



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Estudo da expressão do gene  
*EXPANSINA-LIKE B (EXLB)* em 13 genótipos da  
secção *Arachis* (Fabaceae) submetidos ao déficit  
hídrico

**RAQUEL BISPO SILVA**

Brasília-DF  
Junho, 2015



Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Botânica

Estudo da expressão do gene  
*EXPANSINA-LIKE B (EXLB)* em 13 genótipos da  
secção *Arachis* (Fabaceae) submetidos ao déficit  
hídrico

**RAQUEL BISPO SILVA**

**ORIENTADOR: PROF. DR. LÚCIO FLÁVIO DE ALENCAR  
FIGUEIREDO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Botânica da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de Mestre em Botânica.

Brasília-DF  
Junho, 2015

Trabalho realizado no Laboratório de Interação Planta-Praga III na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

**Banca Examinadora:**

Presidente da banca e membro interno: Prof. Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo - Universidade de Brasília (UnB)

Membro externo: Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Membro externo: Dr. Pierre Roger René Marraccini - Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique (CIRAD)

Membro externo: Dra. Léia Cecília de Lima Fávaro - Embrapa Agroenergia

Membro suplente: Dra. Larissa Arrais Guimarães - Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

*Aos meus pais e irmão Baltazar, Maria e Rafael,  
meu esposo Paulo Júnior e meu filho Samuel Ethan que  
me apoiaram e incentivaram, constantemente, para a  
minha formação.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

---

Ao financiamento fornecido pela bolsa Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por meio do programa Reestruturação e Expansão das Universidades Federais (REUNI), o qual possibilitou a realização deste trabalho.

Aos financiadores, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAP-DF) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do projeto “Valoração do germoplasma de *Arachis* para o melhoramento genético do amendoim” que tem como plano de ação a validação de genes de interesse e transformação genética, permitindo o andamento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Lúcio Flávio de Alencar Figueiredo pela orientação, apoio, sugestões e informações de extrema importância para o enriquecimento do presente trabalho.

À Dra. Ana Cristina Miranda Brasileiro pela orientação, confiança e paciência ilimitada durante todo o caminho percorrido desde a seleção à defesa.

Ao Dr. Márcio de Carvalho Moretzsohn que gentilmente cedeu-me as sementes de todas as espécies da secção *Arachis* utilizadas no ensaio de déficit hídrico.

À Dra. Ana Cláudia Guerra de Araújo quem transmitiu todo o seu conhecimento sobre a superfamília das expansinas, auxiliando nas análises, dúvidas e interpretações dos resultados obtidos.

Ao Dr. Pierre Roger René Marraccini e à Dra. Léia Cecília de Lima Fávoro que aceitaram e se disponibilizaram a participar da banca examinadora e que, por meio de críticas e sugestões construtivas, ajudaram a enriquecer ainda mais este trabalho.

À Dra. Bruna Vidigal que me recebeu de braços abertos desde a minha chegada e me ensinou com grande entusiasmo todas as teorias e técnicas importantes para dar continuidade aos experimentos com autonomia.

À Dra. Larissa Arrais que pacientemente me ajudou com as análises de bioinformática e me ensinou a entender essa área complexa que integra a biotecnologia.

À Karinne Dantas e ao técnico Leandro que me ajudaram no plantio e manutenção dos genótipos da secção *Arachis* utilizados no ensaio de déficit hídrico.

À Msc. Paula Andrea Carvalho que durante o ensaio drydown me ajudou com a pesagem das plantas, todos os dias, inclusive sábados, domingos e feriados, com sol ou com chuva.

À MSc. Andressa Martins que por várias vezes esclareceu minhas dúvidas com procedimentos de laboratório, teorias e, principalmente, RT-qPCR.

Ao técnico Mário Saraiva que me ensinou as técnicas, procedimentos e detalhes da plataforma de RT-qPCR.

À mestranda Thais Nicolini que, amigavelmente, dividiu comigo os horários para corridas das placas de RT-qPCR.

A todos os colegas do Laboratório Planta-Praga III (LPP III) que de alguma maneira, direta ou indiretamente ajudaram na realização do presente trabalho.

Aos pesquisadores, colaboradores, técnicos e estudantes de toda equipe *Arachis* da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pelo acolhimento e suporte.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Botânica da UnB e de outras instituições como a Universidade Federal de Goiás (UFG) com os quais pude aprender, progredir e aumentar meus conhecimentos na área de botânica e biotecnologia. É durante a realização de um trabalho que sentimos a necessidade de termos amigos que nos auxiliem, nos guiem e nos orientem. Aqui, expresso minha gratidão:

À minha família, em especial aos meus pais Baltazar e Maria da Paz que sempre estiveram ao meu lado me dando forças para finalizar e realizar esta conquista tão almejada. Amo vocês.

Ao meu esposo, Paulo Júnior, pelo amor, amizade, paciência e apoio principalmente na reta final deste sonho. Te amo, pretinho.

Ao meu filho, Samuel Ethan, que chegou inesperadamente, mas me mostrou o que é o verdadeiro amor e que com ele e para ele sou capaz de realizar qualquer coisa. Te amo, meu pequeno gafanhoto.

*As ideias e estratégias são importantes, mas o verdadeiro desafio é a sua execução”.*

*(Percy Barnevíck)*



## SUMÁRIO

---

<b>Lista de figuras</b> .....	1
<b>Lista de tabelas</b> .....	5
<b>Lista de abreviaturas e siglas</b> .....	6
<b>Resumo</b> .....	09
<b>Abstract</b> .....	10
<b>1. Introdução</b> .....	11
1.1 O gênero <i>Arachis</i> .....	11
1.2 O amendoim ( <i>Arachis hypogaea</i> L.) .....	16
1.3 Déficit hídrico .....	22
1.4 A relação água e parede celular .....	29
1.5 As proteínas expansinas .....	33
1.5.1 As proteínas expansinas e o déficit hídrico .....	33
1.5.2 As proteínas expansinas e seu envolvimento com outros tipos de estresses bióticos e abióticos e com processos de desenvolvimento .....	34
1.5.3 As proteínas expansinas em outros organismos .....	35
1.5.4 Revisão histórica e estrutural das proteínas expansinas .....	37
1.6 RT-PCR quantitativa (RT-qPCR) .....	43
<b>2. Objetivos</b> .....	49
2.1 Geral .....	49
2.2 Específicos .....	49
<b>3. Material e Métodos</b> .....	50
3.1 Material vegetal .....	50
3.2 Ensaio de déficit hídrico gradual .....	52
3.3 Extração de gDNA .....	54
3.4 Extração e análise qualitativa e quantitativa de RNA total e síntese de cDNA .....	55

3.4.1 Formação de conjuntos de amostras (Pools) .....	55
3.4.2 Extração de RNA total.....	56
3.4.3 Síntese de cDNA .....	58
3.5 RT-PCR quantitativa (RT-qPCR).....	59
3.6 Identificação e caracterização da sequência nucleotídica completa do cDNA do gene <i>EXPANSINA-LIKE B (EXLB)</i> .....	60
3.7 Análise filogenética .....	61
<b>4. Resultados</b> .....	<b>62</b>
4.1 Ensaio de déficit hídrico gradual .....	62
4.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA.....	66
4.3 Análise do perfil de expressão do gene <i>EXLB</i> em raízes de 13 genótipos da secção <i>Arachis</i> .....	68
4.4 Identificação e caracterização da sequência nucleotídica do cDNA e do gDNA do gene <i>EXLB</i> .....	74
4.5 Relações filogenéticas .....	89
<b>5. Discussão</b> .....	<b>91</b>
5.1 Resposta dos 13 genótipos da secção <i>Arachis</i> ao déficit hídrico gradual. ....	91
5.2 Análise do perfil de expressão do gene <i>EXLB</i> em 13 genótipos da secção <i>Arachis</i> submetidos ao déficit hídrico gradual.....	95
5.3 Caracterização da estrutura do gene <i>EXLB</i> em genótipos da secção <i>Arachis</i> .....	98
5.4 Relações filogenéticas entre os 13 genótipos da secção <i>Arachis</i> estudados.....	101
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>104</b>
<b>7. Perspectivas</b> .....	<b>105</b>
<b>8. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>106</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>121</b>

Anexo 1: Tabela de iniciadores utilizados.....	121
Anexo 2: Sequência putativa do gene <i>EXLB</i> ( <i>AdEXLB</i> ) de <i>A. duranensis</i> (848 pb) obtida pelo estudo de Brasileiro et al. (2015) com a localização do par de iniciadores EXPuniF e EXP464R realçados em amarelo. ....	122
Anexo 3: Sequência codificadora do gene <i>EXLB</i> (853 pb) de <i>A. hypogaea</i> (ID: 225598755) utilizada nos alinhamentos com os cDNAs da <i>AdEXLB</i> e o cDNA da <i>EXLB</i> de <i>A. duranensis</i> obtido por meio do ensaio de déficit hídrico gradual.....	123
Anexo 4: Alinhamento entre as sequências nucleotídicas do gene <i>AdEXLB</i> , o cDNA da <i>EXLB</i> de <i>A. duranensis</i> obtido neste estudo e o cDNA de <i>A. hypogaea</i> (ID: 225598755), com a localização do par de iniciadores EXPuniF e EXP464R realçados em amarelo.. ....	124
Anexo 5: Sequência genômica completa do gene <i>EXLB</i> (1.831 pb) de <i>A. duranensis</i> obtida por meio do alinhamento do anexo 4. A localização do par de iniciadores EXPuniF e EXP464R está em realce amarelo e do par de iniciadores EXPF e EXPR em realce verde. Em negrito está a localização dos códons de iniciação (ATG) e terminação (TAG) .....	127
Anexo 6: Sequência codificadora completa do gene <i>EXLB</i> de <i>A. duranensis</i> (753 pb), representante dos 13 genótipos da secção <i>Arachis</i> utilizados, com a localização dos iniciadores EXPF e EXPR realçados em amarelo. Em negrito está a localização dos códons de iniciação (ATG) e terminação (TAG) .....	128
Anexo 7: Alinhamento da sequência codificadora (cDNA) dos 13 genótipos da secção <i>Arachis</i> utilizados neste estudo, por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit. ....	129
Anexo 8: Alinhamento da sequência nucleotídica de gDNA de quatro genótipos da secção <i>Arachis</i> , utilizados neste estudo, por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit. . ....	135

## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1: Cariótipo de *Arachis duranensis* e *Arachis ipaënsis* mostrando o pequeno par de cromossomos (cromossomo A) em *A. duranensis* e sua ausência em *A. ipaënsis*. Imagem reproduzida de (Kochert et al., 1996). .....13
- Figura 2: Árvore filogenética obtida por meio do critério de máxima parcimônia, baseada em dados de sequências intrônicas para 54 acessos da secção *Arachis* (selvagens e cultivados). Imagem reproduzida de (Moretzsohn et al., 2013). .....15
- Figura 3: Principais países produtores e consumidores de amendoim no mundo. Divisão (gradiente de cores) por produção em milhões de toneladas (mt). Gradiente de menor intensidade para maior intensidade: Outros países (8,81/mt), Argentina e Brasil (750 e 296,7 mil toneladas, respectivamente), Senegal (0,70/mt), Indonésia (1,25/mt), Nigéria (1,55/mt), Estados Unidos (1,65/mt) e China (16,0/mt). Os países marcados em cinza representam os principais consumidores: países da Europa, alguns países da África, América do Norte e América Central. Imagem de Raquel Bispo adaptada a partir de dados de (Agroenergia, 2013). .....20
- Figura 4: Produção de amendoim no Brasil nos últimos cinquenta anos, em mil toneladas (FAO, 2013). .....21
- Figura 5: Os três estádios de desidratação. . Imagem adaptada e reproduzida de (Sinclair & Ludlow, 1986). .....24
- Figura 6: Taxa de transpiração normalizada (NTR) em função da fração de água transpirável no solo (FATS) de 12 genótipos da secção *Arachis*. Am (*A. magna*), Ad (*A. duranensis*), Av (*A. villosa*), As (*A. stenosperma*), Ah (*A. hypogaea*), Anf (Anfidiplóide). Imagem reproduzida de (Leal-Bertioli et al., 2012) . .....26
- Figura 7: Análise da expressão de 18 genes candidatos (CGs), por meio da técnica RT-qPCR, em plantas de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico gradual. Imagem reproduzida de Brasileiro et al. (2015). Imagem reproduzida de (Brasileiro et al., 2015) .....28
- Figura 8: Representação esquemática das paredes celulares primária e secundária. Imagem adaptada de (Silveira & Amaral, 2000). .....29
- Figura 9: Diagrama com os principais componentes da parede celular primária. Imagem reproduzida (Taiz & Zeiger, 2006). .....30
- Figura 10: Células vegetais: (a) túrgida, (b) plasmolizada e (c) flácida Imagem reproduzida de (Uzunian & Birner, 2008). .....31
- Figura 11: Mecanismo de ação hipotético das EXPANSINAS A (EXPA). As microfibrilas de celulose formam uma rede mecanicamente resistente. Quando esta

rede está sob estresse mecânico devido ao turgor celular, as microfibrilas e a matriz de polímeros podem se estender por um deslizamento mediado pelas expansinas. EXPA (EXPANSINA A), EXPB (EXPANSINA B), EXLA (EXPANSINA-LIKE A). Os números indicam os domínios I e II destas proteínas. Imagem reproduzida de (Sampedro & Cosgrove, 2005).....40

Figura 12: Principais características estruturais conservadas da proteína expansina. Peptídeo sinal na região N-terminal; domínio I contendo oito cisteínas conservadas (C-vermelho); domínio II contendo quatro triptofanos conservados (W-azul) com espaçamento similar ao encontrado em alguns domínios de ligação de celulose. Os aminoácidos delineados por caixas em azul pontilhadas são sequências conservadas entre EXPA e EXPB, e os em vermelho são sequências conservadas somente entre EXLB (EXPANSINA-LIKE B). CBD (Cellulose –biding). Imagem reproduzida e adaptada de (Cosgrove, 1998). .....41

Figura 13: Curva de amplificação da reação de qPCR mostrando o número de ciclos em função do  $\Delta R_n$  (magnitude da fluorescência emitida). O NTC (no template control) é o controle da reação sem DNA-molde para verificar a qualidade da amplificação e possíveis contaminações. Imagem reproduzida e adaptada de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>) .....44

Figura 14: Representação gráfica dos resultados da amplificação por meio da PCR em função de diferentes teores de moléculas de DNA iniciais. Imagem reproduzida de Pelt-Verkuil (2008).....45

Figura 15: A) Representação da molécula de SYBR® Green (em azul) intercalada na fita dupla de DNA. Etapas de ligação do SYBR® Green ao DNA fita-dupla durante os ciclos da qPCR: B) início da reação; C) anelamento D) extensão e desnaturação. Imagem reproduzida e adaptada de Academic & Industrial Information Platform (<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreen>). .....46

Figura 16: Representação gráfica da curva de dissociação a partir dos dados recolhidos ao final da reação de qPCR. O pico mais evidente (seta azul) indica o ponto de dissociação do produto da reação. Os contaminantes que geram produtos inespecíficos ou dímeros de iniciadores aparecem como picos adicionais (Seta vermelha).  $-R_n$  corresponde à primeira derivada negativa da fluorescência normalizada pelo SYBR® Green durante a amplificação da PCR. Imagem de Raquel Bispo .....47

Figura 17: Sementes de genótipos da secção *Arachis* no primeiro dia de plantio. Para os 13 genótipos foram utilizados, em média, 20 indivíduos. ....51

Figura 18: Divisão das plantas em dois grupos: controle (à esquerda) e estressado (à direita) .....51

Figura 19: Ilustração da formação do *pool* 1 (estressado) e o correspondente *pool* 1 (controle) .....56

