



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

FERNANDA ALVES DE ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Stylosanthes scabra* Vogel SOB
CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

Recife

2022

FERNANDA ALVES DE ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Stylosanthes scabra* Vogel SOB
CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

Monografia apresentada ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Valesca Pandolfi

Coorientadora: Ms. Maria Cidinaria Silva Alves

Recife
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Andrade, Fernanda Alves de .

Análise da expressão gênica de *Stylosanthes scabra* Vogel sob condição de déficit hídrico / Fernanda Alves de Andrade. - Recife, 2022.

45 : il., tab.

Orientador(a): Valesca Pandolfi

Cooorientador(a): Maria Cidinária Silva Alves

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas - Bacharelado, 2022.

1. *Stylosanthes* . 2. Raiz. 3. RT -qPCR. 4. Seca. I. Pandolfi , Valesca .
(Orientação). II. Alves, Maria Cidinária Silva. (Coorientação). III. Título.

570 CDD (22.ed.)

FERNANDA ALVES DE ANDRADE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *Stylosanthes scabra* Vogel SOB
CONDIÇÃO DE DÉFICIT HÍDRICO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Coordenação do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção
do título em Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Valesca Pandolfi - UFPE
(Orientadora)

Ms. Cleidiane Macêdo Santos - UFPE
(Examinadora)

Dra. Flávia Czekalski de Araújo - Diagnósticos do Brasil
(Examinadora)

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe Maria, por todo apoio, incentivo e dedicação. A vocês todo meu amor e gratidão.

Aos meus avós Regina Maria e Eufrasio Carlos (*in memoriam*) por me ensinarem a vida e o amor. Além de todo cuidado, carinho e, principalmente, pelo tempo que estivermos juntos. Compuseram, sem dúvida, as notas mais lindas da melodia da minha vida.

Especialmente, à minha orientadora, Valesca Pandolfi, pelo suporte e confiança depositada durante todo desenvolvimento de minha pesquisa. A minha gratidão e admiração por você transcende o tempo e da distância que um dia possa vir a existir. Pois seus ensinamentos ultrapassam as linhas da pesquisa e foi uma honra ser sua orientada.

Aos membros do Laboratório Genética e Biotecnologia Vegetal, por toda colaboração, aprendizado e cooperação no início da minha caminhada na pesquisa científica, sobretudo, Paulo Vitor, Maria Cidinaria, Manassés e José Ribamar por proporcionarem novos *insights* no íterim de minha pesquisa, permitindo desenvolver meu pensamento crítico e reflexivo.

Agradeço aos professores, Anderson Silva e Marta Gerusa, por suas contribuições para o meu aprendizado e desenvolvimento ao longo da graduação.

Aos amigos que fiz durante esses anos de graduação, por todo companheirismo e amizade. Vitor, Giovana, Letícia, Juan, Eduarda, Sabrina, Thayani e Marília, com vocês tenho colecionado as melhores risadas e momentos dentro e fora da UFPE. Camila e William, a qual me proporcionaram a melhor colaboração de estudos, conselhos e dúvidas que já tive, saibam que vocês foram e são essenciais para mim. “*Agradeço aos amigos que fiz, que mantêm a coragem de gostar de mim, apesar de mim...*” (*Maria Bethânia*).

Agradeço à UFPE e ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelas bolsas de Iniciação Científica concedidas, as quais estimularam meu desenvolvimento como pesquisadora.

Muito obrigada!

Há uma grandeza nessa noção de vida, com seus vários poderes, tendo sido originada por algumas poucas formas ou em apenas uma; e que enquanto o planeta girava de acordo com a lei fixa da gravidade, a partir de um início tão simples, um infinito de formas, as mais belas e maravilhosas, evoluiu e continua a evoluir.

(Charles Darwin)

RESUMO

Sabe-se que é crescente a preocupação acerca das consequências das mudanças climáticas na agricultura mundial e como a produção de alimentos é afetada. Neste sentido, estudos envolvendo a expressão de genes são fundamentais, uma vez que nos permitem entender como algumas plantas conseguem tolerar determinadas condições de estresse ambiental, incluindo seca e a salinidade – considerados os fatores de maior impacto. Uma espécie de grande interesse para estudos de expressão gênica é a *Stylosanthes scabra*, uma Fabaceae nativa do Brasil, amplamente utilizada como forrageira na alimentação animal e na recuperação de solos degradados. O presente estudo teve como objetivo analisar a resposta molecular de quatro genes alvos do tecido radicular de *S. scabra* após 24 horas de deficiência hídrica (DH). Após a imposição do estresse, as raízes das plantas foram utilizadas para a extração do RNA total, o qual apresentou qualidade e quantidade suficientes para síntese de cDNA e posterior análise da expressão diferencial via PCR quantitativo em Tempo Real. Dos quatro genes avaliados, dois são codificantes para proteínas regulatórias (Fatores de transcrição MYB e NAC) e dois codificantes para proteína funcionais (SWEET e DEIDRINA), ambos intimamente implicados na tolerância à diferentes estresses abióticos, principalmente deficiência hídrica. Os dados de expressão observados nesse estudo (induzidos) confirmam os dados obtidos para a mesma espécie/estresse em experimento com RNA-Seq e, portanto, validam os dados de expressão dos quatro genes alvos.

Palavras-chave: Raiz; RT-qPCR; seca, *Stylosanthes*

ABSTRACT

The growing concern about the consequences of climate change and its impacts to agriculture worldwide has been the focus of many studies aimed at obtaining increasingly adapted/tolerant crops. In this sense, studies involving gene expression are fundamental, since they allow us to understand the ability of some plants to tolerate certain conditions of environmental stress, including drought and salinity – considered the factors of the great impact. A species of great interest for gene expression studies is *Stylosanthes scabra*, a Fabaceae native to Brazil, widely used as forage in animal feed and in the recovery of degraded soils. The present study aimed to analyze the molecular response of four target genes in the root tissue of *S. scabra* after 24 hours of water deficit (WD). After WD stress imposition, the plant roots were used for the extraction of total RNA, which presented sufficient quality and quantity for cDNA synthesis and subsequent differential expression analysis via quantitative Real Time PCR. Of the four genes evaluated, two are coding for regulatory proteins (transcription factors MYB and NAC) and two are coding for functional proteins (SWEET and DEHYDRIN), both intimately implicated in tolerance to different abiotic stresses, mainly water deficit. The expression data observed in this study (Up-regulation) confirm the data obtained for the same species/stress in an RNA-Seq experiment and, therefore, validate the expression data of the four target genes.

Keywords: Root, RT-qPCR, drought, *Stylosanthes scabra*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Relação do potencial hídrico do solo e da planta	18
Figura 2	Percepção de ABA, respostas e principais consequências sobre a planta	20
Figura 3 –	Grupos de proteínas induzidas durante estresses abióticos: proteínas funcionais e regulatórias	21
Figura 4 –	Exemplar de <i>Stylosanthes scabra</i>	23
Figura 5 –	Exemplos de sistemas de detecção para qPCR	26
Figura 6 –	Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de amostras de RNA total extraído de raízes de <i>S. scabra</i>	31
Figura 7 -	Análise da curva de <i>melting</i> (<i>melting curve</i>) da especificidade dos primers na amplificação dos genes hídrica.....	33
Figura 8 –	Transcritos superexpressos (UR, <i>up-regulated</i>) nas análises de RNA-Seq cuja expressão foi validada (UR) neste estudo via qPCR.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	<i>Absciscic acid</i> (Ácido Abscísico)
CAM	<i>Crassulacean Acid Metabolism</i> (Metabolismo ácido das crassuláceas)
cDNA	DNA complementar
CE	<i>Constitutively expressed</i> (Expressão constitutiva)
CO ₂	<i>Carbon dioxide</i> (Dióxido de carbono)
DH	Déficit hídrico ou deficiência hídrica
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
DR	<i>Down-regulated</i> (reprimido)
EROs	Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)
FAO	Food and Agriculture Organization of United Nations (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)
FTs	Transcription factors (Fatores de transcrição)
GI	Genes de interesse
H ₂ O ₂	<i>Hydrogen Peroxide</i> (Peróxido de hidrogênio)
LEA	<i>Late embryogenesis abundant proteins</i> (proteínas abundantes da embriogênese tardia)
miRNAs	Micros RNAs
mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
N ₂	Nitrogen (Nitrogênio)
¹ O ₂	<i>Singlet oxygen</i> (Oxigênio <i>singlete</i>)
O ₂ ⁻	<i>Superoxide radical</i> (Radical superóxido)
OH ⁻	<i>Hydroxyl</i> (Hidroxila)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT-qPCR	Real-time quantitative PCR (Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real)
SWEET	<i>Sugars Will Eventually be Exported Transporters</i>
UR	<i>Up regulated</i> (induzido)
µg	Microgram (Micrograma)
µL	Microlitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	ESTRESSE ABIÓTICO E SEUS EFEITOS SOBRE AS PLANTAS.....	16
2.2	PRINCIPAIS ESTRESSES ABIÓTICOS	16
2.3	EFEITOS E MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO.....	17
2.4	<i>Stylosanthes scabra</i> Vogel.....	22
2.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM PLANTAS VIA RT-qPCR	24
3	OBJETIVOS.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	CULTIVO, IMPOSIÇÃO DO ESTRESSE E COLETAS	28
4.2	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA.....	28
4.3	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA VIA RT - qPCR	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	OBTENÇÃO E QUALIDADE DAS AMOSTRAS (RNA E cDNA).....	30
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA	31
5.3	GENES UP REGULADOS EM <i>S. SCABRA</i> APÓS DH.....	32
6	CONCLUSÃO	35
7	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Um dos principais impactos negativos na produtividade e desenvolvimento das culturas em todo mundo são devidos às condições ambientais adversas. Tais fatores vêm sendo acentuados devido ao aumento da instabilidade climática dos últimos anos (JACINTO et al., 2019). As mudanças climáticas, além de afetar a produção agrícola, também causam danos à biodiversidade, o ecossistema, e segurança alimentar mundial (SHAHZAD et al., 2021).

Dentre os estressores abióticos mais severos está a escassez hídrica, cada vez mais frequente em diversas regiões do planeta, principalmente em regiões áridas e semiáridas, a exemplo da Caatinga no Nordeste brasileiro. Atualmente está cada vez mais recorrente o surgimento de áreas com baixa precipitação ou de padrões de chuva irregulares, devido ao aumento da temperatura global (ADEFISAN, 2018).

O déficit hídrico (DH) ocasiona uma interrupção na dinâmica do fluxo de água nos tecidos vegetais, perturbando os mecanismos básicos de desenvolvimento da planta (ARAÚJO JUNIOR et al., 2019). Posto isso, para enfrentar os estresses abióticos, como a seca, as plantas desenvolveram vários mecanismos de respostas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (SILVA et al., 2015) para tolerar e/ou se adaptar a tal situação.

Neste contexto, a *Stylosanthes scabra* Vogel merece destaque – uma Fabaceae (Leguminosae) forrageira, adaptada a ambientes desfavoráveis, como solos pobres e tolerante a pouca disponibilidade hídrica (PATHAK et al., 2004; NAGAICH et al., 2013). Portanto, *S. scabra* configura um ótimo representante para estudos de genes responsivos a estresses abióticos, visando melhoramento genético de plantas mais adaptadas a condições de pouca incidência hídrica.

