Earle, E. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **1991**, *9*, 208-218.
- [199] Chaumont, F.; Tyerman, S.D. Aquaporins: Highly regulated channels controlling plant water relations. *Plant Physiol.*, **2014**, *164*, 1600-1618.
- [200] Johansson, I.; Karlsson, M.; Johanson, U.; Larsson, C.; Kjellbom, P. The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance. *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, *1465*, 324-342.
- [201] Maurel, C.; Boursiac, Y.; Luu, D.T.; Santoni, V.; Shahzad, Z.; Verdoucq, L. Aquaporins in plants. *Physiol. Rev.*, **2015**, *95*(4), 1321-1358.
- [202] Donnard, E.; Barbosa-Silva, A.; Guedes, R.L.; Fernandes, G.R.; Velloso, H.; Kohn, M.J.; Andrade-Navarro, M.A.; Ortega, J.M. Preimplantation development regulatory pathway construction through a text-mining approach. *BMC Genomics*, **2011**, *12*(Suppl 4), S3.
- [203] Wang, X. Properties of the lowest common ancestor in a complete binary tree. *Int. J. Scientific Innovative Mathematical Res.*, **2015**, *3*, 12-17.
- [204] Finn, R.D.; Coghill, P.; Eberhardt, R.Y.; Eddy, S.R.; Mistry, J.; Mitchell, A.L.; Potter, S.C.; Punta, M.; Qureshi, M.; SangradorVegas, A.; Salazar, G.A.; Tate, J.; Bateman, A. The Pfam protein families database: Towards a more sustainable future. *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44*, D279-D285.
- [205] Apweiler, R.; Bairoch, A.; Wu, C.H.; Barker, W.C.; Boeckmann, B.; Ferro, S.; Gasteiger, E.; Huang, H.; Lopez, R.; Magrane, M.; Martin, M.J.; Natale, D.A.; O'Donovan, C.; Redaschi, N.; Yeh, L.S.L. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.*, **2004**, *32*, D115-D119.
- [206] Finn, R.D.; Clements, J.; Eddy, S.R. HMMER web server: Interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res.*, **2011**, *39*, W29-W37.
- [207] Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.*, **2009**, *26*, 1641-1650.
- [208] Delwiche, C.F.; Cooper, D. The evolutionary origin of a terrestrial flora. *Curr. Biol.*, **2015**, *25*(19), R899-R910.
- [209] Martínez-Ballesta, M.C.; López-Pérez, L.; Muries, B.; Muñoz-Azcarate, O.; Carvajal, M. Climate change and plant water balance: The role of aquaporins - A review. In: Lichtfouse, E.; (Ed.). Cli- mate Change, Intercropping, Pest Control and Beneficial Microorganisms. **2009**, 71-89.
- [210] Boyce, K.C.; Lee, J.E. Plant evolution and climate over geological timescales. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.*, **2017**, *45*(1), 61-87.
- [211] Bienert, G.P.; Chaumont, F. Plant aquaporins: Roles in water homeostasis, nutrition, and signaling processes. In: Transporters and Pumps in Plant Signaling; Geisler, M.; Venema, K.; Eds. Springer; Berlin, Heidelberg, **2010**, pp. 3-36.