Figura 20: Genótipos da secção *Arachis* utilizados no ensaio de déficit hídrico gradual apresentando diferentes fenótipos em resposta a este estresse. Os pares de indivíduos de cada genótipo estão apresentados conforme o tratamento submetido. À esquerda: indivíduos submetidos ao estresse (déficit hídrico gradual -  $NTR \leq 0,3$ ). À direita: indivíduos do grupo controle. Barra: 5cm. ....64

Figura 21: Média de dias decorridos entre o início do ensaio de déficit hídrico gradual e o dia da coleta do último indivíduo para cada genótipo .....65


Figura 22: Gel de agarose a 1% (p/v), corado com brometo de etídio, contendo RNA total de raiz dos seguintes genótipos: (1-3, 7) *A. batizocoi* – Controle; (4-6) *A. magna* – Estressado; (8) *A. cardenasii* – Controle, (9-12) *A. cardenasii* – Estressado. (  ) indica contaminação por gDNA .....66

Figura 23: Gel de agarose a 1% (p/v) contendo o produto de amplificação por RT-PCR utilizando como molde o cDNA sintetizado a partir de amostras de raízes de: (1-2) *A. gregoryi* – Estressado; (3) *A. ipaënsis* – Controle; (4-5) Anfidiplóide – Controle e Estressado; (6-7) *A. magna* - Controle e Estressado; (8-9) *A. hypogaea* cv Runner – Estressado; (10-11) *A. stenosperma* – Estressado; (12) *A. hypogaea* cv Tatu – Controle .....67

Figura 24: Gel de agarose a 1% (p/v), corado com brometo de etídio, contendo o produto de amplificação por RT-PCR semi-quantitativa. Quanto maior a intensidade das bandas, maior a expressão do gene utilizado para a amplificação. (1): *A. stenosperma* – estressado; (2) *A. hypogaea* cv Tatu – estressado; (3) *A. hypogaea* cv Tatu – Controle; (4) *A. stenosperma* - Controle .....72

Figura 25: Análise da quantificação relativa (RQ) dos 13 genótipos da secção *Arachis* submetidos ao déficit hídrico gradual. Os níveis relativos de mRNA (razão entre amostras estressadas e controle) estão representados por barras e o desvio-padrão das três repetições biológicas (pools) pelas linhas verticais. Dados normalizados com os genes de referência *ACT1* e *UBI2* .....73

Figura 26: Comparação entre a média de dias de coleta e os níveis relativos de mRNA dos 13 genótipos. ....74

Figura 27: DRI e MRE = cDNA de raízes de *A. duranensis* e *A. magna* utilizados, respectivamente, como molde da RT-PCR. D e M = gDNA de raízes de *A. duranensis* e *A. magna* utilizados, respectivamente, como molde da PCR. (C-) Controle negativo da reação .....75

Figura 28: Modelo da estrutura gênica (gene model) do gene *EXLB* que codifica a proteína EXPANSINA-LIKE B em *A. duranensis*, por meio do programa Artemis. As regiões não-traduzidas (untranslated region - UTR) estão representadas pela cor branca, os exons pela cor amarela e os introns pela cor cinza.... 81

Figura 29: Alinhamento entre a sequência de aminoácidos dos 13 genótipos da secção *Arachis* por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit. ( □ ) indica o resíduo conservado TYYG, comum à família EXPANSINA-LIKE B.( ★ ) indica as cisteínas e os triptofanos conservados.....83

Figura 30: Conservação da sequência de aminoácidos da EXLB entre os 13 genótipos da secção *Arachis*. Logo de sequências da EXLB gerado com *WebLogo* e manualmente alinhados. Nestes logos, a altura das letras indica a frequência do aminoácido correspondente. O resíduo conservado entre as famílias EXLB está envolto por caixa em vermelho. ( ★ ) indica cisteínas (C) e triptofanos (W) conservados. O limite entre os dois domínios estão indicados por setas: ( ← ) domínio I ( → ) e domínio II .....85

Figura 31: Alinhamento entre a sequência de aminoácidos de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* e as sequências de *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum*, *Ricinus communis*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinífera*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa*, *Solanum lycopersicum* e *Solanum tuberosum*, disponíveis em bancos de dados públicos (NCBI). ( □ ) sequência conservada entre as famílias EXLB ( ★ ) indica as cisteínas (C) e triptofanos (W) conservados.....88

Figura 32: Árvore filogenética usando o critério de máxima parcimônia com sequências protéicas da EXLB e outras sequências similares. Os números próximos de cada nó representam os valores bootstrap. ....90

## LISTA DE TABELAS

---

- Tabela 1: Genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo e seus respectivos genomas ..... 50
- Tabela 2: Divisão por blocos dos 13 genótipos da secção *Arachis* em estudo baseada em seu estágio fisiológico (cada indivíduo apresentava mais de 20 folhas expandidas) e o tempo necessário para que todos os indivíduos atingissem CC de 70% ..... 53
- Tabela 3: Quantidade de indivíduos utilizados para cada genótipo da secção *Arachis* durante o ensaio de déficit hídrico gradual, TR do grupo estressado, TR média do grupo controle e NTR média dos indivíduos de cada genótipo no momento da coleta. A média da NTR individual é calculada pela razão entre a TR do indivíduo do grupo estressado pela média da TR de todos os indivíduos do grupo controle ..... 63
- Tabela 4: Média da eficiência do gene-alvo (expansina) e dos dois genes de referência utilizados (*ACT1* e *UBI2*) dos 13 genótipos da secção *Arachis* obtida pelo programa Real-time PCR Miner 4.0 ..... 68
- Tabela 5: Média do ponto Cq por tratamento (obtido pelo algoritmo Miner) dos 13 genótipos da secção *Arachis* utilizados ..... 69
- Tabela 6: Perfil de expressão dos 13 genótipos utilizados. Considerando-se o P-value < 0,05 para efeito significativo, todos os genótipos que apresentaram este parâmetro foram positivamente regulados. RQ: quantificação relativa ..... 71
- Tabela 7: Características de cada SNP encontrado em alinhamento das sequências codificadoras (cDNA) do gene *EXLB* (ATG-TAG) dos 13 genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo, por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit. ALA: Alanina. ASP: Asparagina. CYS: Cisteína. GLU: Glutamina. ILE: Isoleucina. LEU: Leucina. PRO: Prolina. SER: Serina. THR: Treonina. TRY: Tirosina. VAL: Valina. NSC: não-sinônimo conservativo. S: sinônimo. NSNC: não-sinônimo e não conservativo ..... 77
- Tabela 8: Frequência (Fs) de haplótipos por SNPs entre os 13 genótipos da secção *Arachis* estudados. Cores iguais indicam genótipos que compartilham o mesmo haplótipo ..... 78
- Tabela 9: Características de cada SNP encontrado em alinhamento das sequências nucleotídicas do gDNA de quatro genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit. NSC: não-sinônimo conservativo. S: sinônimo. NSNC: não-sinônimo e não-conservativo. SNP: Polimorfismo de base única. UTR (untranslated region): região não-traduzida. .... 79



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

AcNa: Acetato de sódio

CC: Capacidade de campo

cDNA: Complementary deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico complementar)

Cq: Quantification cycle (ciclo de quantificação)

CTAB: Cetyl trimethyl ammonium bromide (brometo de cetiltrimetilamônio)

DDC: Dias de coleta

DNA: Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

dNTP: Nucleoside triphosphate (desoxirribonucleotídeos fosfatados)

Drydown: Ensaio de déficit hídrico gradual

EDTA: Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etileno diamino tetra-acético)

EST: Expressed sequence tags (marcador de sequência expressa)

EXPA: EXPANSINA A (proteína)

*EXPA: EXPANSINA A* (gene)

EXPB: EXPANSINA B (proteína)

*EXPB: EXPANSINA B* (gene)

EXLA: EXPANSINA-LIKE A (proteína)

*EXLA: EXPANSINA-LIKE A* (gene)

EXLB: EXPANSINA-LIKE B (proteína)

*EXLB: EXPANSINA-LIKE B* (gene)

FATS: Fração de água transpirável no solo

G<sub>1</sub>As: Grupo 1 pólen alergênico de gramíneas

gDNA: Genomic deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico genômico)

GH45: Glicosil hidrolase

HFD: Histidina - Fenilalanina - Asparagina

LiCl: Cloreto de lítio

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de magnésio

mRNA: Messenger ribonucleic acid (ácido ribonucleico mensageiro)

NTC: No template control (controle sem molde)

NTR: Normalized transpiration rate (taxa de transpiração normalizada)

ORF: Open reading frame (fase de leitura aberta)

PCR: Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)

PVP: Polivinilpirrolidona

RNA: Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

RQ: Relative quantification (quantificação relativa)

RT: Reverse transcriptase (transcriptase reversa)

RT-qPCR: Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (reação em cadeia quantitativa via transcrição reversa)

SDS: Sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sódio)

SNP: Single nucleotide polymorphism (polimorfismo de base única)

TR: Transpiration rate (taxa de transpiração individual)

TYYG: Threonine – Tyrosine - Glycine (Treonina – Tirosina – Glicina)

## RESUMO

---

O déficit hídrico é um dos principais fatores responsáveis pela redução na produtividade das culturas no Brasil e no mundo. O estudo da expressão de genes envolvidos nas vias que regulam a resposta ao déficit hídrico visa contribuir na elucidação dos mecanismos de tolerância à seca e das estratégias utilizadas pelas plantas para se adaptarem a ambientes adversos. Os parentes silvestres (*Arachis* spp.) do amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) são espécies nativas brasileiras consideradas uma rica fonte de alelos para a prospecção de novos genes, uma vez que estas espécies desenvolveram mecanismos de adaptação a estresses bióticos e abióticos durante a sua evolução. Estudos recentes demonstraram que o gene *EXPANSINA-LIKE B* (*EXLB*) é induzido em folhas e raízes de *Arachis duranensis* submetidas ao déficit hídrico. Embora a importância de *EXLB* na resposta ao estresse abiótico em algumas espécies vegetais de outros gêneros, esse gene ainda não foi caracterizado no gênero *Arachis*. O presente trabalho teve como objetivo principal caracterizar o gene *EXLB* em 13 genótipos da seção *Arachis* e analisar o seu perfil de expressão em resposta ao déficit hídrico. Os genótipos avaliados são compostos por: i) silvestres diploides (n=8) e tetraplóides (n=1) ii) cultivados tetraplóides (n=3) e iii) anfidiplóide (n=1). Iniciadores foram desenhados em regiões conservadas de *EXLB* baseando-se nos dados de sequências transcritas de *Arachis* spp. e em sequências já depositadas em banco de dados públicos. Os produtos de amplificação foram obtidos por PCR com DNA genômico (gDNA) de quatro genótipos da seção *Arachis*. A sequência nucleotídica completa do gene *EXLB* de 13 genótipos foi caracterizada por meio de RT-PCR com a sequência codificadora do DNA (cDNA), tendo como referência *EXLB* de *A. duranensis* (*AdEXLB*). O gene apresenta quatro exons (753 pb), uma região 3'UTR (242 pb) e uma região 5'UTR (106 pb), totalizando 1.831 pb. No alinhamento do gDNA (1.831 pb) de quatro genótipos foram identificados 12 SNPs (polimorfismo de base única). No alinhamento do cDNA (753 pb) dos 13 genótipos foram identificados 11 SNPs. A sequência do cDNA dos 13 genótipos revelou altos níveis de similaridade para os 13 genótipos, com resíduos de aminoácidos conservados comuns entre as famílias de proteínas da EXPASINA-LIKE B. As análises de RT-qPCR mostraram uma regulação positiva da expressão da *EXLB* em resposta ao déficit hídrico gradual nos 13 genótipos utilizados. Uma variação da regulação da expressão foi observada entre os genótipos, com *A. villosa* e *A. gregoryi* mostrando os maiores níveis de expressão relativa (23 e 28 vezes, respectivamente) comparados ao grupo controle (não-estressado), ao contrário de *A. magna* que apresentou o menor nível de expressão comparado ao grupo controle (3,64 vezes).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Arachis*, déficit hídrico, expansina, *EXLB*, RT-qPCR.

## ABSTRACT

---

Drought stress is one of the main causal factors of yield reduction in many crops in Brazil and worldwide. Analysis of host gene expression in response to drought stress can contribute to the elucidation of drought tolerance mechanisms employed by plants during adaptation to adverse environments. The wild parentals (*Arachis* spp.) of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) are native Brazilian species which are considered a rich source of alleles for gene prospecting, given that these species have developed mechanisms of adaptation to abiotic and biotic stresses during evolution. Recent studies have shown that the *EXPANSIN-LIKE B* gene (*EXLB*) is induced in leaves and roots of *Arachis duranensis* subjected to water deficit. Although the importance of *EXLB* in response to abiotic stress in some plant species had been described, this gene has not been yet characterized in the genus *Arachis*. This study aimed to characterize *EXLB* in 13 species of section *Arachis* and analyze its expression profile in response to drought stress. The genotypes evaluated comprised: i) wild diploids (n=8) and tetraploids (n=1), ii) cultivated tetraploids (n=3) and iii) amphidiploid (n=1). Primers were designed for conserved regions of *EXLB* based on transcriptome datasets of *Arachis* spp. and sequences available in public databases. Specific amplification products were obtained by the Polymerase Chain Reaction (PCR) using genomic DNA (gDNA) from four *Arachis* genotypes. RT-PCR with coding sequences (cDNA) from 13 *Arachis* section genotypes were sequenced. The complete nucleotide sequence of *EXLB* from these 13 genotypes was characterized using as reference *EXLB* from *A. duranensis* (*AdEXLB*). The gene comprised four exons (753 bp), a 3'UTR region (242 bp) and a 5'UTR region (106 bp), totaling 1.831 bp. Following genomic sequence alignment in four genotypes, a total of 12 SNPs (single nucleotide polymorphisms) were identified. Sequence alignment of coding sequence for the entire 13 genotypes revealed 11 SNPs. The cDNA sequence showed high levels of similarity for the 13 genotypes, with common conserved amino acid residues among protein family EXPANSIN-LIKE B. RT-qPCR analysis showed up regulation of expression of *EXLB* in response to drought gradual test in all 13 genotypes. Variation of expression regulation was observed among genotypes, with *A. villosa* and *A. gregoryi* showing the greatest relative levels of expression (23 and 28 -fold increase, respectively) compared to the control group (non-stressed), in contrast to *A. magna*, which presented lower expression levels against the control (3.64 fold).

**KEY-WORDS:** *Arachis*, water deficit, expansin, *EXLB*, RT-qPCR.

## INTRODUÇÃO

---

### 1.1 O GÊNERO *ARACHIS*

O gênero *Arachis* é um dos 946 gêneros (<http://www.theplantlist.org/>) que pertencem à família Fabaceae, conhecida anteriormente como Leguminosae. Esta família é a terceira maior família das angiospermas com 24505 espécies (<http://www.theplantlist.org/>) e se destaca pela interações simbióticas com o *Rhizobium* na fixação de nitrogênio. O gênero *Arachis* pertence a subfamília Papilionoideae, e a tribo Dalbergieae (Krapovickas & Gregory, 1994; Wojciechowski 2004). O gênero *Arachis* é nativo da América do Sul onde espécies, cultivadas e silvestres, são encontradas. Este gênero possui 80 espécies (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson, 2005) e atualmente no Germplasm Resources Information Network (GRIN - <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genus/>) são aceitas 81 e registradas 103. No Plant Systematics (<http://www.plantsystematics.org/>) há 93 espécies registradas. Essas espécies estão classificadas em nove seções taxonômicas (*Arachis*, *Caulorrhizae*, *Erectoides*, *Extrabervosae*, *Heteranthae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae*, *Trierectoides* e *Triseminatae*) de acordo com sua morfologia, distribuição geográfica e relações de compatibilidade (Krapovickas & Gregory, 1994; Valls & Simpson) . A seção *Rhizomatosae* é a única que possui duas subseções: *Prorhizomatosae* e a *Rhizomatosae* (GRIN - <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/genus/>). A seção *Arachis* é a mais amplamente distribuída (Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai), com parentes silvestres evolutivamente mais próximos e nela estão contidos os genótipos cultivados, como o amendoim (*Arachis hypogaea* L.). O gênero *Arachis* é exclusivo do continente sul-americano, sendo que o Brasil abriga 63 das 80 espécies descritas e, destas, 46 são endêmicas, tendo assim importante papel na conservação da variabilidade do gênero e diversidade genética de suas espécies (Valls, 2005; Moretzsohn et al., 2013). De acordo com Krapovickas & Gregory (1994). A distribuição dos genótipos do gênero *Arachis* está listada para 13 estados brasileiros: Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pará, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Rondônia, São Paulo e Tocantins. Devido

a estudos recentes, com novas coletas em campo, foram somados a essa lista mais sete estados (Acre, Alagoas, Paraíba, Paraná, Santa Catarina, Sergipe e Rio Grande do Norte) e o Distrito Federal (Schaffer, 2012).