Dentre as estratégias disponíveis para avaliação da expressão gênica, podemos citar a técnica de PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR). Essa técnica possui grande importância entre os métodos de avaliação da expressão gênica, devido a sua simplicidade e especificidade (VANHAUWAERT et al., 2014). RT-qPCR usa como molde o cDNA, gerado a partir da transcrição reversa do mRNA, (TAJTI et al., 2021), extraído de tecidos vegetais ou animal. Podendo também, ser utilizada no diagnóstico clínico. Para obter resultados excelentes, uma vez que, a

qPCR pode sofrer variações, é empregado a utilização de genes de referência para a normalização dos dados.

Sob condições de deficiência hídrica, por exemplo, muitas plantas apresentam mecanismos de defesa, dentre os quais destacam-se diversos genes e vias de sinalização (FANG e XIONG, 2015). Exemplos incluem genes codificantes para proteínas regulatórias, como por exemplo, fatores de transcrição (MYB e NAC), e genes codificantes para proteína funcionais (SWEET e DEIDRINA), as quais funcionam como osmorreguladores, ambos intimamente implicados na tolerância à diferentes estresses abióticos, principalmente deficiência hídrica (LIU et al., 2017; SHIM et al., 2018; LU et al., 2019; FANG et al., 2020).

Dessa maneira, o presente trabalho objetivou avaliar, por meio da técnica de RT-qPCR, o perfil transcricional de quatro genes (MYB, NAC, SWEET e DEIDRINA) no tecido radicular de *S. scabra* nas primeiras 24 horas após imposição de estresse por déficit hídrico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ESTRESSES ABIÓTICOS E SEUS EFEITOS SOBRE AS PLANTAS

O estresse abiótico pode ser definido como fatores ambientais que reduzem o crescimento, desenvolvimento e rendimento das plantas, limitando a produção agrícola (CRAMER et al., 2011). Os efeitos dos estresses ambientais têm sido acentuados em face à instabilidade climática dos últimos anos, visto que são fatores diretamente interligados (JACINTO et al., 2019). Plantas menos tolerantes necessitam de maiores exigências de cultivo, incluindo maior exigência hídrica e de fertilizantes, muitas vezes, agravando as condições ambientais (ZHU, 2016).

Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos para perceber, evitar e até mesmo tolerar os efeitos ambientais adversos, tais como seca, salinidade, calor e frio (SILVA et al., 2015). Algumas dessas respostas podem ser não adaptativas, ou seja, causam danos promovidos pelo estresse, incluindo: alterações na estrutura de proteínas. As respostas adaptativas oferecem um acréscimo na resistência da planta ao estressor (ZHANG et al., 2022). Outros resultados desses estresses incluem a redução do crescimento da planta (de forma geral ou em partes específicas), pois os processos de divisão e expansão celular são afetados, ou as plantas podem prolongar ativamente seu crescimento para se adaptar às condições adversas (ZHANG et al., 2020). Entender como esses mecanismos ocorrem é de suma importância para o desenvolvimento da agricultura moderna.

2.2 PRINCIPAIS ESTRESSES ABIÓTICOS

A salinidade é caracterizada pela situação em que há altas concentrações de sais solúveis no solo, podendo ocorrer devido às características do ambiente, como em regiões áridas e semiáridas ou, ainda, pela ação da atividade humana, denominadas salinização primária e secundária, respectivamente (PEDROTTI et al., 2015). A salinização do solo é um dos principais fatores limitantes para a produtividade agrícola, por restringir o uso de terras e reduzir eficiência das culturas (AHMAD et al., 2013). De acordo com a FAO 2021 (*Food and Agriculture*

Organization of United Nations), a salinidade é responsável pela perda anual de cerca de 1,5 milhão de hectares de terras destinadas a produção agrícola no mundo. Segundo HARTER et al., (2014), demonstraram que o estresse salino prejudica a germinação e desenvolvimento de sementes e plântulas, respectivamente d morango (*Cucurbita pepo*).

Outro fator de estresse abiótico é o estresse hídrico, o qual pode decorrer pela falta (déficit hídrico - DH), ou por excesso de água (inundação), sendo o primeiro mais frequente nas regiões áridas e semiáridas (JACINTO et al., 2019), incluindo a região Nordeste do Brasil. Nessas regiões, a incidência irregular de precipitação e elevadas taxas de evapotranspiração, impedem o desenvolvimento de diversas culturas sem uso da irrigação (ALMEIDA et al., 2018). SOUZA et al., (2018), relataram que o desenvolvimento do ipê-amarelo é afetado em condições de DH. A escassez de água está entre os maiores desafios enfrentados na agricultura do mundo (ZHAO & DAI, 2015). Estima-se que cerca de 30 – 90 % do rendimento das culturas é perdido devido à seca, cuja intensidade varia entre as espécies cultivadas (HUSSAIN et al., 2019).

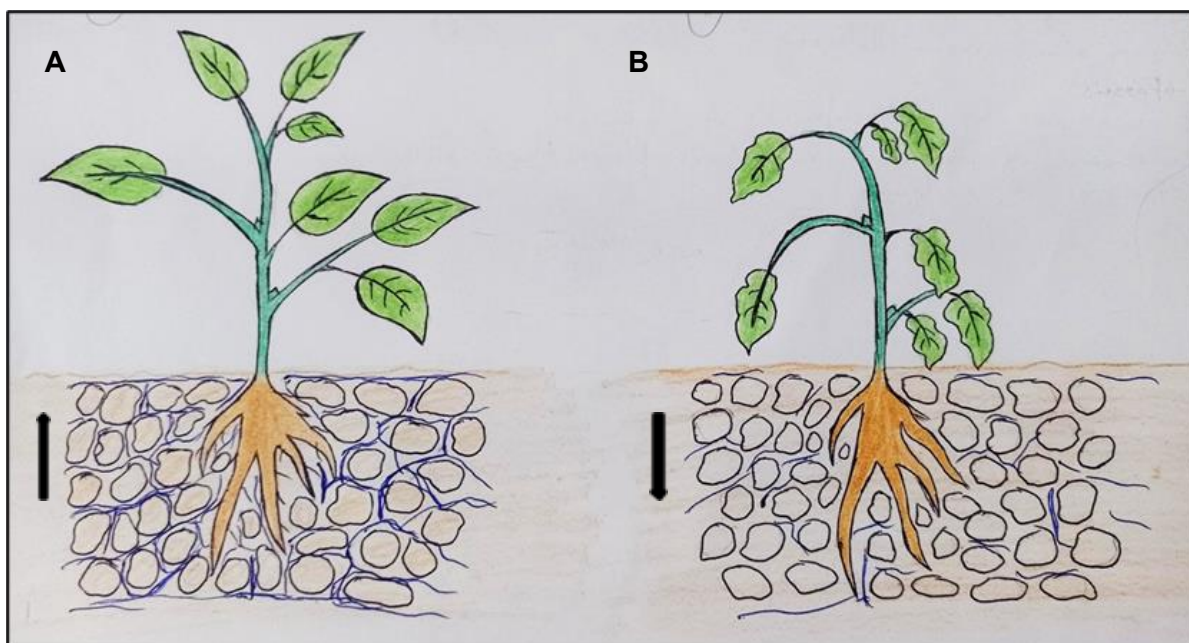
Assim como a seca e a salinidade, mudanças na temperatura também impõem à planta um estresse que causa danos. O calor ou o frio podem desestabilizar e desintegrar, como também, super estabilizar e fortalecer, estruturas secundárias de DNA e RNA, respectivamente, causando alteração na transcrição, tradução ou processamento (TAIZ et al., 2017). Um dos processos mais sensíveis a mudanças da temperatura, é a fotossíntese, e em baixas temperaturas, alguns dos seus componentes são afetados, como cadeia transportadora de elétrons e biossíntese da clorofila (AMARAL et al., 2020). Além disso, algumas plantas têm a germinação afetada. SILVA et al. (2015) relataram que em plântulas de *Cajanus cajan* (L.) Millsp (guandu) cultivadas sob condições de temperaturas entre 12,8°C e 43°C apresentaram uma redução significativa na germinação de ambas cultivares.

2.3 EFEITOS E MECANISMOS DE DEFESA DAS PLANTAS AO DÉFICIT HÍDRICO

A deficiência hídrica, ocorre em diversos ecossistemas, ocasionando sérias disfunções nas plantas (ARAÚJO JUNIOR et al., 2019). O DH impede o “*continuum*” de água que vai do solo para a planta através do interior das células, fornecendo a água necessária para o turgor celular. Com isso, um potencial hídrico é criado para

manter a água na parte interna da célula (FERRARI et al., 2015). Em condições em que o potencial hídrico da raiz for maior que o potencial hídrico do solo, a raiz perde água para o solo e para a parte aérea, dessa forma, reduzindo o potencial hídrico em toda planta, consequentemente, a célula perde o turgor e os tecidos vegetais murcham (VILALTA e FORNER, 2017) (Figura 1).

Figura 1. Relação entre o potencial hídrico do solo e planta. A) Potencial hídrico do solo está menos negativo quando comparado ao potencial da planta, com isso, a água vai do solo para a planta mantendo o *continuum* e o turgor das células. B) Potencial hídrico do solo está mais negativo do que o da planta, assim, a planta perde água para o solo, consequentemente, desidratando. As setas indicam o movimento da água.



Fonte: Autor.

Os efeitos da escassez hídrica na planta vão depender da intensidade, duração e de seu estágio de desenvolvimento, além da espécie e de outros fatores ambientais que podem estar associados (DIETZ et al., 2021). Plantas que estão na fase vegetativa e passam por situações severas de DH apresentam redução no crescimento, diminuição da área foliar e do rendimento das sementes, podendo em muitos casos causar a morte da planta (FARIAS et al., 2007). A resposta das plantas a esse tipo de estresse pode acontecer através do mecanismo de aclimação e de adaptação (KRASENSKY e JONAK, 2012). Aclimação refere-se a tolerância ao estresse, ou seja, são as modificações fisiológicas, bioquímicas e morfológicas, já a

adaptação, ocorre a nível evolutivo, são características herdáveis capazes de evitar o estresse (DIETZ et al., 2021).

Em cenários de deficiência hídrica, algumas funções das plantas são comprometidas e, para sobreviver respostas são iniciadas. Como um dos primeiros efeitos da desidratação ocorre o fechamento dos estômatos, induzido pelo acúmulo de ácido abscísico (ABA), juntamente com a diminuição da turgescência e do potencial hídrico foliar, limitando, assim, as trocas gasosas e o crescimento vegetal (TAIZ et al., 2017). Por sua vez, faz com que a perda de água por transpiração diminua (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2010). Além do mais, essas condições estressantes levam a uma redução na parte aérea da planta, aceleração na senescência e abscisão das folhas (FERRARI et al., 2015).