- [212] Lopez, D.; Bronner, G.; Brunel, N.; Auguin, D.; Bourgerie, S.; Brignolas, F.; Carpin, S.; Tournaire-Roux, C.; Maurel, C.; Fumanal, B.; Martin, F.; Sakr, S.; Label, P.; Julien, J.L.; Gousset-Dupont, A.; Venisse, J.S. Insights into *Populus* XIP aquaporins: Evolutionary expansion, protein functionality, and environmental regulation. *J. Exp. Bot.*, **2012**, *63*(5), 2217-2230.
- [213] Sade, N.; Vinocur, B.J.; Diber, A.; Shatil, A.; Ronen, G.; Nissan, H.; Wallach, R.; Karchi, H.; Moshelion, M. Improving plant stress tolerance and yield production: Is the tonoplast aquaporin S1TIP2;2 a key to isohydric to anisohydric conversion? *New Phytol.*, **2009**, *181*, 651-661.
- [214] Gawwad, M.R.A.; Sutkovic, J.; Matakovic, L.; Musrati, M.; Zhang, L. Functional interactome of aquaporin 1 sub-family reveals new physiological functions in *Arabidopsis thaliana*. *Netw. Biol.*, **2013**, *3*(3), 1-10.
- [215] Madeira, A.; Moura, T.F.; Soveral, G. Detecting aquaporin function and regulation. *Front. Chem.*, **2016**, *4*, 3.
- [216] Zardoya, R.; Ding, X.; Kitagawa, Y.; Chrispeels, M.J. Origin of plant glycerol transporters by horizontal gene transfer and functional recruitment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2002**, *99*, 14893-14896.
- [217] Liu, Q.; Wang, H.; Zhang, Z.; Wu, J.; Feng, Y.; Zhu, Z. Divergence in function and expression of the NOD26-like intrinsic proteins in plants. *BMC Genomics*, **2009**, *10*, 1-13.
- [218] Zapater, C.; Chauvigné, F.; Norberg, B.; Finn, R.N.; Cerdà, J. Dual neofunctionalization of a rapidly evolving aquaporin-1 paralog resulted in constrained and relaxed traits controlling channel function during meiosis resumption in teleosts. *Mol. Biol. Evol.*, **2018**, *28*, 3151-3169.
- [219] Abascal, F.; Irisarri, I.; Zardoya, R. Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1840*, 1468-1481.
- [220] Diehn, T.A.; Pommerrenig, B.; Bernhardt, N.; Hartmann, A.; Benkert, G.P. Genome-wide identification of aquaporin encoding genes in *Brassica oleracea* and their phylogenetic sequence comparison to *Brassica* crops and *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.*, **2015**, *6*, 166.
- [221] Beilstein, M.A.; Nagalingum, N.S.; Clements, M.D.; Manchester, S.R.; Mathews, S. Dated molecular phylogenies indicate a Miocene origin for *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2010**, *107*, 18724-18728.
- [222] Tao, P.; Zhong, X.; Li, B.; Wang, W. Genome wide identification and characterization of aquaporin genes (AQPS) in Chinese cabbage (*Brassica Rapa* Ssp. *Pekinensis*). *Mol. Genet. Genomics*, **2014**, *289*, 1131-1145.
- [223] Cheng, F.; Liu, S.; Wu, J.; Fang, L.; Sun, S.; Liu, B.; Li, P.; Hua, W.; Wang, X. BRAD, the genetics and genomics database for *Brassica* plants. *BMC Plant Biol.*, **2011**, *11*, 136.
- [224] Krzywinski, M.; Schein, J.; Birol, I.; Connors, J.; Gascoyne, R.; Horsman, D.; Jones, S.J.; Marra, M.A. Circos: An information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.*, **2009**, *19*(9), 1639-1645.
