



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS COM ÊNFASE EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS

ANA BEATRIZ FELIX LEONARDO

**DESIDRINA EM *Stylosanthes scabra* (Vogel) SOB ESTRESSE ABIÓTICO:
ABORDAGEM GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA**

Recife
2025

ANA BEATRIZ FELIX LEONARDO

**DESIDRINA EM *Stylosanthes scabra* (Vogel) SOB ESTRESSE ABIÓTICO:
ABORDAGEM GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado ao Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em Ciências Ambientais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel.

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

Coorientadora: Dr^a Jéssica Barboza da Silva

Recife

2025

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

Leonardo, Ana Beatriz Felix .

DESIDRINA EM *Stylosanthes scabra* (Vogel) SOB ESTRESSE ABIÓTICO:
ABORDAGEM GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA / Ana Beatriz Felix
Leonardo. - Recife, 2025.

60 : il., tab.

Orientador(a): Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientador(a): Jéssica Barboza da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Ciências Biológicas /Ciências
Ambientais - Bacharelado, 2025.

1. Genética. 2. Biotecnologia. 3. Botânica. I. Benko-Iseppon, Ana Maria.
(Orientação). II. Silva, Jéssica Barboza da . (Coorientação). IV. Título.

580 CDD (22.ed.)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me permitido chegar até aqui, por Ele ter me dado força e graça ao longo dessa caminhada.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, Cristina e Samuel, minha avó Angelita e minhas tias Inês e Irani por todo suporte financeiro e emocional, além do apoio e incentivo a não desistir dessa graduação.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon e chefe do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), pela oportunidade de ingressar na equipe do LGBV e por ser sua orientanda.

À minha coorientadora, Jéssica Barboza da Silva, por toda ajuda e paciência, por todo conhecimento passado e construído.

À minha coorientadora não oficial, Agnes, por toda sua disponibilidade para me ajudar.

Aos meus amigos do “Povo do busão”, nas pessoas de Ana Carolina, Michele Raiza, Luiz Euzébio, Inaldo Henrique, Ingrid Coriolano, Karen Milleny, Miguel Gomes e Rikelme Carmo. Que estiveram comigo desde o início da graduação, partilhando de muitos perrengues e alegrias também.

“E o meu Deus, segundo a sua riqueza em glória, há de suprir, em Cristo Jesus, cada uma de vossas necessidades. ”

Filipenses 4.19

RESUMO

As proteínas desidrinas (*DHNs*) pertencem à subfamília LEA e desempenham papel fundamental na adaptação vegetal frente a estresses abióticos, especialmente à seca. Este estudo realizou uma abordagem genômica, transcriptômica e molecular para análise da família *DHN* em *Stylosanthes scabra* (Vogel), espécie forrageira nativa do semiárido brasileiro com notável tolerância hídrica. Foram identificados oito genes *SsDHN* no proteoma predito da espécie, classificados nos subgrupos SKn e YnSKn. As análises incluíram predição estrutural, alinhamento de motivos conservados, localização subcelular, duplicação gênica e pressão seletiva. A duplicação segmentar foi o principal mecanismo responsável pela expansão da família *DHN*, estando os pares *SsDHN1/SsDHN2* e *SsDHN3/SsDHN8* sob seleção purificadora. A investigação de elementos regulatórios apontou fatores de transcrição das famílias ERF, bHLH e bZIP como os mais presentes nos promotores dos *SsDHNs*. Além disso, a avaliação transcricional por RNA-Seq indicou um padrão de expressão constitutivo na maioria dos *SsDHNs*, com exceção de *SsDHN2* e *SsDHN3* que se destacaram como significativamente induzidos após 24 horas de supressão de rega. Esses dados reforçam o papel funcional dos *SsDHNs* na resposta molecular à seca e oferecem suporte para estratégias de melhoramento genético em leguminosas tropicais resilientes a estresses ambientais.

Palavras-chave: déficit hídrico; transcriptoma; regulação gênica; RNA-Seq.

ABSTRACT

Protein dehydrins (*DHNs*) belong to the LEA subfamily and play a fundamental role in plant adaptation to abiotic stresses, especially drought. This study used a genomic, transcriptomic, and molecular approach to analyze the *DHN* family in *Stylosanthes scabra* (Vogel), a forage species native to the Brazilian semiarid region with remarkable water tolerance. Eight *SsDHN* genes were identified in the predicted proteome of the species, classified into the SKn and YnSKn subgroups. The analyses included structural prediction, alignment of conserved motifs, subcellular localization, gene duplication, and selective pressure. Segmental duplication was the main mechanism responsible for the expansion of the *DHN* family, with the *SsDHN1/SsDHN2* and *SsDHN3/SsDHN8* pairs undergoing purifying selection. Investigation of regulatory elements identified transcription factors from the ERF, bHLH, and bZIP families as the most prevalent in *SsDHN* promoters. Furthermore, transcriptional analysis by RNA-Seq indicated a constitutive expression pattern in most *SsDHNs*, with the exception of *SsDHN2* and *SsDHN3*, which were significantly induced after 24 hours of watering suppression. These data reinforce the functional role of *SsDHNs* in the molecular response to drought and support genetic improvement strategies in tropical legumes resilient to environmental stresses.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1– Estratégias morfológicas de adaptação à seca em plantas de 17
Estratégias morfológicas de adaptação à seca em plantas de
diferentes ecossistemas brasileiros. A) Suculência; B) presença de
camadas serosas em folhas; C) desenvolvimento de raízes
profundas; D) dormência vegetal durante a estação seca.
- Figura 2 – Principais grupos de genes envolvidos na resposta de plantas a 19
estresses abióticos como seca.
- Figura 3 – Sequências consenso dos motivos K, Y e S, característicos das 22
proteínas do tipo desidrina, com destaque para a conservação de
resíduos de aminoácidos. As cores indicam a natureza química dos
aminoácidos: verde – apolares alifáticos (A, V, G, M, L, I, P); roxo –
apolares aromáticos (Y, W, F); preto – polares sem carga (S, Q, N,
T); vermelho – polares com carga positiva (R, K, H); azul – polares
com carga negativa (D, E).
- Figura 4 – Matriz dos motivos distintivos nos subgrupos da proteína Desidrina. 23
Cada bloco contém uma representação esquemática do arranjo dos
motivos que distinguem cada subgrupo correspondente da proteína
Desidrina.
- Figura 5 – Características morfológicas do gênero *Stylosanthes*. A maioria das 26
espécies do gênero apresentam inflorescência em espiga, folhas
trifoliadas, flores amarelas e fruto do tipo lomento.
- Figura 6 – Distribuição de *Stylosanthes scabra* entre os estados brasileiros. 27
Cores representam estados separados por região.

ARTIGO

- Figura 1 – Alinhamento de múltiplas sequências de aminoácidos *SsDHN*. As 40
sequências de aminoácidos conservadas são indicadas em caixas
laranjas para o segmento Y; azul para o segmento S; e verde para o
segmento Y.
- Figura 2 – Análise fenética das proteínas *SsDHN* (A), estrutura gênica (B) e 41
motivos conservados (C).

Figura 3 – Análise fenética de proteínas desidrina de *Stylosanthes scabra* (Ss), 44
Arabidopsis thaliana (At), *Vigna unguiculata* (Vu), *Arachis hypogaea*
(Ah), *Oryza sativa* (Os) e *Solanum lycopersicum* (Sl).

Figura 4 – Representação esquemática dos fatores de transcrição dos genes 44
SsDHN de *Stylosanthes scabra*. (A) Proporção das famílias de
fatores de transcrição identificadas. (B) Distribuição dos sítios de
ligação nas regiões promotoras, com cores indicando cada família.

.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Características da cultivar <i>Stylosanthes scabra</i> cv. Seca, desenvolvida a partir de material coletado em Pernambuco e registrada na Austrália em 1977.	29
------------	--	----

ARTIGO

Tabela 1	Características das proteínas <i>DHN</i> em <i>Stylosanthes scabra</i>	39
Tabela 2 –	Análise de duplicação cromossômica de <i>SsDHN</i>	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
ALA	Alanina
AP2/EREBP	<i>Ethylene-responsive-element-binding protein</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BLASTp	<i>Basic Local Alignment Search Tool for Proteins</i>
BR	Brassinosteróide
cDNA	DNA Complementar, <i>Complementary DNA</i>
CDPKs	<i>Calcium-dependent protein kinases</i>
CD-Search	<i>Conserved Domain Search</i>
CSIRO	<i>Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation</i>
DHN	Desidrina
DREB	<i>Dehydration-responsive element binding</i>
EBR	Epibrassinolide
GFF	<i>General Feature Format</i>
Gly	Glicina
kDA	Kilodalton
LDH	Lactato desidrogenase
MEGA	Análises Genéticas da Evolução Molecular, <i>Molecular Evolutionary</i>
mRNA	RNA mensageiro, <i>Messenger RNA</i>
MDH	Malato desidrogenase
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
OsFKBP	Proteínas de ligação à desidrina FK506
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, <i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-Seq	Sequenciamento do RNA; <i>RNA Sequencing</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, <i>Reactive Oxygen Species</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase de transcrição reversa, <i>Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVOS GERAIS	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REFERÊNCIAL TEÓRICO	15
3.1	ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS	15
3.1.1	Seca e déficit hídrico	16
3.1.2	Mecanismos de adaptação das plantas ao déficit hídrico	16
3.1.3	Genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico	18
3.2	LEA (<i>Late Embryogenesis Abundant</i>)	19
3.2.1	Desidrinase: Características gerais	21
3.2.1.1	Proteção celular e estabilização de proteínas	23
3.2.1.2	Regulação no déficit hídrico	24
3.3	<i>Stylosanthes scabra</i>	25
3.3.1	Caracterização Botânica e Taxonomia	25
3.3.2	Importância Agronômica	28
3.3.3	Biotecnologia	29
3.4.1	Transcriptômica e técnicas moleculares	30
3.4.2	Bioinformática	31
4	MANUSCRITO	33
4.1	ARTIGO - ABORDAGEM MULTIÔMICA REVELA O PAPEL DAS DESIDRINAS NA TOLERÂNCIA AO ESTRESSE ABIÓTICO EM <i>Stylosanthes Scabra</i> (VOGEL)	33
5	CONCLUSÕES GERAIS	52
6	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

As plantas estão constantemente expostas a diversos fatores ambientais adversos, como estresses bióticos e abióticos, que afetam seu ciclo de vida e sua produtividade. Dentre esses fatores, estresses abióticos, como temperaturas extremas, déficit hídrico, salinidade e toxicidade por metais pesados destacam-se como os principais responsáveis por limitações no crescimento vegetal e perdas na produção agrícola em escala global (Singh *et al.*, 2024). Para enfrentar tais estresses, as plantas ativam rapidamente mecanismos de defesa que incluem sinais moleculares e a ativação de genes relacionados à produção de proteínas e enzimas protetoras (Benko-Iseppon *et al.*, 2012; Casaretto *et al.*, 2016; Mahajan & Tuteja, 2005). Entre esses genes, destaca-se o que codifica as desidrinas, importantes para a proteção das membranas celulares e a estabilização de proteínas, contribuindo para a maior tolerância ao estresse ambiental.

As proteínas desidrinas (*DHNs*) compõem a classe II da família de proteínas abundantes durante a embriogênese tardia (*LEA — Late Embryogenesis Abundant Proteins*). Essas proteínas são altamente hidrofílicas, com elevado conteúdo de resíduos de alanina (Ala), glicina (Gly) e serina (Ser) (Battaglia *et al.*, 2008). Além disso, apresentam três motivos conservados característicos — os segmentos K, Y e S — a partir dos quais são classificadas em cinco subgrupos estruturais: Kn, SKn, KnS, YnKn e YnSKn (Riyazuddin *et al.*, 2022).

A composição de aminoácidos confere às *DHNs* uma natureza intrinsecamente desordenada, pois, em geral, não apresentam estrutura secundária definida, como alfa-hélices ou folhas beta. Essas proteínas podem adquirir conformações estruturais apenas após interação com ligantes específicos, como lipídios de membrana ou íons metálicos, tornando-se funcionalmente ativas (Szlachtowska & Rurek, 2023).

As *DHNs* já foram identificadas em uma grande diversidade de espécies vegetais, desde plantas avasculares, como os musgos (Saavedra *et al.*, 2006; Ruibal *et al.*, 2012; Agarwal *et al.*, 2017), até plantas vasculares com sementes, incluindo arroz (*Oryza sativa*), cevada (*Hordeum vulgare*) e milho (*Zea mays*) (Galau *et al.*, 1986; Mundy & Chua, 1988; Close *et al.*, 1989; Close, 1997). O número de genes codificadores de *DHNs* varia de 4 a 24, dependendo da espécie, refletindo sua ampla distribuição e conservação evolutiva. Essa presença abrangente reforça a importância

adaptativa dessas proteínas, evidenciando seu papel essencial na sobrevivência vegetal.

Em condições normais, as *DHNs* se acumulam principalmente em embriões em processo de maturação e nos tecidos vegetativos, sendo encontradas em regiões vasculares e meristemáticas jovens. Quando induzidas, sua expressão aumenta consideravelmente em diferentes compartimentos celulares, como citoplasma, núcleo e mitocôndrias. Destacam-se por atuar como proteínas hidrossolúveis que, em associação com outras proteínas hidrofílicas, se ligam às moléculas de água e funcionam como elementos de preenchimento, ajudando a manter a integridade celular e evitando o colapso das estruturas durante a perda de água (Tunnacliffe & Wise, 2007). Além disso, as *DHNs* também contribuem para a redução do estresse oxidativo, preservando a integridade das membranas, regulando a homeostase das espécies reativas de oxigênio (ROS) e estabilizando a fotossíntese (Yang *et al.*, 2019).

As leguminosas possuem grande importância ecológica e econômica, representando cerca de 27% da produção agrícola global e sendo fundamentais na agricultura sustentável (Duc *et al.*, 2015). Dentro da família Fabaceae, destaca-se a subfamília Papilionoideae, que abriga o maior número de espécies, com aproximadamente 14 mil (Azani *et al.*, 2017), incluindo a tribo Dalbergieae, à qual pertence o gênero *Stylosanthes* Swartz. Este gênero, composto por aproximadamente 50 espécies (Ferreira & Costa 1982; Tarawali *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005), tem sido estudado desde a década de 1970 devido à sua adaptabilidade ao semiárido brasileiro (Lima, 2019). Entre essas espécies, *Stylosanthes scabra* (Vogel), conhecida popularmente como trifólio ou alfafa-do-nordeste, destaca-se pela sua tolerância à seca e pela capacidade de se desenvolver em solos inférteis, ácidos e arenosos (Alves, 2021), além da sua ampla utilização como forragem em regiões semiáridas (Chandra *et al.*, 2006; Lima, 2019).

Nesse contexto, a identificação de genes *DHNs* em espécies de importância agrônômica, biotecnológica e nativas, como *S. scabra*, pode impulsionar avanços no melhoramento genético, especialmente considerando que estresses abióticos causam perdas significativas na produtividade. Dessa forma, o estudo desses genes é fundamental para fornecer *insights* para cultivares mais resistentes à seca e com maior potencial produtivo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o mapeamento genômico e avaliar a expressão dos genes desidrinas em *Stylosanthes scabra* (Vogel) submetida a supressão de irrigação (desidratação radicular), a fim de identificar genes potencialmente associados à plasticidade adaptativa ao estresse abiótico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Identificar transcritos pertencentes à subfamília desidrina em *S. scabra* e comparar seus ortólogos em outras leguminosas, visando detectar regiões conservadas (domínios e motivos) características dessa família gênica;
- II. Analisar *in silico* o perfil de expressão do gene desidrina em *S. scabra* (*SsDHN*), utilizando bibliotecas de RNA-Seq obtidas de tecidos radiculares submetidos a condições de déficit hídrico;
- III. Selecionar genes candidatos relacionados à expressão de *SsDHN* sob condição de déficit hídrico, visando à validação da expressão diferencial por qPCR e sua possível aplicação em programas de melhoramento genético.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Estresses abióticos em plantas

O termo "estresse" é amplamente utilizado de maneira subjetiva, com diversos significados, no entanto, em termos fisiológicos, o conceito de estresse está relacionado às respostas do organismo a diferentes situações. A capacidade de adaptação do metabolismo normal possibilita a geração de respostas às mudanças ambientais que ocorrem de forma cíclica e previsível, diária e sazonalmente, por isso, nem toda variação em relação às condições ideais de um fator é considerada estresse. No entanto, o estresse ocorre quando há restrições ou alterações ambientais imprevisíveis que interferem nos padrões metabólicos regulares, podendo causar danos, doenças ou disfunções fisiológicas. Em essência, o estresse representa uma condição fisiológica modificada por fatores que perturbam o equilíbrio interno, enquanto a tensão refere-se às mudanças físico-químicas resultantes do estresse (Hong-Bo *et al.*, 2005).