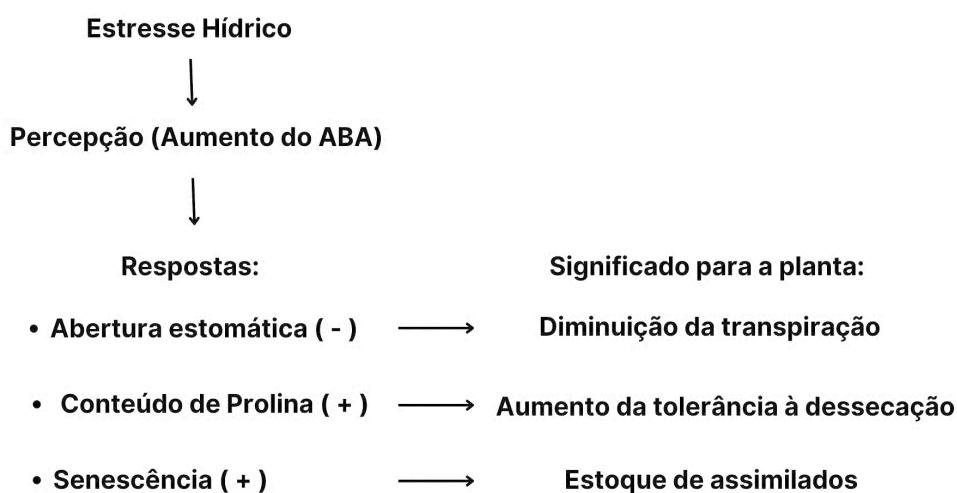
A fotossíntese é um processo bastante afetado pelo DH, pois a ingestão de CO_2 é afetada, causada pelo fechamento dos estômatos, além dos danos sofridos as membranas dos tilacóides e pigmentos fotossintéticos (RAI e RAI, 2020). HUSSAIN et al., (2019), relataram que os conteúdos de clorofila diminuem em situação de escassez hídrica, resultado do aumento do estresse oxidativo e/ou da foto-oxidação. Outro fator que limita a fotossíntese é a redução na atividade da Rubisco, essencial para o ciclo de Calvin (ZHOU et al., 2007). As plantas dispõem de três mecanismos para realizarem o ciclo fotossintético, são esses: as vias C3, C4 e CAM (metabolismo ácido das crassuláceas) (FANG e XIONG, 2015). Plantas C4 e CAM, normalmente, estão mais adaptadas a ambientes quentes e áridos por apresentarem maior eficiência no uso da água (ASHRAF e HARRIS, 2013).

Com o prolongamento do período de DH os danos oxidativos começam a ocorrer. O acúmulo das espécies reativas de oxigênio (EROs) compreende quatro principais formas: o oxigênio *singlete* ($^1\text{O}_2$), radical superóxido (O_2^-), hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (CARVALHO et al., 2008). Espécies reativas de oxigênio são produzidas, essencialmente, nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (MITTLER, 2017). Sob condições favoráveis, o sistema oxidante das células consegue manter os níveis basais de EROs e, ocorrendo um equilíbrio entre produção X eliminação das EROs, evitando danos nas células (FOYER e NOCTOR, 2005). Desta forma, EROs podem atuar na sinalização do estresse imposto, para direcionamento das respostas adaptativas e de aclimação da planta (ROSADO et al., 2016). Já, em situações de desequilíbrio (entre produção e eliminação), as EROS são prejudiciais às proteínas e aos ácidos nucleicos (DNA e RNA), além de

atuar na peroxidação lipídica da membrana, danificando a integridade da célula (DAS & ROYCHOUDHURY, 2014).

O ABA é um hormônio essencial para vários processos fisiológicos das plantas, além de estar relacionado a respostas frente aos estresses ambientais, como a DH (ULLAH et al., 2017). Este fitohormônio é sintetizado, principalmente, nas raízes após a percepção do estresse que, em seguida é transportado para todas as partes da planta, em especial para as folhas (LARCHER, 2006). Sob condições adversas o ABA promove o fechamento estomático, induz a expressão de genes que codificam proteínas de resposta ao estresse (KRASENSKY e JONAK, 2012), induz a senescência (FINKELSTEIN, 2013) e regula a produção (acúmulo) de prolina (ABRAHAM et al., 2003) (Figura 2). TENG et al., (2014), concluíram que a taxa fotossintética, de transpiração, condutância estomática e expressão de genes relacionados à seca, foram otimizados após a aplicação de ABA exógeno em arroz (*Oriza sativa* L.).

Figura 2. Percepção do ácido abscísico (ABA), respostas e principais consequências sobre a planta. (+): aumento, (-): diminuição.

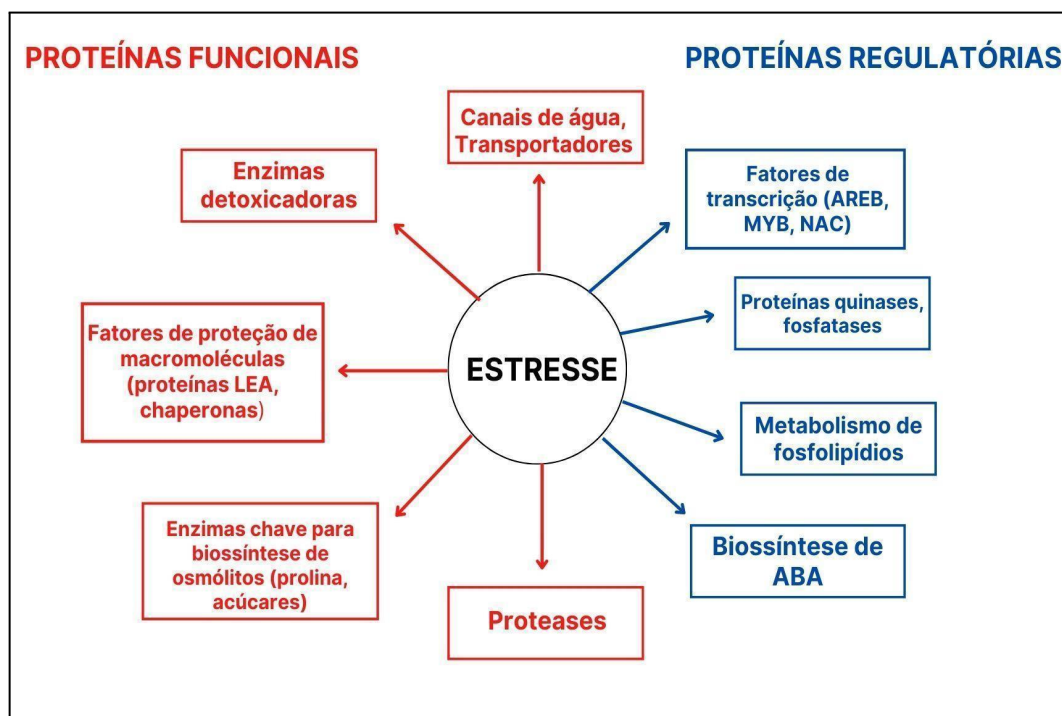


Fonte: TIETZ e TIETZ (1982).

Os mecanismos moleculares estão sendo melhor entendidos com os avanços das técnicas de biologia molecular. Hoje sabemos que a resposta das plantas aos estresses abióticos (a exemplo da escassez hídrica) envolve diversos genes e vias de sinalização (FANG e XIONG, 2015). Estudo realizado com arroz (*Oryza sativa*)

sob estresse hídrico revelou que os genes responsivos foram divididos em dois grupos (RABBANI et al., 2003). O primeiro grupo consiste em proteínas que possivelmente funcionam na tolerância ao estresse, tais como osmotinas e proteínas LEA- *Late embryogenesis Abundant*). O segundo grupo são as proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica, ou seja, proteínas regulatórias, a exemplo dos fatores de transcrição e proteínas quinases (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007) (Figura 3).

Figura 3. Grupos de proteínas induzidas durante estresse abióticos: proteínas funcionais e regulatórias.



Fonte: Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (2007).

Em relação aos genes responsivos ao estresse, esses podem ser dependentes ou independentes de ABA (MAGALHÃES JÚNIOR et al., 2010). Por exemplo, alguns fatores de transcrição (FT) do tipo “zíper de leucina” (bZIP), participam do aumento da tolerância de plantas submetidas a estresse abiótico quando induzidos por ABA (MANNA et al., 2020). Arroz transgênico superexpressando OsbZIP66 (um membro pertencente à família de bZIP) apresentou maior tolerância à seca quando comparados às plantas controle (YOON et al., 2017). Alguns outros fatores de transcrição estão envolvidos na resposta da planta ao DH, como por exemplo, MYB/MYC, NAC e WRKY.

Os membros da grande família de FTs NAC, foram amplamente relatados como reguladores na sinalização de diversos genes responsivos ao DH (RAI & RAI, 2020). NAC pode regular a via de transdução de sinal ABA, sob condições de estresse abiótico e, também regula genes responsivos independentes de ABA (FANG et al., 2015; ZHANG et al., 2021). O fator de transcrição MYB está relacionado a resposta da planta à escassez hídrica, sendo uma das maiores famílias de FTs em plantas e, está envolvido em diferentes processos de biossíntese (CHEN et al., 2021). Além disso, são elementos essenciais na sinalização ABA (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006). Isso indica que os FTs podem apresentar vias dependentes e independentes de ABA (SHINOZAKI e YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2000).

Dentre as proteínas funcionais podem ser citadas as proteínas SWEET e DEIDRINA, as quais desempenham uma variedade de funções nas plantas, além de atuar frente aos estresses abióticos, como a deficiência hídrica (GRAETHER e BODDINGTON, 2014; JIANG et al., 2021). Assim como nos FTs, ABA também tem relação com as duas proteína transportadora de açúcar SWEET e a DEIDRINA. Segundo CHEN et al., (2019), ABA age no acúmulo de açúcares solúveis regulando a expressão de genes relacionados à síntese de açúcar, transporte e metabolismo. Ademais, foi relatado que ABA exógeno induziu a expressão de uma DEIDRINA em plantas de *Vitis vinifera* (YANG et al., 2012).

2.4 *Stylosanthes scabra* Vogel

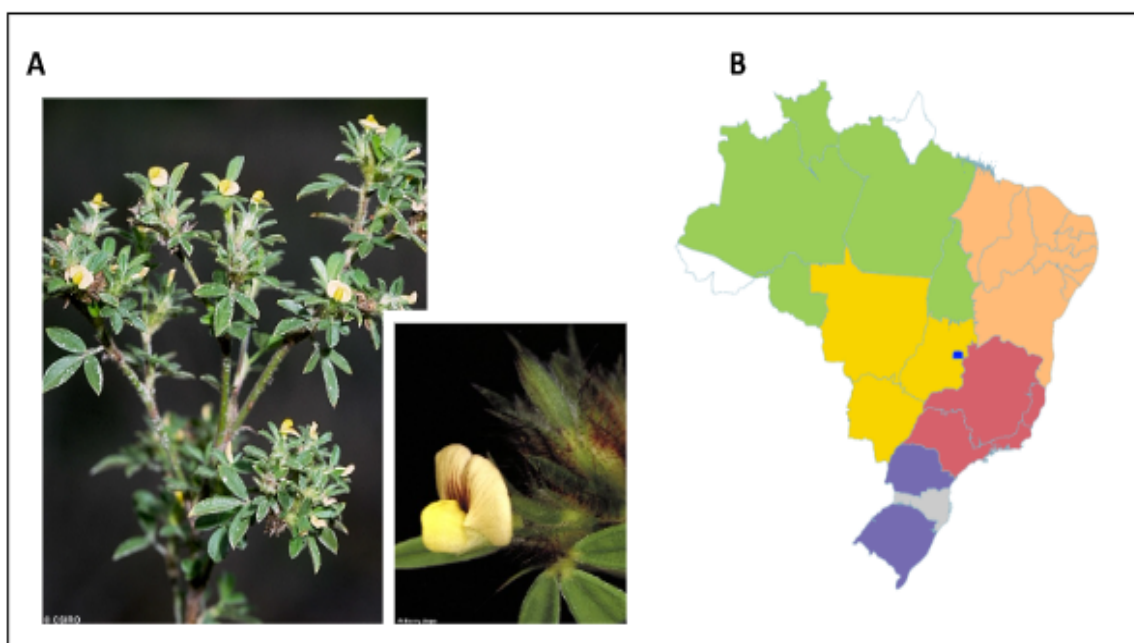
A família Fabaceae (Leguminosae) está entre as três maiores famílias de Angiospermas, com 795 gêneros e quase 20.000 espécies, representando grande importância econômica e ecológica (LPWG, 2013; FLORA DO BRASIL, 2020). A família das leguminosas está dividida em seis subfamílias: Cercidoideae; Detarioideae; Dialioideae; Papilionoideae; Duparquetioideae e Caesalpionioideae (LPWG, 2017). Com distribuição quase cosmopolita (YAHARA et al., 2013), no Brasil é a família com mais diversidade e número de espécies, com maior incidência na Floresta Amazônica e Caatinga, seguidos de Mata Atlântica, Cerrado e Pantanal (BFG, 2015).