- [225] Snowdon, J.; Friedrich, T.; Friedt, W. Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid brassica species *B. rapa* (Syn. *Campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theor. Appl. Genet.*, **2002**, *104*(4), 533-538.
- [226] Panchy, N.; Lehti-Shiu, M.; Shiu, M.H. Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiol.*, **2016**, *171*(4), 2294-2316.
- [227] Gena, P.; Pellegrini-Calace, M.; Biasco, A.; Svelto, M.; Calamita, G. Aquaporin membrane channels: Biophysics, classification, functions, and possible biotechnological applications. *Food Biophys.*, **2011**, *6*(2), 241-249.
- [228] Chevalier, A.S.; Chaumont, F. Trafficking of plant plasma membrane aquaporins: Multiple regulation levels and complex sorting signals. *Plant Cell Physiol.*, **2015**, *56*(5), 819-829.
- [229] Yaneff, A.; Sigaut, L.; Gomez, N.; Aliaga Fandino, C.; Alleva, K.; Pietrasanta, L.I.; Amodeo, G. Loop B serine of a plasma membrane aquaporin type PIP2 but not PIP1 plays a key role in pH sensing. *Biochim. Biophys. Acta*, **2016**, *1858*(11), 2778-2787.
- [230] Pandey, B.; Sharma, P.; Pandey, D.M.; Sharma, I.; Chatrath, R. Identification of new aquaporin genes and single nucleotide polymorphism in bread wheat. *Evol. Bioinform. Online*, **2013**, *9*, 437-452.
- [231] Navarro-Ródenas, A.; Xu, H.; Kempainen, M.; Pardo, A.G.; Zwiazek, J.J. Laccaria bicolor aquaporin LbAQ1 is required for hartig net development in trembling aspen (*Populus tremuloides*). *Plant Cell. Environ.*, **2015**, *38*(11), 2475-2486.
- [232] Martins, C.P.S.; Neves, D.M.; Cidade, L.C.; Mendes, A.F.S.; Silva, D.C.; Almeida, A.A. F.; Coelho-Filho, M.A.; Gesteira, A.S.; Soares-Filho, W.S.; Costa, M.G.C. Expression of the citrus CsTIP2;1 gene improves tobacco plant growth, antioxidant capacity and physiological adaptation under stress conditions. *Planta*, **2017**, *245*(5), 951-963.
- [233] Sun, H.; Li, L.; Lou, Y.; Zhao, H.; Yang, Y.; Wang, S.; Gao, Z. The bamboo aquaporin gene PeTIP4;1-1 confers drought and salinity tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.*, **2017**, *36*(4), 597-609.
- [234] Rhee, J.; Horie, T.; Sasano, S.; Nakahara, Y.; Katsuhara, M. Identification of an H₂O₂-permeable PIP aquaporin in barley and a serine residue promoting H₂O transport. *Physiol. Plant.*, **2017**, *159*(1), 120-128.
- [235] Song, J.; Ye, G.; Qian, Z.; Ye, Q. Virus-induced plasma membrane aquaporin PsPIP2;1 silencing inhibits plant water transport of *Pisum sativum*. *Bot. Stud.*, **2016**, *57*(1), 15.
- [236] Conde, A.; Soares, F.; Breia, R.; Geros, H. Postharvest dehydration induces variable changes in the primary metabolism of grape berries. *Food Res. Int.*, **2018**, *105*, 261-270.
- [237] Rodrigues, M.I.; Bravo, J.P.; Sasaki, F.T.; Severino, F.E.; Maia, I.G. The Tonoplast Intrinsic Aquaporin (TIP) subfamily of eucalyptus grandis: Characterization of EgTIP2, a root-specific and osmotic stress-responsive gene. *Plant Sci.*, **2013**, *213*, 106-113.