O centro de origem do gênero *Arachis* está localizado no planalto central brasileiro, provavelmente na região que se estende pelos estados do Mato Grosso do Sul e Goiás (Hammons, 1994). Ainda há controvérsias quanto ao local de origem exato do amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.), sendo que a hipótese mais aceita aponta para o sul da Bolívia e norte da Argentina, uma vez que esta também é a área de ocorrência de *Arachis monticola*, considerado o genótipo silvestre mais próximo e o progenitor direto do amendoim cultivado (Gregory et al., 1980; Krapovickas & Gregory, 1994)

A maioria dos genótipos do gênero *Arachis* é diploide ( $2n = 2x = 20$ ), três são aneuplóides ( $2n = 2x = 18$ ; *Arachis palustris*, *Arachis decora*, *Arachis praecox*), ou seja, possuem um número cromossômico diferente do normal do genótipo, e duas são tetraplóides ( $2n = 4x = 40$ ; *A. hypogaea* e *A. monticola*) (Krapovickas & Gregory, 1994; Lavia, 2000; Veiga et al., 2001; Moretzsohn et al., 2013). Estudos do genoma estrutural de diferentes genótipos do gênero *Arachis* identificaram diferenças no tamanho, na forma e nos arranjos de seus cromossomos e, assim, os genótipos diploides ( $2n = 2x = 20$ ) foram organizados em cinco genomas: A, B, D, F e K (Custodio et al., 2013). O genoma A é caracterizado por um pequeno par de cromossomos localizado no cromossomo 10, chamado de cromossomo A, que possui um padrão de condensação diferente na prometáfase e também por bandas heterocromáticas na região centromérica de quase todos os cromossomos (Figura 1) (Seijo et al., 2004; Robledo & Seijo, 2008, 2010). O genoma B corresponde aos genótipos que têm cariótipo simétrico, com padrão de condensação comum a todos os cromossomos, e não há presença de bandas heterocromáticas. O genoma D é exclusivo para o genótipo *Arachis glandulifera*, que não possui o cromossomo A e é o único com cariótipo assimétrico composto por vários cromossomos submetacêntricos e subtelocêntricos (Robledo & Seijo, 2008, 2010). Já o genoma K é caracterizado pela

presença de grandes bandas centroméricas; e o genoma F por bandas centroméricas bem menores em até oito cromossomos (Robledo & Seijo, 2010).



Figura 1: Cariótipo de *Arachis duranensis* e *Arachis ipaënsis* mostrando naquele o pequeno par de cromossomos localizado no cromossomo 10 (cromossomo A) e neste, a condensação diferente desse cromossomo. Imagem reproduzida de (Kochert et al., 1996).

Utilizando-se sequências intrônicas e marcadores microssatélites, Moretzsohn et al. (2013) reconstruíram a relação filogenética da secção *Arachis* por meio do critério de máxima parcimônia e análises de distância genética (Figura 2). As análises mostraram que os genomas D, F e K agrupam-se próximo ao genoma A e que as espécies aneuploides agrupam-se próximo ao genoma B. Além disso, dados de sequências intrônicas de genes de cópia única indicaram que *A. duranensis* e *A. ipaënsis* são os ancestrais de *A. hypogaea* e *A. monticola*. Assim, o amendoim cultivado (*A. hypogaea*) é um tetraplóide natural ( $2n = 4x = 40$  cromossomos) que surgiu a partir do cruzamento entre dois genótipos silvestres diploides de genomas diferentes: *A. duranensis* ( $2n = 2x = 20$  cromossomos e de genoma A) e *A. ipaënsis* ( $2n = 2x = 20$  cromossomos e de genoma B) (Krapovickas & Gregory, 1994; Seijo et al., 2004). Dados moleculares e citogenéticos indicam que o híbrido estéril (AB) resultante sofreu duplicação espontânea de cromossomos (AABB), restaurando assim sua fertilidade, sendo capaz de produzir pólen viável (Seijo et al., 2004).



Comparando-se com outras culturas, a origem do amendoim ainda é limitada (Seijo et al., 2007; Robledo & Seijo, 2010). Baseada em evidências arqueológicas e datação por carbono, sua origem ocorreu há aproximadamente 3.500 anos sendo que sua distribuição geográfica compreende o Brasil, o leste da Bolívia, Paraguai e o norte da Argentina. Sendo assim, a Cordilheira dos Andes pode ter atuado como uma barreira impedindo as espécies de alcançar a costa do Pacífico por dispersão natural. Atualmente foram encontradas amostras na costa do Peru semelhantes a três espécies selvagens diferentes sugerindo que povos antigos possam ter cultivado algumas espécies de *Arachis* selvagem, sendo este um possível local para a origem do amendoim.

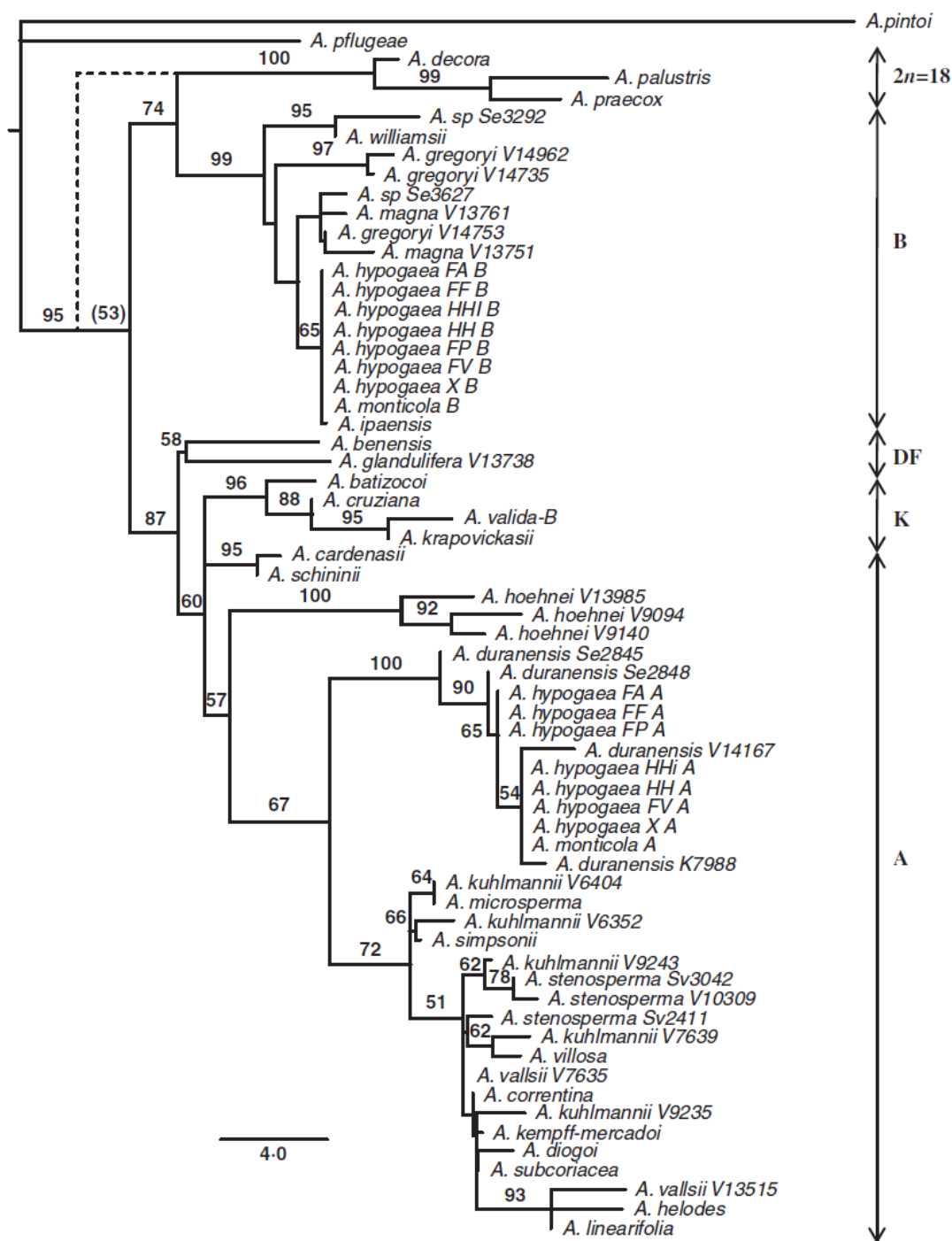


Figura 2: Árvore filogenética obtida por meio do critério de máxima parcimônia, baseada em dados de sequências intrônicas para 54 acessos da seção *Arachis* (selvagens e cultivados). Imagem reproduzida de (Moretzsohn et al., 2013).

As cultivares de amendoim desenvolvidas até hoje apresentam grande variabilidade com relação à morfologia e reprodução, porém devido à sua base genética estreita, são suscetíveis a vários fatores bióticos e abióticos (Rao et al., 2003; Seijo et al., 2004; Moretzsohn et al., 2013). O maior Banco Ativo de Germoplasma de amendoim está localizado na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília e em contrapartida aos cultivares, os parentes silvestres diploides ( $x=2n$ ) possuem boa adaptação a ambientes adversos (Dwivedi et al., 2003; Rao et al., 2003). Assim, os genótipos silvestres são uma fonte rica de alelos de tolerância à fatores abióticos como o estresse hídrico e também bióticos como a mancha preta (*Cercosporidium personatum* Berk. & M.A. Curtis) (Pande & Rao, 2001), a mancha castanha (*Cercospora arachidicola* Hori.) e a ferrugem (*Puccinia arachidis* Speg.) (Fávero et al., 2009), e pragas como tripes (*Frankliniella schultzei* Trybom) (Scarpellini & Nakamura, 2002).

## **1.2 O AMENDOIM (*ARACHIS HYPOGAEA* L.)**

O amendoim cultivado (*Arachis hypogaea* L.) pertence a secção *Arachis* do gênero *Arachis*. Cerca de 70% (6.969 acessos) dos acessos conhecidos pertencem ao genótipo *A. hypogaea*, sendo esses acessos oriundos de mais de cem países (GRIN).

Quanto à sua morfologia, a planta do amendoim é herbácea, com hábito de crescimento ereto ou rasteiro e apresenta folhas compostas e pinadas (Nogueira et al., 2013). Os folíolos têm inserção oposta, apresentando forma elíptica, embora exista alguns cultivares com folíolos de forma lanceolada. Há presença de estômatos nas duas superfícies e movimentos nictinásticos ascendentes, ou seja, os folíolos ficam distendidos durante o dia para captar a energia solar e à noite voltam-se para cima, paralelos à raque, evidenciando sua face abaxial. Quanto à sua reprodução, as flores estão agrupadas em inflorescências, são completas, perfeitas e hermafroditas. O ovário é pequeno, cilíndrico, súpero, unicarpelar, com dois a seis óvulos. Apresenta o estigma situado entre as anteras e em decorrência dessa posição e da ocorrência de cleistogamia

(polinização e fecundação antes da abertura da flor), a flor do amendoim possui alta taxa de autogamia (autofecundação).

O amendoim é a quarta oleaginosa mais produzida no mundo, perdendo apenas para soja, canola e algodão (USDA-FAS, 2015). É cultivado em regiões tropicais, subtropicais e é amplamente utilizado nas regiões tropicais como fonte de proteínas, óleo para consumo humano (Campos-Mondragón et al., 2009) e também como forragem para alimentação de gado (Hill, 2002). As sementes de amendoim possuem alto valor nutritivo e são altamente calóricas ( $596 \text{ cal g}^{-1}$ ) e ricas em proteínas (22 a 30%), vitaminas e óleo (cerca de 50%) (Bolonhezi et al., 2013). Assim, sua cultura torna-se lucrativa para o produtor uma vez que seu produto é de grande interesse para a indústria alimentícia (Lourenzani & Lourenzani, 2006; Bolonhezi et al., 2013).

O cultivo mundial de amendoim nos últimos cinco anos alcançou, em média, 34 milhões de toneladas por ano (Agroenergia, 2013) sendo que mais de 12 milhões de hectares de área plantada (FAO, 2013) está sujeita ao estresse induzido pela seca, uma vez que a grande maioria dos cultivares ocupam regiões áridas e semiáridas (Rao et al., 2003; Reddy et al., 2003). O amendoim é cultivado em mais de 30 países destacando-se China, o maior produtor global alcançando 16 milhões de toneladas em 2011/2012, seguido pela Índia (5,5 mt/ano), Estados Unidos (1,65 mt/ano), Nigéria (1,55 mt/ano), Indonésia (1,25 mt/ano) e Senegal (0,70 mt/ano) (Agroenergia, 2013). Na América do Sul, destacam-se a Argentina (0,9 mt/ano) e o Brasil (0,296 mt/ano) como os maiores produtores (Figura 3). Segundo dados da FAO (2013), os quatro maiores produtores, incluindo a Argentina, respondem por 70% das exportações de amendoim descascado. Esta cultura tem se destacado cada vez mais no mercado mundial, movimentando cerca de US\$18,5 bilhões ao ano, sendo a União Européia, Japão, Rússia, Indonésia, Canadá e México seus principais consumidores (Scarpin and Mundo, 2013).

Nos anos 60, o Brasil era considerado um grande produtor mundial de amendoim, ocupando a sétima posição com uma produção de 584.432 toneladas/ano (FAO, 2013). Os estados de São Paulo e Paraná concentravam cerca de 90% da produção nacional, assumindo participação importante no fornecimento de farelo e óleo vegetal.

A década de 70 foi marcada por um vigoroso crescimento industrial concomitante com a aceleração da inflação, logo, ajustes na política macroeconômica brasileira foram necessários para reduzir o crescimento da economia e assim houve uma queda de 300% da produção de amendoim nos 10 anos subsequentes (1972 – 1982) (Figura 4). Esta queda de produção também foi resultante de dois padrões tecnológicos atrasados e da introdução da sojicultura que, neste período, o mercado internacional estava em alta, possuía facilidade de mecanização e no Rio Grande do Sul estava sendo utilizada na correção de fertilidade do solo. (Freitas et al., 2003b; Lourenzani & Lourenzani, 2006; Martins, 2013). A cultura do amendoim retomou seu crescimento no Brasil a partir dos anos 90 e encontra-se em fase de transição de uma tecnologia de produção semimecanizada (equipamento acoplado a um trator ou animal) para uma tecnologia totalmente mecanizada, mas sendo ainda responsável por menos de 1% da produção mundial e ocupando somente a 17ª posição dos países produtores (Martins, 2013; Scarpin & Mundo, 2013). Esse crescimento na quantidade de amendoim produzido evidencia a evolução da produtividade do grão no país, resultado da disponibilidade de novas técnicas de manejo (utilização de cultivares mais produtivas e de larga adaptação regional, do tipo Runner, por exemplo, e cultivares precoces e tolerantes ao estresse hídrico) e de colheita mecanizada e de secagem artificial (Bolonhezi et al., 2013). Ainda assim, a produção em 2012 foi de 334 mil toneladas, aproximadamente 1/3 da produção obtida no auge da sua produtividade em 1972.