O gênero *Stylosanthes* foi descrito por SWARTZ (1788) e representa um importante grupo dentre as leguminosas (CHAKRABORTY, 2004). Um gênero com

aproximadamente 50 espécies, sendo mais de 30 ocorrendo no Brasil (COSTA e VALLS, 2015). As espécies estão distribuídas em áreas subtropicais, tropicais e de clima temperado na América (SANTOS GARCIA et al., 2011). O gênero *Stylosanthes* foi descrito por Swartz (1788), revisado por Vogel (1838), dividindo-o em duas seções (com base na ausência ou presença do eixo floral e bractéolas), sendo: *Stylosanthes* (sem eixo floral, uma bractéola interna) e *Styposanthes* (com eixo floral, duas bractéolas internas) (KIRKBRIDE e KIRKBRIDE, 1985; COSTA et al., 2008).

Dentre as espécies do gênero *Stylosanthes* destaca-se *Stylosanthes scabra* Vogel - uma das principais forrageiras para diversas utilizações. *S. scabra* é um subarbusto de caule ereto, ramos normalmente escamosos e viscosos, com flores amarelas (MELO et al., 2018) (Figura 4A). É uma espécie nativa do Brasil, com distribuição na América do Sul, Índia, Austrália e Ásia (TROPICAL FORAGES, 2017), no Brasil, ocorre em todas as cinco regiões (FLORA DO BRASIL, 2020) (Figura 4B).

Figura 4 – Exemplar de *Stylosanthes scabra* (A) e regiões de ocorrência no Brasil (B).



Fonte: Flora do Brasil (<https://reflora.jbrj.gov.br>). Acesso em 30 de julho de 2022

S. scabra é uma espécie que apresenta considerável tolerância à seca, com boa adaptação à solos de baixa fertilidade, ácidos e arenosos (MARQUES et al.,

2018). Além disso, possui a capacidade de fixar biologicamente nitrogênio (N₂) em associação com bactérias diazotróficas do gênero *Rhizobium* (ANDRADE et al., 2010). Por essas razões, vem sendo utilizada para melhorar a fertilidade, propriedades físicas e recuperar solos degradados (CHANDRA e BHATT, 2007).

S. scabra também se destaca no contexto econômico por sua aplicação na alimentação animal (ARAÚJO, 2019). Segundo CHAKRABORTY (2004), há um aumento na melhoria do peso vivo, das taxas de lotação, criação e manejo do gado nas pastagens com essa espécie, como por exemplo, em trópicos secos da Austrália. Para a forragem são utilizados os ramos, ternos e folhas, as quais apresentam uma porcentagem alta de proteína (MELO et al., 2018), macromolécula importante para a alimentação animal.

2.5. ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM PLANTAS POR RT-qPCR

A análise da expressão gênica tem sido uma das principais estratégias para entender as complexas redes de sinalização que regulam as várias respostas durante o ciclo de vida das plantas ou quando elas enfrentam vários estímulos (MARTINS et al., 2016).

Dentre os métodos de análise da expressão gênica, a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) destaca-se pela sua capacidade de quantificar de forma eficiente, rápida e com grande especificidade amostras biológicas simultaneamente (VANHAUWAERT et al., 2014). Esta técnica fundamenta-se na transcrição reversa do RNA mensageiro (mRNA), através da síntese de DNA complementar (cDNA), seguida da amplificação por PCR em tempo real (SINICROPI et al., 2007).

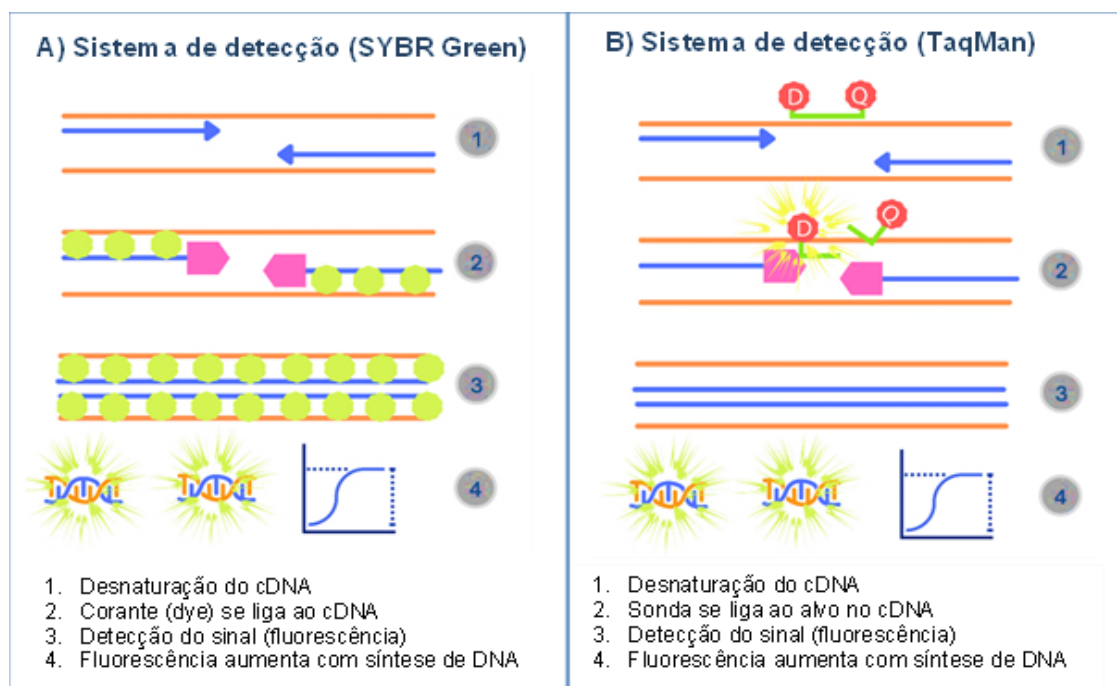
O estudo da expressão gênica por RT-qPCR é de suma importância para vários campos de pesquisa, como estudos de genômica, diagnósticos moleculares, aplicações forenses e na biotecnologia (BUSTIN et al, 2005). Com isso, espera-se que essas investigações em torno dos genes expressos ofereçam informações e identifique genes pertinentes para novos processos biológicos (VANDESOMPELE et al., 2002).

A visualização da amplificação pode ser realizada através de dois métodos de detecção, específica e a não específica. O primeiro diferencia sequências alvos particulares de primer ou de produtos de amplificação não específica, já o segundo, permite a detecção de todo o DNA gerado ao longo da reação de PCR

(VANHAUWAERT et al., 2014). O SYBER green é um exemplo de detecção de alvos não específicos, onde o corante é intercalado na dupla fita de DNA e a detecção da fluorescência é realizada ao final da fase de extensão (BUSTIN, 2000) (Figura 5A).

Por outro lado, o método de detecção específica requer duas sondas de hibridização fluorescentes para detectar seu alvo específico (HEID et al., 1996). Um exemplo é o TaqMan, cujas sondas são constituídas por uma sequência específica de nucleotídeos com fluorescência “repórter” ligada à extremidade 5’, e a molécula captadora (“quencher”) na extremidade oposta. A detecção da fluorescência é realizada após a *Taq* DNA polimerase encontrar o alvo especificamente, durante a fase de extensão (HUI et al., 2008) (Figura 5B).

Figura 5 – Exemplos de sistemas de detecção para qPCR, baseado em SYBER green (A) e baseado em TaqMan (B).



Fonte: HUI et al., 2008

Através da técnica de RT-qPCR é possível analisar a quantificação absoluta ou relativa da expressão gênica (FITZGERALD e McQUALTER, 2011). A quantificação absoluta é utilizada para medir o número real de cópias de ácido nucleico em uma determinada amostra, ou seja, é necessária uma amostra de quantidade conhecida (número de cópias) do gene de interesse que pode ser diluída para gerar uma curva padrão, a partir de concentrações conhecidas diluídas em

série (TAJTI et al. (2021). Este é um padrão externo “absoluto” onde amostras desconhecidas são comparadas com a curva padrão para quantificação absoluta. A principal limitação desta abordagem é a necessidade de obter um padrão independente e confiável para cada gene a ser analisado e então executar curvas padrão concorrentes durante cada ensaio (VALASEK e REPA, 2005).

A quantificação relativa é empregada para analisar as mudanças nos níveis da expressão de um gene de interesse (GI) em relação a um (ou mais) genes de expressão invariável, denominado de gene interno ou gene de referência (VALASEK e REPA, 2005; TAJTI et al., 2021).

Apesar de toda confiabilidade do método, a normalização das amostras controle por genes de referência é algo relevante, uma vez que, a normalização controla as variações no rendimento de extração e transcrição reversa, além da efetividade da amplificação (BUSTIN et al., 2009; TANG et al., 2017).

Assim, métodos como a RT-qPCR de análise rápida e com grande precisão, são fundamentais para elucidar e realizar medidas que solucionem os problemas que as plantas enfrentam no ambiente (ALEMU, 2014). Nos estudos de expressão gênica em plantas por qPCR é de importância crucial manter as diferenças ambientais restritas, visto que, qualquer alteração na planta irá causar impactos em seu transcriptoma e, conseqüentemente, no resultado (FITZGERALD e QUALTER, 2013).

Esta metodologia tem sido utilizada para análise de expressão de diferentes genes de plantas em respostas a vários estresses abióticos. Exemplos incluem a super expressão dos genes MYB, NAC, SWEET e DEIDRINA em plantas submetidas à deficiência hídrica (LIU et al., 2017; SHIM et al., 2018; LU et al., 2019; FANG et al., 2020). Essa metodologia também tem sido usada na avaliação e seleção de genes de referência. Em estudo com a aveia (*Avena sativa* L.) TAJTI e colaboradores (2021) utilizaram o mesmo método de análise para identificar diferentes genes de referência sob distintos estresses abióticos, como o déficit hídrico.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar as respostas moleculares do tecido radicular de *Stylosanthes scabra* frente ao déficit hídrico (DH).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a resposta molecular de *S. scabra* considerando o tempo de 24 horas de estresse por DH;
- Analisar a expressão dos genes MYB, NAC, SWEET e DEIDRINA e algumas de suas funções sob estresse hídrico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO, IMPOSIÇÃO DO ESTRESSE E COLETAS

O acesso 85/UNEB de *Stylosanthes scabra* pertencente ao Banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), foi utilizado neste estudo. As plantas foram cultivadas por seis meses em condições de temperatura, umidade e fotoperíodo de luz natural de 12 horas, com rega diária, uma vez ao dia, na Embrapa Semiárido (Petrolina - PE). Depois dos seis meses de cultivo, as plantas foram submetidas ao estresse por déficit hídrico por suspensão de rega por 6, 24 e 48 horas, com três réplicas biológicas e seus respectivos controles (6, 24 e 48 horas com rega normal). Após coletadas, todas as plantas (tratamentos e controles, 6, 24 e 48 horas), foram congeladas em N₂ líquido e imediatamente armazenadas em ultra freezer -80°C até a extração do RNA. Essa etapa foi realizada por integrantes do LGBV/UFPE (FERREIRA NETO et al.2022; Artigo enviado à Revista “Planta”), onde parte do material do tratamento 24h após DH com seu respectivo controle foram disponibilizados para a validação dos genes alvos deste estudo.