- [238] Lee, S.H.; Zwiazek, J.J. Regulation of aquaporin-mediated water transport in *Arabidopsis* roots exposed to NaCl. *Plant Cell Physiol.*, **2015**, *56*(4), 750-758.
- [239] Srivastava, S.; Srivastava, A.K.; Suprasanna, P.; D'Souza, S.F. Quantitative real-time expression profiling of aquaporins-isoforms and growth response of *Brassica juncea* under arsenite stress. *Mol. Biol. Rep.*, **2013**, *40*(4), 2879-2886.
- [240] Li, D.D.; Tai, F.J.; Zhang, Z.T.; Li, Y.; Zheng, Y.; Wu, Y.F.; Li, X.B. A cotton gene encodes a tonoplast aquaporin that is involved in cell tolerance to cold stress. *Gene*, **2009**, *438*(1-2), 26-32.
- [241] Baaziz, K.B.; Lopez, D.; Rabot, A.; Combes, D.; Gousset, A.; Bouzid, S.; Cochard, H.; Sakr, S.; Venisse, J.S. Light-mediated K(leaf) induction and contribution of both the PIP1s and PIP2s aquaporins in five tree species: Walnut (*Juglans regia*) case study. *Tree Physiol.*, **2012**, *32*(4), 423-434.
- [242] Yin, Y.X.; Wang, S.B.; Zhang, H.X.; Xiao, H.J.; Jin, J.H.; Ji, J.J.; Jing, H.; Chen, R.G.; Arisha, M.H.; Gong, Z.H. Cloning and expression analysis of CaPIP1-1 gene in pepper (*Capiscum annum* L.). *Gene*, **2015**, *563*(1), 87-93.
- [243] Tian, S.; Wang, X.; Li, P.; Wang, H.; Ji, H.; Xie, J.; Qiu, Q.; Shen, D.; Dong, H. Plant aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. *Plant Physiol.*, **2016**, *171*(3), 1635-1650.
- [244] Quiroga, G.; Erice, G.; Aroca, R.; Chaumont, F.; Ruiz-Lozano, J.M. Enhanced drought stress tolerance by the arbuscular mycorrhizal symbiosis in a drought-sensitive maize cultivar is related to a broader and differential regulation of host plant aquaporins than in a drought-tolerant cultivar. *Front. Plant Sci.*, **2017**, *19*(8), 1056-1065.
- [245] Gond, S.K.; Torres, M.S.; Bergen, M.S.; Helsel, Z.; White, J.F.J. Induction of salt tolerance and up-regulation of aquaporin genes in tropical corn by *Rhizobacterium Pantoea agglomerans*. *Lett. Appl. Microbiol.*, **2015**, *60*(4), 392-399.
- [246] Kayum, M.A.; Park, J.I.; Nath, U.K.; Biswas, M.K.; Kim, H.T.; Nou, I.S. Genome-wide expression profiling of aquaporin genes confer responses to abiotic and biotic stresses in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biol.*, **2017**, *17*(1), 23.
- [247] Chen, W.; Yin, X.; Wang, L.; Tian, J.; Yang, R.; Liu, D.; Yu, Z.; Ma, N.; Gao, J. Involvement of rose aquaporin RhPIP1;1 in ethylene-regulated petal expansion through interaction with RhPIP2;1. *Plant Mol. Biol.*, **2013**, *83*(3), 219-233.
- [248] Vera-Estrella, R.; Barkla, B.J.; Amezcua-Romero, J.C.; Pantoja, O. Day/night regulation of aquaporins during the CAM cycle in *Meembryanthemum crystallinum*. *Plant. Cell. Environ.*, **2012**, *35*(3), 485-501.
- [249] Fouquet, R.; Leon, C.; Ollat, N.; Barrieu, F. Identification of grapevine aquaporins and expression analysis in developing berries. *Plant Cell. Rep.*, **2008**, *27*(9), 1541-1550.