As plantas são continuamente sujeitas a estresses ambientais, e suas respostas são fundamentais para o seu desenvolvimento, sobrevivência e produtividade. Nos últimos anos, essas variações se intensificaram devido às condições climáticas extremas, que ameaçam a produção agrícola (Lijun *et al.*, 2024). Esses estresses afetam as plantas em níveis moleculares e celulares, impactando aspectos fisiológicos e metabólicos (Lima, 2009), como alterações no ciclo de vida e na relação entre a parte aérea e a raiz, homeostase iônica que abrange a distribuição, eliminação e armazenamento de íons e metabolismo primário, na síntese de osmólitos e expressão proteica (Xiong & Zhu, 2002).

Estresses abióticos incluem seca, salinidade, calor, frio e metais pesados; entre estes, a seca é particularmente um dos fatores mais severos que afetam o crescimento e a produtividade das plantas (Singh *et al.*, 2024). A forma como esses estresses afetam o desempenho das plantas depende da capacidade de cada espécie em responder aos fatores abióticos (Xiong & Zhu, 2002). As plantas podem ser resistentes e sobreviver a alguma injúria provocada por estresses, ou algumas partes da planta podem ser tolerantes, enquanto outras partes podem ser suscetíveis (Didonet, 2009).

3.1.1 Seca e déficit hídrico

A seca é um fenômeno climático natural caracterizado pela diminuição prolongada da disponibilidade de água, tanto nos recursos hídricos superficiais como no solo (Sheffield & Wood, 2008). Este fenômeno é resultado da diminuição da precipitação e da variação de outros fatores climáticos, como temperatura, luminosidade e salinidade (Riyazuddin *et al.*, 2022), que vêm sendo intensificado pelas mudanças climáticas, aquecimento global e aumento das emissões de gases de efeito estufa (Trenberth *et al.*, 2015). Essa carência de água é mais preocupante em algumas regiões do mundo, em especial regiões áridas e semiáridas, que sofrem com seca e salinidade extremas, impactando a biodiversidade e o setor agrícola (Benko-Iseppon *et al.*, 2011).

A água constitui entre 85 e 90% da massa fresca na maioria das plantas herbáceas e é absorvida do solo por meio de um gradiente de pressão que conecta as raízes às partes responsáveis pela transpiração. Nesse sentido, o estresse hídrico ocorre quando a perda de água pela planta excede sua capacidade de absorção, resultando na quebra do equilíbrio dos potenciais hídricos entre os tecidos e gerando competição interna por água (Didonet, 2009).

O estresse hídrico é um fenômeno multidimensional que impacta o crescimento e desenvolvimento (Bittencourt & Silva, 2018), causa mudanças nas funções, na estrutura, no metabolismo e na atividade genética das plantas. Além disso, influencia negativamente a assimilação de carbono, reduz a pressão de turgor e modifica processos como a troca gasosa foliar, a fotossíntese, a respiração e a absorção de nutrientes (Riyazuddin *et al.*, 2022). Essas mudanças provocadas pelo déficit hídrico acarretam alterações deletérias e/ou adaptativas que, em condições de campo, podem ser antagônicas ou sinérgicas e intensificadas pela sobreposição de outros fatores (Chaves *et al.*, 2002).

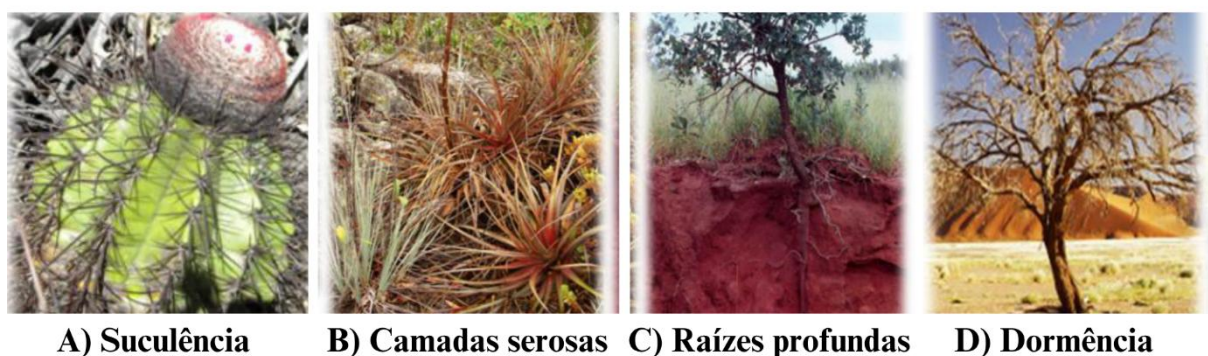
3.1.2 Mecanismos de adaptação das plantas ao déficit hídrico

As plantas foram submetidas, ao longo das eras geológicas, a diferentes ambientes influenciados pelas condições edafoclimáticas, o que permitiu sua adaptação a ambientes com recursos hídricos limitados, como é o caso de alguns ecossistemas brasileiros, por exemplo, a caatinga. Estima-se que essas adaptações teriam começado há cerca de 400 milhões de anos, impulsionadas pela pressão seletiva de ambientes terrestres secos e salinos, o que resultou em modificações no

comportamento das espécies e, eventualmente, no surgimento de plantas adaptadas a ambientes áridos (Dietrich *et al.*, 2001).

Para lidar com a seca, as plantas adotam respostas rápidas ao estresse, iniciando uma cascata de sinais moleculares que leva a modificações morfofisiológicas, genéticas e metabólicas, a fim de tolerar esse estresse. Plantas mais aptas à aridez, mesmo quando encontradas em continentes distintos, geralmente apresentam estratégias de sobrevivência semelhantes, incluindo suculência, dormência, folhas com camadas serosas ou ainda a capacidade de armazenar água e nutrientes em estruturas específicas das raízes (Benko-Iseppon *et al.*, 2011; Figura 1).

Figura 1. Estratégias morfológicas de adaptação à seca em plantas de diferentes ecossistemas brasileiros. A) Suculência; B) presença de camadas serosas em folhas; C) desenvolvimento de raízes profundas; D) dormência vegetal durante a estação seca.



Fonte: Benko-Iseppon *et al.* (2011) (Adaptado)

Mudanças morfológicas e fisiológicas em condição de déficit hídrico são adotadas pelas plantas, incluindo respostas como alongamento da raiz e maturação precoce, visando à captação de água mais eficiente, redução do número e tamanho das folhas para aclimação e retardo da desidratação (Silveira *et al.*, 2015), fechamento dos estômatos e diminuição da fotossíntese (Lijun *et al.*, 2024).

As plantas também adotaram estratégias bioquímicas para tolerar o estresse hídrico, tais como o acúmulo de solutos osmóticos, que consiste na síntese e aumento de moléculas de baixo peso molecular (Silveira *et al.*, 2015). Entre eles estão o potássio (K), nitrato (NO₃), cloro (Cl), sulfato (SO₄), malato, aspartato, carboidratos (sacarose, hexoses, manitol) e aminoácidos (prolina, glicina betaína) (Hanson & Hitz, 1982; Bartels & Sunkar, 2005). Além do acúmulo de fito-hormônios, como o ácido

abscísico (ABA), que controla os estômatos, reduzindo a perda de água (Santana *et al.*, 2011). Além dessas adaptações bioquímicas, outra estratégia essencial adotada pelas plantas é a ativação de genes estresse-induzidos, que atuam tanto na proteção de estruturas moleculares quanto na regulação da síntese de osmossolutos (Benko-Iseppon *et al.*, 2011).

3.1.3 Genes envolvidos na resposta ao déficit hídrico

Diversos genes podem responder a situações de estresse abiótico, contribuindo para que a planta se adapte e desenvolva tolerância a essas condições adversas. Esses genes podem ser expressos ou reprimidos, o que causa interferência e modificação de funções metabólicas, resultando em mudanças fisiológicas e no desenvolvimento vegetal. A ativação ou repressão de genes induzidos pelo estresse, juntamente com o acúmulo de proteínas específicas, é que caracteriza o fenótipo tolerante, o mesmo é resultante de uma complexa rede de interações que envolve múltiplos níveis de expressão e regulação (Lima, 2019).

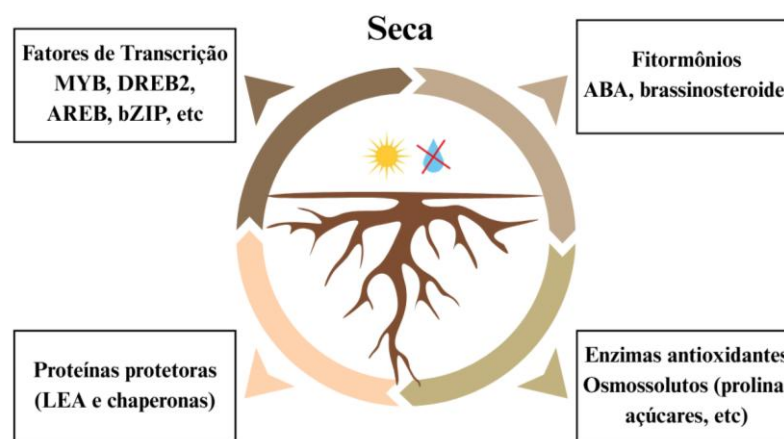
Genes estresse-induzidos relacionados às respostas à seca podem ser divididos em duas categorias principais. A primeira categoria inclui genes envolvidos na cascata de sinalização e no controle transcricional, como fatores de transcrição, proteínas quinases e fosfatases. Os fatores de transcrição do tipo AP2/EREBP (*ethylene-responsive-element-binding protein*; proteína de ligação ao elemento responsivo ao etileno), como as proteínas DREB (*dehydration-responsive element binding*; proteínas de elementos de ligação responsivos a desidratação), atuam auxiliando a planta na resposta e adaptação a estresses abióticos. Membros dessa família são conhecidos há mais de uma década por sua participação na tolerância ao estresse hídrico, por meio de vias metabólicas dependentes e independentes do ABA, e por sua regulação estresse-responsiva envolvendo mais de cem genes-alvo (Benko-Iseppon *et al.*, 2011).

Outro grupo de proteínas relacionado às respostas ao estresse hídrico são as quinases e fosfatases, enzimas essenciais na regulação de processos celulares por meio da transferência de grupos fosfatos, geralmente utilizando ATP como fonte. A atividade dessas enzimas pode ser modulada por mecanismos como autofosforilação, interação com outras proteínas ou ligação a pequenas moléculas. Elas desempenham papéis importantes em diversas rotas de sinalização ativadas por estresses ambientais, ajustando a expressão gênica de acordo com as condições externas. Um

exemplo ocorre no arroz, em que a expressão da maioria das CDPKs (*calcium-dependent protein kinases*) é induzida por estímulos abióticos. A expressão do gene OsCPK7 em plantas de arroz transgênico promove maior sobrevivência após estresse por frio e a ativação do gene OsCPK13 está associada ao aumento da tolerância à salinidade e à seca (Benko-Iseppon *et al.*, 2011).

Além disso, outra categoria compreende genes que atuam diretamente na proteção de membranas e proteínas, incluindo as proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant proteins; proteínas abundantes na embriogênese tardia), osmoprotetores, aquaporinas e transportadores de íons (Seki *et al.*, 2002; Figura 2).

Figura 2. Principais grupos de genes envolvidos na resposta de plantas a estresses abióticos como seca.



Fonte: Benko-Iseppon *et al.* (2011) (Adaptado)

3.2 LEA (*Late Embryogenesis Abundant*)

As proteínas LEA, conhecidas como “proteínas abundantes na fase tardia da embriogênese” (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*), constituem um grupo de proteínas que desempenham um papel importante na resposta das plantas a diferentes tipos de estresses abióticos. São abundantes em estruturas naturalmente tolerantes à dessecação, como sementes e grãos de pólen, e são induzidas em tecidos vegetativos em resposta a condições de estresse (Diogo, 2018). Além disso, estão presentes também em compartimentos subcelulares incluindo citoplasma, núcleo, membrana plasmática, entre outros (Hundertmark & Hinch, 2008).

Por sua vez, as proteínas LEA apresentam baixo peso molecular, geralmente variando entre 10 e 30 kDa e estão envolvidas na proteção das plantas contra danos causados por estresses ambientais, especialmente a seca (Souza, 2014). Em sua maioria, são hidrofílicas, ricas em glicina, que podem atuar na manutenção estrutural de outras proteínas, vesículas e endomembranas, além de realizarem ajustes osmóticos como sequestro de íons, estabilização de membranas, funcionando como chaperonas moleculares e atuando na desintoxicação de ROS (espécies reativas de oxigênio) (Wang *et al.*, 2004; Porcel *et al.*, 2005; Riyazuddin *et al.*, 2022).

Uma das estratégias pelas quais as proteínas LEA protegem as células é a sua capacidade de atuar como agentes solúveis em água. Elas, juntamente com outras proteínas hidrofílicas ligam-se a moléculas de água, servindo como "preenchedores de espaço" para prevenir o colapso das estruturas celulares durante a secagem. Essa capacidade é atribuída, em parte, à sua plasticidade estrutural, pois carecem de estrutura secundária quando hidratadas, mas podem adquirir conformações mais enoveladas quando expostas ao estresse hídrico ou ao interagir com superfícies de membranas (Tunnacliffe & Wise, 2007).

Tal família de proteínas é dividida em sete grupos ou famílias, de acordo com domínios conservados e motivos específicos, bem como semelhanças na composição peptídica. Em geral, os principais grupos são o 1, 2 e 3, pois concentram a maioria dos membros desta família (Bies-Ethève *et al.*, 2008). O grupo 1 é caracterizado por sequências repetitivas de 20 aminoácidos, que participam no desenvolvimento do endosperma e na manutenção do equilíbrio osmótico da célula. O grupo 2 apresenta uma estrutura altamente conservada composta por 15 aminoácidos e uma região C-terminal, estando envolvido em mecanismos de resistência à seca e atuando como chaperonas moleculares, protegendo a integridade de outras proteínas. Já o grupo 3 é composto por proteínas com 11 aminoácidos organizados em 13 repetições, o que lhes confere uma estrutura em α -hélice anfipática, associada a processos de desidratação em plantas superiores e ao acúmulo de íons (Hong-Bo *et al.*, 2005). Dentre esses, o grupo 2 se destaca por incluir as proteínas do tipo desidrina, amplamente reconhecidas por sua notável capacidade de responder a condições de seca (Close *et al.*, 1989).

3.2.1 Desidrinas: Características gerais

As Desidrinas (*DHNs*) são proteínas LEA, mais especificamente do grupo 2, originalmente identificada em embriões de algodão em desenvolvimento como a família “D11” (Battaglia *et al.*, 2008). Elas ganharam destaque no final da década de 1980 por sua capacidade de responder a condições de seca, sendo, portanto, denominadas “proteínas induzidas por desidratação” (Close *et al.*, 1989). Estudos posteriores revelaram que a produção dessas proteínas também é estimulada pelo ácido abscísico (ABA), razão pela qual também são chamadas de “proteínas responsivas ao ABA” (Hanin *et al.*, 2011).

Os genes *DHN* pertencem a uma família multigênica diversa, sendo identificados em organismos como cianobactérias, musgos, algas e plantas superiores, com número de genes variando entre espécies. Em plantas, estudos identificaram, até o momento, 13 genes *DHN* na cevada, 12 na macieira, 10 em *Arabidopsis* e no álamo, 8 no arroz, 6 no tomate e 4 na videira. Esses estudos também indicam que as *DHNs* estão amplamente distribuídas em diversos compartimentos celulares e são mais expressas em células sob estresse. Em condições normais, no entanto, acumulam-se principalmente em embriões em maturação e dessecação, enquanto, nos tecidos vegetativos, aparecem em regiões vasculares e meristemáticas jovens, como extremidades de raízes, ápices de brotos e pecíolos (Riyazuddin *et al.*, 2022).

A composição química dessas proteínas consiste em um caráter altamente hidrofílico, contendo aminoácidos polares e carregados, e uma baixa fração de resíduos não polares e hidrofóbicos. Essa composição confere às *DHNs* uma natureza intrinsecamente desordenada, pois, em geral, não apresentam estrutura secundária definida, como alfa-hélices ou folhas beta. Essas proteínas podem adquirir conformações estruturais apenas após interação com ligantes específicos, como lipídios de membrana ou íons metálicos, tornando-se funcionalmente ativas (Szlachtowska & Rurek, 2023).