4.2 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

O RNA total das raízes de *S. scabra* foi extraído a partir do kit SV Total RNA Isolation System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, a qualidade e quantidade foram avaliadas em gel de agarose (1,5%) e por fluorimetria, usando Qubit (Invitrogen).

4.3 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA VIA RT-qPCR

A síntese do cDNA foi realizada a partir do mRNA extraído do tecido radicular de *S. scabra*, sendo empregado 1µg do RNA total, através do Kit Improm-IITM Reverse Transcription System (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

Os genes de interesse (GI) escolhidos para este estudo (Tabela 1) foram selecionados com base nos resultados de expressão observados no experimento de

RNA-Seq realizado pelo grupo de pesquisa (FERREIRA NETO; De ARAÚJO et al., 2022; *In press*) e disponibilizados para a análise em questão.

Tabela 1. Pares de *primers* desenhados para análise de expressão dos genes de interesse (GI) via qPCR

S. scabra ID	Anotações de Transcrição	Left	Right
Ssc_TR30399/c0_g1_i3	MYB - relacionado	TTCCACCTCCTCGACCAAAG	AGGGTCTCGGAACAACAGC
Ssc_TR21796/c0_g1_i1	Fator de Transcrição NAC	AGCCACCACCATAACCAACC	GTGGAAGGTTTCGGTTGTTGC
Ssc_TR83700/c0_g1_i3	Proteína SWEET	CGTCGTTACCATCAACAGCG	TGAGAAGGAAGAGCAGCACC
Ssc_TR19533/c0_g1_i2	Proteína Deidrina	TGCAACTTCAACAATGGCGG	TGGCCATGCTCGTCAGTTAG

Fonte: Autor.

Os pares de *primers* para os genes de interesse (Tabela 1), assim como os genes de referência (Ubiquitina e da β -tubulina) (FERREIRA NETO; De ARAÚJO et al., 2022; *In press*), foram desenhados utilizando software *online* Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) seguindo os padrões estabelecidos em AMORIN et al., (2018), sendo: temperatura de anelamento de 57–63°C (ideal 60°C), tamanho entre 18-22 pb (ideal 20 pb), conteúdo de GC (45–55%, ideal 50%) e tamanho do amplicon de 100–200 pb. A eficiência de amplificação dos *primers* foi estabelecida a partir de uma curva padrão de 5 pontos, gerada por diluições seriadas do cDNA (10X cada) em triplicata técnica. As reações de qPCR foram realizadas com três réplicas biológicas e três réplicas técnicas, no equipamento LineGene 9660 (Bioer), utilizando o SYBR Green como método de detecção.

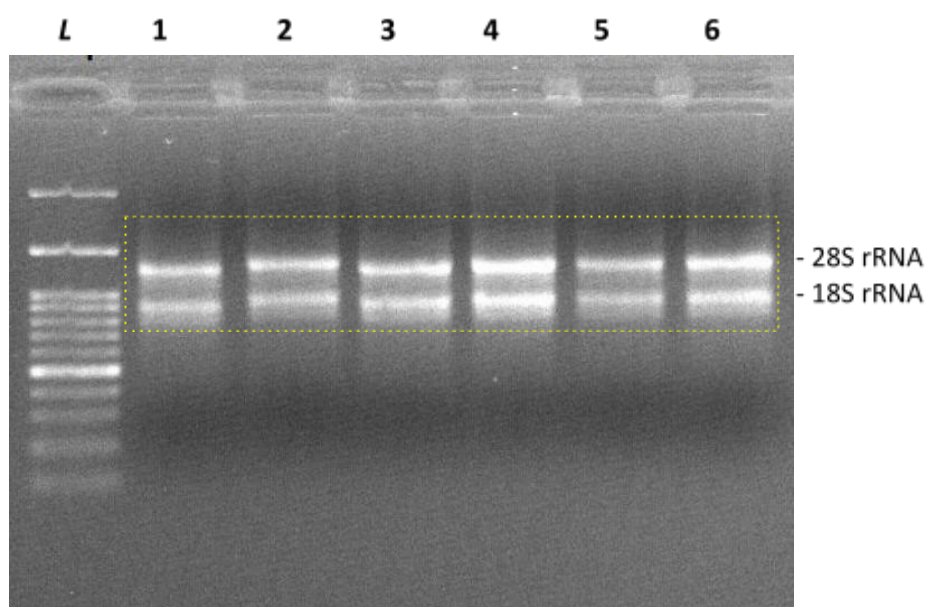
As reações foram preparadas em uma solução contendo: 1 μ L de cDNA (diluído 10X), 5 μ L 'HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix 2x' (USB), 0,05 μ L de ROX, 1 μ L de cada *primer* (500 nM) e água ultrapura para um volume final de 10 μ L. O programa foi ajustado para 95°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 15 segundos. Os dados de expressão relativa dos GI foram submetidos a comparações pareadas usando técnicas de randomização e *bootstrapping* (Teste de Randomização de Realocação Pareada Fixa) com nível de significância de 5 %, utilizando o software Rest 2009 (PFAFFL et al., 2002).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO E QUALIDADE DAS AMOSTRAS (RNA E cDNA)

As amostras de RNA das raízes de *S. scabra* apresentaram excelente qualidade, como mostrado na Figura 6, onde as duas bandas de RNA ribossomal mostram-se integras após a eletroforese em gel de agarose (1,5%) (Figura 6, amostras 1-6).

FIGURA 6. Eletroforese em gel de agarose (1,5%) de amostras de RNA total extraído de raízes de *S. scabra* (1-3: plantas controle e 4-6: plantas tratadas).



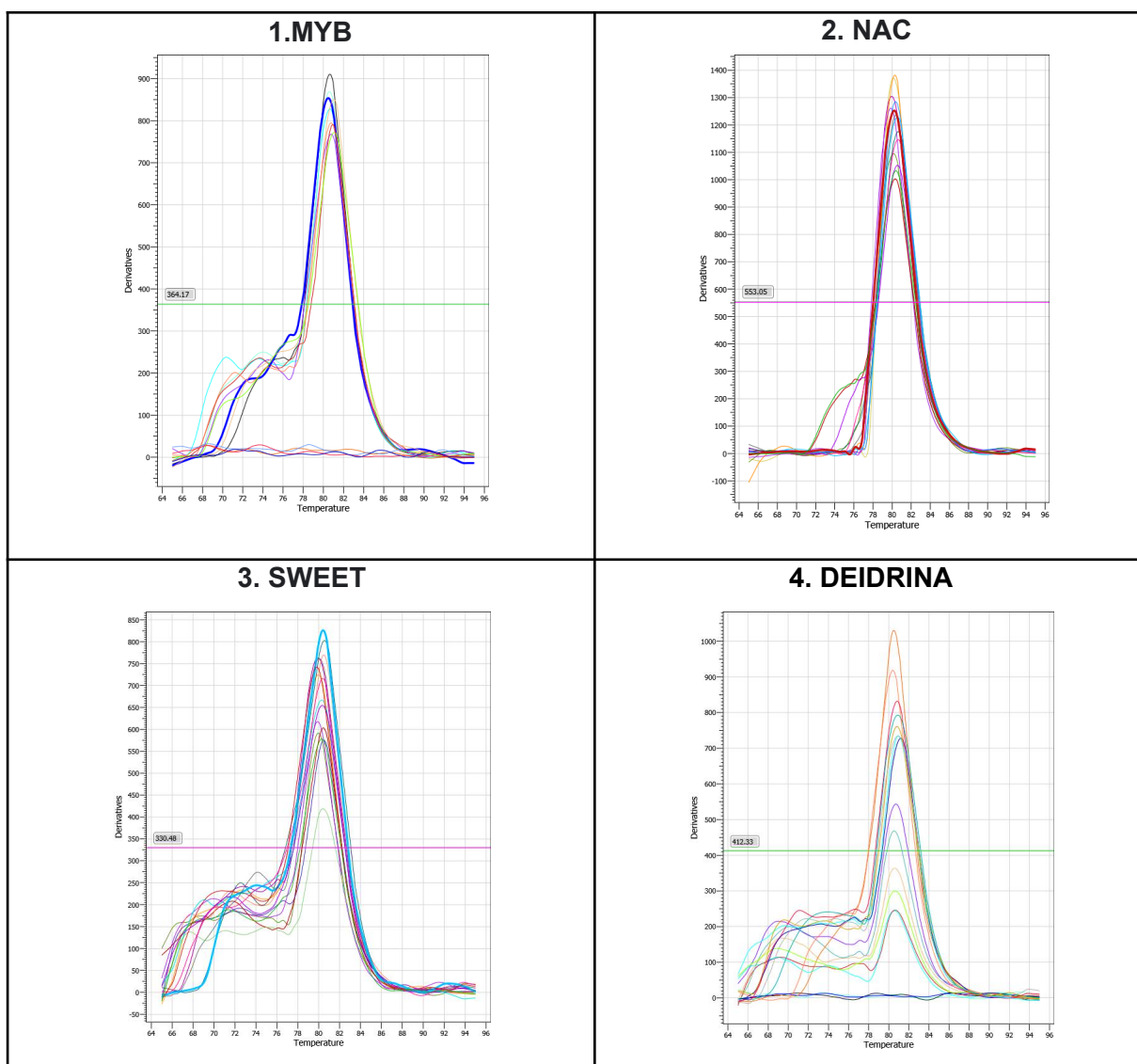
L: *Ladder* (marcador molecular de 100 pb; 1-6: Amostras de RNA total extraídas de *S. scabra* (Fonte: Autor)

A etapa de extração de RNA total é fundamental para se ter uma ampla amostragem dos transcritos expressos nos tratamentos avaliados. Uma questão crítica muitas vezes subestimada nas análises de expressão gênica é a qualidade das amostras de RNA. Assim, o monitoramento da qualidade do RNA é fundamental importância tanto para a obtenção de dados de expressão gênica significativos e confiáveis, como para garantir a reprodutibilidade dos resultados (VERMEULEN et al., 2011).

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Plantas de *S. scabra* após 24 horas de estresse por deficiência hídrica (DH) e sem imposição do estresse (irrigação normal) foram avaliadas (tecido radicular) com relação a expressão de quatro genes de interesse, sendo dois codificantes de fatores de transcrição (MYB e NAC) e dois codificadores de proteínas funcionais (SWEET e DEIDRINA) através da técnica de qPCR. A eficiência de amplificação variou de 93-101,0%, ou seja, dentro dos padrões aceitáveis (*dados não mostrados*). A especificidade dos *primers* também foi confirmada pela presença de um único pico nas curvas de *melting* (Figura 7).

Figura 7. Análise da curva de *melting* (*melting curve*) da especificidade dos *primers* na amplificação dos genes: 1. MYB; 2. NAC; 3. SWEET e 4. DEIDRINA em raiz de *Stylosanthes scabra* frente ao estresse por deficiência hídrica.



MYB em plantas pertence a subfamília R2R3 (BALBONI et al., 2015), as quais estão envolvidas na resposta a diferentes estresses ambientais (LI et al., 2019). A superexpressão de *GaMYB85* aumentou a tolerância de *A. thaliana* transgênica quando submetida déficit hídrico quando comparada às plantas não transformadas (BUTT et al., 2017).

A família de fatores de transcrição NAC também revelou uma indução (2.4X) na validação por qPCR (Figura 8). Essa família de FTs tem sido relacionada a várias vias de sinalização de estresse abiótico (YU et al., 2016). SHIM et al. (2018) e YUAN et al. (2019) em trabalhos com arroz transgênico superexpressando de diferentes membros, *OsNAC14* e *ONACo66*, respectivamente, pertencentes a família de FTs NAC, aumentaram a tolerância perante déficit hídrico.