Grande parte dessa produção brasileira está relacionada ao sistema produtivo de cana-de-açúcar, pois o amendoim é utilizado como adubo verde durante a renovação do canavial com o objetivo de manter ou melhorar as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (Drapala, 2009; Santiago & Rosseto, [s. d.]). Em decorrência da baixa exigência de fertilidade do solo, sistema radicular bem desenvolvido, boa adaptação a solos arenosos, possibilidade de cultivo em condições marginais, boa fixação de nitrogênio e tolerância a alguns nematoides, o amendoim é uma das culturas mais importantes para ser utilizada em rotação de culturas. Além disso, o aumento na

produtividade nos últimos anos também se deve ao aumento no potencial produtivo das variedades de amendoim decorrente do melhoramento genético.

## PRINCIPAIS PAÍSES PRODUTORES E CONSUMIDORES DE AMENDOIM EM 2012

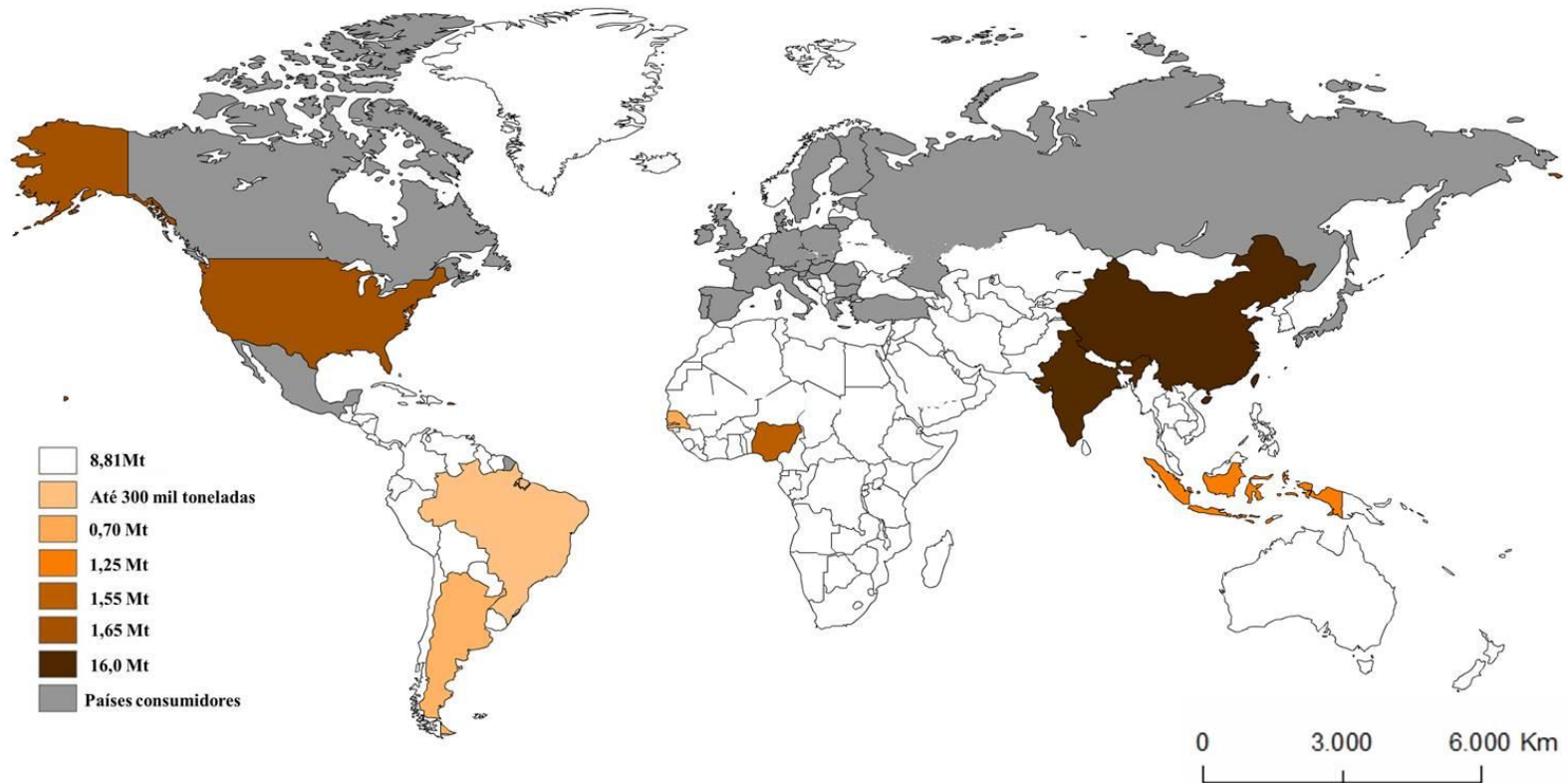


Figura 3: Principais países produtores e consumidores de amendoim no mundo. Divisão (gradiente de cores) por produção em milhões de toneladas (mt) no ano de 2012. Gradiente de menor intensidade para maior intensidade: Outros países (8,81/mt), Argentina e Brasil (0,750 e 0,296 mt, respectivamente), Senegal (0,70/mt), Indonésia (1,25/mt), Nigéria (1,55/mt), Estados Unidos (1,65/mt) e China (16,0/mt). Os países marcados em cinza representam os principais consumidores: países da Europa, alguns países da África, América do Norte e América Central. Imagem de Raquel Bispo adaptada a partir de dados de (Agroenergia, 2013).

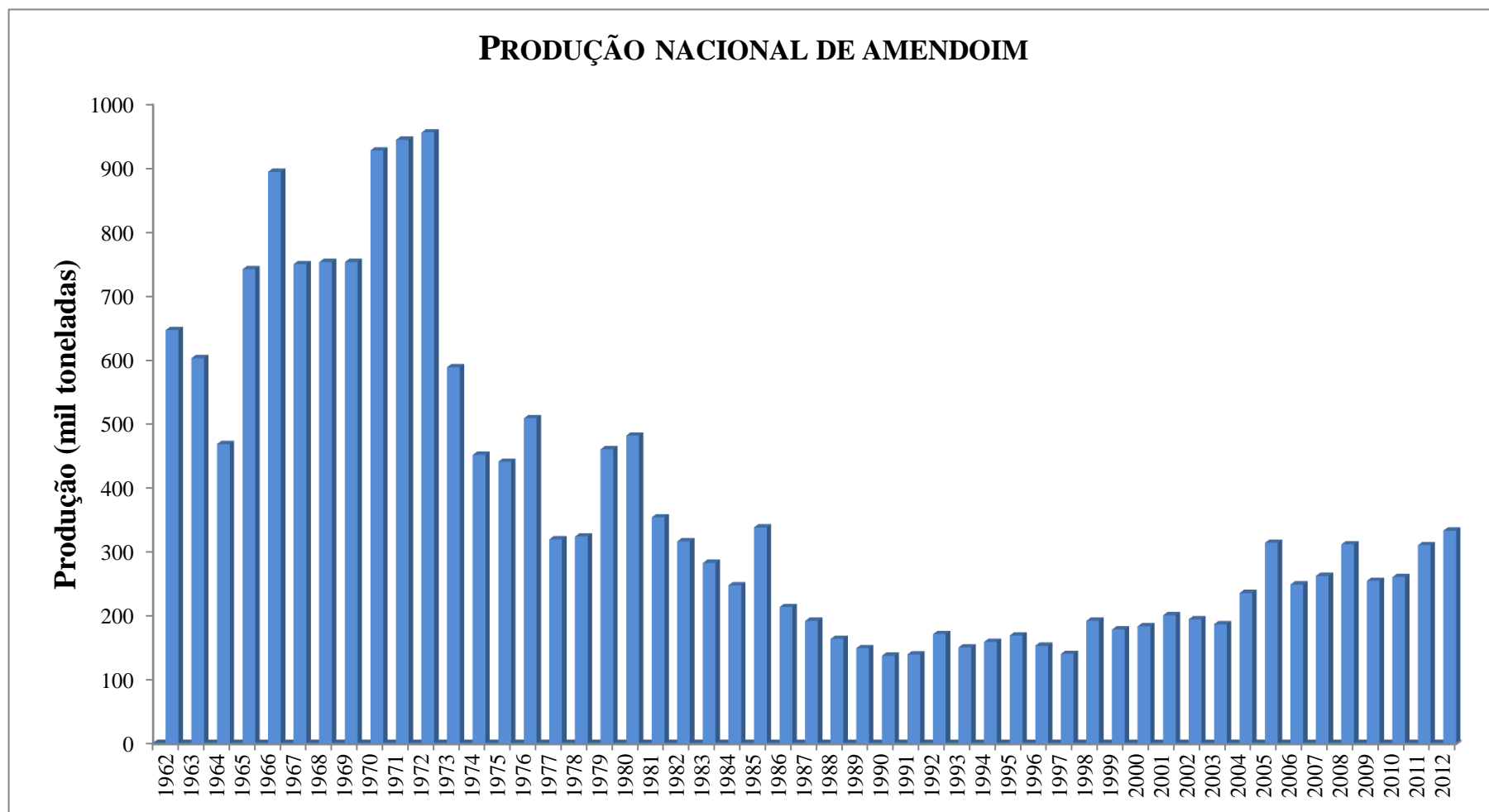


Figura 4: Produção de amendoim no Brasil nos últimos cinquenta anos, em mil toneladas (FAO, 2013).



### 1.3 DÉFICIT HÍDRICO

Grande parte dos cultivos sofre redução na produção devido à falta de água e às condições climáticas preditas. O aumento na frequência, duração e/ou severidade dos períodos de estiagem ou de intenso calor tem sido um sério desafio para a produção agrícola mundial. Atualmente, a irrigação agrícola, o abastecimento de água potável (urbano e rural) e o saneamento são considerados os principais usuários de recursos hídricos (Folegatti et al., 2007). No Brasil e no mundo, estima-se que 68 e 69%, respectivamente, do consumo de água sejam dedicados à agricultura, sendo esta o principal consumidor, seguido pela evaporação dos reservatórios, abastecimento da população e, por último, a indústria.

No Brasil, de um total de 64 produtos agrícolas, 41 tiveram queda na produção em relação ao ano anterior (2011/2012) devido à seca (IBGE, 2012). Dentre eles, destacam-se: alho (*Allium sativum* L.), arroz (*Oryza sativa* L.), batata inglesa (*Solanum tuberosum* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum* L.) feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) e tomate (*Solanum lycopersicum* L.). A soja [*Glycine max* (L.) Merr.], por exemplo, líder de produção no Brasil desde 2002, teve uma queda em sua produção de 12% devido à falta de chuvas no Nordeste e no Sul.

A seca e a estiagem provocadas pela insuficiência de precipitações desencadeiam respostas na planta em que a quantidade de energia utilizada para sua sobrevivência passa a ser maior do que a de seu desenvolvimento, desestabilizando suas funções, seguida por uma normalização e indução de processos fisiológicos de adaptação (Tate & Gustard, 2000; Favero & Diesel, 2008; Pereira et al., 2009). Já o déficit hídrico ou deficiência hídrica é definido como todo conteúdo de água de uma célula ou tecido que está abaixo do conteúdo de água mais alto exibido no estado de maior hidratação (Taiz & Zeiger, 2006).

A diminuição ou retardo do crescimento celular como resposta à seca está diretamente relacionada à transpiração, ao fornecimento de água e ao estado de turgescência. Uma leve diminuição na turgescência celular pode causar uma diferença de potencial que leva ao movimento de água em direção às células e tecidos mais secos, reduzindo assim o crescimento celular. Devido à subsequente concentração de solutos

nas células, a membrana plasmática torna-se mais espessa e comprimida diminuindo, então, sua área de superfície. Se a indisponibilidade de água se mantém, a pressão de turgescência celular continua diminuindo até a membrana celular não estar mais sob pressão e, então, o crescimento é reduzido até que a célula volte ao seu estado de equilíbrio. De fato, a manutenção da turgidez das células é importante para muitos processos fisiológicos tais como, a expansão celular, trocas gasosas nas folhas e vários outros processos de transporte pelas membranas (Taiz & Zeiger, 2006).

A imposição do estresse provocado pela falta de água provoca uma complexa série de respostas, iniciando um sistema de transdução de sinal e se manifestando em alterações a nível molecular, celular, fisiológico e de desenvolvimento (Bray, 1993). Esta complexidade dificulta a descoberta de respostas específicas para a tolerância à seca, pois o déficit hídrico pode ser resultante da limitação de água, salinidade ou alta temperatura. E, ainda, as alterações provocadas dependerão da gravidade e da duração do estresse, do genótipo da planta e do seu estágio de desenvolvimento e de outros fatores ambientais.

Os mecanismos de tolerância em resposta a este estresse incluem abscisão foliar, expansão das raízes para zonas mais úmidas e profundas do solo e fechamento estomático (Price et al., 2002). Tais mecanismos podem afetar, então, a transpiração, a fotossíntese, a fosforilação, o transporte de elétrons, a carboxilação e, ainda, alterar a composição e o conteúdo lipídico, aumentando a permeabilidade da membrana, levando à sua ruptura e morte celular (Chaves et al., 2002). Além disso, leva à redução de atividades fisiológicas e da produção de sementes e à alteração da qualidade nutricional de proteínas da semente, tornando-as mais suscetíveis à invasão de fungos.

De fato, a seca é considerada um dos maiores obstáculos para o desenvolvimento sustentável da agricultura, pois plantas submetidas ao déficit hídrico têm seu crescimento afetado e, conseqüentemente, uma produtividade limitada. Assim, o estudo da resposta das plantas ao déficit hídrico e a prospecção e identificação de genes envolvidos na tolerância à seca são de extrema importância para programas de melhoramento genético (Mitra, 2001; Leal-Bertioli et al., 2012).

Em 1986, Sinclair & Ludlow constataram que à medida que a disponibilidade de água no solo diminui, a planta passa por três estádios de desidratação (Figura 5). No

estádio I, a água está livremente disponível no solo e a condutância estomática e a perda de vapor de água são máximas, ou seja, neste estágio, a transpiração se mantém máxima (em torno de 100%). O estágio II começa quando o conteúdo de água disponível no solo reduz a 50% e a capacidade de absorção de água passa a ser menor que a demanda da transpiração. A redução na disponibilidade de água no solo é consequência do declínio de sua condutividade hidráulica. Este declínio leva ao início do fechamento estomático e à diminuição da transpiração, permitindo assim que a taxa de transpiração continue semelhante à taxa de absorção de água no solo resultando na manutenção do balanço hídrico da planta e da turgescência celular. O estágio III é caracterizado pelo fechamento completo dos estômatos, logo, a condutância estomática é mínima e, para manter o balanço hídrico da planta, toda a perda de água ocorre pela cutícula (condutância epidérmica).