Uma característica marcante das *DHN* são os três motivos conservados denominados K, Y e S. O segmento K é caracterizado por um motivo de 15 resíduos, rico em Lys (lisina), com a sequência EKKGIMDKIKEKLP, que pode se repetir de uma a quinze vezes em um único polipeptídeo (Amara *et al.* 2014). O segmento Y, encontrado na porção N-terminal da proteína, apresenta a sequência consenso (V/T)D(E/Q)YGNP, podendo ocorrer até 35 repetições em tandem. Já o segmento S

é composto por resíduos de serina/treonina (Ser/Thr) e integra uma sequência conservada, LHRSGS4–10(E/D)3, frequentemente sujeita à fosforilação (Battaglia *et al.*, 2008; Figura 3).

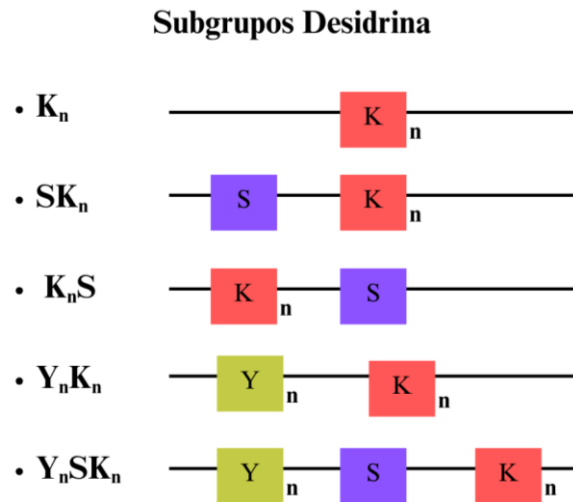
Figura 3. Sequências consenso dos motivos K, Y e S, característicos das proteínas do tipo desidrina, com destaque para a conservação de resíduos de aminoácidos. As cores indicam a natureza química dos aminoácidos: verde – apolares alifáticos (A, V, G, M, L, I, P); roxo – apolares aromáticos (Y, W, F); preto – polares sem carga (S, Q, N, T); vermelho – polares com carga positiva (R, K, H); azul – polares com carga negativa (D, E).

Motivo	Sequência consenso
K	
Y	
S	

Fonte: Battaglia *et al.* (2008) (Adaptado)

De acordo com os três motivos K, Y e S, as *DHN* podem ser classificadas em cinco subgrupos estruturais, incluindo Kn, SKn, KnS, YnKn e YnSKn (Close, 1996; 1997; Figura 4). Os genes *DHNs* do tipo SKn são geralmente ligados à tolerância ao frio e encontrados próximos a membrana plasmática, enquanto o tipo YnSKn é predominante em monocotiledôneas e desempenha um papel essencial na tolerância à seca, possivelmente mantendo o conteúdo de água celular e estabilizando as membranas celulares (Abedini *et al.* 2017). A desidrina do tipo KnS participa da regulação de espécies reativas de oxigênio (ROS), sequestrando metais pesados, como o cobre (Cu^{2+}) (Hara *et al.* 2013), e o subgrupo YnKn está envolvido nas respostas a estresses de sal e frio (Lin *et al.* 2012).

Figura 4. Matriz dos motivos distintivos nos subgrupos da proteína Desidrina. Cada bloco contém uma representação esquemática do arranjo dos motivos que distinguem cada subgrupo correspondente da proteína Desidrina. A letra n indica o número de cópias de cada motivo por sequência.



Fonte: Battaglia *et al.* (2008) (Adaptado)

3.2.1.1 Proteção celular e estabilização de proteínas

As proteínas *DHN* desempenham um papel multifuncional na proteção celular vegetal sob condições de estresse por seca. Elas contribuem para a manutenção da taxa de fotossíntese, preservam a estabilidade das membranas dos tilacóides e cloroplastos, e ajudam a manter a integridade da estrutura celular. Além disso, auxiliam na conservação do peso fresco, reduz a densidade estomática e aumenta os teores de clorofila a e b, carotenoides e solutos compatíveis, como prolina e açúcares solúveis (Hanin *et al.*, 2011; (Yang *et al.*, 2019). Um estudo recente com trevo branco (*Trifolium repens*) demonstrou que a aplicação exógena de manose, um soluto compatível, promoveu o aumento na expressão dos genes SK2, Y2K, Y2SK e desidrina b, além de contribuir para a manutenção de altos níveis de clorofila, taxa fotossintética líquida e eficiência no uso da água (Zhao *et al.* 2020).

O acúmulo de ROS (espécies reativas de oxigênio) durante o estresse por seca compromete a saúde geral das plantas, sendo a geração intracelular de H_2O_2 atribuída, principalmente, ao vazamento de elétrons das cadeias de transporte de elétrons fotossintéticas e respiratórias (Zhang *et al.*, 2016; Mittler *et al.*, 2004). As desidrinas (*DHNs*), devido à presença de grandes quantidades de arginina (Arg), histidina (His) e outros aminoácidos altamente reativos em sua superfície, apresentam propriedades de eliminação de ROS e de ligação a íons metálicos por meio de

interações físicas diretas (Hanin *et al.*, 2011). Um estudo relatou que as *DHNs* CuCOR15 e CuCOR19, de tangerina (*Citrus unshiu*), apresentaram atividade antioxidante durante o estresse causado pelo frio, atuando na eliminação de radicais livres e na ligação a metais, além disso, a superexpressão de CuCOR19 levou à redução dos níveis de peroxidação lipídica e de lipossomos, reforçando o papel direto dessa proteína na eliminação de ROS (Hara *et al.*, 2001 2004, 2005).

Proteínas desidrinas, assim como outras proteínas LEA, demonstraram, em experimentos *in vitro*, a capacidade de proteger outras proteínas sob condições de déficit hídrico, prevenindo a inativação de enzimas como lactato desidrogenase (LDH) e malato desidrogenase (MDH) em diferentes níveis de desidratação. De forma semelhante, também apresentaram propriedades protetoras em ensaios *in vitro* submetidos a variações de temperatura e ciclos de congelamento-descongelamento (Battaglia & Covarrubias, 2013). Além disso, a estabilização de membranas tem sido outra função atribuída às proteínas LEA, especialmente às desidrinas (LEA2), cujo papel foi evidenciado em experimentos *in vitro* que demonstraram sua associação preferencial a vesículas fosfolipídicas aniônicas, como ocorre com as *DHNs* de milho (*Zea mays*), cuja ligação promove um aumento na α -helicidade da proteína, podendo ser induzida por dodecil sulfato de sódio (Koag *et al.*, 2003, 2009).

3.2.1.2 Regulação durante o déficit hídrico

A regulação dos genes *DHN* raramente é de forma isolada e está associada a fito-hormônios, como por exemplo o ácido abscísico (ABA), o brassinosteroide (BR) e outros fito-hormônios, além de fatores de transcrição como o DREB, permitindo uma regulação das desidrinas em resposta ao estresse hídrico. A expressão desse gene é induzida em várias espécies como cevada, trigo, tomate, batata e maçã (Riyazuddin *et al.*, 2022).

A expressão do gene desidrina pode ser regulada de forma dependente do ABA, como no caso da maçã (*malus domestica*) onde foram identificados 12 genes *DHN* (*MdDHNs*), dos quais *MdDHN1*, *MdDHN2*, *MdDHN4* e *MdDHN6* responderam rapidamente ao hormônio e apresentaram alta regulação sob condições de seca (Liang *et al.* 2012). Em *Gentiana triflora*, a indução de *GtDHN1* (desidrina do tipo SK2) e *GtDHN2* (desidrina do tipo K3) pelo ABA promove maior tolerância à seca por meio do aumento na produção de antioxidantes como ascorbato de glutatona (Imamura *et al.* 2013). Em *Solanum lycopersicum*, a superexpressão de um gene *DHN* tas14,

regulado pelo ABA, melhorou a resistência ao estresse osmótico, promulgado pela seca (Muñoz-Mayor *et al.* 2012). Da mesma forma, em *Oryza sativa* L. ssp. japonica a superexpressão dos genes *OsDhn-Rab16D* e *OsFKBP* (proteínas de ligação à desidrina FK506), com múltiplos elementos cis responsivos a ABA, conferiu maior tolerância ao estresse de seca e maior integridade da membrana e fortalecimento da lignificação radicular sob estresse. (Tiwari *et al.* 2018).

Os brassinosteroides (BRs) também desempenham um papel na regulação da expressão de *DHNs*, contribuindo para a tolerância ao estresse hídrico. Em tratamento com epibrassinolide (EBR) as cultivares de sementes de trigo transgênicas apresentaram acúmulo de *DHNs* de baixa massa molecular e reduziram os efeitos negativos da seca. Esse tratamento também aumentou os níveis de ABA, indicando uma interação entre essas duas vias hormonais. Embora existam vias independentes de ABA e EBR na regulação do nível de proteínas *DHN* (Shakirova *et al.* 2016).

O fator de transcrição DREB é outro importante regulador da expressão de *DHNs*, que funciona independente do ABA (Agarwal *et al.* 2006). Os DREBs se liga a elementos cis-regulatórios (DRE) presentes nas regiões promotoras de genes responsivos por seca e baixa temperatura, como os *DHNs* do pessegueiro (*Prunus pérsica*) *PpDhn1* e *PpDhn3* (Yu *et al.* 2018). A introdução do gene DREB1A da *Arabidopsis* em grama alta de festuca aumentou a tolerância à seca e o acúmulo de prolina (Zhao *et al.* 2007). Em *Vigna radiata*, a superexpressão de *VrDREB2A* em *Arabidopsis* transgênica resultou no aumento da expressão dos genes *AtRD17*, *AtRD29A* e *AtRD29B* reforçando, o papel essencial do DREBs na regulação de *DHN* na resposta de seca (Chen *et al.* 2016).

Diante disso, torna-se fundamental investigar esses genes em espécies adaptadas a regiões áridas e semiáridas, cujas condições ambientais extremas favorecem o surgimento de genótipos altamente tolerantes, dotados de um maquinário genético diversificado e eficiente para a sobrevivência. Um exemplo notável é a espécie *Stylosanthes scabra*, nativa desses ambientes, que se destaca por sua elevada tolerância ao estresse hídrico.

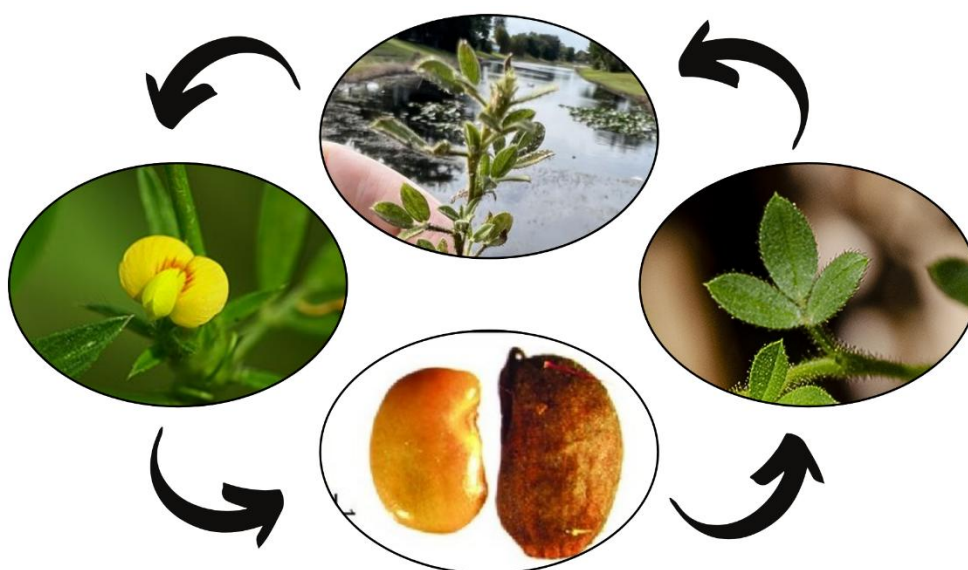
3.3 *Stylosanthes scabra*

3.3.1 Caracterização Botânica e Taxonomia

O gênero *Stylosanthes* Sw. pertence à família Fabaceae e tem origem nas Américas Central e do Sul (Galdino, 2014), sendo nativo da flora brasileira (Barcellos

et al., 2001), com 31 das 50 espécies ocorrendo no Brasil. Por essa razão, o país é considerado o principal centro de origem e diversidade desse grupo (Lewis *et al.*, 2015; Costa & Valls, 2015). As espécies deste gênero são compostas por plantas herbáceas que apresentam folhas trifoliadas, estípulas amplexicaules, bidentadas, inflorescências em forma de espiga com uma ou várias, possuindo flores amarelas e frutos do tipo lomento (Ferreira & Costa, 1979; Figura 5).

Figura 5. Características morfológicas do gênero *Stylosanthes*. A maioria das espécies do gênero apresentam inflorescência em espiga, folhas trifoliadas, flores amarelas e fruto do tipo lomento.



Fonte: Schultze-Kraft *et al.*, (2023); GBIF.org (2023) (Adaptado)

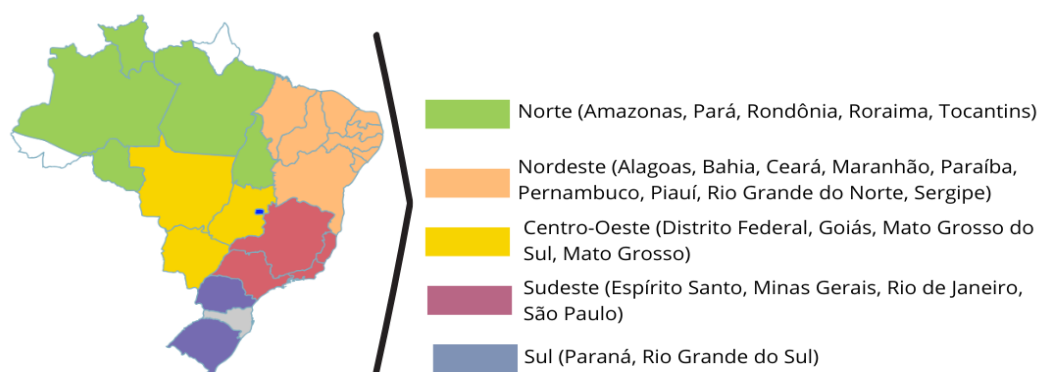
A taxonomia do gênero *Stylosanthes* é bastante complexa e é descrita atualmente por Kirkbride Jr. & Kirkbride (1987) e Calles & Schultze-Kraft (2010), sendo que a distinção entre as espécies tem sido realizada com base em características morfológicas, sendo dividido em duas seções, de acordo com a presença ou ausência de eixo plumoso na base de flores e/ou frutos, e com o número de bractéolas (Calles & Schultze-Kraft 2010). A primeira seção é caracterizada pelas espécies *S. macrocephala*, *S. hamata* e *S. scabra* que apresentam eixo rudimentar na base e três bractéolas nas flores e/ou frutos. Já a segunda seção não apresenta eixo rudimentar na base das flores e/ou frutos e possui duas bractéolas, incluindo espécies como *S. humilis*, *S. angustifolia*, *S. guianensis*, entre outras (Costa *et al.*, 2008).

Dentre as espécies do gênero, destaca-se *Stylosanthes scabra* Vogel, conhecida popularmente como trifólio e alfafa-do-nordeste, por ser uma forrageira

adaptada a solos inférteis, ácidos e arenosos, além de apresentar tolerância à seca (Alves 2021). Apresenta ampla distribuição em grande parte da América do Sul e ocorre em todas as regiões do Brasil, incluindo Norte (Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul) (Figura 6; Gissi, 2020).

A espécie *S. scabra* é caracterizada por ser uma planta perene, subarborescente com hábito ereto, cujo porte varia entre 20 e 150 cm. Os ramos costumam ser ásperos e viscosos, com folhas trifoliadas. Possui uma raiz principal reta e robusta, com características lenhosas, além de caule lenhoso. Apresenta inflorescência semelhante à espiga, composta por flores de tonalidade amarela. Os frutos são do tipo lomento com sementes reniformes e assimétricas (Alves 2021). A reprodução ocorre, predominantemente, por autofecundação, embora em raros casos, possa ocorrer reprodução cruzada (Lima, 2019). Seu habitat é bastante diversificado, ocorrendo espontaneamente em regiões da Caatinga, além de matas de cipó e campos rupestres, áreas de vegetação mais aberta, solos arenosos, restingas, dunas, proximidades de lagoas e florestas estacionais decíduas (Alves 2021). Dada essa ampla adaptabilidade ecológica e suas características morfofisiológicas, *S. scabra* tem despertado interesse crescente no contexto agrônomo, especialmente como planta forrageira em ambientes semiáridos.