- [250] Heinen, R.B.; Ye, Q.; Chaumont, F. Role of aquaporins in leaf physiology. *J. Exp. Bot.*, **2009**, *60*(11), 2971-2985.
- [251] Shi, J.; Wang, J.; Li, R.; Li, D.; Xu, F.; Sun, Q.; Zhao, B.; Mao, A.J.; Guo, Y.D. Expression patterns of genes encoding plasma membrane aquaporins during fruit development in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Physiol. Biochem.*, **2015**, *96*, 329-336.
- [252] Tungogoen, K.; Viboonjun, U.; Kongsawadworakul, P.; Katsuhara, M.; Julien, J.L.; Sakr, S.; Chrestin, H.; Narangajavana, J. Hormonal treatment of the bark of rubber trees (*Hevea brasiliensis*) increases latex yield through latex dilution in relation with the differential expression of two aquaporin genes. *J. Plant Physiol.*, **2011**, *168*(3), 253-262.
- [253] Xu, H.; Cooke, J.E.K.; Kemppainen, M.; Pardo, A.G.; Zwiazek, J.J. Hydraulic Conductivity and aquaporin transcription in roots of trembling aspen (*Populus tremuloides*) seedlings colonized by *Laccaria bicolor*. *Mycorrhiza*, **2016**, *26*(5), 441-451.
- [254] Regon, P.; Panda, P.; Kshetrimayum, E.; Panda, S. K. Genome- wide comparative analysis of tonoplast intrinsic protein (TIP) genes in plants. *Funct. Integr. Genomics*, **2014**, *14*(4), 617-629.
- [255] Lopez, D.; Amira, M.B.; Brown, D.; Muries, B.; Brunel-Michac, N.; Bourgerie, S.; Porcheron, B.; Lemoine, R.; Chrestin, H.; Mollison, E.; Di Cola, A.; Frigerio, L.; Julien, J.L.; Gousset-Dupont, A.; Fumanal, B.; Label, P.; Pujade-Renaud, V.; Auguin, D.; Venisse, J.S. The *Hevea brasiliensis* XIP aquaporin subfamily: Genomic, structural and functional characterizations with relevance to intensive latex harvesting. *Plant Mol. Biol.*, **2016**, *91*(4-5), 375-396.
- [256] Di Giorgio, J.A.P.; Bienert, G.P.; Ayub, N.D.; Yaneff, A.; Barberini, M.L.; Mecchia, M.A.; Amodeo, G.; Soto, G.C.; Muschietti, J.P. Pollen-specific aquaporins NIP4;1 and NIP4;2 are required for pollen development and pollination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, **2016**, *28*(5), 1053-1077.
- [257] Sadhukhan, A.; Kobayashi, Y.; Nakano, Y.; Iuchi, S.; Kobayashi, M.; Sahoo, L.; Koyama, H. Genome-wide association study reveals that the aquaporin NIP1;1 contributes to variation in hydrogen peroxide sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant*, **2017**, *10*(8), 1082-1094.
- [258] Noronha, H.; Agasse, A.; Martins, A.P.; Berny, M.C.; Gomes, D.; Zarrouk, O.; Thiebaud, P.; Delrot, S.; Soveral, G.; Chaumont, F.; Gerós, H. The grape aquaporin VvSIP1 transports water across the ER membrane. *J. Exp. Bot.*, **2014**, *65*(4), 981-993.
- [259] Šurbanovski, N.; Sargent, D.J.; Else, M.A.; Simpson, D.W.; Zhang, H.; Grant, O.M. Expression of *Fragaria vesca* PIP aquaporins in response to drought stress: PIP down-regulation correlates with the decline in substrate moisture content. *PLoS One*, **2013**, *8*(9), e74945.
- [260] Besse, M.; Knipfer, T.; Miller, A.J.; Verdeil, J.L.; Jahn, T.P.; Fricke, W. Developmental pattern of aquaporin expression in barley (*Hordeum Vulgare* L.) leaves. *J. Exp. Bot.*, **2011**, *62*(12), 4127- 4142.
- [261] Feng, Z.J.; Xu, S.C.; Liu, N.; Zhang, G.W.; Hu, Q.Z.; Xu, Z.S.; Gong, Y.M. Identification of the AQP members involved in abiotic stress responses from *Arabidopsis*. *Gene*, **2018**, *646*, 64-73.
- [262] Denker, B.M.; Smith, B.L.; Kuhajda, F.P.; Agre, P. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *J. Biol. Chem.*, **1998**, *263*, 15634-15642.
- [263] Day, R.E.; Kitchen, P.; Owen, D.S.; Bland, C.; Marshall, L.; Conner, A.C.; Bill, R.M.; Conner, M.T. Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. *Biochim. Biophys. Acta*, **2014**, *1840*, 1492-1506.