O açúcar é uma fonte considerável de carbono e de metabolismo energético fundamental para o crescimento e desenvolvimento das plantas, além de desempenhar funções na regulação das respostas às condições ambientais adversas (JI et al., 2022). Em plantas o transporte do açúcar é mediado por transportadores, incluindo as proteínas *SWEETs* (*Sugars Will Eventually be Exported Transporters*). Essas proteínas atuam como uniporteres presentes na membrana plasmática das células vegetais, sendo os principais determinantes do influxo/efluxo de vários açúcares e seus metabólitos intermediários necessários para o crescimento e desenvolvimento das plantas (CHEN et al., 2012; EOM et al., 2015).

Proteínas *SWEETs* são diferencialmente expressas em vários tecidos vegetais (JI et al 2022). Neste estudo, a expressão do transportador SWEET em raízes de *S. scabra* foi quase duas vezes (1,7; Figura 8) superior quando sob deficiência hídrica. Segundo VALIFARD e colaboradores (2019), as respostas celulares induzidas pela deficiência hídrica na sinalização da frutose foram necessárias para a modulação do sistema radicular e máxima tolerância à seca em *Arabidopsis*. Nesse estudo, o gene *AtSWEET17* de *Arabidopsis* localizado na membrana vacuolar teve uma expressão marcadamente (~200%) em raízes laterais após 36 h sob estresse hídrico (experimento de hidroponia com adição de PEG 8000) (VALIFARD et al., 2019).

Sob déficit hídrico, o acúmulo de açúcares solúveis celulares induz o aumento da expressão desses transportadores, resultando numa reprogramação da sua distribuição entre os vários compartimentos celulares e subcelulares (KAUR et al., 2021). A relação desta proteína com tolerância à restrição hídrica também foi

demonstrada em plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) expressando o gene de maçã *MdSWEET17* (LU et al., 2019). Segundo esse estudo, a expressão heteróloga desse gene em plantas tomate promoveu aumento de tolerância a seca, sugerindo a que a sinalização deste açúcar (frutose) pode estar envolvida na tolerância ao referido estresse.

Outro alvo deste estudo avaliado foi a proteína DEIDRINA (*dehydrin*), a qual apresentou maior expressão (10x maior) em *S. scabra* em resposta à deficiência hídrica (Figura 8). As deidrinas pertencem a um grupo de proteínas da família LEA (*late embryogenesis abundant*; proteínas; Abundantes da Embriogênese Tardia) (ALLAGULOVA et al., 2003). Deidrinas (DHN) constituem principalmente uma família de proteínas induzidas como resposta a várias condições de estresse abiótico, incluindo baixa temperatura, seca e alta salinidade (SUN et al 2021; SHARMA, 2022). Além de atuar nas respostas ao estresse, essas proteínas exercem um papel fundamental no crescimento das plantas sob condições normais (RORAT, 2006). GUO et al. mostraram que a DEIDRINA (DHN3) foi diferencialmente expressa em dois genótipos de cevada tolerantes à seca sob estresse hídrico (GUO et al., 2009). Em plantas transgênicas de tabaco (*Nicotiana benthamiana*) super expressando DEIDRINAS houve um menor acúmulo do radical superóxido (O_2^-) sob estresse oxidativo (LIU et al., 2017).

Contudo, vários estudos visam reconhecer os principais reguladores dos processos moleculares e bioquímicos associados à resposta de tolerância ao déficit hídrico. Muitos potenciais candidatos são agora considerados alvos promissores, incluindo os fatores de transcrição e outros genes relacionados à tolerância podem ser direcionados ao melhoramento de diversas culturas. Desta forma, compreender o papel e a regulação desses candidatos tem sido considerada uma tarefa fundamental na obtenção de cultura cada vez mais adaptados às constantes mudanças ambientais.

6 CONCLUSÃO

As análises de expressão dos genes candidatos através da metodologia por qPCR revelaram aumento de expressão de *S. scabra* em condições de déficit hídrico, ao expressar positivamente proteínas funcionais (proteína SWEET e DEIDRINA), e proteínas regulatórias (fatores de transcrição NAC e MYB - relacionado). Os dados de expressão observados nesse estudo confirmam os obtidos para a mesma espécie/estresse em experimento com RNA-Seq e, portanto, valida os dados de expressão dos quatro genes alvos.

7. REFERÊNCIAS

- ÁBRAHÁM, E.; RIGÓ, G.; SZÉKELY, G.; NAGY, R.; KONCZ, C.; SZABADOS, L. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. *Planta Molecular Biology* 51: 363-372, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12602867/>. Acesso em: 19 de Jul. de 2022.
- ADESIFAN, E. Climate change impact on rainfall and temperature distributions over West Africa from three IPCC scenarios. *Journal of Earth Science & Climate Change* (2018). Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/326298544>. Acesso em: 04 de Set. de 2022.
- AHMAD, P.; AZOOZ, M.M.; PRASAD, M.N.V. Recent Advances of Metabolomics to Reveal Plant Response During Salt Stress. In: AHMAD, P. *Salt Stress in Plants*. Nova York: Springer Nova York; 2013. 920–9 p. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4614-6108-1>. Acesso em: 27 de Mai. de 2022.
- ALEMU, K. Real-time PCR and its application in plants disease diagnostics. *Advances in Life Science and Technology*, Vol.27, 2014. Disponível em: <https://core.ac.uk/download/pdf/234687067.pdf>. Acesso em: 07 de Ago. de 2022.
- ALLAGULOVA, C. R.; GIMALOV, F. R.; SHAKIROVA, F. M.; VAKHITOV, V. A. The Plant Dehydrins: Structure and Putative Functions. *Biochemistry (Moscow)*, Vol. 68, No. 9, 2003, pp. 945-951. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14606934/>. Acesso em: 24 de Ago. de 2022.
- ALMEIDA, M.C.R.; LEITE, M.L.M.V.; SÁ JÚNIOR, E.H.; CRUZ, M.G.; MOURA, G.A.; MOURA, E.A.; SÁ, G.A.S.; LUCENA, L.R.R. Crescimento vegetativo de cultivares de milho sob diferentes disponibilidades hídricas. *Magistra, Cruz das Almas – BA*, V. 29, N.2 p.161-171, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/327118305>. Acesso em: 05 de Jan. de 2022.
- AMARAL, C.L.; SANTOS, J.I.; PORTUGAL, C.R.S.; BRAGA, A.F.; ALVES, P.L.C.A. Crescimento de Plântulas de mudas de *Vernonia ferruginea* submetidas a estresse térmico. *Planta Daninha* 2020; v 38: e020188700. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pd/a/n3PpwpP49mcMCpxXRtpB5Kb/?format=pdf&lang=en>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.
- AMORIM, LLB, FERREIRA-NETO, JRC, BEZERRA-NETO, JP, PANDOLFI, V., DE ARAUJO, FT, DA SILVA MATOS, MK, et al. Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. *Plant Methods* 14, 88, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0354-z> . Acesso em: 20 set de 2022.
- ANDRADE, C.M.S.; ASSIS, G.M.L.; SALES, M.F.L. Estilosantes Campo Grande: leguminosa forrageira recomendada para solos arenosos do Acre. *Circular Técnica*, 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/879062>. Acesso em: 01 de Ago. de 2022.
- ARAÚJO JÚNIOR, G.N.; GOMES, F.T.; SILVA, M.J.; JARDIM, M.F.R.; SIMÕES, V.J.L.P.; IZIDRO, J.P.P.; LEITE, M.L.M.V.; TEXEIRA, V.I.; SILVA, T.G.F. Estresse

hídrico em plantas forrageiras: Uma revisão. Pubvet. v.13 No. 01 p. 148 (2019). Disponível em: <https://www.pubvet.com.br/artigo/5408/>. Acesso em: 08 de Nov. de 2021.

ARAÚJO, F.C. Expressão diferencial e respostas fisiológicas de *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/39525>. Acesso em: 30 de Jun. de 2022.

ASHRAF, M.; HARRIS, P.J.C. Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica* 51, 163-190, 2013. Disponível em: <https://ps.ueb.cas.cz/artkey/phs-201302-0002>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

BALDONI, E.; GENGA, A.; CAMINELLI, E. Plant MYB Transcription Factors: Their Role in Drought Response Mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26184177/>. Acesso em: 18 de Ago. de 2022.

BFG, BRAZIL FLORA GROUP. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. *Rodriguésia*: 1085-1113. 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/s8qy5ZLWZcyFxx9WGsh34PK/abstract/?lang=en>. Acesso em: 29 de Jul. de 2022.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* (2000) 25, 169–193. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11013345/>. Acesso em: 03 de Ago. de 2022.

BUSTIN, S.A. BENES, V. NOLAN, T.; PFAFFL, M.W. Quantitative real-time RT-PCR. *Journal of Molecular Endocrinology* (2005) 34, 597–601. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15956331/>. Acesso em: 02 de Ago. de 2022.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.; HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.; WITTEW, C.T. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 611–622 (2009). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19246619/>. Acesso em: 02 de Ago. de 2022.

BUTT, H.I.; YANG, Z.; ERYONG, C.; WANG, X.; ZHAO, G.; GE, X.; ZHANG, X.; LI, F. GaMYB85, an R2R3 MYB gene, in transgenic *Arabidopsis* plays an important role in drought tolerance. *BMC Plant Biology*, 2017. Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-017-1078-3>. Acesso em: 20 de Jul. de 2022.

CARVALHO, M.H.C. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior*, 156-165, 2008. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2634109/>. Acesso em: 16 de Jul. de 2022.

CHAKRABORTY, S. High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems. Australian Center for International Agricultural Research. 2004. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043151610>. Acesso em: 25 de Jul. de 2022.

CHANDRA, A.; BHATT, R.K. Carbon isotope discrimination function analysis and drought tolerance of stylo species grown under rain-fed environment. *Acta Physiol*

Plant. 63-69, 2007. Disponível em:

<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.agro-37cf3a35-ebed-45e8-b79b-11079d2b9ea0>. Acesso em: 31 de Jul. de 2022.

CHEN, L.; QU, X.; HOU, B.; SOSSO, D.; OSORIO, S.; FERNIE, A. R.; FROMMER, W. B. Sucrose Efflux Mediated by SWEET Proteins as a Key Step for Phloem Transport. *Science*, Vol. 335, Ed. 6065, p. 207 - 211, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22157085/>. Acesso em: 22 de Ago. de 2022.

CHEN, T.; Li, G.; ISLAM, M.R.; FU, W.; FENG, B.; TAO, L.; FU, G. (2019) Absciscic acid synergizes with sucrose to enhance grain yield and quality of rice by improving the source-sink relationship. *BMC Plant Biol* 19: 525. Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-019-2126-y>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

CHEN, X.; WANG, P.; GU, M.; LIN, X.; HOU, B.; ZHENG, Y.; SUN, Y.; JIN, S.; YE, N. R2R3-MYB transcription factor family in tea plant (*Camellia sinensis*): Genome-wide characterization, phylogeny, chromosome location, structure and expression patterns. *Genomics*, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33819564/>. Acesso em: 10 de Out. de 2022.

COSTA, L. C.; VALLS, J. F. M. *Stylosanthes* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível 2015 em: <http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/FB83746>. Acesso em: 30 de Jul. de 2022.

COSTA, L.C.; SARTORI, A.L.B.; POTT, A. Estudo Taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae - Papilionoideae - Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rodriguésia*: 547-572. 2008. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rod/a/jxVkv4bTPGPqbvQKzww8jp/?lang=pt>. Acesso em: 10 de Abr. de 2021.