Figura 6. Distribuição geográfica de *Stylosanthes scabra* no Brasil. As cores representam os estados agrupados por região: Norte (verde), Nordeste (laranja), Centro-Oeste (amarelo), Sudeste (vermelho) e Sul (azul). As áreas em branco indicam estados onde não há ocorrência registrada da espécie.



Fonte: Gissi (2020).

3.3.2 Importância Agronômica

A escassez de plantas forrageiras com alta produtividade e valor nutricional tem sido um dos maiores desafios da atividade agropecuária, especialmente em regiões afetadas por estiagens prolongadas e pela exploração desordenada dos recursos nativos (Araújo Filho, 2013). A introdução de espécies pouco adaptadas, associada à baixa fertilidade do solo e ao manejo inadequado, tem reduzido a longevidade das pastagens, contribuindo para a degradação do solo e o avanço de plantas invasoras (Macedo, 2009). Um exemplo marcante desses impactos ocorre na Caatinga, onde a sazonalidade do período chuvoso e as secas recorrentes impõem severas restrições ao suprimento de forragem, comprometendo a produtividade dos rebanhos (Araújo *et al.*, 2000).

Por outro lado, espécies do gênero *Stylosanthes* destacam-se por sua importância na atividade agropecuária, devido ao seu elevado potencial forrageiro, sendo amplamente utilizadas tanto na alimentação de gado de corte quanto na produção leiteira em regiões tropicais e subtropicais. Além disso, apresentam alta produtividade e qualidade nutricional significativa, com cerca de 10% de proteína bruta. Entre as vantagens do cultivo dessas leguminosas está a capacidade de restaurar a fertilidade e aprimorar as propriedades físicas do solo, devido à sua associação comprovada com rizóbios (bactérias que fixam nitrogênio), o qual fornece cobertura vegetal permanente, promovendo a sustentabilidade em ambientes semiáridos (Barcellos *et al.*, 2008). Uma das espécies deste gênero que se destaca por ser utilizada predominantemente como forragem em climas úmidos e regiões semiáridas é *S. scabra* (Chandra *et al.*, 2006).

Os ramos e folhas de *S. scabra* são amplamente utilizados como forragem na Austrália e em outros países com climas tropicais, trazendo benefícios significativos para a pecuária. A utilização desta leguminosa tem contribuído para o aumento do peso vivo, melhorias nas taxas de lotação e maior flexibilidade nas práticas de manejo e criação. Em solos inférteis, com superfície arenosa e baixos níveis de fósforo (menos de 5 ppm extraível) a performance do gado em pastagens de *S. scabra* demonstraram um aprimoramento no desempenho do gado, especialmente à medida que a proporção de leguminosas na pastagem aumentava com o tempo (Hall & Glatzle, 2004).

O gênero *Stylosanthes* começou a ser estudado em 1963 pela CSIRO (*Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation*; Organização de Pesquisa Científica e Industrial da Commonwealth), quando passou a ser considerado uma das principais fontes de leguminosas forrageiras para o norte da Austrália. Uma cultivar de *S. scabra* cv. Seca foi desenvolvida a partir do exemplar CPI 40292, coletado nas proximidades de Gravatá, PE. Essa cultivar foi testada em 17 locais da Austrália por meio de uma parceria da CSIRO com outros órgãos do setor agrícola e indústria animal. Como resultado, destacou-se por sua maior tolerância a condições edafoclimáticas adversas, em comparação a outras cultivares, além de apresentar melhor desempenho em produção de biomassa e maior resistência à antracnose (Lima, 2019; Tabela 1).

Tabela 1. Características da cultivar *Stylosanthes scabra* cv. Seca, desenvolvida a partir de material coletado em Pernambuco e registrada na Austrália em 1977.

Cultivar	Tipo (Local de Registro)	Local de origem	Local de origem	Resistência	Resistência
Seca (CPI 40292)	Cultivar (Austrália, 1977)	Pernambuco	Vigorosa, ereta, 2 m de altura, caule avermelhado e copa aberta.	Antracnose (único gene).	800 mm, 7 meses de estação seca.

Fonte: Lima (2019) (Adaptado)

3.3.3 Biotecnologia

O melhoramento de leguminosas forrageiras em países tropicais tem avançado nos últimos anos, priorizando o aumento da produtividade, a melhoria da persistência no pasto e a resistência a doenças (Valle *et al.*, 2009; Vieira *et al.*, 2007). *Stylosanthes scabra*, uma leguminosa adaptada a regiões semiáridas, vem sendo estudada por meio de abordagens ômicas, revelando um repertório de genes associados à sua resistência a estresses ambientais, como seca e solos ácidos de baixa fertilidade. Ferreira-Neto *et al.* (2022) demonstraram que *S. scabra* apresenta notável capacidade de recuperação frente à desidratação, aliada a uma resposta fisiológica e molecular eficiente diante das variações na disponibilidade hídrica. A partir de abordagens baseadas em ciências ômicas, foi possível identificar alterações no comportamento

de diversos genes, muitos dos quais associados a vias metabólicas relevantes na mitigação do estresse oxidativo (ROS). Destacam-se, entre eles, genes envolvidos na biossíntese de osmoprotetores, como prolina e açúcares solúveis, além da identificação de proteínas protetoras como as desidrinas, que desempenham papel crucial na manutenção da homeostase celular e do equilíbrio osmótico, favorecendo a aclimação da planta em condições de seca (Ferreira-Neto *et al.*, 2022).

Os avanços na caracterização genética de leguminosas têm permitido a identificação de marcadores moleculares associados a características agronômicas desejáveis, o que tem contribuído para o aprimoramento genético de *Stylosanthes* spp. A análise desses marcadores em 26 Acessos de *S. scabra* e outras leguminosas de interesse econômico revelou uma ampla variabilidade intraespecífica, destacando a relevância dos bancos de germoplasma para os programas de melhoramento (Karia *et al.*, 2002). Além de fornecerem informações sobre aspectos morfológicos, fisiológicos e agronômicos, esses bancos também reúnem dados sobre a tolerância a estresses, contribuindo para a seleção de acessos mais adaptados a diferentes condições ambientais (Barros, 2019).

3.4.1 Transcriptômica e técnicas moleculares

O conjunto de transcritos (RNA_m) presente em uma célula ou tecido em um dado momento, compõe o transcriptoma, cuja composição varia conforme o desenvolvimento e as condições fisiológicas do organismo, de acordo com o perfil de expressão de cada gene (Silva, 2019). O estudo de expressão gênica pode ser conduzido por meio de desenhos experimentais que simulam a aplicação de determinados estresses a um sistema biológico, com um controle, com o objetivo de analisar o perfil de expressão associado a uma condição específica (Silva Filho, 2019).

A análise do perfil transcricional nos oferece informações valiosas sobre diversos aspectos biológicos, como metabolismo, resistência e suscetibilidade em plantas, além de processos relacionados ao desenvolvimento e à resposta a estresses. Essa abordagem permite quantificar os níveis de expressão dos transcritos ao longo do tempo e sob diferentes condições ambientais. O conhecimento gerado por estudos transcriptômicos contribui diretamente para a interpretação dos elementos funcionais do genoma e para uma compreensão mais aprofundada do funcionamento dos organismos (Silva Filho, 2019). Diversas metodologias podem ser empregadas para avaliar a expressão gênica, com destaque para a técnica de PCR (*Polymerase*

Chain Reaction), amplamente utilizada por sua sensibilidade, especificidade e aplicabilidade em diferentes contextos experimentais.

A técnica de PCR é amplamente utilizada em projetos que envolvem a análise do transcriptoma de espécies submetidas a condições específicas, a partir do RNA mensageiro maduro. Após o isolamento do RNAm, este é convertido em DNA por meio da enzima 'transcriptase reversa', em um processo conhecido como RT-PCR (*Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction*). Dessa forma, gera-se uma biblioteca de cDNA (*complementary DNA*), que representa a informação presente no RNAm da célula ou tecido de origem (Silva, 2019). Esse cDNA gerado representa com fidelidade a informação genética presente na célula ou tecido de origem e pode ser utilizado em diversas técnicas de sequenciamento, como o RNA-Seq (Silva, 2019).

O RNA-Seq é uma das tecnologias mais modernas de sequenciamento utilizadas em estudos transcriptômicos. Quando combinada com ferramentas computacionais, essa técnica permite a montagem e análise dos dados em *reads*. Além disso, o RNA-Seq não está restrito a transcritos previamente conhecidos, o que a torna uma opção atrativa para o sequenciamento de transcriptomas de organismos não-modelos ou de espécies sem sequências genômicas previamente mapeadas (Martin & Wang, 2011). Com isso, a técnica se tornou uma ferramenta popular em estudos de expressão gênica, possibilitando a identificação de transcritos inéditos, revelando a identidade das sequências e sendo fundamental para a análise de genes desconhecidos e isoformas (Hrdlickova *et al.*, 2017).

3.4.2 Bioinformática

A bioinformática é uma ciência multidisciplinar que integra computação, estatística, matemática e tecnologia da informação na análise de dados biológicos. Essa integração é fundamental para lidar com o volume crescente de dados moleculares gerados em estudos com plantas, permitindo avanços significativos na compreensão da regulação da transcrição em resposta a fatores ambientais. Além disso, possibilita o desenvolvimento de modelos computacionais capazes de contribuir para a análise e a elucidação da estrutura de redes celulares sob condições de estresse (Chen & Zhu, 2004; Lai *et al.*, 2011). Nesse contexto, diversos bancos de dados foram desenvolvidos, mostrando-se altamente eficazes no armazenamento e na interpretação dos resultados obtidos a partir das diferentes abordagens ômicas.

Entre os principais bancos de dados públicos, destacam-se o GenBank, mantido pelo NCBI, e o UniProt. Estes integram, padronizam e disponibilizam dados provenientes de diversas fontes, reunindo informações genéticas de espécies ou grupos de organismos, incluindo sequências de nucleotídeos, proteínas, moléculas e elementos gênicos e genômicos (The Uniprot Consortium, 2012). Além disso, oferecem um catálogo abrangente de sequências proteicas curadas, com anotações funcionais detalhadas, constituindo uma base essencial para análises moleculares e funcionais (Fernandez-Suarez & Galperin, 2012).

Por outro lado, a mineração de texto (*text mining*) tem se consolidado como uma ferramenta valiosa nas análises bioinformáticas, permitindo a extração de informações não estruturadas a partir de bancos de dados estruturados e facilitando a identificação de entidades biológicas e suas interações. Essa técnica abrange subáreas como recuperação e extração da informação, além de sistemas de perguntas e respostas, sendo aplicada com crescente precisão graças à integração com métodos estatísticos e algoritmos de aprendizado de máquina (Espindola *et al.*, 2010). Essa combinação tem permitido a detecção automatizada de relações entre genes, proteínas e outros elementos descritos na literatura científica, promovendo análises em larga escala com alto desempenho (Barros, 2019).

A caracterização estrutural e funcional de genes tem sido significativamente aprimorada com o uso de ferramentas bioinformáticas avançadas, como o MEGA11 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). Essa plataforma permite o processamento de grandes volumes de dados genômicos e transcricionais, facilitando análises comparativas entre espécies e membros de famílias gênicas. Entre suas funcionalidades esta o alinhamento múltiplo de sequências, que possibilita a identificação de motivos conservados, regiões que indicam similaridade funcional ou estrutural entre genes ortólogos e parálogos. Além disso, permite a construção de árvores filogenéticas, estimativas de distâncias genéticas, detecção de eventos de duplicação gênica, o que permite traçar a história evolutiva de grupos de genes e inferir possíveis mudanças funcionais ao longo do tempo. Essas análises são fundamentais para compreender a diversidade gênica e a plasticidade dos genomas, e também para identificar genes candidatos associados a características adaptativas ou de interesse agrônomo, como tolerância ao estresse ou resistência a doenças (Tamura *et al.*, 2021).

4. MANUSCRITO

4.1 Artigo

Abordagem multiômica revela o papel das desidrinas na tolerância ao estresse abiótico em *Stylosanthes scabra* (Vogel)

Ana Beatriz Felix Leonardo¹; Jéssica Barboza da Silva¹; Agnes Angélica Guedes de Barros¹; Flavia Beatriz Mendes da Silva¹; José Ribamar Costa Ferreira Neto¹; Ana Maria Benko-Iseppon¹

¹Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Autor para correspondência: ana.iseppon@ufpe.br

RESUMO

As desidrinas (*DHNs*) constituem uma subfamília de proteínas LEA amplamente associadas à resposta vegetal frente a estresses abióticos, especialmente à seca. Apesar da relevância biológica e agrônômica dessa classe gênica, ainda são escassos os estudos aprofundados envolvendo sua caracterização funcional em leguminosas forrageiras nativas. Neste estudo, foi realizada a prospecção e caracterização dos genes *DHNs* em *Stylosanthes scabra* (Vogel), espécie adaptada ao semiárido brasileiro. Oito genes *SsDHN* foram identificados no proteoma predito da espécie, classificados nos subgrupos SKn e YnSKn com suporte da análise estrutural éxon-íntron, composição de motivos conservados e localização subcelular preditiva. A análise evolutiva indicou que eventos de duplicação segmentar contribuíram de forma crucial para a expansão da família *DHN*, sob pressão seletiva purificadora. Fatores de transcrição das famílias ERF, bHLH e bZIP foram preditos como potenciais reguladores dos *SsDHN*, indicando o envolvimento de múltiplas vias na aclimação molecular de *S. scabra*. Adicionalmente, a expressão diferencial dos genes foi avaliada por meio de bibliotecas de RNA-Seq, indicando que *SsDHN2* e *SsDHN3* foram significativamente induzidos após 24 horas de déficit hídrico. Este estudo apresenta uma caracterização genômica e transcriptômica abrangente da família *DHN* na espécie, com potencial para subsidiar futuras estratégias de melhoramento genético voltadas à tolerância à seca em leguminosas tropicais.

ABSTRACT

Dehydrins (*DHNs*) form a subfamily of LEA proteins widely associated with plant responses to abiotic stresses, particularly drought. Despite the biological and agronomic relevance of this gene class, in-depth studies addressing its functional characterization in native forage legumes are still limited. This study involved the identification and characterization of *DHN* genes in *Stylosanthes scabra* (Vogel), a species adapted to the Brazilian semiarid. Eight *SsDHN* genes were identified in the species' predicted proteome and classified into the SKn and YnSKn subgroups, supported by exon–intron structural analysis, conserved motif composition, and predicted subcellular localization. Evolutionary analysis indicated that segmental duplication events played a crucial role in the expansion of the *DHN* family under purifying selective pressure. Transcription factors from the ERF, bHLH, and bZIP families were predicted as potential regulators of *SsDHNs*, suggesting the involvement of multiple pathways in the molecular acclimation of *S. scabra*. Additionally, differential gene expression was evaluated using RNA-Seq libraries, indicating that *SsDHN2* and *SsDHN3* were significantly induced after 24 hours of water deficit. This study provides a comprehensive genomic and transcriptomic characterization of the *DHN* family in the species, with potential to support future genetic improvement strategies targeting drought tolerance in tropical legumes.

INTRODUÇÃO

Stylosanthes scabra (Vogel) é uma leguminosa forrageira nativa de regiões tropicais e semiáridas, amplamente utilizada em sistemas de produção animal, recuperação de áreas degradadas e conservação de solos (Barcellos *et al.*, 2008; Cameron & Chakraborty, 2004; Marques *et al.*, 2018). No Brasil, especialmente no Nordeste, a espécie destaca-se pela capacidade de adaptação a ambientes de baixa fertilidade e disponibilidade hídrica, contribuindo significativamente para a sustentabilidade agropecuária em regiões áridas e semiáridas (Chandra *et al.*, 2006; Lima, 2019; Alves, 2021).

Ambientes semiáridos expõem as plantas a estresses abióticos severos, sendo a escassez hídrica a principal limitação à produção agrícola e forrageira (Singh *et al.*, 2024). Diante disso, a identificação e caracterização de genes associados à tolerância a estresses abióticos têm sido fundamentais para o desenvolvimento de cultivares mais adaptadas a essas condições adversas.

Para lidar com tais adversidades, as plantas ativam rapidamente mecanismos de defesa que envolvem sinalização molecular e a indução de genes responsáveis pela produção de proteínas e enzimas com função protetora (Benko-Iseppon *et al.*, 2012; Casaretto *et al.*, 2016; Mahajan & Tuteja, 2005). Dentre esses, destacam-se os genes que codificam desidrinas (*DHNs*), proteínas hidrofílicas que desempenham

papel central na proteção das membranas celulares e na estabilização de proteínas, colaborando para o aumento da tolerância ao estresse ambiental.