- [264] Martinez-Ballesta, M.C.; Carvajal, M. New challenges in plant aquaporin biotechnology. *Plant Sci.*, **2014**, *217*(218), 71-77.
- [265] Khan, K.; Agarwal, P.; Shanware, A.; Sane, V.A. Heterologous expression of two jatropha aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **2015**, *10*(6), e0128866.
- [266] Alavilli, H.; Awasthi, J.P.; Rout, G.R.; Sahoo, L.; Lee, B.H.; Panda, S.K. Overexpression of a barley aquaporin gene, HvPIP2;5 confers salt and osmotic stress tolerance in yeast and plants. *Front. Plant Sci.*, **2016**, *7*, 1566.
- [267] An, J.; Hu, Z.; Che, B.; Chen, H.; Yu, B.; Cai, W. Heterologous expression of *Panax ginseng* PgTIP1 confers enhanced salt tolerance of soybean cotyledon hairy roots, composite, and whole plants. *Front. Plant Sci.*, **2017**, *8*, 1232.
- [268] Khan, K.; Agarwal, P.; Shanware, A.; Sane, V.A. Heterologous expression of two jatropha aquaporins imparts drought and salt tolerance and improves seed viability in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, **2015**, *10*(6), e0128866.
- [269] Pang, Y.; Li, L.; Ren, F.; Lu, P.; Wei, P.; Cai, J.; Xin, L.; Zhang, J.; Chen, J.; Wang, X. Overexpression of the tonoplast aquaporin At-TIP5;1 conferred tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis*. *J. Genet. Genomics.*, **2010**, *37*(6), 389-397.
- [270] Takano, J.; Wada, M.; Ludewig, U.; Schaaf, G.; Von Wirén, N.; Fujiwara, T. The *Arabidopsis* major intrinsic protein NIP5;1 is essential for efficient boron uptake and plant development under boron limitation. *Plant Cell*, **2006**, *18*, 1498-1509.
- [271] Noronha, H.; Araújo, D.; Conde, C.; Martins, A.P.; Soveral, G.; Chaumont, F.; Delrot, S.; Gerós, H. The grapevine uncharacterized intrinsic protein 1 (VvXIP1) is regulated by drought stress and transports glycerol, hydrogen peroxide, heavy metals but not water. *PLoS One*, **2016**, *11*(8), e0160976.
- [272] Verkman, A.S.; Mitra, A.K. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **2000**, *278*(1), F13- F28.
- [273] Wang, F.; Feng, X.C.; Li, Y.M.; Yang, H.; Ma, T.H. Aquaporins as potential drug targets. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2006**, *27*(4), 395-401.
- [274] Tradtrantip, L.; Jin, J.B.; Anderson, M.O.; Verkman, A.S. Aquaporin-targeted therapeutics: State-of-the-field. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **2017**, *969*, 239-250.
- [275] Verkman, A.S. A cautionary note on cosmetics containing ingredients that increase aquaporin-3 expression. *Exp. Dermatol.*, **2008**, *17*(10), 871-872.
- [276] Boury-Jamot, M.; Daraspe, J.; Bonté, F.; Perrier, E.; Schnebert, S.; Dumas, M.; Verbavatz, J.M. Skin aquaporins: Function in hydration, wound healing, and skin epidermis homeostasis. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2009**, *190*, 205-217.
- [277] Contreras, M.; De La Fuente, J. Control of infestations by Ixodes ricinus tick larvae in rabbits vaccinated with aquaporin recombinant antigens. *Vaccine*, **2017**, *35*(9), 1323-1328.
- [278] Yi, F.; Khan, M.; Gao, H.; Hao, F.; Sun, M.; Zhong, L.; Lu, C.; Feng, X.; Ma, T. Increased differentiation capacity of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in aquaporin-5 deficiency. *Stem Cells Dev.*, **2012**, *21*(13), 2495-2507.
- [279] Avola, R.; Graziano, A.C.E.; Pannuzo, G.; Cardile, V. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue differentiated into neuronal or glial phenotype express different aquaporins. *Mol. Neurobiol.*, **2017**, *54*(10), 8308-8320.
- [280] Graziano, A.C.E.; Avola, R.; Pannuzo, G.; Cardile, V. Aquaporin1 and 3 modification as a result of chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cell. *J. Cell. Physiol.*, **2018**, *233*(3), 2279-2291.