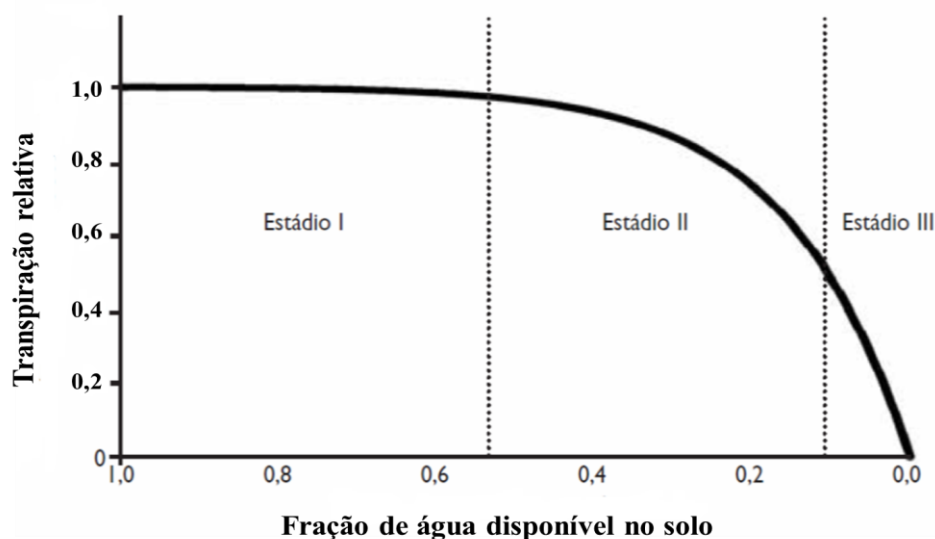


Figura 5: Os três estádios de desidratação. Imagem adaptada e reproduzida de (Sinclair & Ludlow, 1986).

Utilizando deste método descrito por Sinclair & Ludlow (1986), Leal-Bertioli et al. (2012) realizaram um ensaio de déficit hídrico gradual (drydown) com sete genótipos da secção *Arachis* (silvestres diploides, cultivados tetraplóides e um anfidiplóide) a fim de investigar características relacionadas à seca. Dentre outras

variáveis, foram analisadas as mudanças na taxa de transpiração normalizada (*Normalized Transpiration Ratio*; NTR) em função da fração de água transpirável no solo (FATS). Para cada genótipo, um valor específico de limiar de FATS foi estimado, isto é, o valor de FATS onde a NTR começa a declinar (Ray & Sinclair, 1997). Os resultados revelaram que a curva de transpiração (NTR *versus* FATS) é diferente para cada genótipo estudado e que há uma grande variação do limiar de FATS entre os mesmos (Figura 6). É possível também observar um comportamento diferenciado do grupo formado pelos genótipos diploides silvestres em relação ao grupo de tetraplóides cultivados. Entretanto, devido a falta de dados morfológicos, fisiológicos e moleculares não é possível afirmar se este comportamento diferenciado indica maior tolerância dos genótipos diploides silvestres ao estresse hídrico submetido, em comparação aos tetraplóides cultivados utilizados. Este estudo mostrou que os diploides tendem a apresentar um maior limiar de FATS do que os tetraplóides, ou seja, reduzem gradativamente a taxa de transpiração à medida que a quantidade de água disponível no solo diminui (estratégia conservativa). Por outro lado, observa-se que os tetraplóides possuem um menor limiar de FATS e reduzem bruscamente a taxa de transpiração em função da baixa disponibilidade de água no solo (estratégia “menos” conservativa).

As estratégias para o uso eficiente da água pode ser diferente entre espécies anuais e perenes e para espécies de terra seca e agricultura irrigada (Munns et al., 2010). Para cultivares anuais, como trigo (*Triticum* L.) e cevada (*Hordeum vulgare* L.), uma das estratégias utilizadas é o rápido desenvolvimento e um curto intervalo de tempo entre a floração e a maturação do grão, permitindo o uso da água disponível no solo antes de sua redução devido ao aumento da temperatura. Por outro lado, espécies perenes podem empregar uma estratégia conservativa, a fim de minimizar o uso da água para evitar a desidratação foliar e retomar seu crescimento quando a estação chuvosa retornar.

Dentre os acessos utilizados no estudo acima, *A. magna* (acesso KG30097) e *A. duranensis* (acesso K7988) apresentaram a resposta de transpiração mais conservativa quando submetidas a condições limitantes de água no solo, com um limiar de FATS de 0,76 e 0,62 respectivamente.

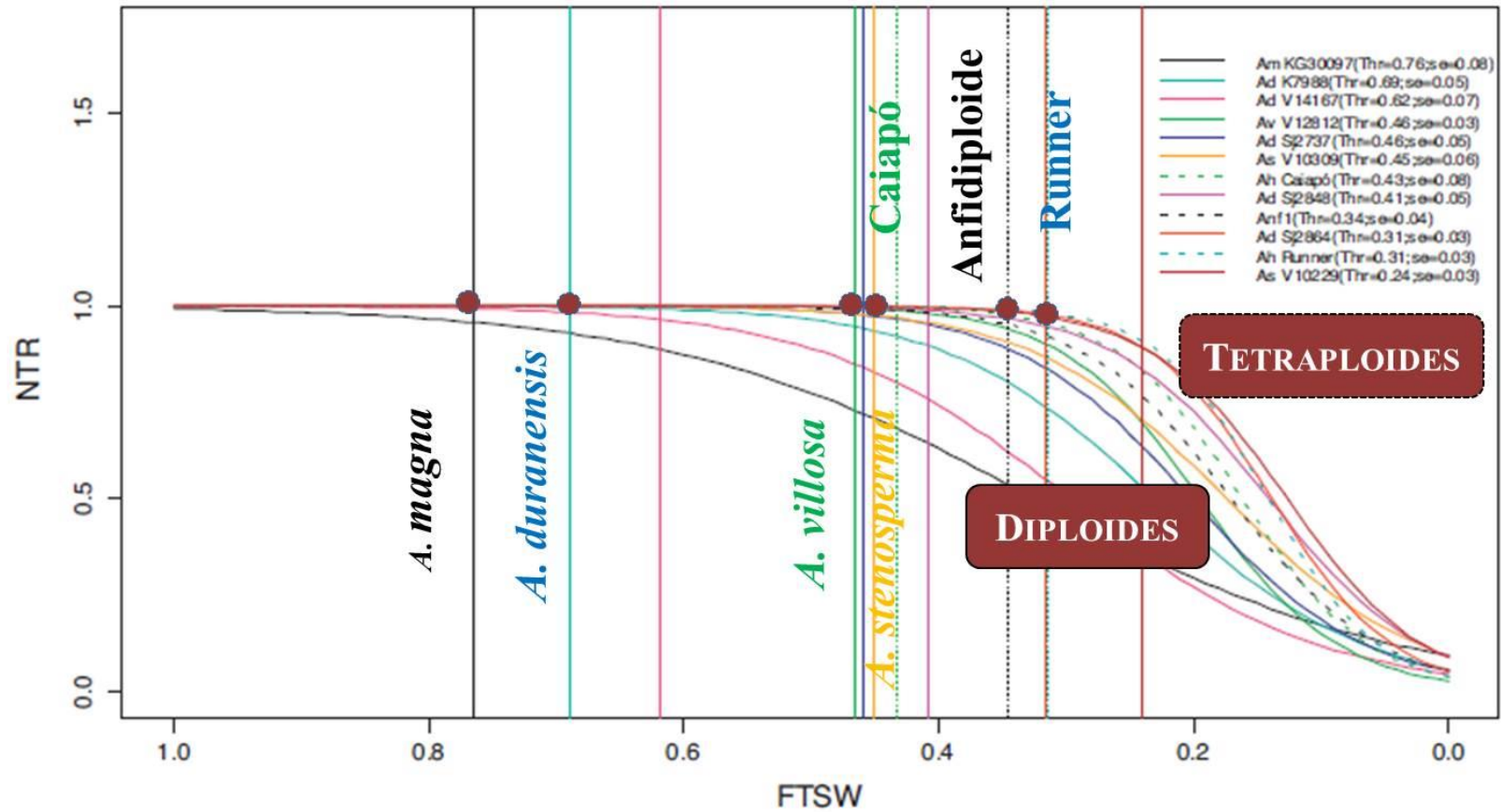


Figura 6: Taxa de transpiração normalizada (NTR) em função da fração de água transpirável no solo (FATS) de 12 genótipos da secção *Arachis*. Am (*A. magna*), Ad (*A. duranensis*), Av (*A. villosa*), As (*A. stenosperma*), Ah (*A. hypogaea*), Anf (Anfidiplóide). As linhas ininterruptas indicam os genótipos diploides e as linhas pontilhadas os genótipos cultivados tetraplóides. Imagem reproduzida de (Leal-Bertioli et al., 2012).

A partir destes resultados, Brasileiro et al. (2015) visando estudar a resposta de genótipos silvestres ao déficit hídrico gradual, analisaram o perfil global de expressão de dois genótipos da secção *Arachis* (*A. duranensis* e *A. magna*). Dentre os 18 genes candidatos, um gene que codifica uma proteína expansina putativa em raízes de *A. duranensis* mostrou maior nível de expressão (7 vezes), quando comparado com o grupo controle (Figura 7).

Atualmente, as expansinas têm sido alvo de vários estudos uma vez que atuam na parede celular e, portanto, estão envolvidas na resposta à tolerância ao déficit hídrico de diversas culturas importantes para o agronegócio.

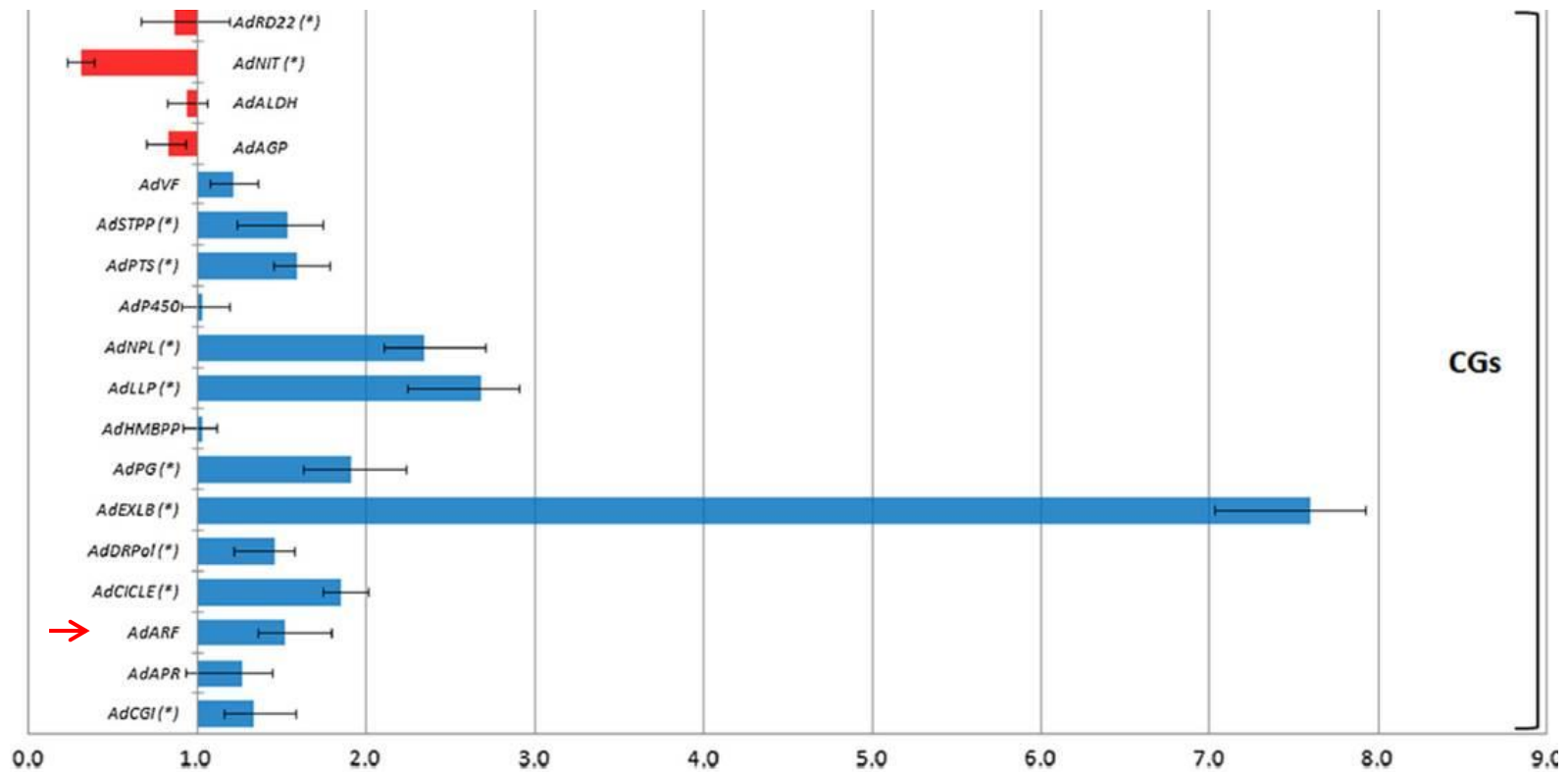


Figura 7: Análise da expressão de 18 genes candidatos (CGs), por meio da técnica RT-qPCR, em plantas de *A. duranensis* submetidas ao déficit hídrico gradual. Imagem reproduzida de (Brasileiro et al., 2015)

#### 1.4 A RELAÇÃO ÁGUA E PAREDE CELULAR

As células vegetais são circundadas por paredes celulares que proporcionam rigidez e suporte mecânico além de desempenhar um importante papel no crescimento celular (Silveira & Amaral, 2000; Brooker et al., 2011). As paredes celulares possuem uma grande diversidade morfológica, mas podem ser classificadas em dois tipos principais: a parede primária, que permite a ocorrência de crescimento celular devido à sua capacidade de extensão e a parede secundária, que é depositada no decorrer do processo de diferenciação (Figura 8). A parede primária é composta por microfibrilas de celulose e uma matriz de polissacarídeos composta por hemiceluloses e pectinas (Figura 9). As microfibrilas estão inseridas nessa matriz, fornecendo resistência e flexibilidade. As hemiceluloses são um grupo heterogêneo de polissacarídeos que têm a função de ligar várias microfibrilas umas às outras, sendo o xiloglucano o mais abundante na parede primária das dicotiledôneas. Já as pectinas são componentes da matriz e formadores de géis.

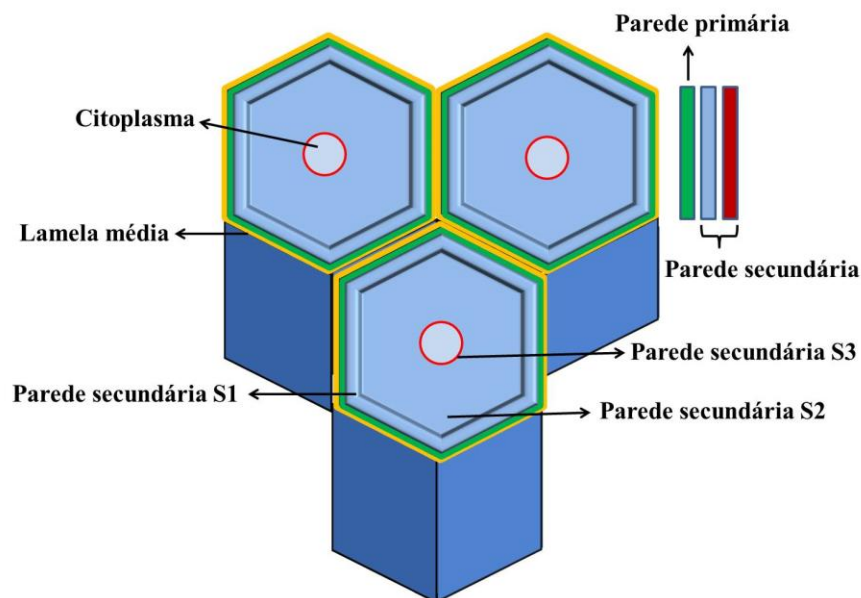


Figura 8: Representação esquemática das paredes celulares primária e secundária. Imagem adaptada de (Silveira & Amaral, 2000).