As *DHNs* pertencem à classe II da família LEA (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*) e são compostas predominantemente por resíduos de alanina, glicina e serina (Battaglia *et al.*, 2008). Caracterizam-se por três segmentos conservados, K, Y e S, e são classificadas em cinco subgrupos estruturais: Kn, SKn, KnS, YnKn e YnSKn (Riyazuddin *et al.*, 2022). Essas proteínas apresentam estrutura intrinsecamente desordenada, adquirindo conformação funcional apenas após interação com ligantes específicos, como lipídios de membrana ou íons metálicos (Szlachtowska & Rurek, 2023).

As *DHNs* foram inicialmente descritas em arroz (*Oryza sativa*) e cevada (*Hordeum vulgare*) (Galau *et al.*, 1986; Mundy & Chua, 1988) e, desde então, identificadas em diversas plantas vasculares e não vasculares, com o número de genes variando de 4 a 24 entre as espécies, evidenciando sua importância evolutiva (Close, 1997; Saavedra *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2017). Em condições normais, acumulam-se principalmente nos embriões em maturação e nos tecidos vegetativos jovens. Sob estresse, sua expressão é induzida em compartimentos como citoplasma, núcleo e mitocôndrias, exercendo funções na manutenção da integridade celular e na regulação do equilíbrio osmótico (Tunnacliffe & Wise, 2007; Yang *et al.*, 2019). Nesse contexto, a prospecção de genes codificadores de *DHNs* em leguminosas surge como uma estratégia promissora para identificar mecanismos associados à tolerância ao estresse abiótico.

As leguminosas forrageiras, além de sua importância econômica e ecológica, representando cerca de 27% da produção agrícola mundial (Duc *et al.*, 2015), destacam-se pela capacidade de adaptação a solos pobres e pela fixação biológica de nitrogênio. Na família Fabaceae, a subfamília Papilionoideae abriga cerca de 14 mil espécies (Azani *et al.*, 2017), incluindo o gênero *Stylosanthes*, tradicionalmente valorizado no Brasil desde a década de 1970 (Lima, 2019). Dentre suas espécies, *S. scabra* é notável por sua rusticidade, resistência à seca e capacidade de se desenvolver em solos ácidos e arenosos (Alves, 2021).

Considerando o cenário de mudanças climáticas e os desafios impostos pela escassez hídrica, a identificação de genes *DHNs* em espécies como *S. scabra* representa uma oportunidade estratégica para o avanço no melhoramento genético, visando cultivares mais tolerantes à seca e com maior estabilidade produtiva. Estudos

direcionados à caracterização estrutural, perfil transcricional e funcional dessas proteínas podem fornecer subsídios para o desenvolvimento de tecnologias e bioprodutos aplicáveis à agricultura em regiões áridas e semiáridas.

MATERIAIS E METODOS

Caracterização *in silico* da subfamília DHN no genoma de *Stylosanthes scabra*

Para identificação dos candidatos a DHNs, as sequências foram recuperadas do proteoma de *Stylosanthes scabra*. Para isso, foram utilizadas duas abordagens complementares:

- I. Busca por similaridade via BLASTp, utilizando sequências sonda curadas de DHNs previamente anotadas em *Arabidopsis thaliana* e em leguminosas como *Pisum sativum*, *Medicago truncatula*; e
- II. Pesquisa baseada em modelos ocultos de Markov (HMMER), utilizando o domínio conservado PF00257.

As sequências obtidas foram inicialmente avaliadas quanto à presença do domínio catalítico utilizando a ferramenta CD-Search (*Conserved Domain Search*; Wang *et al.*, 2023). Em seguida, foram preditos o comprimento, ponto isoelétrico e peso molecular das proteínas por meio da plataforma Protpi (<https://www.protpi.ch/>). A predição da localização subcelular foi realizada com o CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>).

Adicionalmente, a análise de motivos conservados foi conduzida com o MEME Suite v5.5.8 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>), adotando-se os seguintes parâmetros: (1) zero e uma ocorrência por modelo de sequência escolhida, (2) comprimentos do motivo entre seis e 50 nucleotídeos, (3) número máximo de motivos: dez e (4) ocorrência de motivos em ambas as fitas das sequências de DNA de entrada, associados a um e-value 10^{-2} . As estruturas gênicas (éxon-íntron) foram determinadas a partir do arquivo GFF e visualizadas no software TBtools (Chen *et al.*, 2020).

Alinhamento múltiplo e análise fenética dos DHNs

O alinhamento múltiplo das sequências proteicas de SsDHNs foi realizado utilizando o ClustalW, no software MEGA 11 (Tamura *et al.*, 2021), com parâmetros padrão e ajustes manuais posteriores. As regiões correspondentes aos sítios ativos

característicos de cada família de DHNs foram destacadas com o auxílio da ferramenta Jalview. Para a classificação das SsDHNs em nível de subfamília, foram recuperadas sequências proteicas curadas de DHNs em *A. thaliana*, *Vigna unguiculata*, *Arachis hypogaea*, *Oryza sativa* e *Solanum lycopersicum*, que foram alinhadas via ClustalW juntamente com as sequências candidatas de *S. scabra*, seguidas de ajustes manuais. As árvores filogenéticas foram construídas utilizando o método *Neighbor-Joining* (NJ), com modelo *p-distance*, opção de deleção completa e 1.000 repetições de *bootstrap*.

Procedimento experimental de déficit hídrico em *Stylosanthes scabra*

O experimento de estresse hídrico foi conduzido como descrito por Ferreira-Neto *et al.* (2022), em casa de vegetação na Embrapa Semiárido (Petrolina, Brasil), utilizando o acesso 85/UNEB, proveniente do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade do Estado da Bahia. Plantas propagadas por estaquia foram cultivadas em vasos de 5 L sob condições controladas, distribuídas em dois grupos: controle (irrigação diária) e tratamento (suspensão da irrigação por 24 h), com três réplicas biológicas por grupo. Amostras de raízes foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até a extração de RNA.

Extração de RNA e construção de bibliotecas de RNA-Seq

A extração foi realizada a partir do tecido radicular utilizando o método CTAB-Acetato, conforme descrito por Zhao *et al.* (2012). O RNA obtido foi tratado com DNase para a remoção de contaminantes genômicos e, em seguida, submetido ao controle de qualidade para averiguar a concentração, pureza e integridade do RNA em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (*ThermoFisher Scientific*), fluorímetro Qubit® (*Life Technologies*) e Bioanalyser (*Agilent Technologies*), respectivamente.

As amostras de RNA purificado foram encaminhadas ao Centro de Genômica Funcional da ESALQ/USP, onde foram realizadas a construção das bibliotecas de RNA-Seq e o sequenciamento na plataforma HiSeq 2500 V4 (Illumina), no modo *paired-end*, com leitura de 2 × 100 pb. A montagem do transcriptoma de referência foi conduzida utilizando o software Trinity, enquanto a análise de expressão diferencial dos genes foi realizada com os programas EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) e DESeq2 (Love *et al.*, 2014).

Análise da duplicação gênica e predição de elementos regulatórios

Para investigar os eventos de duplicação gênica dos genes *SsDHNs*, utilizou-se a ferramenta *MCScanX* (Wang *et al.*, 2012), utilizando como arquivo de entrada o GFF do proteoma de *S. scabra*. A classificação dos genes duplicados foi realizada por meio do script *Duplicate_gene_classifier*, que distribuiu os pares gênicos em cinco categorias: segmentares, tandem, proximais, dispersos e transpostos.

Para os pares classificados como segmentares, foram estimados os valores de K_a e K_s utilizando o script *add_kaks_to_synteny.pl*. No caso dos genes duplicados em tandem, empregou-se um pipeline em Python que envolveu a tradução das sequências CDS com a ferramenta *transeq*, alinhamento com *MAFFT*, conversão com *pal2nal.pl* e, por fim, o cálculo dos índices evolutivos através do *KaKs_Calculator*. Os resultados foram compilados em planilhas, possibilitando a inferência da pressão seletiva atuante sobre os pares duplicados.

Além disso, as sequências promotoras dos genes *SsDHN*, correspondentes a 2000 pb a montante das regiões codificadoras, foram extraídas do genoma de *S. scabra* com o software *TBTools*. A predição dos elementos regulatórios foi conduzida via funcionalidade "*Binding Site Prediction*" da plataforma *PlantRegMap* (Tian *et al.*, 2020), acessível em <http://plantregmap.gao-lab.org>, tendo *Arachis duranensis* como espécie de referência. A filtragem dos fatores de transcrição foi realizada com base em critérios estatísticos rigorosos, adotando valores de *p-value* e *q-value* inferiores a 0,05.

Perfil de expressão via RNA-Seq e desenho de *primers*

O perfil de expressão diferencial dos dados de RNA-Seq foi baseado na análise dos valores de $\log_2$ *Fold Change* ($\log_2FC$) dos transcritos isolados de cada biblioteca/tratamento a partir das análises via *EdgeR*, sendo considerados diferencialmente expressos aqueles com $\log_2FC > +1$ ou < -1 ($p\text{-value} \leq 0.05$).

Para a validação por qPCR, os *primers* foram desenhados utilizando o programa *Primer3 Plus* (Untergasser *et al.*, 2007), configurado com os seguintes parâmetros: conteúdo de GC de aproximadamente 50%, tamanho do amplicon entre 70 e 150 pares de bases (bp), temperatura de melting (T_m) variando de 40 °C a 60 °C, e posicionamento preferencial na região de junção exon-exon. A especificidade dos *primers* foi verificada por meio da ferramenta *Primer-BLAST*, disponível no NCBI

(Ye *et al.*, 2012), utilizando o RefSeq de mRNA de *Arachis hypogaea* (taxid:3818) (Tabela S1).

RESULTADOS

Identificação e caracterização dos genes *SsDHN*

Foram identificados oito genes candidatos a *DHNs* no proteoma predito de *Stylosanthes scabra*, destes, apenas três continham domínios conservados, enquanto os demais exibiam quebras na região terminal-N. As proteínas identificadas foram designadas como *SsDHN1* a *SsDHN8*, seguindo a nomenclatura estabelecida por Campbell e Close (1997) para genes *DHN*.

O comprimento das sequências *SsDHN* variou de 146 a 240 aminoácidos. O peso molecular (p.M) das proteínas preditas variou de 15,39 (*SsDHN7*) a 25,94 kDa (*SsDHN2*). O ponto isoelétrico (p.I) apresentou valores entre 5,7 (*SsDHN4*) e 8,0 (*SsDHN5* e *SsDHN7*), sugerindo que algumas dessas proteínas tem um caráter mais ácido (*SsDHN1*, *SsDHN2*, *SsDHN4* e *SsDHN6*) enquanto outras são consideradas alcalinas (*SsDHN3*, *SsDHN5*, *SsDHN7* e *SsDHN8*) (Tabela 1). A análise preditiva da localização subcelular indicou que a maioria das *SsDHN* possui potencial para estar distribuída na região extracelular e intracelular (citoplasma).

Tabela 1. Características das proteínas *DHNs* em *Stylosanthes scabra*.

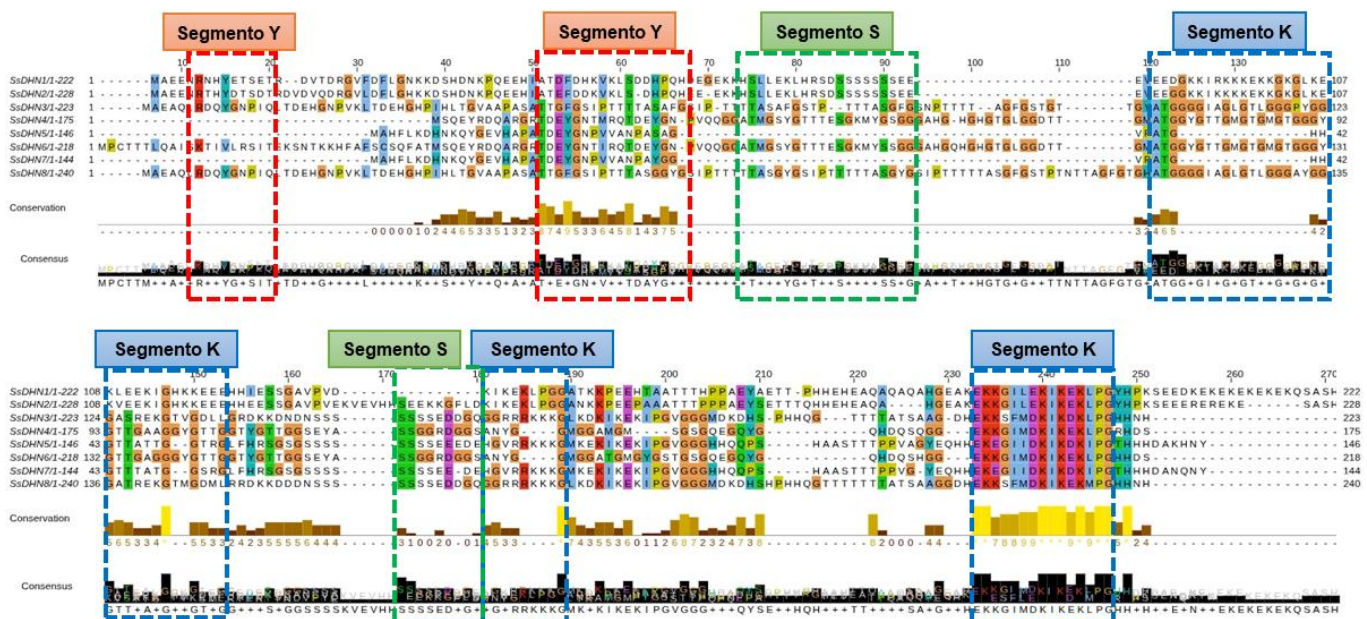
ID	Comprimento	P.M (Kda)	P.I.	Localização Subcelular	SubClasse
<i>SsDHN1</i>	222	25,27	6,1	Citoplasma	SK3
<i>SsDHN2</i>	228	25,94	5,9	Citoplasma	SK3
<i>SsDHN3</i>	223	22,49	7,9	Extracelular	YSK
<i>SsDHN4</i>	175	17,23	5,7	Extracelular	YSK
<i>SsDHN5</i>	146	15,57	8	Extracelular/ Citoplasma	YSK
<i>SsDHN6</i>	218	21,89	6,7	Extracelular	YSK
<i>SsDHN7</i>	144	15,39	8	Extracelular	YSK
<i>SsDHN8</i>	240	24,3	7,9	Extracelular	YSK

Fonte: Leonardo (2025)

Alinhamento múltiplo de sequências

A partir do alinhamento múltiplo de sequências, foi possível identificar os três motivos típicos das proteínas desidrina: segmentos Y, S e K. O segmento K esteve presente em todas as sequências, com três cópias nas proteínas *SsDHN1* e *SsDHN2*, e apenas uma cópia nas demais. O segmento S ocorreu em todas as sequências, com cópia única. Já o segmento Y foi encontrado nas proteínas *SsDHN3* a *SsDHN8*, com uma única cópia e localizado na parte inicial da sequência. Com base na combinação desses motivos, quatro proteínas (*SsDHN3* a *SsDHN8*) foram classificadas como do subtipo YnSKn, enquanto *SsDHN1* e *SsDHN2* foram classificadas como SKn (Figura 1).

Figura 1. Alinhamento de múltiplas sequências de aminoácidos *SsDHN*, utilizando o ClustalW no MEGA 11. As sequências de aminoácidos conservadas são indicadas em caixas vermelhas para o segmento Y; verde para o segmento S; e azul para o segmento K.