Material suplmentar disponível em:

<https://drive.google.com/file/d/1m66snZwBSpNjV4OdLY9FRY8bg22n6MIK/view?usp=sharing>.

DISCLAIMER: The above article has been published in Epub (ahead of print) on the basis of the materials provided by the author. The Editorial Department reserves the right to make minor modifications for further improvement of the manuscript.

PMID: 30387391

APÊNDICE B – Plant Elite Squad: First Defense Line and Resistance Genes – Identification, Diversity and Functional Roles

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.se

Current Protein and Peptide Science, 2017, 18, 1-17

1

REVIEW ARTICLE

Plant Elite Squad: First Defense Line and Resistance Genes – Identification, Diversity and Functional Roles

Ana Carolina Wanderley-Nogueira^{1,*}, João Pacifico Bezerra-Neto¹, Ederson Akio Kido¹, Flávia Tadeu de Araújo¹, Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim^{1,2}, Sergio Crovella¹ and Ana Maria Benko-Iseppon^{1,2}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Genetics Department, Center of Biological Sciences, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50.670-423, Recife, Pernambuco, Brazil; ²Federal Institute of Education, Science and Technology of Piauí, Campus Oeiras, R. Projesada, CEP 64500-000, Oeiras, PI, Brazil; ³Genetic Service, IRCCS Burlo Garofolo and Department of Developmental and Reproductive Sciences, University of Trieste - Via dell'Istria, 65/1 - 34137 Trieste, Italy

Abstract: Plants exhibit sensitive mechanisms to respond to environmental stresses, presenting some specific and non-specific reactions when attacked by pathogens, including organisms from different classes and complexity, as viroids, viruses, bacteria, fungi and nematodes. A crucial step to define the fate of the plant facing an invading pathogen is the activation of a compatible Resistance (*R*) gene, the focus of the present review. Different aspects regarding *R*-genes and their products are discussed, including pathogen recognition mechanisms, signaling and effects on induced and constitutive defense processes, splicing and post transcriptional mechanisms involved. There are still countless challenges to the complete understanding of the mechanisms involving *R*-genes in plants, in particular those related to the interactions with other genes of the pathogen and of the host itself, their regulation, acting mechanisms at transcriptional and post-transcriptional levels, as well as the influence of other types of stress over their regulation. A magnification of knowledge is expected when considering the novel information from the omics and systems biology.

ARTICLE HISTORY

Received: May 27, 2016
Revised: July 10, 2016
Accepted: July 26, 2016

DOI: 10.2174/1568017177661607240
1568017177661607240

Keywords: Avirulence, DAMPs, Hypersensitive response, MAMPs, PAMPs, *R*-gene, Signal transduction.

INTRODUCTION

Until recently, the term "immunity" was not well accepted because plants have neither a circulatory system nor antibody-like molecules related to an adaptive or acquired system as reported in mammals. Despite several differences plants like animals are also subjected to pathogen attack leading to diseased condition and in extreme situations death. The causative agents of infectious diseases in plants comprise the same types of organisms that attack other organisms as well. These include fungi, bacteria, viruses and viroids. Out of these viroids are some unique to plants alone [1]. As reported for animals, plants defend themselves by a combination of induced and constitutive mechanisms through an intricate network of signals.

The identification of plant genes responsible for defense against pathogen attack has been an important area of research. Among different gene categories identified, Resistance (*R*) genes are essential for plant survival, since they

account for the first interaction between plant and pathogen, inducing the hypersensitive response (HR) after the perception of the pathogen through the so called gene-for-gene interaction [2-4]. The identification of a pathogen typically occurs when an avirulence protein, secreted by the pathogen interacts with the product of a plant *R*-gene, activating resistance mechanisms, such as the onset of Systemic Acquired Resistance (SAR) triggering pathogenesis-related (*PR*) genes (Fig. 1). Evidences show that this gene category is ancient in plants, being highly polymorphic, probably due to their coevolution as a response to the pressure of avirulence factors secreted by the pathogens. Even though these genes are so important for breeding purposes, at present automatic bioinformatic annotation tools are unavailable. It is observed that most *R*-genes have a number of conserved functional domains that belong to different classes [2-4] some of them also present in other gene families, making them traceable using bioinformatic tools.

The plant-pathogen recognition leads to the activation of several signal transduction pathways, which interact to form a complex network that culminates in a resistance response, failure of which leads to susceptibility [5]. In the currently

*Address correspondence to this author at the Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brazil; Tel.: +55-81-2126-7816; Fax: +55-81-2126-8522; E-mail: carolwn@gmail.com

APÊNDICE C – Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR

Amorim et al. *Plant Methods* (2018) 14:88
<https://doi.org/10.1186/s13007-018-0354-z>

Plant Methods

RESEARCH

Open Access



Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR

Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim^{1,2†}, José Ribamar Costa Ferreira-Neto^{2†}, João Pacífico Bezerra-Neto², Valesca Pandolfi², Flávia Tadeu de Araújo², Mitalle Karen da Silva Matos², Mauro Guida Santos³, Ederson Akio Kido² and Ana Maria Benko-Iseppon^{2*}