CRAMER, G.R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K.; Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 2011. 11;163. Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2229-11-163>. Acesso em: 31 de Mai. de 2021.

DAS, K.; ROYCHOUDHURY, A. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Environmental Science*. 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00053/full>. Acesso em: 13 de Jul. de 2022.

DIETZ, K.J.; ZORB, C.; GEILFUS, C.M. Drought and crop yield. 2021. *Plant Biology* / Volume 23, Edição 6/ pág.881-893. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/plb.13304>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

DUBOS, C.; STRACKE, R.; GROTEWOLD, E.; WEISSHAAR, B.; MARTIN, C.; LEPINIEC, L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science*, 2010, Vol. 15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20674465/>. Acesso em: 20 de Ago. de 2022.

EOM, J.; CHEN, L.; SOSSO, D.; JULIUS, B. T.; LIN, I.W.; QU, X.; BRAUN, D. M.; FROMMER, W. B. SWEETs, transporters for intracellular and intercellular sugar

translocation. *Plant Biology*, 2015. Disponível em:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25988582/>. Acesso em: 23 de Ago. de 2022.

FANG, Z.; ZHANG, X.; GAO, J.; WANG, P.; XU, X.; LIU, Z.; SHEN, S.; FENG, B. A Buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) DRE-Binding Transcription Factor Gene, *FeDREB1*, Enhances Freezing and Drought Tolerance of Transgenic *Arabidopsis*.

Plant Molecular Biology Reporter 33, 1510-1525 (2015). Disponível em:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s11105-015-0851-4>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanics of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*.

(2015). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25336153/>. Acesso em: 04 de Jul. de 2022.

FANG, Q.; WANG, X.; WANG, H.; TANG, X.; LIU, C.; YIN, H.; YE, S.; JIANG, Y.;

DUAN, Y.; LUO, K. The polar R2R3 MYB transcription factor PtrMYB94 coordinates with abscisic acid signaling to improve drought tolerance in plants. *Tree Physiology* 40, 46-59, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31728530/>. Acesso em: 20 de Ago. de 2022.

FAO. 2021. *Situação Mundial da Terra e dos Recursos Hídricos para Alimentação e Agricultura – Sistemas em ponto de ruptura. Relatório de síntese 2021*. Roma.

Disponível em: <https://www.fao.org/documents/card/en/c/cb4474en>. Acesso em: 06 de Jun. de 2022.

FARIAS, J.B.B.; NEPOMUCENO, A.L.; NEUMAIER, N. *Ecofisiologia da soja*.

Londrina: Embrapa CNPSO, 2007. 9p. (Circular Técnica, N° 48). Disponível em:

<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/470308>. Acesso em: 05 de Jul. de 2022.

FERRARI, E.; PAZ, A.; SILVA, A. C. Déficit hídrico no metabolismo da soja em semeaduras antecipadas no Mato Grosso. *Nativa*, Sinop, v. 03, n. 01, p. 67-77, 2015.

Disponível em:

<https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/nativa/article/view/1855>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

FERREIRA-NETO, J.R.C.; ARAUJO, F.C.; SILVA, R.L.O.; MELO, N.F.; PANDOLFI, V.; FROSI, G.; MORAIS, D.A.L.; DA SILVA, M.D.; RIVAS, R.; SANTOS, M.G.; AIDAR, S.T.; MORGANTE, C.V.; BENKO-ISEPPON, A.M. Dehydration response in *Stylosanthes scabra*: physiological and transcriptional modulation. *Planta* (In press)

FINKELSTEIN, R. Absciscic acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book*, 2013. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3833200/>.

Acesso em: 19 de Jul. de 2022.

FITZGERALD, T.L.; MCQUALTER, R.B. (2014). The quantitative real-time polymerase chain reaction for the analysis of plant gene expression. *In*: Henry, R., Furtado, A. (eds) *Cereal Genomics, Methods in Molecular Biology*, vol. 1099.

Humana Press. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24243198/>. Acesso em: 07 de Ago. de 2022.

FLORA DO BRASIL. Fabaceae. Disponível em:

<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC>. Acesso em: 28 de Jul. 2022.

FOYER, C.H.; NOCTOR, G. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*, Vol. 17, 2005, p. 1866-1875. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15987996/>. Acesso em: 17 de Jul. de 2022.

GUO, P. G., BAUM, M., GRANDO, S., CECCARELLI, S., BAI, G. H., LI, R. H., et al. (2009). Differentially expressed genes between drought-tolerant and drought-sensitive barley genotypes in response to drought stress during the reproductive stage. *J. Exp. Bot.* 60, 3531–3544. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/60/12/3531/520856>. Acesso em: 26 de Set. de 2022.

GRAETHER, S. P.; BODDINGTON, K. F. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci*, 2014. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2014.00576/full>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

HARTER, L.S.H.; HARTER, F. S.; DEUNER, C.; MENEGHELLO, G. E.; VILLELA, F. A. 2014. Salinidade e desempenho fisiológico de sementes e plântulas de morango. *Horticultura Brasileira* 32: 80-85. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/hb/a/8n6VQPBqx4SRzyn6JqQKzFx/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 03 de Jun. de 2021.

HEID, C.A.; STEVENS, J.; LIVAK, K.J.; WILLIAMS, P.M. Real Time Quantitative PCR. *Genome Research*, 1996. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8908518/>. Acesso em: 06 de Ago. de 2022.

HUI, L.; DELMONTE, T.; RANADE, K. Genotyping Using the TaqMan. *Current Protocols in Human Genetics* 2.10.1-2.10.8, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18428424/>. Acesso em: 07 de Ago. de 2022.

HUSSAIN, S.; HUSSAIN, S.; QADIR, T.; KHALIQ, A.; ASHRAF, U.; PARVEEN, A. Drought stress in plants: An overview on implications, tolerance mechanisms and agronomic mitigation strategies. *Plant Science Today* (2019). Disponível em: <https://horizonpublishing.com/journals/index.php/PST/article/view/578>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

JACINTO, S.G.; MORAES, J.G.L.; SILVA, F.D.B.; SILVA, B.N.; SOUZA, G.G.; OLIVEIRA, L.L.B.; MESQUITA, R.O. Respostas fisiológicas de genótipos de fava (*Phaseolus lunatus* L.) submetidas ao estresse hídrico cultivadas no Estado do Ceará. *Revista Brasileira de Meteorologia*. 2019, v. 34, n. 3, pp. 413-422. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbmet/a/T4JCyxmWLvthzkc8MkRnX6L/?lang=pt&format=pdf>. Acesso em: 19 de Jan. de 2021.

JIANG, L.; SONG, C.; ZHU, X.; YANG, J. SWEET Transporters and the Potential Functions of These Sequences in Tea (*Camellia sinensis*). *Front. Genet.* 2021. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.655843/full>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

JI, J.; YANG, L.; FANG, Z.; ZHANG, Y.; ZHUANG, M.; LV, H.; WANG, Y. Plant SWEET Family of Sugar Transporters: Structure, Evolution and Biological Functions. *Biomolecules* 2022, 12, 205. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/2/205>. Acesso em: 22 de Ago. de 2022.

KAUR, H; MANNA, M.; THAKUR, T.; GAUTAM, V.; SALVI, P. Imperative role of sugar signaling and transport during drought stress responses in plants. *Physiol Plant*. 2021 171(4):833-848. doi: 10.1111/ppl.13364.

KIRKBRIDE, J.H.; KIRKBRIDE, M.C.G. Typification of *Stylosanthes* (Leguminosae) and its sections. *Taxon*, 1985. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2307/1221449>. Acesso em: 30 de Jul. de 2022.

KRASENSKY, J.; JONAK, C. Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 63, Ed. 4, 2012, p. 1593-1608. Disponível em: <https://academic.oup.com/jxb/article/63/4/1593/448768>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

LARCHER, W. *Ecofisiologia Vegetal*. São Carlos: RiMa, 2006. Acesso em: 19 de Jul. de 2022.

LI, J.; HAN, G.; SUN, C.; SUI, N. Research advances of MYB transcription factors in plant stress resistance and breeding. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, Vol. 14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31084451/>. Acesso em: 18 de Ago. de 2022.

LIU, Y.; WANG, L.; ZHANG, T.; YANG, X.; LI, D. Functional characterization of KS-type dehydrin ZmDHN13 and its related conserved domains under oxidative stress. *Sci Rep* (2017). Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-07852-y>. Acesso em: 24 de Ago. de 2022.

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. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/313900548>. Acesso em: 28 de Jul. de 2022.

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. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.12705/622.8>. Acesso em: 03 de Ago. de 2022.

LU, J.; SUN, M.; MA, Q.; KANG, H.; LIU, Y.; YOU, C. MdSWEET17, a sugar transporter in apple, enhances drought tolerance in tomato. *Journal of Integrative Agriculture* 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S209531191962695X>. Acesso em: 22 de Ago. de 2022.

MAGALHÃES JUNIOR, A.M.; OLIVEIRA, A.C.; SILVEIRA, C.F.; BRAGA, E.J.B.; FONSECA, G.M.; BENITEZ, L.C.; MAIA, L.C.; LUZ, V.K. Ácido abscísico e o estresse abiótico. Embrapa Clima Temperado, 2010. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/884372/acido-abscisico-e-o-estresse-abiotico>. Acesso em: 21 de Jul. de 2022.

MANAA, M.; THAKUR, T.; CHIROM, O.; MANDLIK, R.; DESHMUKH, R.; SALVI, P. Transcription factors as key molecular target to strengthen the drought stress tolerance in plants. *Physiologia Plantarum*, 2021. Disponível em:

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppl.13268>. Acesso em: 22 de Jul. de 2022.

MARQUES, A.; MORAES, L.; SANTOS, M.A.; COSTA, I.; COSTA, L.; NUNES, T.; MELO, N.; SIMOM, M.F.; LEITCH, A.R.; ALMEIDA, C.; SOUZA, G. Origin and parental genome characteristics of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. *Annals of Botany*: 1143-1159, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29982475/>. Acesso em: 04 de Ago. de 2022.

MARTINS, P.K.; MAFRA, V.; SOUZA, W.R.; RIBEIRO, A.P.; VINECKY, F.; BASSO, M.F.; CUNHA, B.A.D.B.; KOBAYASHI, A.K.; MOLINARI, H.B.C. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. *Scientific Reports* 6, 28348, 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep28348>. Acesso em: 07 de Set. de 2022.

MELO, N.F.; LIRA, I.C.S.A.; NASCIMENTO, M.P.S.B. *Stylosanthes scabra*: Trifólio. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed). *Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: região Nordeste*. Brasília, DF: MMA, 2018. p. 631-638. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1104791/stylosanthes-scabra-trifolio>. Acesso em: 28 de Mar. de 2021.

MITTLER, R. Ros are good. *Trends of Plant Science*. Vol. 22, Ed. 1, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27666517/>. Acesso em: 16 de Jul. de 2022.

NAGAICH, D.; TIWARI, K. K.; SRIVASTVA, N.; CHANDRA, A. Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. *Acta Physiologiae Plantarum* v. 35, 3127 - 3136. (2013). Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11738-013-1345-3>. Acesso em: 05 de Set. de 2022.

PATHAK, P.S.; RAMESH, C.R.; BHATT, R.K. *Stylosanthes* in the reclamation and development of degraded soils in India. In *High-Yielding Anthracnose Resistant Stylosanthes for Agricultural Systems*; Chakraborty, S., Ed.; Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR): Canberra, Austrália, 2004; pp. 85–96. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20043151610>. Acesso em: 25 de Jul. de 2022.