Fonte: Leonardo (2025)

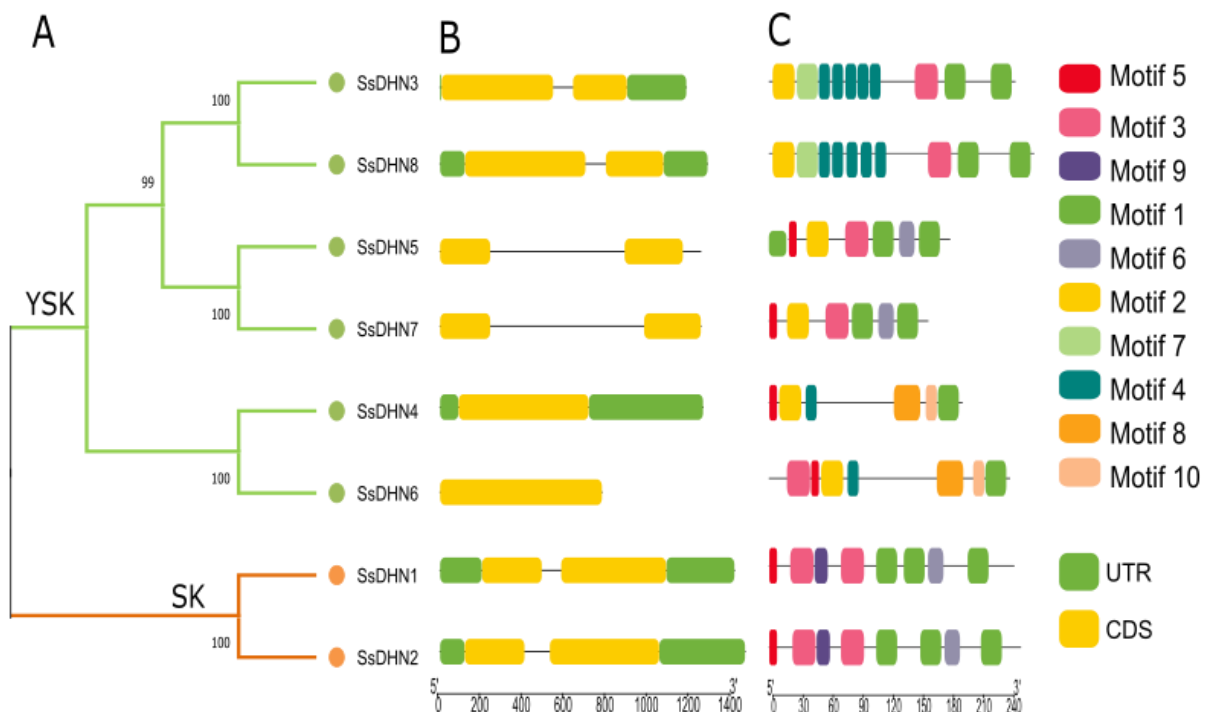
Análise fenética, estrutura gênica e motivos conservados

Na Figura 2A, observa-se o agrupamento das oito proteínas *SsDHN* com base na similaridade de sequência e na presença de motivos conservados, resultando na formação de dois grupos principais: os tipos YnSKn e SKn. Seis genes (*SsDHN3* a *SsDHN8*) foram classificados como pertencentes ao tipo YnSKn,

caracterizado pela presença do motivo Y além dos segmentos S e K. Por outro lado, dois genes (*SsDHN1* e *SsDHN2*) foram agrupados no tipo SKn, apresentando apenas os motivos S e K, sem o motivo Y.

A análise da estrutura gênica dos genes *SsDHN* revelou que a maioria apresentou dois éxons e duas regiões UTR, com íntrons presentes em seis dos oito genes, exceto em *SsDHN4* e *SsDHN6*, que eram isentos. Destaca-se os genes *SsDHN5*, *SsDHN6* e *SsDHN7*, que apresentaram apenas regiões codificantes (éxons), sem interrupções por íntrons (Figura 2B). A análise de motivos revelou que a maioria dos membros compartilha, de forma semelhante em quantidade e distribuição, pelo menos 3 motivos em comum (motivo 1, 2, 3 e 5). O motivo 2 foi encontrado exclusivamente nos membros da subClasse YnSKn, enquanto o motivo 9 estava presente apenas na subClasse SKn. Já o motivo 4 foi identificado unicamente nos genes *SsDHN3* e *SsDHN8* (Figura 2C).

Figura 2. Análise das proteínas e genes *SsDHN*. (A) Agrupamento fenético das proteínas baseado na similaridade das sequências e na presença de motivos conservados. (B) Estrutura gênica dos genes, com exibição dos éxons (em amarelo), regiões UTR (em verde) e íntrons (representados por linhas pretas). (C) Identificação e distribuição dos motivos conservados nas diferentes proteínas *SsDHN*.

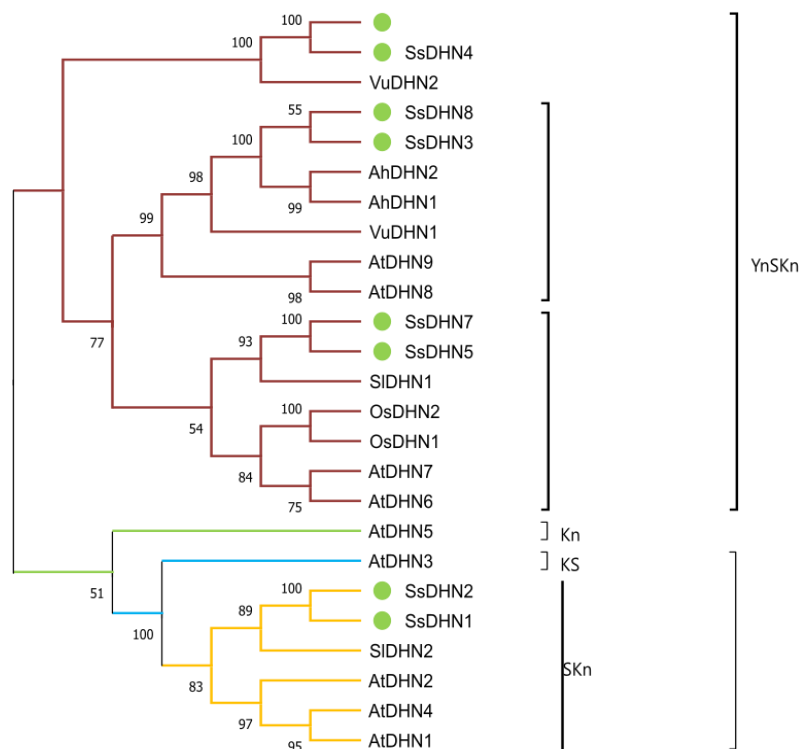


Fonte: Leonardo (2025)

Para analisar as relações fenéticas entre os genes *SsDHN* e os genes de *Arabidopsis* (*AtDHN1* a *AtDHN9*), feijão-caupi (*VuDHN1* e *VuDHN2*), amendoim

(AhDHN1 e AhDHN2), arroz (OsDHN1 e OsDHN2) e tomate (SlDHN1 e SlDHN2), foi construída uma árvore fenética das proteínas desidrina. Os resultados mostraram que a árvore pode ser dividida em clados distintos com base nos motivos. *Arabidopsis* apresentou 4 dos 5 subtipos de *DHN*, enquanto as outras espécies apresentaram apenas dois tipos, o YnSKn e SKn. Esta análise revelou que a SsDHN6 e SsDHN4 estavam mais próximas do feijão-caupi, enquanto a SsDHN7, SsDHN5, SsDHN1 e SsDHN2 estavam mais próximas do tomate (Figura 3).

Figura 3. Análise fenética de proteínas desidrina de *Stylosanthes scabra* (SsDHNs); *Arabidopsis thaliana* (AtDHNs); *Vigna unguiculata* (VuDHNs); *Arachis hypogaea* (AhDHNs); *Oryza sativa* (OsDHNs) e *Solanum lycopersicum* (SlDHNs).



Fonte: Leonardo (2025)

Análise de eventos de duplicação gênica, pressão seletiva e predição de fatores de transcrição regulatórios dos genes *SsDHN*

Os eventos de duplicação gênica foram analisados com o intuito de compreender os padrões evolutivos dos oito genes da família *DHN* (*SsDHN1* a

SsDHN8) em *Stylosanthes scabra*. Os resultados indicaram a ausência de duplicações em tandem. No entanto, os genes *SsDHN1*, *SsDHN2*, *SsDHN3* e *SsDHN8* originaram-se de eventos de duplicação segmentar, sugerindo que esse mecanismo foi o principal responsável pela expansão da família gênica *DHN* na espécie.

Para investigar as pressões seletivas atuantes sobre os genes duplicados por duplicação segmentar, foram analisadas as relações Ka/Ks. Os pares gênicos *SsDHN1/SsDHN2* e *SsDHN3/SsDHN8* apresentaram valores de Ka/Ks de 0,299016 e 0,240654, respectivamente. Como esses valores são inferiores a 1, os resultados indicam que os genes passaram por pressão de seleção purificadora após os eventos de duplicação (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de duplicação cromossômica de *SsDHN*

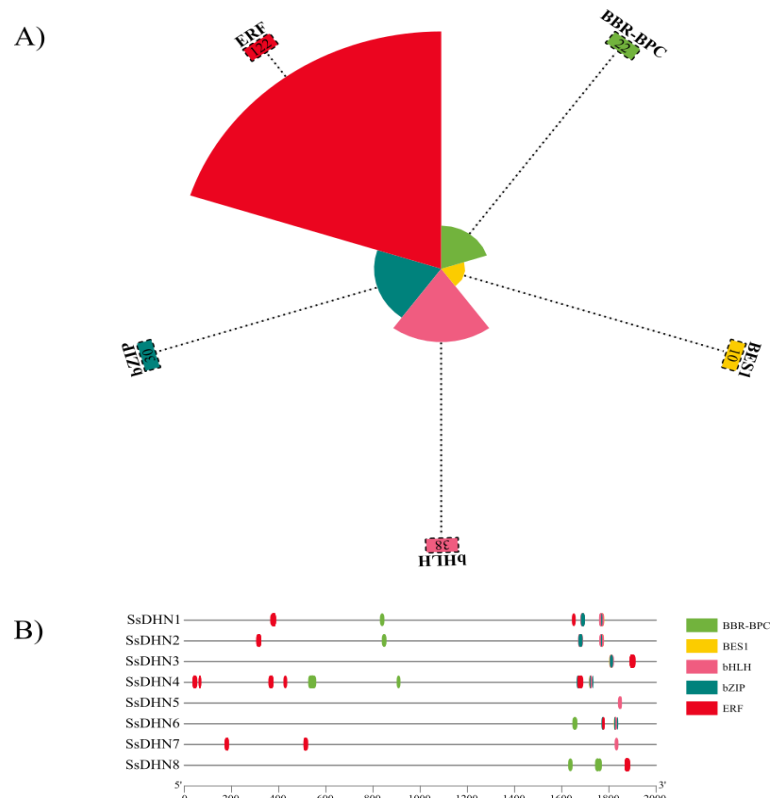
Gene 1	Gene2	ka	ks	ka/ks	Pressão de seleção
<i>SsDHN1</i>	<i>SsDHN2</i>	0,053792706	0,179898965	0,299016207	Seleção purificadora
<i>SsDHN3</i>	<i>SsDHN8</i>	0,051923844	0,215761554	0,240653827	Seleção purificadora

Fonte: Leonardo (2025)

A partir de análises realizadas no banco de dados PlantRegMap, utilizando *Arachis duranensis* como espécie de referência, foram identificadas 17 famílias de fatores de transcrição (FTs) com potencial para regular os genes desidrina em *S. scabra*. Dentre essas, destacaram-se as famílias ERF, bHLH, bZIP, BBR-BPC e BES1.

As famílias ERF, bHLH e bZIP apresentaram os maiores números de sítios de ligação nos promotores dos genes *SsDHN*, com 122, 38 e 30 sítios identificados, respectivamente. A família ERF e bHLH estavam amplamente distribuídas, sendo detectada nos promotores de sete genes *SsDHN*, com exceção de *SsDHN5* e *SsDHN8*, respectivamente. Já a família bZIP estava presente apenas em cinco genes *SsDHN1*, *SsDHN2*, *SsDHN3*, *SsDHN4* e *SsDHN6* (Figura 5).

Figura 4. Representação esquemática dos fatores de transcrição dos genes *SsDHN* de *Stylosanthes scabra*. (A) Proporção das famílias de fatores de transcrição identificadas. (B) Distribuição dos sítios de ligação nas regiões promotoras, com cores indicando cada família.



Fonte: Leonardo (2025)

Resposta Transcricional da Família *SsDHN* Frente ao Estresse Hídrico

O perfil de expressão obtido a partir dos dados transcriptômicos da biblioteca de 24 horas revelou que cinco genes *SsDHN* apresentaram expressão constitutiva, enquanto dois genes, *SsDHN2* e *SsDHN3*, exibiram expressão diferencial induzida, com valores significativamente aumentados de $\log_2FC = 5,3$ para *SsDHN2* e $\log_2FC = 5,4$ para *SsDHN3*. Esses resultados indicam a possível participação desses genes na resposta de *Stylosanthes scabra* ao déficit hídrico.

DISCUSSÃO

As desidrinas (*DHNs*) são proteínas essenciais nas respostas das plantas a estresses abióticos, atuando na proteção celular. Pertencentes à família LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), essas proteínas já foram amplamente estudadas em diferentes espécies vegetais. Os genes *DHN* compreendem uma família multigênica com 10 membros em *Arabidopsis thaliana* (Bies-Etheve *et al.*, 2008; Hundertmark e

Hincha, 2008), oito membros em arroz (*Oryza sativa*; Verma *et al.*, 2017), 13 membros em cevada (*Hordeum vulgare*; Tommasini *et al.*, 2008), nove em maçã (*Malus domestica*; Liang *et al.*, 2012), sete em pêra (*Pyrus spp.*; Hussain *et al.*, 2015), quatro em uva (*Vitis vinifera*; Ibrahim *et al.*, 2019) e cinco em tomate (*Solanum lycopersicum*; Cao & Li, 2015). No presente estudo, foram identificados oito genes *SsDHN* em *Stylosanthes scabra*, número compatível com o registrado na maioria das espécies vegetais.

Com base na classificação estrutural proposta para as desidrinases, esses genes foram agrupados em dois dos cinco subgrupos descritos na literatura: SKn e YnSKn (Close, 1996; 1997). Dentre os oito genes, seis foram classificados como do tipo YnSKn, sendo três pertencentes ao subtipo YSK2 (*SsDHN5*, *SsDHN6* e *SsDHN7*), dois ao subtipo YSK3 (*SsDHN3* e *SsDHN8*) e um ao tipo YSK (*SsDHN4*). Os dois genes restantes (*SsDHN1* e *SsDHN2*) foram classificados como do tipo SKn, com *SsDHN1* pertencendo ao subtipo SK2 e *SsDHN2* pertencendo ao subtipo SK (Tabela 1). Os subtipos Kn, KnS e YnKn não foram identificados. Um padrão semelhante foi observado em kiwi e pimenta, indicando que esses subtipos podem ter sido perdidos ao longo da evolução (Zang *et al.*, 2021; Jing *et al.*, 2016). O predomínio dos subgrupos YnSKn e SKn em *S. scabra* pode refletir um padrão adaptativo, uma vez que esses subtipos são associados a respostas rápidas e eficazes ao déficit hídrico, conferindo maior proteção celular sob condições severas de seca.

Na literatura, há evidências de que as desidrinases ácidas são fosforiladas pela caseína quinase II e outras quinases no segmento S, promovendo sua translocação do citoplasma para o núcleo. Em *Arabidopsis*, as *DHNs* ácidas fosforiladas, como COR47, ERD10 e ERD14, se ligam mais eficientemente a íons de cálcio que suas formas não fosforiladas (Heyen *et al.*, 2002; Alsheikh *et al.*, 2003, 2005). Além disso, desidrinases podem se ligar a outros íons, auxiliando na atenuação da toxicidade iônica associada ao estresse (Bassett *et al.*, 2015). No presente trabalho, observou-se que algumas *DHNs* de *S. scabra* são ácidas (*SsDHN1*, *SsDHN2*, *SsDHN4* e *SsDHN6*) e todas apresentam o segmento S. Essa capacidade de interação com íons, especialmente em ambientes semiáridos caracterizados por solos salinos e déficit hídrico, pode representar uma vantagem adaptativa relevante para *S. scabra*, reduzindo o impacto osmótico e preservando a estabilidade celular.

Em relação à localização subcelular, os genes *DHN* do trigo-pão foram detectados no citoplasma e núcleo (Hao *et al.*, 2022), enquanto no kiwi, essas

proteínas localizaram-se preferencialmente no núcleo (Zang *et al.*, 2021). Na uva, as proteínas LEA foram predominantemente encontradas em compartimentos intracelulares como núcleo, mitocôndria e citoplasma, além de algumas no meio extracelular (Ibrahim *et al.*, 2019). No presente estudo, os genes *SsDHN* mostraram-se direcionados majoritariamente para o citoplasma e meio extracelular, indicando que essas proteínas podem estar atuando na percepção e mitigação dos efeitos do estresse hídrico.