Abstract

Background: Due to cowpea ability to fix nitrogen in poor soils and relative tolerance to drought and salt stresses, efforts have been directed to identifying genes and pathways that confer stress tolerance in this species. Real-time quantitative PCR (qPCR) has been widely used as the most reliable method to measure gene expression, due to its high accuracy and specificity. In the present study, nine candidate reference genes were rigorously tested for their application in normalization of qPCR data onto roots of four distinct cowpea accessions under two abiotic stresses: root dehydration and salt (NaCl, 100 mM). In addition, the regulation of four target transcripts, under the same referred conditions was also scrutinized.

Results: geNorm, NormFinder, BestKeeper, and ΔC_t method results indicated a set of three statistically validated RGs for each stress condition: (I) root dehydration (actin, ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1D, and a *Phaseolus vulgaris* unknown gene—*UNK*), and (II) salt (ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant 1D, F-box protein, and *UNK*). The expression profile of the target transcripts suggests that flavonoids are important players in the cowpea response to the abiotic stresses analyzed, since chalcone isomerase and chalcone synthase were up-regulated in the tolerant and sensitive accessions. A lipid transfer protein also participates in the cowpea tolerance mechanisms to root dehydration and salt stress. The referred transcript was up-regulated in the two tolerant accessions and presented no differential expression in the sensitive counterparts. Chitinase B, in turn, generally related to plant defense, was an important target transcript under salt stress, being up-regulated at the tolerant, and down-regulated in the sensitive accession.

Conclusions: Reference genes suitable for qPCR analyses in cowpea under root dehydration and salt stress were identified. This action will lead to a more accurate and reliable analysis of gene expression on this species. Additionally, the results obtained in this study may guide future research on gene expression in cowpea under other abiotic stress types that impose osmotic imbalance. The target genes analyzed, in turn, deserve functional evaluation due to their transcriptional regulation under stresses and biotechnological potential.

Keywords: Housekeeping genes, Root tissue, Salt stress, Drought, Phenylpropanoids, Legume

*Correspondence: ana.benko.iseppon@pq.cnpq

[†]Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim and José Ribamar Costa Ferreira-Neto authors contributed equally to this work

² Genetics Department, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2018. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

APÊNDICE D – NBS-LRR genes – plant health sentinels: Structure, roles, evolution and biotechnological applications

CHAPTER

4

NBS-LRR genes—Plant health sentinels: Structure, roles, evolution and biotechnological applications

João P. Bezerra-Neto^a, Flávia C. Araújo^a, José R.C. Ferreira-Neto^b, Roberta L.O. Silva^a, Artemisa N.C. Borges^a, Mitalle K.S. Matos^a, Jéssica B. Silva^a, Manassés D. Silva^b, Ederson A. Kido^b, Ana M. Benko-Iseppon^a

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Recife, Brazil ^bUniversidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Genética Molecular, Departamento de Genética, Recife, Brazil

4.1 Introduction

For centuries, the agriculture has suffered severe productivity losses, caused by biotic (including the action of insects, fungi, bacteria, viruses, and nematodes) and abiotic stresses (such as drought, salinity, extreme temperatures, and irradiation). In addition to causing significant changes in plant physiology, and cause significant losses in productivity, leading to financial losses for both large and small farmers (Affenzeller et al., 2009; O'Brien and Benková, 2013). The application of agrochemicals has been the most used alternative to control pathogens, constituting in many cases an expensive and inefficient measure, since pathogens can acquire resistance, requiring higher doses of the pesticide after each application. Besides, pesticides represent a source of contamination for the environment, the farmer and the final consumer (Mizumoto et al., 2006; Damalas, 2009).

As a result of the sessile life habit of plants, there is constant exposure to environmental stresses, whether of biotic or abiotic origin. Unlike animals, they do not have an adaptive immune system or mobile defense cells, such as macrophages (Chisholm et al., 2006). However, throughout their evolution, plants have developed an intricate network of less complex but