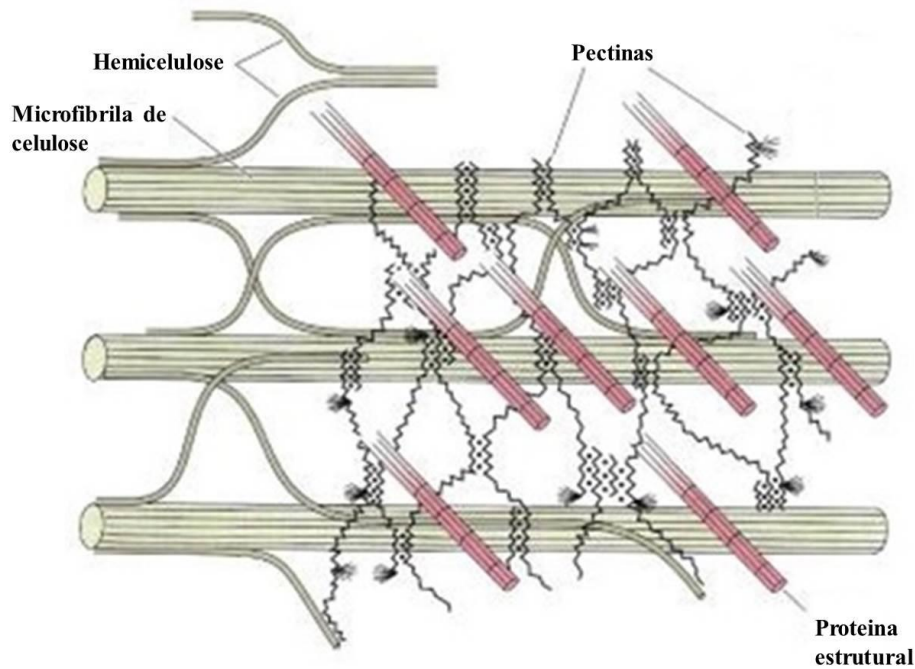


Figura 9: Diagrama com os principais componentes da parede celular primária. Imagem reproduzida (Taiz & Zeiger, 2006).

A organização destes componentes da parede celular está sujeita a modificações por ação de enzimas e proteínas secretadas pela célula, além de hormônios de crescimento como a giberelina (Chen et al., 2002) e a auxina (Paque et al., 2014) e outros fatores externos como luz (Miyamoto et al., 1994), temperatura (Roeck et al., 2008), gravidade (Hoson et al., 2002) e disponibilidade de água (Moore et al., 2008).

A quantidade de água presente em células vegetais é influenciada pela quantidade de soluto e pela pressão de turgor, ou seja, a pressão hidrostática que aumenta à medida que a água entra na célula (Brooker et al., 2011). Diz-se que a célula vegetal está túrgida quando a quantidade de água presente no citosol faz com que a membrana plasmática seja pressionada contra a parede celular (Figura 10a). Em uma célula plasmolizada, a perda de água por osmose é grande o suficiente para reduzir a pressão de turgor e retraindo não somente a membrana plasmática, como também o citoplasma e o vacúolo (Figura 10b). Quando a célula vegetal não está sob pressão de qualquer natureza diz-se, então, que se encontra em estado flácido (Figura 10c).

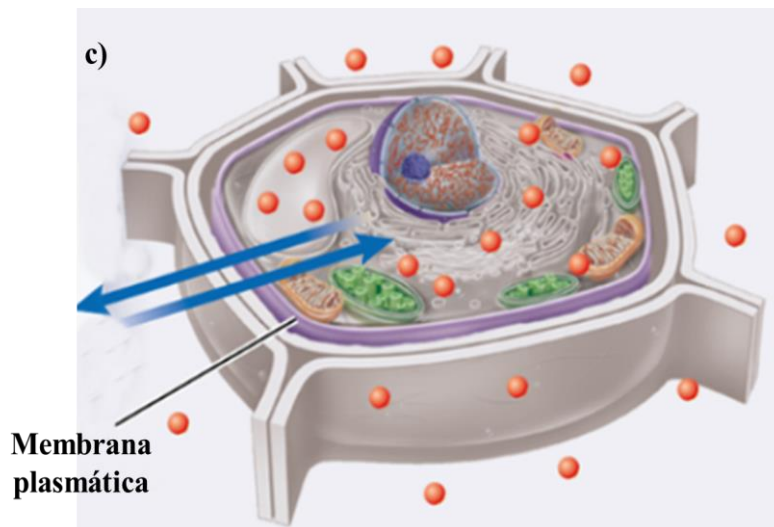
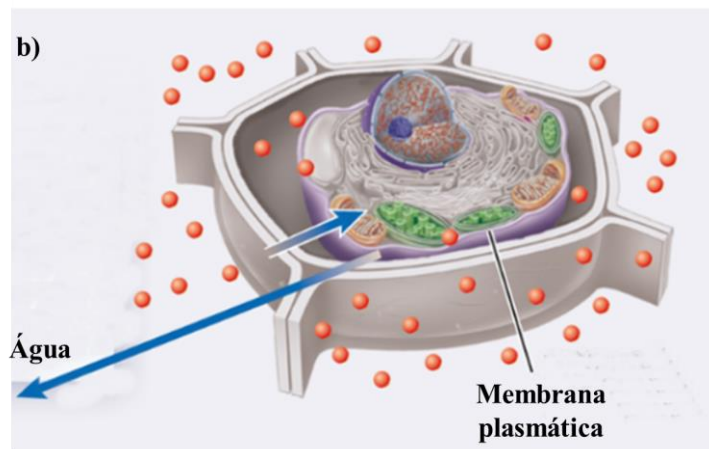
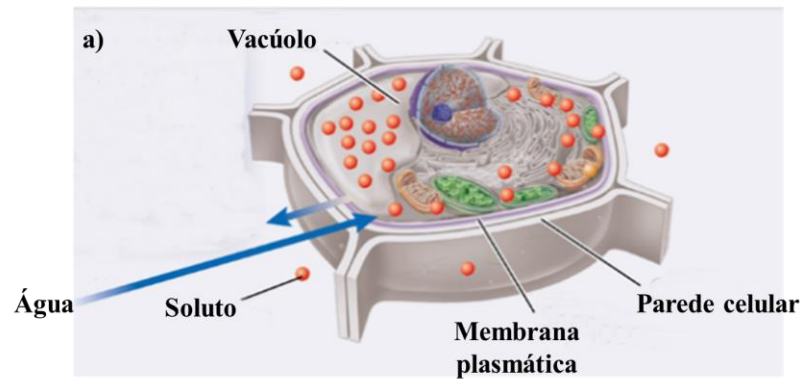


Figura 10: Células vegetais: (a) túrgida, (b) plasmolizada, (c) flácida. Imagem reproduzida de (Uzunian & Birner, 2008).

A estrutura da parede celular permite que esta suporte alto estresse físico causado pela pressão de turgor sem afetar sua integridade mecânica. Como consequência, o alargamento celular exige um relaxamento, ou seja, as células em crescimento relaxam a parede celular reduzindo o turgor e o potencial hídrico para que retenham água e possam se expandir fisicamente (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994).

Ao longo dos anos 70 e 80, acreditou-se que somente as glucanases, enzimas que hidrolisam ligações glicosídicas, eram responsáveis pelo relaxamento da estrutura da parede a fim de permitir que o crescimento ocorra (Li et al., 2003b). Em meados dos anos 90, dois novos grupos de proteínas, xiloglucanos endotransglicosilase/hidrolases e expansinas foram descritas como sendo também envolvidas no relaxamento da parede celular. Desde então, vários mecanismos potenciais de relaxamento e expansão da parede celular têm sido propostos. Segundo a hipótese do crescimento ácido, um mecanismo que pode causar o relaxamento é a acidificação da parede celular por meio da liberação de prótons pela enzima  $H^+$  - ATPase da membrana plasmática (Cosgrove, 1998; Taiz & Zeiger, 2006). Para confirmar que proteínas são necessárias para o crescimento ácido, foram realizados experimentos por reconstituição (McQueen-Mason et al., 1992). Neles, paredes celulares de hipocótilo de pepino (*Cucumis sativus* L.) foram inativadas por calor e para recuperar sua resposta, proteínas de paredes em crescimento (incluindo as expansinas), foram extraídas e adicionadas à solução que circunda a parede. Neste estudo foi verificado que estas proteínas são restritas às paredes celulares em crescimento e podem induzir a extensão de paredes celulares inativadas por calor, mas são ineficientes contra paredes celulares maduras. Além disso, ainda que estas proteínas possuam essa capacidade de extensão, elas não possuem atividade hidrolítica e apresentam sensibilidade ao pH.

## 1.5 AS PROTEÍNAS EXPANSINAS

### 1.5.1. AS PROTEÍNAS EXPANSINAS E O DÉFICIT HÍDRICO

Vários genes que codificam proteínas responsivas ao déficit hídrico foram identificados e caracterizados em várias espécies como arábido (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh) (Seki et al., 2001) e milho (*Zea mays* L.) (Zhang & Hasenstein, 2000). Dentre essas proteínas, as expansinas se destacam por ter um papel importante no maior controle da perda de água sob condições de déficit hídrico.

Em estudo realizado com *Craterostigma plantagineum*, também chamada de planta da ressurreição, foi demonstrado que a extensibilidade da parede sofreu um aumento durante os primeiros estádios de desidratação e reidratação sugerindo mudanças adaptativas durante a seca (Jones & McQueen-Mason, 2004). A extensibilidade da parede foi diretamente proporcional à atividade da EXPANSINA A (EXPA) encontrada, sugerindo que a atividade desta proteína pode contribuir para as mudanças observadas. Portanto, o aumento observado no nível de transcritos para o gene que codifica esta proteína durante os estádios iniciais de desidratação e ao longo da reidratação indica que a expansina possui um papel específico nestes processos.

Em arábido também foi observado um aumento significativo na expressão dos genes *EXPA* e *EXPANSINA-LIKE B (EXLB)* indicando que a expansina é um componente de uma etapa preparatória de adaptação à desidratação por meio de ajuste da parede celular (Harb et al., 2010). Um estudo com plantas transgênicas de arábido expressando constitutivamente uma *EXPA* de roseira (*Rosa* L.) mostrou um aumento na tolerância à seca e também no estresse salino quando comparadas ao controle não-transgênico (Lü et al., 2013).

Um mutante de arábido (*edt1*) mostrou um aumento significativo de tolerância a seca em relação ao tipo selvagem Columbia (Col-0). Ao se comparar o transcriptoma de raiz de *edt1* e Col-0, dentre várias proteínas, foi encontrada uma *EXPA* positivamente regulada, sugerindo que diferentes proteínas de relaxamento de parede celular podem estimular o desenvolvimento e crescimento de raízes em arábido (Xu et al., 2014).

Em milho, os resultados observados indicam que o aumento da atividade da *EXPA* está diretamente relacionado com a manutenção do alongamento da região apical das raízes primárias em baixo potencial hídrico (Wu et al., 1996).

Em coleótilos de trigo, as mudanças na atividade e abundância da *EXPANSINA B (EXPB)* em resposta ao déficit hídrico reforça a importância de seu papel na tolerância a este estresse (Gao et al., 2007). Em raízes de soja, a expressão de um gene *EXPB (GmEXPB2)* foi induzida, dentre outros fatores, por deficiência hídrica moderada e, ainda neste estudo, a super-expressão deste gene também estimulou o crescimento de pelos radiculares e raízes laterais em *arabidopsis*.

Um gene *EXPB (TaEXPB23)* foi isolado de coleótilos de trigo e usado para gerar uma linhagem de tabaco transgênica super expressando o mesmo (Xing et al., 2009; Li et al., 2011). Neste estudo, foi detectada uma acumulação de *TaEXPB23* em resposta ao déficit hídrico sugerindo que a super-expressão deste gene aumenta a tolerância ao estresse hídrico em tabaco transgênico.

### **1.5.2 AS PROTEÍNAS EXPANSINAS E SEU ENVOLVIMENTO COM OUTROS TIPOS DE ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS E COM PROCESSOS DE DESENVOLVIMENTO.**

Estresses abióticos, como a seca, resultam na produção e acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem atuar como agentes oxidantes danificando todos os tipos de estrutura celular (Han et al., 2014). Há evidências que enzimas antioxidantes como catalase e peroxidase estão envolvidas na tolerância ao estresse salínico e estresse à seca. Ainda que expansinas, aparentemente, não possuam atividade enzimática, a super-expressão de um gene *EXPB* de trigo em plântulas de tabaco transgênico (*TaEXPB23*) submetidos à estresse oxidativo levou ao crescimento e alongamento de raízes primárias e maior conteúdo de peso fresco e de clorofila quando comparadas com o controle. Estes resultados sugerem que a super-expressão de *TaEXPB23* pode aumentar a tolerância de tabaco transgênico ao estresse oxidativo.

Assim como, a superexpressão de uma *EXPA* específica de raiz em arroz transgênico resultou na melhoria da arquitetura do sistema radicular, como raízes primárias longas e raízes e pelos radiculares laterais (Ma et al., 2013).

A expressão do gene *EXPANSINA* pode também ser regulada por diferentes fitohormônios. Em arábido, houve um aumento na expressão de *AtEXP2* (*EXPA*), exclusivamente expressa durante a germinação de sementes. Este aumento foi detectado em sementes tratadas com giberelina (GA), fitohormônio que promove o crescimento do caule e desenvolvimento de frutos (Yan et al., 2014). Com a aplicação exógena de etileno e auxina, fitohormônios de crescimento, foi observada a formação de pêlos radiculares e a expressão de genes que codificam *EXPA* (Cho & Cosgrove, 2002).

Em coleóptilos de trigo, submetidos ao déficit hídrico, foi observado que o ácido abscísico (ABA), fitohormônio que dá início ao fechamento estomático e regula a resposta do crescimento da planta ao estresse hídrico, induz um aumento no nível de expressão da *EXPA* e da *EXPB* (Zhao et al., 2012). Neste mesmo estudo, o hormônio vegetal auxina (ácido-indolilacético; IAA), responsável pela regulação do crescimento e por estimular a síntese de enzimas que promovem um relaxamento da parede celular possibilitando a distensão das células, aumenta a acidificação da parede celular e consequentemente, a atividade da expansina.

Assim, as expansinas são proteínas que se encontram na parede celular vegetal e que também estão envolvidas em vários processos de desenvolvimento (Lin et al., 2005), tais como germinação de sementes e amolecimento de frutas em tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Brummel et al., 1999; Chen et al., 2001), desenvolvimento de raiz e polinização em milho (Cosgrove, 1997a; Zhang & Hasenstein, 2000), crescimento foliar em tabaco transgênico (*Nicotiana tabacum* L.) (Pien et al., 2001), alongamento de haste em arroz (Cho & Kende, 1997), abertura e senescência floral em *Mirabilis jalapa* L (Gookin et al., 2003) e expansão do endosperma de trigo (Lizana et al., 2010) e café (*Coffea arabica* L.) (Budzinski et al., 2011).

### **1.5.3 AS PROTEÍNAS EXPANSINAS EM OUTROS ORGANISMOS**

Proteínas e domínios com similaridade de sequência com as expansinas já foram identificadas em outros organismos e associadas a características importantes.

Em bactérias patogênicas de plantas (*Xanthomonas campestris* Pammel, *Clavibacter michiganensis* Smith e *Ralstonia solanacearum* Smith) e em um fungo patogênico (*Aspergillus niger*) estas proteínas causam a extensão da parede celular *in vitro* e enfraquecem a rede de fibras de celulose, facilitando a interação microbiana com as plantas (Georgelis et al., 2014), assim como em *Pectobacterium carotovorum* Jones (Olarte-Lozano et al., 2014). As expansinas de microrganismos possuem, assim, um grande potencial para possível aplicação na conversão de biomassa celulósica em biocombustível (Kerff et al., 2008).