A análise da estrutura gênica dos *SsDHN* mostrou que, em sua maioria, os genes apresentaram dois éxons e duas regiões UTR, com íntrons presentes em seis dos oito membros da família, exceto *SsDHN4* e *SsDHN6*. Destacam-se os *SsDHN5*, *SsDHN6* e *SsDHN7*, compostos exclusivamente por regiões codificantes, sem interrupção por íntrons. Essas variações estruturais podem refletir diferentes mecanismos de regulação transcricional e funcional da família *SsDHN*. Segundo Zang *et al.* (2021), genes dos subtipos SKn e YnSKn tendem a conter apenas um íntron, e essa característica está relacionada à produção de transcritos mais curtos, o que pode conferir maior agilidade e eficiência na resposta celular frente a variações rápidas no ambiente, como déficit hídrico (Zang *et al.*, 2021). Essa diferença estrutural pode representar uma vantagem adaptativa relevante para a espécie, ao possibilitar uma resposta plástica e eficiente frente ao estresse hídrico.

A árvore fenética construída a partir das proteínas *DHN* de *S. scabra*, *Arabidopsis*, feijão-caupi, amendoim, arroz e tomate evidenciou que o número de genes variou entre as espécies, com exceção de *Arabidopsis*, que apresentou nove genes, todas as demais possuíam dois genes. *SsDHN6* e *SsDHN4* agruparam-se com *VuDHN2* (feijão-caupi), *SsDHN7* e *SsDHN5* com *SlDHN1* (tomate) e *SsDHN1* e *SsDHN2* com *SlDHN2*. Esses agrupamentos sugerem uma maior proximidade genética entre *S. scabra*, tomate e feijão-caupi. Na literatura, estudos indicam que as desidrinas em pepino apresentam relações filogenéticas mais próximas com os *DHNs* de *Arabidopsis* e tomate, reforçando a conservação evolutiva desses genes entre espécies dicotiledôneas (Zhou *et al.*, 2018). Essa proximidade pode ser explorada para estudos comparativos funcionais e biotecnológicos visando transferência de características de tolerância ao estresse abiótico entre espécies geneticamente relacionadas.

Quanto aos mecanismos evolutivos, duplicações em tandem e segmentares são os principais responsáveis pela expansão da família *DHN*. Em *A. thaliana*, três

dos dez genes *DHN* surgiram por duplicação em tandem e três por duplicação segmentar (Hundertmark & Hinch, 2008). Em *Populus trichocarpa*, dois e três, respectivamente, dos onze genes *DHN*, originaram-se desses processos (Liu *et al.*, 2012). No tomate, dos seis genes *DHN*, apenas um par apresentou relação de paralogia (Cao & Li, 2015), e na uva, que possui quatro genes *DHN*, não foram observadas duplicações (Yang *et al.*, 2012). No presente estudo, *SsDHN1*, *SsDHN2*, *SsDHN3* e *SsDHN8* derivaram de eventos de duplicação segmentar, sem evidências de duplicações em tandem. Esse padrão sugere que as duplicações segmentares foram o principal mecanismo de expansão da família *DHN* em *S. scabra*. Contudo, os resultados evidenciaram a atuação da seleção purificadora, indicando que não houve alteração de função, o que possivelmente garante redundância funcional e permite a diversificação adaptativa dos genes sob pressão seletiva em ambientes secos.

As famílias de fatores de transcrição bZIP, AP2/ERF e bHLH desempenham papéis essenciais na regulação da resposta das plantas a estresses abióticos. A família bZIP está envolvida na via dependente do ácido abscísico (ABA), interagindo com o elemento cis-regulador ABRE para modular a expressão gênica relacionada ao estresse (Allagulova *et al.*, 2003). A família AP2/ERF, por sua vez, é caracterizada por um domínio altamente conservado e inclui os fatores DREBs, que ativam genes responsivos ao estresse por meio da ligação ao elemento DRE/CRT nos promotores (Mizoi *et al.*, 2012). Um exemplo específico é o ERF4 do trigo, que atua como regulador positivo do gene da desidrina *Cor410b* em resposta ao estresse pelo frio (Eini *et al.*, 2013). Já a família bHLH, a segunda maior superfamília de fatores de transcrição em plantas, exerce um papel complexo e fundamental no crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas a condições ambientais adversas (Xue *et al.*, 2023). A identificação dessas três famílias associadas aos genes *SsDHN* em nosso estudo reforça a importância das desidrinas na resposta eficiente ao estresse abiótico em *Stylosanthes scabra*, evidenciando a complexidade e a integração dos mecanismos regulatórios envolvidos.

Por fim, os padrões de expressão gênica são essenciais para a compreensão funcional de genes envolvidos em respostas ao estresse abiótico. Diversos estudos mostraram elevada expressão de *DHNs* em tecidos vegetativos de espécies como maçã (Liang *et al.*, 2012), pimenta (Jing *et al.*, 2016) e arroz (Verma *et al.*, 2017), reforçando o papel desses genes na tolerância ao estresse. Neste estudo, os dados de RNA-Seq indicaram que a maioria dos genes *SsDHN* apresentou expressão

constitutiva, porém dois genes, *SsDHN2* e *SsDHN3*, destacaram-se por exibirem expressão induzida. O significativo aumento na expressão desses dois genes após 24 horas de déficit hídrico, sugere que eles podem atuar como genes de resposta rápida ao estresse em *S. scabra*, sendo potenciais candidatos para uso como marcadores moleculares em programas de melhoramento de leguminosas forrageiras tolerantes à seca.

CONCLUSÃO

Nosso estudo disponibilizou informações inéditas sobre a identificação e caracterização de oito genes desidrina (*SsDHN*) no genoma de *S. scabra*, pertencentes à subfamília LEA, majoritariamente classificados nos grupos YnSKn e SKn. Pela primeira vez, relatamos o padrão de expressão desses genes via RNA-Seq em resposta ao estresse hídrico. A indução específica de *SsDHN2* e *SsDHN3* sugere que esses membros atuam como elementos-chave na resposta inicial ao déficit hídrico, participando da manutenção do turgor celular, controle de ROS e estabilização proteica. A presença de elementos cis-regulatórios para fatores de transcrição como ERF, bZIP e bHLH indica que os *SsDHNs* estão integrados a redes de sinalização do estresse abiótico. Eventos de duplicação gênica e a conservação sob pressão seletiva purificadora reforçam a relevância funcional desses genes para a adaptação de *S. scabra* a ambientes semiáridos.

Entretanto, os perfis de expressão ainda requerem validação por qPCR. Nossos resultados oferecem um novo painel de genes candidatos com potencial biotecnológico para programas de melhoramento genético, além de contribuir com a compreensão dos mecanismos moleculares que conferem tolerância à seca em leguminosas.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1. Sequência dos *primers*

ID	<i>Primers (Reverse)</i>	<i>Primers (Reverse)</i>
SsDHN1	TTCCTGGTTATCACCCCAAG	AAGCAGACAGAAGCATGAGG
SsDHN2.1	GGTGCTAACAGAAGCCTGAG	TTTCTTTTCCTTGGCCTCAC
SsDHN2.2	AGGAGAAGATAGGTCACAAG	CTTCTCAACTGGAAGTGC
SsDHN2.3	GAAGGGGAAAGGATTGAAGG	CTCAACTGGAAGTGCACCAC
SsDHN3	ACGAGACCAATATGGCAACC	GGCCATGCTCGTCAGTTAG
SsDHN4	ATCAAGCTCGTGGAAGAACC	GAACTGGGTTTCCGTACTCG
SsDHN5	TTATGGAGGAATGGGTGGAG	TCTCACCTCCATGAGACTGG

Fonte: Leonardo (2025)

REFERÊNCIAS

1. AGARWAL, P. K. *et al.* Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1263-1274, 2006.
2. ALSHEIKH, M. K.; HEYEN, B. J.; RANDALL, S. K. Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 42, p. 40882-40889, 2003.
3. ALSHEIKH, M. K.; SVENSSON, J. T.; RANDALL, S. K. Phosphorylation regulated ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. **Plant, Cell & Environment**, v. 28, n. 9, p. 1114-1122, 2005.
4. ALVES, M. C. S. Caracterização estrutural e expressão diferencial de TLPs (Thaumatococcus-like Proteins) em duas leguminosas da Caatinga sob estresses abióticos. 2021.
5. AZANI, Nasim *et al.* A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017.
6. BARCELLOS, A. De O. *et al.* Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 51-67, 2008.
7. BATTAGLIA, M. *et al.* The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 6-24, 2008.
8. 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.
9. CAO, J.; LI, X. Identification and phylogenetic analysis of *Late Embryogenesis Abundant Proteins* family in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Planta**, v. 241, p. 757-772, 2015.
10. CAMPBELL, S. A.; CLOSE, T. J. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *The New Phytologist*, v. 137, n. 1, p. 61-74, 1997.
11. CAMERON D. F., CHAKRABORTY S. Forage potential of *Stylosanthes* in different production systems. In: Chakraborty C, ed. High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems. **Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research**, 27-38, 2004.

12. CASARETTO, J. A. *et al.* Expression of OsMYB55 in maize activates stress-responsive genes and enhances heat and drought tolerance. **BMC genomics**, v. 17, p. 1-15, 2016.
13. CHANDRA, A., PATHAK, P. S & BHATT, R. K. Stylophone research in India: Future prospects and challenges. **Current Science**, 90, 915-921, 2006.
14. CHEN, C. *et al.* TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. **Molecular plant**, v. 13, n. 8, p. 1194-1202, 2020.
15. CLOSE, T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia plantarum**, v. 97, n. 4, p. 795-803, 1996.
16. CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 291-296, 1997.
17. DUC, G. *et al.* Breeding annual grain legumes for sustainable agriculture: new methods to approach complex traits and target new cultivar ideotypes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 381-411, 2015.
18. GALAU, G. A.; HUGHES, D. W.; DURE III, L. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. **Plant molecular biology**, v. 7, n. 3, p. 155-170, 1986.
19. HAO, Y. *et al.* Genome-wide survey of the dehydrin genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) and its relatives: identification, evolution and expression profiling under various abiotic stresses. **BMC genomics**, v. 23, n. 1, p. 73, 2022.
20. HALDER, T.; AGARWAL, T.; RAY, S. Isolation, cloning, and characterization of a novel Sorghum dehydrin (SbDHN2) protein. **Protoplasma**, v. 253, n. 6, p. 1475-1488, 2016.
21. HEYEN, B. J. *et al.* The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. **Plant Physiology**, v. 130, n. 2, p. 675-687, 2002.
22. HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.
23. HUSSAIN, S. *et al.* Genome-wide identification, characterization, and expression analysis of the dehydrin gene family in Asian pear (*Pyrus pyrifolia*). **Tree Genetics & Genomes**, v. 11, p. 1-11, 2015.
24. İBRAHİME, M. *et al.* Genome-wide identification of the LEA protein gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Tree Genetics & Genomes**, v. 15, p. 1-14, 2019.
25. JING, H. *et al.* Genome-wide identification, expression diversification of dehydrin gene family and characterization of CaDHN3 in pepper (*Capsicum annuum* L.). **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0161073, 2016.
26. KIM, E. C.; LEE, H. Shin; CHOI, D. Sequence variability and expression pattern of the dehydrin gene family in '*Populus tremula*'x'*Populus alba* var. glandulosa'. **Plant Omics**, v. 5, n. 2, p. 122-127, 2012.
27. LABHILILI, M.; JOUDRIER, P.; GAUTIER, M. Characterization of cDNAs encoding Triticum durum dehydrins and their expression patterns in cultivars that differ in drought tolerance. **Plant Science**, v. 112, n. 2, p. 219-230, 1995.
28. LIANG, D. *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of dehydrin gene family in *Malus domestica*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 10759-10768, 2012.
29. LIMA, S. C. B. Da S. Caracterização proteômica e identificação de proteínas em *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/39646>>. Acesso em: 29 jun. 2025.
30. LIU, Chang-Cai *et al.* Genome-wide identification and characterization of a dehydrin gene family in poplar (*Populus trichocarpa*). **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 30, n. 4, p. 848-859, 2012.
31. LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome biology**, v. 15, p. 1-21, 2014.
32. MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.

33. 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**, v. 122, n. 7, p. 1143-1159, 2018.
34. MUNDY, J.; CHUA, Nl. Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 8, p. 2279-2286, 1988.
35. RIYAZUDDIN, R. *et al.* Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 3, p. 519-533, 2022.
36. ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139-140, 2010.
37. SAAVEDRA, Laura *et al.* A dehydrin gene in *Physcomitrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. **The Plant Journal**, v. 45, n. 2, p. 237-249, 2006.
38. SINGH, M. *et al.* Insights into the Multifaceted Roles of Soil Microbes in Mitigating Abiotic Stress in Crop Plants: A Review. **Environmental and Experimental Botany**, p. 106010, 2024.
39. SZLACHTOWSKA, Z.; RUREK, M. Plant dehydrins and dehydrin-like proteins: characterization and participation in abiotic stress response. *Frontiers in Plant Science*, v. 14, p. 1213188, 2023.
40. TOMMASINI, L. *et al.* Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of barley (*Hordeum vulgare* L.). **Functional & integrative genomics**, v. 8, p. 387-405, 2008.
41. TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 10, p. 791-812, 2007.
42. UNTERGASSER, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic acids research**, v. 35, n. suppl_2, p. W71-W74, 2007.
43. YANG, Y. *et al.* 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**, v. 12, n. 1, p. 140, 2012.
44. YANG, Z. *et al.* Y2SK2 and SK3 type dehydrins from *Agapanthus praecox* can improve plant stress tolerance and act as multifunctional protectants. **Plant Science**, v. 284, p. 143-160, 2019.
45. YE, Jian *et al.* Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.
46. VERMA, G. *et al.* Genome-wide analysis of rice dehydrin gene family: Its evolutionary conservedness and expression pattern in response to PEG induced dehydration stress. **PLoS One**, v. 12, n. 5, p. e0176399, 2017.
47. WANG, Jiyao *et al.* The conserved domain database in 2023. **Nucleic acids research**, v. 51, n. D1, p. D384-D388, 2023.
48. ZHANG, J. *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of the dehydrin gene family in *Actinidia chinensis*. **Scientia Horticulturae**, v. 280, p. 109930, 2021.
49. ZHAO, L. *et al.* An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. **Phytochemical Analysis**, v. 23, n. 6, p. 647-650, 2012.

5. CONCLUSÕES GERAIS

- I. Foram identificados oito genes codificantes de desidrina (*SsDHNs*) no proteoma conceitual de *Stylosanthes scabra*, classificados em dois subgrupos estruturais (SKn e YnSKn).
- II. A duplicação segmentar foi o principal mecanismo de expansão da família DHN, com pares gênicos sob seleção purificadora, indicando conservação funcional.
- III. A predominância de desidrinas do tipo YnSKn sugere especialização evolutiva para resposta rápida à seca, favorecendo a estabilidade celular.
- IV. Fatores de transcrição das famílias ERF, bHLH e bZIP foram preditos nos promotores dos *SsDHNs*, demonstrando integração em redes regulatórias relacionadas ao estresse hídrico.
- V. RNA-Seq mostrou expressão constitutiva na maioria dos *SsDHNs*, com destaque para *SsDHN2* e *SsDHN3*, fortemente induzidos após 24 horas de déficit hídrico.
- VI. A confirmação por qPCR dos genes diferencialmente expressos é essencial para validar a funcionalidade dos *SsDHNs* na aclimação molecular à seca.
- VII. *SsDHN2* e *SsDHN3* se apresentam como candidatos promissores para uso em programas de melhoramento genético de leguminosas tolerantes à seca.

REFERÊNCIAS

- ABEDINI, R. *et al.* Plant dehydrins: shedding light on structure and expression patterns of dehydrin gene family in barley. **Journal of Plant Research**, v. 130, p. 747-763, 2017.
- AGARWAL, P. K. *et al.* Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. **Plant Cell Reports**, v. 25, p. 1263-1274, 2006.
- ALVES, M. C. S. Caracterização estrutural e expressão diferencial de TLPs (Thaumatin-Like Proteins) em duas leguminosas da Caatinga sob estresses abióticos. 2021.
- ALLAGULOVA, Ch R. *et al.* The plant dehydrins: structure and putative functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 9, p. 945-951, 2003.
- AMARA, I. *et al.* Insights into *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) proteins in plants: from structure to the functions. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, n. 22, p. 3440-3455, 2014.
- ARAUJO, G. G. L. *et al.* Diferentes níveis de feno de manicoba, na alimentacao de ovinos: digestibilidade e desempenho animal. 2000. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/134015>>. Acesso em: 6 ago. 2025
- ARAÚJO FILHO, J. A. Propuestas tecnológicas para el manejo de la vegetación de la caatinga con fines pastoriles. **La producción de rumiantes menores en las zonas áridas de Latinoamérica**, p. 281-294, 2013.
- AZANI, N. *et al.* A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny: The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). **TAXON**, 2017. v. 66, n. 1, p. 44–77.
- BARCELLOS, A. O. *et al.* Potencial e uso de leguminosas forrageiras dos gêneros *Stylosanthes*, *Arachis* e *Leucaena*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DE PASTAGEM, 17, 2000, Piracicaba. A planta forrageira no sistema de produção: anais. **Piracicaba: FEALQ**, 2000. 2. ed. p. 297-357, 2001.
- BARCELLOS, A. De O. *et al.* Sustentabilidade da produção animal baseada em pastagens consorciadas e no emprego de leguminosas exclusivas, na forma de banco de proteína, nos trópicos brasileiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 51-67, 2008.
- BARROS, Agnes Angélica Guedes de. Caracterização estrutural, funcional e diversidade de osmoprotetores no transcriptoma de *Stylosanthes scabra* (Vogel) sob déficit hídrico. 2019. Disponível em: <<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede2/handle/tede2/9507>>. Acesso em: 29 jun. 2025.
- BARTELS, D.; SUNKAR, R. AND. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. October 2011, p. 23–58, 2005.