PEDROTTI, A.; CHAGAS, R.M.; RAMOS, V.C.; PRATA, A.P.N.; LUCAS, A.A.T.; SANTOS, P.B. Causes and consequences of the process of soil salinization. *Revista Eletronica em Gestão, Educação, Tecnologia Ambiental*. Santa Maria, v. 19, n.2, msi-ago. 2015, p.1308-1324. Disponível em: <https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/16544>. Acesso em: 26 de Mai. de 2022.

PFÄFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30:e36. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>

RABBANI, M.A.; MARUYAMA, K.; ABR H.; KHAN, M.A.; KATSURA, K.; ITO, Y.; YOSHIWARA, K.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI. Monitoring expression profiles of rice genes under cold, drought, and high-salinity stresses and abscisic acid application using cDNA microarray and RNA Gel-blot analyses. *Plant*

Physiology, r 2003, Vol. 133, pp. 1755–1767. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14645724/>. Acesso em: 20 de Jul. de 2022.

RAI, A.C.; RAI, K. Drought stress and its mitigation and management strategies in crop plants. Springer Nature, Switzerland AG. Capítulo 6, 2020. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/342151768>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

RORAT, T. Plant Dehydrins - Tissue Location, Structure and Function. Cellular & Molecular Biology Letters, Vol. 11, (2006) pp 536 - 556. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16983453/>. Acesso em: 24 de Ago. de 2022.

ROSADO, C.C.G.; SOBREIRA, F.B.S.; SILVA, F.D.; SOUZA, L.C.; SOARES, T.C.B. Genes Candidatos e Mecanismos Fisiológicos Relacionados ao Estresse Hídrico em Plantas. MIRANDA, F.D.; FERREIRA, M.F.S.; CAVATTE, P.C.; SOARES, T.C.B. Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento II. Alegre: CAUFES, 2018. p. 115-143. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Pedro-Santos-13/publication/327695694>. Acesso em: 18 de Jul. 2022.

SANTOS-GARCIA, M.O.; RESENDE, R.M.S.; CHIARI, L.; ZUCCHI, M.I.; SOUZA, A.P. Mating systems in tropical forages: *Stylosanthes capitata* Vog. *Stylosanthes guianensis* (Aubl.) Sw. Euphytica, 185-193, 2011). Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201301943594>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

SHAHZAD, A.; ULLAH, S.; DAR, A. A.; SARDAR, M. F.; MEHMOOD, T. Nexus on climate change: agriculture and possible solution to cope future climate change stresses. Environmental Science and Pollution Research , 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33515149/>. Acesso em: 04 de Set. de 2022.

SHARMA, G. S. (2022). Structural and Functional Role of Plant Dehydrins in Enhancing Stress Tolerance. In Plant Stress: Challenges and Management in the New Decade (pp. 111-121). Springer, Cham.

SHIM, J.S.; OH, N.; CHUNG, P. J.; KIM, Y. S.; CHOI, Y. D.; KIM, J. K. Overexpression of OsNAC14 Improves Drought Tolerance in Rice. Frontiers in Plant Science, 2018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00310/full>. Acesso em: 21 de Ago. de 2022.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Plant Biology, 2000. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369526600800680>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stresses. Plant Biology. Vol. 57:781-803, 2006. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105444>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. Journal Experimental Botany, Vol. 58 , No. 2, pp.

221-227, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17075077/>. Acesso em: 20 de Jul. de 2022.

SILVA, J.; SACCINI, V.P.V.; SANTOS, D.M.M. Temperature stress in accumulation of free proline of pigeonpea seedlings from seeds treated with polyamines. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 36, n. 1, p. 103-122, jan./fev. 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/129158?show=full>. Acesso em: 28 de Mai. de 2022.

SINICROPI, D.; CRONIN, M.; LIU, M.L. Gene Expression Profiling Utilizing Microarray Technology and RT-PCR. R. 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. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-0-387-25843-0_2. Acesso em: 03 de Ago. de 2022.

SOUZA, N. S.; CONCEIÇÃO, H. E. O.; SILVA, M. K. F.; OLIVEIRA, L. J. S.; MAIA, W. J. M. S.; FILHO, M. S. Crescimento e desenvolvimento de plantas jovens de ipê - amarelo submetidas a diferentes regimes hídricos. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada* v.12, nº.7, p. 3108 – 3117, 2018. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/331596565>. Acesso em: 23 de Jan. de 2021.

SUN, Z., LI, S., CHEN, W., ZHANG, J., ZHANG, L., SUN, W., & WANG, Z. (2021). Plant Dehydrins: Expression, Regulatory Networks, and Protective Roles in Plants Challenged by Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23), 12619. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8657568/>. Acesso em: 26 de Set. de 2022.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I.M.; MURPHY, A. *Fisiologia do Desenvolvimento Vegetal*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p. 731-760, 2017. Acesso em: 06 de Jun. de 2022.

TAJTI, J.; PÁL, M.; JANDA, T. Validation of Reference Genes for Studying Different Abiotic Stresses in Oat (*Avena sativa* L.) by RT-qPCR. *Plants*, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34206660/>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

TANG, X.; ZHANG, N.; SI, H.; CALDERÓN-URREA, A. Selection and validation of reference genes for RT-qPCR analysis in potato under abiotic stress. *Plant Methods* (2017). Disponível em: <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13007-017-0238-7>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

TENG, K.; LI, J.; LIU, L.; HAN, Y.; DU, Y.; ZHANG, J.; SUN, H.; ZHAO, Q. Exogenous ABA induces drought tolerance in upland rice: the role of chloroplast and ABA biosynthesis-related gene expression on photosystem II PEG stress. *Acta Physiol Plant* (2014) 36:2219-2227. Disponível em: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201500018839>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

TIETZ, D.; TIETZ, A. *Streß em Pflanzenreich. Biologie*, v. 12, ed. 4, p. 113-119, 1982. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biuz.19820120406>. Acesso em: 19 de Jul. de 2022.

TROPICAL FORAGES. *Stylosanthes scabra*. Disponível em: https://www.tropicalforages.info/text/entities/stylosanthes_scabra.htmzoom_highlight=Stylosanthes+scabra+Vogel Acesso em: 30 de Jul. de 2022.

ULLAH, A.; SUN, H.; YANG, X.; ZHANG, X. Drought coping strategies in cotton: increased crop per drop. *Plant Biotechnology Journal* (2017) 15, pp. 271-284. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pbi.12688>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ* 29: 151–159, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16109794/>. Acesso em: 07 de Set. de 2022.

VALIFARD, M, HIR, R.L.; MÜLLER, J.; SCHEURING, D; NEUHAUS, H.E; POMMERENIG, B. Vacuolar fructose transporter SWEET17 is critical for root development and drought tolerance. *Plant Physiol.* 2021;187(4):2716–30. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab436>. Acesso em: 24 de Set de 2022.

VANDESOMPELE J.; PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; ROY, N.V.; PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 2002. Disponível em: <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>. Acesso em: 05 de Ago. de 2022.

VANHAUWAERT, S.; PEER, G.V.; RIHANI, A.; JANSSENS, E.; RONDOU, P.; LEFEVER, S.; PAEPE, A.; COUCKE, P.J.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J.; WILLAERT, A. Expressed Repeat Element Improve RT-qPCR Normalization across a Wide Range of Zebrafish Gene Expression Studies. *PLOS ONE*, v. 9, n. 10, p. e109091, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4195698/>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

VERMEULEN, J.; PRETER, K.D.; LEFEVER, S.; NUYTENS, J.; VLOED, F.; DERVEAUX, S.; HELLEMANS, J.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. Measurable impact of RNA quality on gene expression results from quantitative PCR, *Nucleic Acids Research*, V.39, 9,1, p.e63, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr065>. Acesso em: 05 de Jul. de 2022.

VILALTA, J.M.; FORNER, N.G. Water potencial regulation, stomatal behavior and hydraulic transport under drought: deconstructing the iso/anisohydric concept. *Plant, Cell and Environment* (2017) 40, 962-976. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pce.12846>. Acesso em: 05 de Jul. de 2022.

YAHARA, T.; JAVADI, F.; ONODA, Y. QUEIROZ, L.P.; FAITH, D.P.; PRADO, D.E.; AKASAKA, M.; KADOYA, T.; ISHIHAMA, F.; DAVIES, S. et al. (2013) Global legume diversity assessment: Concepts, key indicators and strategies. *Taxon* 249-266. Disponível em: <https://kyushu-u.pure.elsevier.com/en/publications/global-legume-diversity-assessment-concepts-key-indicators-and-st>. Acesso em: 27 de Mar. de 2021.

YANG, Y.; HE, M.; ZHU, Z.; LI, S.; XU, Y.; ZHANG, C.; SINGER, S. C.; WANG, Y. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. *BMC Plant Biology*

(2012). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22882870/>. Acesso em: 11 de Out. de 2022.

YOON, S.; LEE, D.K.; YU, I.J.; KIM, Y.S.; CHOI, Y.D.; KIM, J.K. Overexpression of the Oszip66 transcription factor enhances drought tolerance of rice plants. *Plant Biotechnol Rep* (2017) 11:53-62. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11816-017-0430-2>. Acesso em: 25 de Jul. de 2022.

YU, X.; LIU, Y.; WANG, S.; TAO, Y.; WANG, Z.; SHU, Y.; PENG, H.; MIJITI, A.; WANG, Z.; WANG, Z.; ZHANG, H.; MA, H. CarNAC4, a NAC-type chickpea transcription factor conferring enhanced drought and salt stress tolerances in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep*, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26650836/>. Acesso em: 21 de Ago. de 2022.

YUAN, X.; WANG, H.; CAI, J.; BI, Y.; LI, D.; SONG, F.; Rice NAC transcription factor ONAC066 functions as a positive regulator os drought and oxidative stress response. *BMC Plant Biology* (2019). Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-019-1883-y>. Acesso em: 21 de Ago. de 2022.

ZHAO, X.; YANG, X.; PEI, S.; HE, G.; HAN, B.; O fator de transcrição Miscanthus NAC MINAC9 aumenta a tolerância ao estresse abiótico em *Arabidopsis* transgênica. *Gene*

ZHANG, H.; ZHAO, Y.; Zhu, J.K. Thriving under stress: how plants balance growth and the stress response. *Dev Cell*. 2020 Dec 7;55(5):529-543. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33290694/>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

ZHANG, H.; ZHU, J.; GONG, Z.; ZHU, J.K. Abiotic stress responses in plants. *Nat Rev Genet* 23, 104-119 (2022). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34561623/>. Acesso em: 01 de Jun. de 2022.

ZHANG, X.; LONG, Y.; CHEN, X.; ZHANG, B.; XIN, Y.; LI, L.; CAO, S.; LIU, F.; WANG, Z.; WANG, Z.; HUANG, H.; ZHOU, D.; XIA, J. A NAC transcription factor OsNAC3 positively regulates ABA response and salt tolerance in rice. *BMC Plant Biology* (2021). Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-021-03333-7>. Acesso em: 10 de Out. de 2022.

ZHAO, T.; DAI, A (2015). The magnitude and causes of global drought changes in the twenty-first century under a low-moderate emissions scenario. *Journal Of Climate*, 28 , 4490-4512. Disponível em: <https://journals.ametsoc.org/view/journals/clim/28/11/jcli-d-14-00363.1.xml>. Acesso em: 08 de Ago. de 2022.

ZHOU, Y.; LAM, H.M.; ZHANG, J. Inhibition of photosynthesis and energy dissipation induced by water and high light stresses in rice. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 5, pp. 1207-1217, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17283375/>. Acesso em: 09 de Jul. de 2022.

ZHU, J.K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell* 167, 313–324 (2016). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27716505>. Acesso em: 01 de Jun. de 2022.