Em *Trichoderma reesei* Persson (Saloheimo et al., 2002) e *Phanerochaete carnososa* (Burt) Parmasto (Suzuki et al., 2014), a expansina pode ser utilizada como pré-tratamento para o afrouxamento das microfibrilas de celulose e em *Trichoderma asperellum* Persoon aumenta sua habilidade de colonizar raízes de pepino (Brotman et al., 2008); Em *Ceratocystis platani* Engelbrecht & Harrington, um fungo fitopatogênico, pode facilitar a colonização do hospedeiro por enfraquecimento da rede celulósica e também está envolvida na remodelagem e alargamento da parede celular durante o crescimento da hifa e formação de clamidósporos (Bacelli et al., 2014).

Em nematoides, expansinas tornam os componentes da parede celular mais vulneráveis ao ataque de enzimas, facilitando a infecção e o desenvolvimento de galhas (Qin et al., 2004; Kudla et al., 2005).

Em moluscos, a endoglucanase encontrada possui sequências pertencentes ao domínio da família glicosil hidrolase 45 apresentando uma pequena, mas significativa atividade da expansina. Uma espécie invasora de moluscos que se alimenta de várias plantas têm causado danos à flora do sul da China, uma vez que esta espécie de molusco secreta esta endoglucanase no estômago para digerir o material celulósico (Xu et al., 2001).

Em amebas de solo (*Dictyostelium discoideum* Raper), a expansina encontrada parece auxiliar no movimento das microfibrilas de celulose durante a formação do pedúnculo, fase da ameba em período de escassez de alimento, que possui uma matriz extracelular celulósica (Ogasawara et al., 2009).

Quanto às algas verdes, as expansinas podem alterar a estrutura da parede celular e ter função semelhante às encontradas em plantas terrestres (Vannerum et al., 2011).

#### **1.5.4 REVISÃO HISTÓRICA E ESTRUTURAL DAS PROTEÍNAS EXPANSINAS**

As expansinas foram primeiramente identificadas em hipocótilo de pepino estudando-se o mecanismo de alargamento de parede celular, também denominado “crescimento ácido”, onde a extrusão de prótons pela  $H^+$  - ATPase ativa essas proteínas (McQueen-Mason et al., 1992). Posteriormente foram descritas como proteínas capazes de induzir a extensão e o relaxamento da parede celular de uma maneira única, rompendo as ligações não-covalentes entre os polissacarídeos que a compõem (glucanos) (Cosgrove, 2000; Sampedro et al., 2006) Neste estudo foi mostrado que apesar da capacidade de extensão, as expansinas não possuem atividade hidrolítica, como esperado para outras enzimas que atuam no afrouxamento da parede celular, e também apresentam sensibilidade ao pH. Entretanto, estudos recentes indicam que resultados negativos podem não assegurar que essas proteínas não possuam qualquer atividade enzimática (Cosgrove, 2015). A Swolenina, uma proteína de fungo (*Trichoderma reesei*) com similaridade de sequência com expansinas de plantas, exibe atividade hidrolítica contra substratos celulósicos indicando que as expansinas podem ter alguma atividade enzimática oculta (Andberg et al., 2015; Cosgrove, 2015). Assim, como o mecanismo molecular que rege esse relaxamento e expansão ainda não está claro, o mecanismo de ação das expansinas também é incerto, pois os estudos sobre a sua atividade geralmente envolvem o uso de extratos de proteínas incipientes que revelam pouco sobre os detalhes moleculares de sua ação (Li et al., 2003b). Além disso, expansinas são difíceis de purificar, uma vez que não são abundantes e a maioria dos tecidos expressa mais de uma isoforma (proteínas que têm a mesma função, mas são codificadas por genes diferentes), além de os ensaios exigirem boa aparelhagem, serem demorados e precisar de uma quantidade considerável de proteína. Há evidências que indicam que as expansinas causam o deslizamento da parede por meio de relaxamento entre os polissacarídeos, atuando na interface entre celulose e



hemiceluloses, permitindo a absorção de água e, conseqüentemente, a expansão celular. Auxiliando este processo, existem enzimas, como hidrolases de parede e transglicosilases, que clivam as ligações entre os polímeros para iniciar o relaxamento de parede e o alargamento celular. No entanto, não induzem diretamente a extensão da parede como as expansinas. Grande parte da informação sobre a atividade das expansinas é proveniente de estudos realizados após a caracterização, isolamento e sequenciamento dessas proteínas em pepino (Cosgrove, 1997b).

Pesquisas em bancos de dados de genoma funcional do tipo EST's (Expressed Sequence Tags) mostraram que as expansinas formam uma complexa superfamília de genes e outras proteínas, como o Grupo I de pólen alergênico de gramíneas, que contém regiões de aminoácidos similares às expansinas (Cosgrove et al., 1997). Assim, houve a necessidade de introduzir uma nomenclatura diferenciada entre as famílias. que são filogeneticamente relacionadas à expansina primeiramente descoberta em pepino foram chamadas de EXPANSINA A (EXPA), e as expansinas relacionadas ao Grupo I de pólen alergênico de gramíneas foram designadas EXPANSINA B (EXPB). Posteriormente, pesquisas revelaram a existência de proteínas com homologia distante tanto de EXPA quanto de EXPB, logo, estas foram chamadas de EXPANSINA-LIKE A (EXLA) ou EXPANSINA-LIKE B (EXLB) (Cosgrove, 2000; Kende et al., 2004; Sampedro & Cosgrove, 2005).

A análise das sequências de expansina de pinho (*Pinus radiata* D.Don, *Pinus taeda* L.), samambaia (*Regnellidium diphyllum* Lindm, *Marsilea quadrifolia* L.) e musgo (*Physcomitrella patens* Hedw. Bruch & Schimp.) indica que a conservação desta sequência ao longo de centenas de milhões de anos de evolução também leva a igual conservação de sua função (Schipper et al., 2002; Carey & Cosgrove, 2007; Popper, 2008). Assim, sugere-se que as expansinas se duplicaram e divergiram antes da divisão evolutiva das angiospermas em monocotiledôneas e eudicotiledôneas, há cerca de 150 milhões de anos. Entretanto, EXLA e EXLB estão ausentes na briófitas *Physcomitrella patens*.

Todas as expansinas do tipo EXPA atuam da mesma maneira e, aparentemente, são específicas para a rede celulose-xiloglucano, enquanto que EXPB possui atividade similar, mas com especificidade de substrato diferente de EXPA, provavelmente,

xilana. EXLA e EXLB ainda não possuem atividade esclarecida (Figura 12). Entretanto, estudo realizado com videira demonstrou forte expressão da *EXLB* em órgãos e tecidos lenhosos sugerindo que este gene possui papel específico na formação de parede celular secundária (Dal Santo et al., 2013).

Em geral, as expansinas possuem de 250 a 275 aminoácidos e são compostas por dois domínios precedidos por um peptídeo sinal N-terminal: domínio I, homólogo ao domínio catalítico (domínio C) de proteínas da família glicosil hidrolase (GH45); domínio II, homólogo ao grupo I pólen alergênico de gramíneas (G<sub>1</sub>As) e um peptídeo sinal de 20 a 30 aminoácidos (Figura 11) (Cosgrove, 1998; Sampedro & Cosgrove, 2005). O domínio I é responsável por ligar esta proteína às microfibrilas de celulose e a função do domínio II parece estar relacionada com a ligação entre polissacarídeos, devido à presença de resíduos polares e aromáticos na superfície da proteína. No entanto, ainda que o domínio I possua alta homologia com proteínas da família GH45, nenhuma atividade enzimática foi detectada, possivelmente devido à interação altamente específica e transiente entre a expansina e seu substrato (McQueen-Mason & Cosgrove, 1994).

As expansinas possuem ainda componentes estruturais conservados específicos para cada família. O motivo HFD (Histidina - Fenilalanina – Asparagina) e a presença de oito resíduos conservados de cisteína (Cys) na região N-terminal do domínio catalítico (domínio I) e quatro resíduos conservados de triptofanos (Trp) na região C-terminal do domínio de ligação para celulose (domínio 2) são comuns às famílias EXPA e EXPB; enquanto que EXLB é caracterizada pelo motivo TYYG (Treonina – Tirosina - Glicina) na região central, seis resíduos conservados de cisteínas, e quatro resíduos conservados de triptofanos (Figura 12). Pouco se sabe sobre a função biológicas da EXLB, no entanto, a ausência do motivo HFD sugere que sua ação possa ser diferente destas famílias, uma vez que este está localizado no domínio I homólogo à família GH45 (Wu et al., 2001; Sampedro & Cosgrove, 2005).

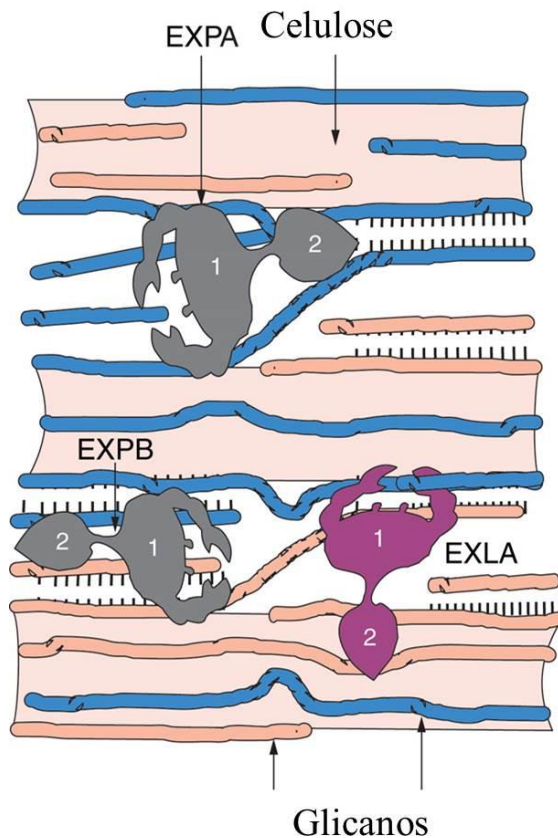


Figura 11: Mecanismo de ação hipotético da EXPANSINA A (EXPA). As microfibrilas de celulose formam uma rede mecanicamente resistente. Quando esta rede está sob estresse mecânico devido ao turgor celular, as microfibrilas e a matriz de polímeros podem se estender por um deslizamento mediado pelas expansinas. EXPA (EXPANSINA A), EXPB (EXPANSINA B), EXLA (EXPANSINA-LIKE A). Os números indicam os domínios I e II desta proteína. Imagem reproduzida de (Sampedro & Cosgrove, 2005).

Há poucos estudos sobre a estrutura das expansinas e esta falta de dados estruturais reflete sobre as informações funcionais e o modo de ação destas proteínas. Cristalografias já foram realizadas em EXPB de bactéria, *Bacillus subtilis* Cohn (Kerff et al., 2008) demonstrando uma homologia estrutural com EXPB de pólen de milho (Li et al., 2003a; Yennawar et al., 2006). E também em *Clavibacter michiganensis* e *Phleum pratense* L. os quais dados ainda não foram publicados e estão disponíveis apenas no Protein Data Bank (PDB).

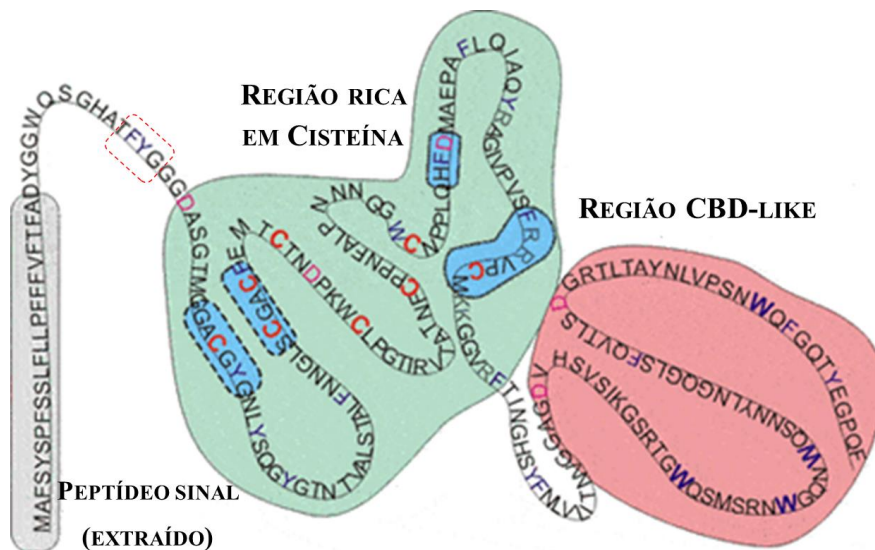


Figura 12: Principais características estruturais conservadas da proteína expansina. Peptídeo sinal na região N-terminal; Domínio I contendo oito cisteínas conservadas (C-vermelho); Domínio II contendo quatro triptofanos conservados (W-azul) com espaçamento similar ao encontrado em alguns domínios de ligação de celulose; Os aminoácidos delineados por caixas em azul pontilhadas são sequências conservadas entre EXPA (EXPANSINA A) e EXPB (EXPANSINA B), e os em vermelho são sequências conservadas somente entre EXLB (EXPANSINA-LIKE B). Imagem reproduzida e adaptada de (Cosgrove, 1998). \*CBD: Cellulose-binding (ligação de celulose).

A partir das análises das sequências do cDNA de expansina em pepino, arroz e *Arabidopsis* (Shcherban et al., 1995), ervilha (*Pisum sativum* L.) (Michael, 1996), tomate (Rose et al., 1997), pinho (Cosgrove, 1997a), milho (Wu et al., 2001), soja (Guo et al., 2011), *Selaginella moellendorffii* (Carey et al., 2013) e *Anthocephalus chinensis* (Lam.) A. Rich. ex Walp (Rubiaceae) (Ouyang et al., 2012), as proteínas deduzidas são altamente conservadas, com similaridade de sequência variando entre 70 e 90% para a superfamília EXPA. Entre as quatro superfamílias, essas proteínas compartilham entre si até 40% de identidade, sendo que o grau de conservação é maior no domínio I

(Sampedro & Cosgrove, 2005). Apesar do alto grau de conservação, diferentes genes que codificam expansinas são expressos em diferentes órgãos e tipos de célula, ou seja, a expansina expressa na raiz é diferente daquela expressa no hipocótilo. Entretanto, análises da expressão de expansina em soja demonstraram que estes genes podem ser tecido-específico ou, pelo menos, preferencialmente expressos e ainda podem apresentar função similar no mesmo tecido (Zhu et al., 2014). A expressão do gene e da proteína está correlacionada ao crescimento em vários tecidos da planta, incluindo hipocótilos (McQueen-Mason et al., 1992), coleótilos (Li et al., 1993), entrenós (Cho & Kende, 1997), folhas (Keller & Cosgrove, 1995), raízes (Wu et al., 1996) e frutos verdes (Brummel et al., 1999).

Então, é eminente o envolvimento das expansinas em diversos processos de desenvolvimento e também em respostas a diferentes estresses possuindo de fato, um grande potencial de aplicação biotecnológica. Entretanto, há poucos estudos sobre a caracterização da superfamília das expansinas em leguminosas e tampouco no gênero *Arachis*, incluindo o papel biológico da EXLB que não está elucidado até o momento.

## 1.6 RT-PCR QUANTITATIVA (RT-QPCR)

Existem várias metodologias utilizadas para o estudo da expressão gênica pela análise do transcriptoma, seja para a compreensão global dos padrões de expressão ou para a determinação de expressão diferencial. A análise do transcriptoma em larga escala exige uma etapa subsequente de refinamento e validação de resultados por meio de metodologias como microarranjos de DNA ou northern blotting. No entanto, estas técnicas possuem como fator limitante a baixa sensibilidade comparativa que podem fornecer. Atualmente, a técnica da reação em cadeia da polimerase quantitativa via transcrição reversa (RT-qPCR) é a metodologia que oferece dados mais rápidos e reprodutíveis, além de apresentar maior precisão e acurácia na quantificação de níveis de expressão de um determinado gene (Hayward-Lester et al., 1995; Ginzinger, 2002; Morgante et al., 2011). A técnica de RT-qPCR, descrita pela primeira vez em 1993, consiste na reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR) via transcriptase reversa (RT), isto é, utilizando cDNA como molde da reação, e quantificada (q) em tempo real (Higuchi et al., 1993).