- BATTAGLIA, M. *et al.* The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. **Plant Physiology**, v. 148, n. 1, p. 6-24, 2008.
- BATTAGLIA, M & COVARRUBIAS, A. A. *Late Embryogenesis Abundant* (LEA) proteins in legumes. **Frontiers in Plant Science**, 2013.
- 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. 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.
- BIES-ETHÈVE, N. *et al.* Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v. 67, n. 1–2, p. 107–124, 2008.
- BITTENCOURT, P. P.; SILVA, L. N. N. S. Estresse hídrico em plantas: aspectos morfofisiológicos, adaptações e mecanismos de resposta. In: VIII Botânica no Inverno 2018/ Org. Aline Possamai Della [*et al.*]. - São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, p. 275, 2018.
- CAO, J.; LI, X. Identification and phylogenetic analysis of *Late Embryogenesis Abundant Proteins* family in tomato (*Solanum lycopersicum*). **Planta**, v. 241, p. 757-772, 2015.
- CAMERON D. F., CHAKRABORTY S. Forage potential of *Stylosanthes* in different production systems. In: Chakraborty C, ed. High-yielding anthracnose-resistant *Stylosanthes* for agricultural systems. Canberra, Australia: Australian Centre for International Agricultural Research, 27–38, 2004.
- CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. *Stylosanthes* (Leguminosae, Dalbergieae) of Venezuela. **Willdenowia**, v. 40, n. 2, p. 305, 2010.
- CAMPBELL, S A.; CLOSE, T. J. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. **The New Phytologist**, v. 137, n. 1, p. 61-74, 1997.
- CASARETTO, J. A. *et al.* Expression of OsMYB55 in maize activates stress-responsive genes and enhances heat and drought tolerance. **BMC genomics**, v. 17, p. 1-15, 2016.
- COSTA, L. C.; SARTORI, A. L. B.; POTT, A. Estudo Taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae – Papilionoideae – Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Rodriguésia* n.59, n.3, p.547-572, 2008.
- 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.

- CHANDRA, A., PATHAK, P. S & BHATT, R. K. Stylophone research in India: Future prospects and challenges. **Current Science**, 90, 915-921, 2006.
- CHAVES, M. M. *et al.* How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. **Annals of botany**, v. 89, n. 7, p. 907, 2002.
- CHEN, W. J.; ZHU, T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. **Trends Plant Science**, v. 9, n. 12, p. 591-596, 2004.
- CHEN, H. *et al.* VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Journal of plant research**, v. 129, p. 263-273, 2016.
- CLOSE, T. J.; KORTT, A. A.; CHANDLER, P. M. A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. **Plant molecular biology**, v. 13, p. 95-108, 1989.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. **Physiologia plantarum**, v. 97, n. 4, p. 795-803, 1996.
- CLOSE, T. J. Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. **Physiologia Plantarum**, v. 100, n. 2, p. 291-296, 1997.
- DIETRICH, P.; SANDERS, D.; HEDRICH, R. The role of ion channels in light-dependent stomatal opening. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 363, p. 1959-1967, 2001.
- DIOGO JUNIOR, R. Expressão de genes codificantes para proteínas de choque térmico em sementes de linhagens de milho. 2018. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/30240>>. Acesso em: 29 jun. 2025
- DIDONET, A. D. Estresse Abiótico. Embrapa, n 239, p. 25-32, 2009 Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/doc/697072/1/doc-239-p25.pdf>>.
- DUC, G. *et al.* Breeding annual grain legumes for sustainable agriculture: new methods to approach complex traits and target new cultivar ideotypes. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 34, n. 1-3, p. 381-411, 2015.
- EDWARDS, D.; BATLEY, J. Plant bioinformatics: from genome to phenome. **Trends in Biotechnology**, v. 22, n. 5, p. 232-237, 2004.
- EINI, O. *et al.* Complex regulation by Apetala2 domain-containing transcription factors revealed through analysis of the stress-responsive TdCor410b promoter from durum wheat. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. e58713, 2013.
- ESPINDOLA, F. *et al.* Bioinformatic resources applied on the omic sciences as genomic, transcriptomic, proteomic, interatomic and metabolomic. **Bioscience Journal**, v. 26 p. 463-477, 2010.

- FERNANDEZ-SUAREZ, X. M.; GALPERIN, M. Y. The 2013 Nucleic Acids Research Database Issue and the online Molecular Biology Database Collection. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D1-D7, 2012.
- FERREIRA, B.M.; COSTA, S.M.N. O gênero *Stylosanthes* Sw. no Brasil. **Epaming**, Belo Horizonte. 107p. 1979.
- FERREIRA-NETO, J. R. C. *et al.* Dehydration response in *Stylosanthes scabra*: Transcriptional, biochemical, and physiological modulations. **Physiologia Plantarum**, v. 174, n. 6, p. e13821, 2022.
- GALAU, G. A.; HUGHES, D. W.; DURE III, L. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. **Plant molecular biology**, v. 7, n. 3, p. 155-170, 1986.
- GALDINO, A. C. Ocorrência e multiplicação de *Stylosanthes* em Pernambuco. Tese (Doutorado Integrado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, p. 94, 2014.
- GBIF.org (2023). Registro da espécie *Stylosanthes scabra*. Disponível em: <https://www.gbif.org/species/1234567>. Acesso em: 12 ago. 2025.
- GISSI, D.S. 2020. *Stylosanthes* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<https://floradobrasil2020.jbrj.gov.br/FB29880>).
- HALL, T.J.; GLATZLE, A. Cattle production from *Stylosanthes* pastures. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.) High-yielding antracnose-resistant *Stylosantes* for agricultural systems. **ACIAR**: Camberra, p.51- 64. 2004.
- HANIN, M. *et al.* Plant dehydrins and stress tolerance: versatile proteins for complex mechanisms. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 10, p. 1503-1509, 2011.
- HANSON, A.D.; HITZ, W.D. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. **Annual Review Plant Physiology**, v. 33, p. 163-203, 1982.
- HARA, M.; TERASHIMA, S.; KUBOI, T. Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. **Journal of Plant Physiology**, v. 158, n. 10, p. 1333-1339, 2001.
- HARA, M.; FUJINAGA, M.; KUBOI, T. Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 42, n. 7-8, p. 657-662, 2004.
- HARA, M.; FUJINAGA, M.; KUBOI, T. Metal binding by *citrus* dehydrin with histidine-rich domains. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 420, p. 2695-2703, 2005.
- HARA, M.; KONDO, M.; KATO, T. A KS-type dehydrin and its related domains reduce Cu-promoted radical generation and the histidine residues contribute to the radical-reducing activities. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 6, p. 1615-1624, 2013.

- HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p. e1364, 2017.
- HONG-BO, S.; ZONG-SUO, L.; MING-AN, S. LEA proteins in higher plants: structure, function, gene expression and regulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 45, n. 3-4, p. 131-135, 2005.
- HUNDERTMARK, M.; HINCHA, D. K. LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. **BMC Genomics**, v. 9, 2008.
- IDRIS, S.; SAAD, M. S. Characterization of plant genetic resources. **Establishment and Management of Field Genebank, a Training Manual**, p. 81, 2001.
- IMAMURA, T.; HIGUCHI, A.; TAKAHASHI, H. Dehydrins are highly expressed in overwintering buds and enhance drought and freezing tolerance in *Gentiana triflora*. **Plant science**, v. 213, p. 55-66, 2013.
- KARIA, C. T. *et al.* Caracterização morfológica de Acessos do gênero *Stylosanthes* no banco ativo de germoplasma da Embrapa Cerrados-coleção 1994/1995. 2002.
- KOAG, M. *et al.* The K-segment of maize *DHN1* mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. **Plant physiology**, v. 150, n. 3, p. 1503-1514, 2009.
- KIRKBRIDE JR, J. H.; DE KIRKBRIDE, M. C. G. Typification of *Stylosanthes* (Leguminosae) and its sections. **TAXON**, p. 455-458, 1987.
- LAI, Z.; *et al.* *Arabidopsis* sigma factor binding proteins are activators of the WRKY33 transcription factor in plant defense. **Plant Cell**, v. 23, p. 3824–3841, 2011.
- LEWIS, G. P.; MACKINDER B.; LOCK, M. (Eds.) Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens**, Kew, UK. 578 p. 2005.
- LIANG, D. *et al.* Genome-wide identification and expression profiling of dehydrin gene family in *Malus domestica*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, p. 10759-10768, 2012.
- LIMA, C. S. De. Mudanças na expressão de proteínas induzidas por estresses isolados e combinados de seca e temperatura elevada de folhas de cajueiro. 2009. Disponível em: <<http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10452>>. Acesso em: 29 jun. 2025.
- LIMA, S. C. B. Da S. Caracterização proteômica e identificação de proteínas em *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/39646>>. Acesso em: 29 jun. 2025.
- LIN, C. *et al.* Characterization of a novel Y2K-type dehydrin VrDHN1 from *Vigna radiata*. **Plant and Cell Physiology**, v. 53, n. 5, p. 930-942, 2012.
- MA, L. *et al.* Epigenetic control of plant abiotic stress responses. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 52, n. 2, p. 129-144, 2025.

- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, p. 139-158, 2005.
- MITTLER, R. *et al.* Reactive oxygen gene network of plants. **Trends in plant science**, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.
- MARTIN, J. A.; WANG, Z. Next-generation transcriptome assembly. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 10, p. 671-682, 2011.
- 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**, v. 122, n. 7, p. 1143-1159, 2018.
- MIZOI, J.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. AP2/ERF family transcription factors in plant abiotic stress responses. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 86-96, 2012.
- MOCHIDA, K. *et al.* LegumeTFDB: an integrative database of Glycine max, Lotus japonicus and *Medicago truncatula* transcription factors. **Bioinformatics**, v. 26, n. 2, p. 290-291, 2010.
- MUNDY, J.; CHUA, N. Absciscic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. **The EMBO Journal**, v. 7, n. 8, p. 2279-2286, 1988.
- MUÑOZ-MAYOR, A. *et al.* Overexpression of dehydrin tas14 gene improves the osmotic stress imposed by drought and salinity in tomato. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 5, p. 459-468, 2012.
- PORCEL, R.; AZCON, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Evaluation of the role of genes encoding for dehydrin proteins (LEA D-11) during drought stress in arbuscular mycorrhizal *Glycine max* and *Lactuca sativa* plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1933-1942, 2005.
- RIYAZUDDIN, R. *et al.* Involvement of dehydrin proteins in mitigating the negative effects of drought stress in plants. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 3, p. 519-533, 2022.
- SANTANA, M. J.; CARVALHO, J. A.; SILVA, E. L.; MIGUEL, D. S. Efeito da irrigação com água salina em um solo cultivado com o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 27, p. 443-450, 2011.
- SEKI, M. *et al.* Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **Plant J.** 31: 279-292, 2002.
- SINGH, M. *et al.* Insights into the Multifaceted Roles of Soil Microbes in Mitigating Abiotic Stress in Crop Plants: A Review. **Environmental and Experimental Botany**, p. 106010, 2024.

- SILVA, J. B. Da. Seleção *in silico* e expressão diferencial de genes de defesa em uva (*Vitis vinífera* L.) sob condições de estresse biótico. 20 jul. 2018. masterThesis. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/34572>>. Acesso em: 8 ago. 2025.
- SILVA FILHO, J. L. B. Da. Genômica estrutural e transcriptômica de genes correguladores em *Jatropha curcas* L. sob salinidade. 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/35317>>. Acesso em: 28 jun. 2025.
- SILVEIRA, R. D. D.; PANTALIÃO, G. F.; BRONDANI, C. Estudos genômicos de tolerância à seca em arroz: uma breve revisão. **Multi-Science Journal**, v. 1, n. 1, p. 62-69, 2015.
- SOUZA, A. M. S. De. Estresse hídrico e expressão de genes no início de crescimento de algodoeiros naturalmente coloridos. 2014. Disponível em: <<http://tede.bc.uepb.edu.br/tede/jspui/handle/tede/2025>> Acesso em: 28 jun. 2025.
- SCHULTZE-KRAFT, R. *et al.* *Stylosanthes guianensis* CIAT 184—review of a tropical forage legume. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 11, n. 2, p. 95-120, 2023.
- SHAKIROVA, F. *et al.* Involvement of dehydrins in 24-epibrassinolide-induced protection of wheat plants against drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 108, p. 539-548, 2016.
- SHEFFIELD, J.; WOOD, E. F. Projected changes in drought occurrence under future global warming from multi-model, multi-scenario, IPCC AR4 simulations. **Climate dynamics**, v. 31, p. 79-105, 2008.
- SZLACHTOWSKA, Z.; RUREK, M. Plant dehydrins and dehydrin-like proteins: characterization and participation in abiotic stress response. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1213188, 2023.
- TARAWALI, G. *et al.* Smallholders' use of *Stylosanthes* for sustainable food production in subhumid West Africa. 1998.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. **Molecular biology and evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021.
- TIWARI, P. *et al.* Role of dehydrin-FK506-binding protein complex in enhancing drought tolerance through the ABA-mediated signaling pathway. **Environmental and Experimental Botany**, v. 158, p. 136-149, 2019.
- THE UNIPROT CONSORTIUM. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D43-D47, 2012.
- TUNNACLIFFE, A.; WISE, M. J. The continuing conundrum of the LEA proteins. **Naturwissenschaften**, v. 94, n. 10, p. 791-812, 2007.
- TRENBERTH, K. E.; FASULLO, J. T.; SHEPHERD, T. G. Attribution of climate extreme events. **Nature climate change**, v. 5, n. 8, p. 725-730, 2015.

- XIONG, L.; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.
- XIONG, L. LEE, H., ISHITANI, M., ZHU, J.K Regulation of osmotic stress responsive gene expression by the LOS6/ABA1 locus in *Arabidopsis* J Biol Chem, v. 277, p. 8588-8596, 2002.
- XUE, G. *et al.* bHLH transcription factor family identification, phylogeny, and its response to abiotic stress in *Chenopodium quinoa*. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1171518, 2023.
- YANG, Z. *et al.* Y2SK2 and SK3 type dehydrins from *Agapanthus praecox* can improve plant stress tolerance and act as multifunctional protectants. **Plant Science**, v. 284, p. 143-160, 2019.
- YU, Z.; WANG, Xin; ZHANG, L. Structural and functional dynamics of dehydrins: a plant protector protein under abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, p. 3420, 2018.
- VALLE, C. B.; JANK, L.; RESENDE, R. M. S. O melhoramento de forrageiras tropicais no Brasil. **Revista Ceres**, v. 56, n. 4, p. 460-472, 2009.
- VIEIRA, E. A. *et al.* Virulência de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* de populações selvagens de *Stylosanthes* spp. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 661-667, 2007.
- WANG, W. *et al.* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 5, p. 244-252, 2004.
- ZHANG, H. *et al.* Analysis of dynamic protein carbonylation in rice embryo during germination through AP-SWATH. **Proteomics**, v. 16, n. 6, p. 989-1000, 2016.
- ZHAO, J. *et al.* *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 bestowed transgenic tall fescue increased tolerance to drought stress. **Plant Cell Reports**, v. 26, p. 1521-1528, 2007.
- ZHAO, S. Y. *et al.* Mannose regulates water balance, leaf senescence, and genes related to stress tolerance in white clover under osmotic stress. **Biologia plantarum**, v. 64, n. 1, p. 406-416, 2020.
- ZHOU, Y. *et al.* Identification and transcriptional analysis of dehydrin gene family in cucumber (*Cucumis sativus*). **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 8, p. 144, 2018.