A PCR quantitativa (qPCR) é semelhante à técnica da PCR convencional, no entanto, há a possibilidade de quantificação do DNA amplificado em tempo real, ou seja, em cada ciclo de amplificação (Heid et al., 1996). Assim, a qPCR também apresenta as três fases da PCR: a fase de crescimento exponencial, específica e precisa; a fase de crescimento linear, onde os produtos da reação são consumidos e o processo de degradação se inicia; e a fase estacionária ou plateau que corresponde ao final da análise. À reação de qPCR são adicionadas moléculas fluorescentes que se ligam ao produto de amplificação (amplicon) que está sendo gerado, emitindo assim um sinal de fluorescência diretamente proporcional à quantidade de produto amplificado ao longo das diferentes fases. Devido à elevada eficiência da reação e à abundância dos reagentes da PCR que levam à duplicação dos amplicons gerados em cada ciclo, a fase de crescimento exponencial é considerada a melhor para se quantificar o produto da reação.

Na curva de amplificação gerada pela qPCR (relação entre a fluorescência captada e o número do ciclo correspondente da PCR) é possível observar alguns

elementos que devem ser analisados. A linha de base (baseline) corresponde à fase da reação onde a intensidade de sinal do produto amplificado ainda não ultrapassa a intensidade da fluorescência encontrada no meio (background). O Cq (quantification cycle) corresponde ao número de ciclos necessários para que a fluorescência detectada atinja um limiar (threshold) da fase exponencial, que é predefinido em função da linha de base (Figura 13). Assim, quanto menor for o número de moléculas (cópias) de DNA ou cDNA presentes no início da amplificação, maior será o número de ciclos (Cq) necessários para que o sinal de fluorescência atinja o limiar (Heid et al., 1996; Bustin, 2000; Almeida & Saddi, 2007).

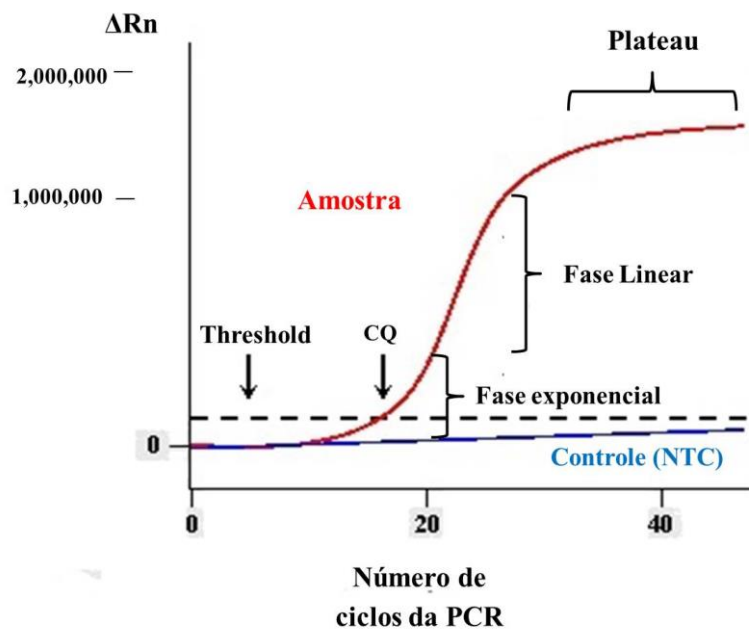


Figura 13: Curva de amplificação da reação de qPCR, mostrando o número de ciclos em função do  $\Delta Rn$  (magnitude da fluorescência emitida). O NTC (no template control = controle sem molde) é o controle da reação sem DNA-molde para verificar a qualidade da amplificação e possíveis contaminações. Cq: Quantification cycle (ciclo de quantificação). Imagem reproduzida e adaptada de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/probe/docs/techqpcr/>)

O valor de Cq pode variar entre 17 ciclos, com cerca de 10 milhões de moléculas iniciais e 37 ciclos, com uma molécula inicial (Figura 14) (Van Pelt-Verkuil et al., 2008).

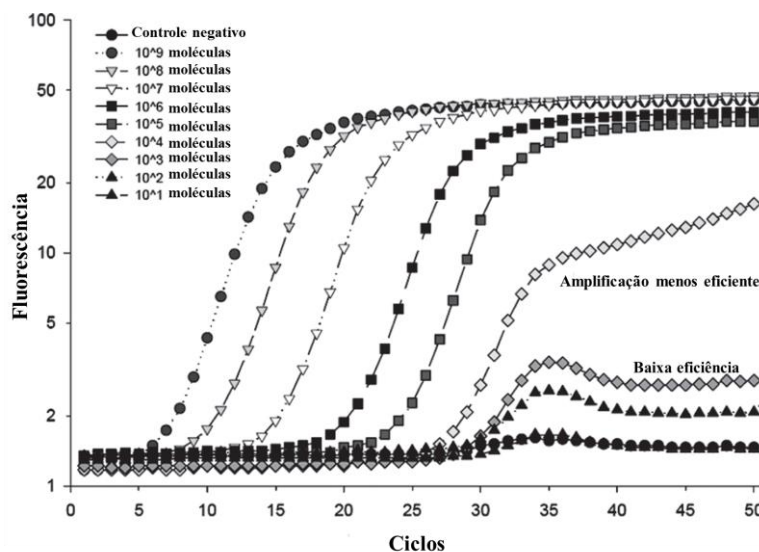


Figura 14: Representação gráfica dos resultados da amplificação por meio da PCR em função de diferentes teores de moléculas de DNA iniciais. Imagem reproduzida de Pelt-Verkuil (2008).

O composto fluorescente mais utilizado nas reações de qPCR é o SYBR<sup>®</sup> Green I, um corante fluorescente que se liga de forma intercalante ao DNA de fita dupla (Figura 15a) (VanGuilder et al., 2008). Durante a reação, as moléculas de SYBR<sup>®</sup> Green se ligam ao produto da PCR e emitem um sinal fluorescente verde que é medido e, posteriormente, seu valor convertido em uma quantidade de DNA. Assim, a quantidade de sinal é dependente da quantidade de DNA fita-dupla gerada a cada ciclo da reação. Como no início do processo, as moléculas de SYBR<sup>®</sup> Green estão livres e não ligadas ao DNA, a fluorescência é reduzida e o sinal produzido é mínimo (Figura 15b). Após o anelamento dos iniciadores (primers), quantidades crescentes de moléculas de corante se ligam à dupla fita recém-sintetizada (Figura 15c). Ao final da fase de extensão de cada ciclo, a fluorescência é quantificada. Devido à desnaturação



do DNA ao final do ciclo, as moléculas de SYBR<sup>®</sup> Green são liberadas, o sinal de fluorescência cai e um novo ciclo recomeça (Figura 15d).

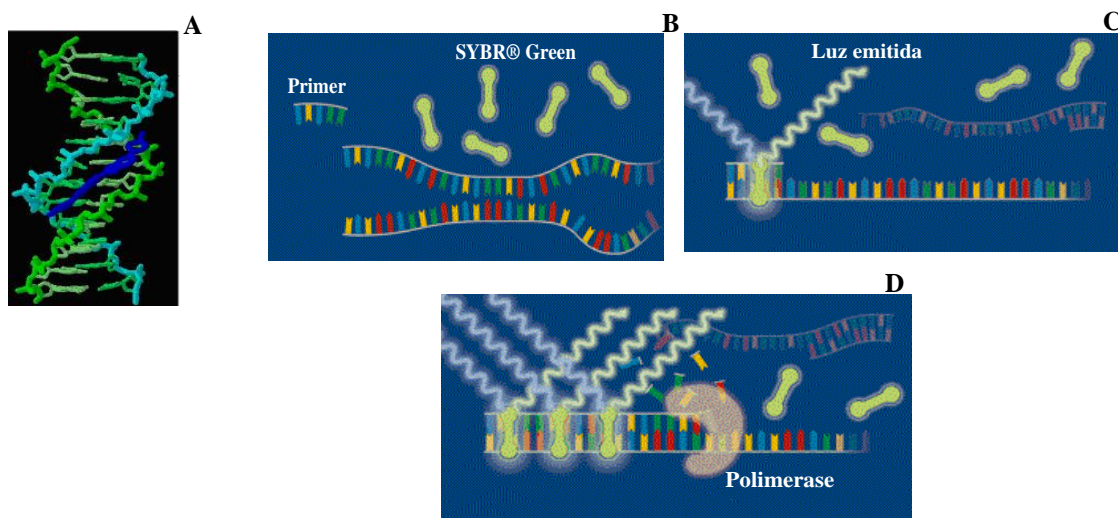


Figura 15: a) Representação da molécula de SYBR<sup>®</sup> Green (em azul) intercalada na fita dupla de DNA. Etapas de ligação do SYBR<sup>®</sup> Green ao DNA fita-dupla durante os ciclos da qPCR: b) Início da reação; c) Anelamento D) Extensão e desnaturação. Imagem reproduzida e adaptada de Academic & Industrial Information Platform (<http://www.gene-quantification.de/chemistry.html#sybrgreen>).

Para determinar a especificidade da amplificação, ou seja, se o amplicon desejado foi o único a ser amplificado, deve ser realizada uma análise da curva de dissociação (melting curve) (VanGuilder et al., 2008). Essa análise é necessária, pois apesar da facilidade de manuseio, da grande sensibilidade e do baixo custo, o SYBR<sup>®</sup> Green é inespecífico e pode se ligar a qualquer DNA fita-dupla, ou seja, há possibilidade também de ligação com dímeros de iniciadores e outros produtos não específicos (Figura 16). Também é necessário analisar a eficiência da amplificação para cada novo iniciador e para cada amostra testada. Para uma reação de PCR ocorrer com 100% de eficiência, em cada ciclo a quantidade de produto deve ser duplicado. No entanto, vários fatores podem influenciar a eficiência da amplificação, como a

qualidade dos iniciadores utilizados, os procedimentos laboratoriais, a presença de inibidores da PCR (polissacarídeos, por exemplo), entre outros.

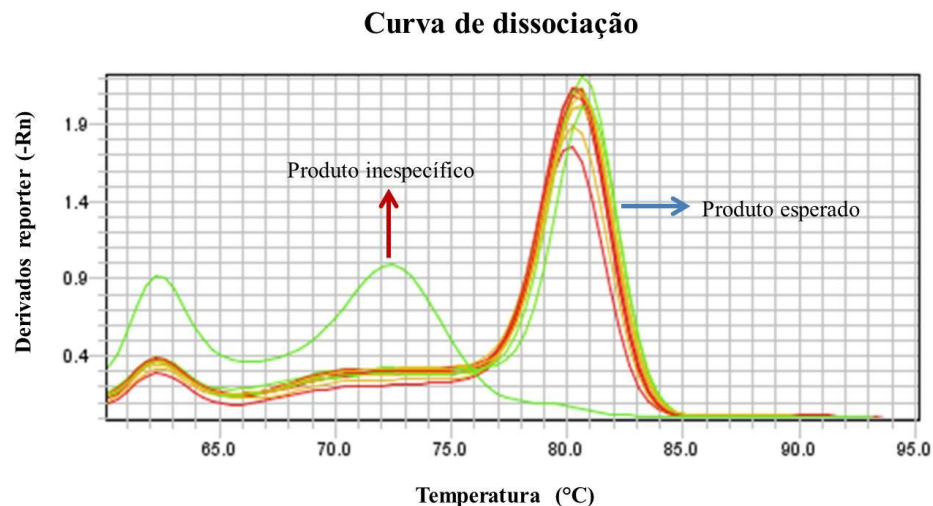


Figura 16: Representação gráfica da curva de dissociação a partir dos dados recolhidos ao final da reação de qPCR. O pico mais evidente (seta azul) indica o ponto de dissociação do produto da reação. Os contaminantes que geram produtos inespecíficos ou dímeros de iniciadores aparecem como picos adicionais (Seta vermelha).  $-Rn$  corresponde à primeira derivada negativa da fluorescência normalizada pelo SYBR<sup>®</sup> Green durante a amplificação da PCR.

Embora a técnica de RT-qPCR seja amplamente utilizada, vários problemas estão associados ao seu uso, como a variabilidade de RNA e dos protocolos de extração, a qualidade do cDNA-molde, a eficiência da PCR, entre outros. Assim, é necessário um método de normalização para minimizar esse erro e uma das estratégias mais simples é a utilização de genes de referência (VanGuilder et al., 2008). Genes de referência são genes que estão envolvidos em processos celulares básicos e se expressam de uma maneira estável em todos os tecidos ao longo da vida da planta, independente das condições ambientais. Devido à diversidade dessas condições e a incapacidade de controlar os parâmetros ambientais, o gene de referência é considerado válido somente quando está sob as mesmas condições utilizadas para analisar a expressão do gene-alvo (Huggett et al., 2005; Gutierrez et al., 2008).

Os dados gerados pela técnica de RT-qPCR dependem de ajustes dos dados para gerar curvas teóricas que permitam o cálculo dos níveis de mRNA iniciais. Calcular com maior precisão os níveis de mRNA requer parâmetros importantes, tais como a eficiência da reação e o ponto Cq. Utiliza-se, então, o algoritmo Real-Time PCR Miner (<http://www.miner.ewindup.info>) que normaliza os dados da RT-qPCR e calcula a eficiência dos iniciadores usando cálculos baseados nas reações individuais da PCR, sem necessidade do estabelecimento de curva-padrão. Este algoritmo utiliza critérios estritamente objetivos, automatizando todos os cálculos, independente da plataforma de PCR em tempo real utilizada (Zhao & Fernald, 2005). É necessário, posteriormente, realizar a normalização dos dados obtidos, ou seja, corrigir as variações entre as amostras, comparando-se os níveis de expressão do gene-alvo e do gene de referência. No entanto, os modelos disponíveis para calcular a expressão relativa somente permitem a determinação da diferença de transcrição entre uma amostra-controle e uma amostra tratada, ou seja, não é permitida uma comparação ampla entre várias amostras. Atualmente, o programa REST<sup>®</sup> (relative expression software tool) permite a comparação entre dois grupos (controle e tratado) avaliando, por meio de significância, as diferenças entre eles.

## OBJETIVOS

---

### 2.1 GERAL

Identificar e caracterizar o gene que codifica a proteína EXPANSINA-LIKE B (EXLB) em genótipos da secção *Arachis* e analisar o seu perfil de expressão em resposta ao déficit hídrico gradual.

### 2.2 ESPECÍFICOS

a) Analisar o perfil de expressão do gene *EXPANSINA-LIKE B (EXLB)* em 13 genótipos da secção *Arachis* submetidos ao déficit hídrico gradual por meio da técnica de RT-qPCR.

b) Identificar e caracterizar a sequência nucleotídica completa do cDNA do gene *EXPANSINA-LIKE B (EXLB)* de 13 genótipos da secção *Arachis*.

c) Analisar a estrutura do gene *EXLB* no genoma dos parentais (*A. duranensis* e *A. ipaënsis*) e no amendoim cultivado (*A. hypogaea*).

d) Elucidar as relações filogenéticas entre os 13 genótipos da secção *Arachis* estudados, baseadas nas estruturas protéica e nucleotídica obtidas.

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1. MATERIAL VEGETAL

Os ensaios de déficit hídrico gradual foram realizados entre maio e julho de 2013, em casas de vegetação e no Laboratório Interação Molecular Planta-Praga III, no prédio de Biotecnologia da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF. 13 genótipos da secção *Arachis* foram selecionados para esse estudo baseando-se na sua resposta diferenciada ao estresse hídrico (Leal-Bertioli et al., 2012; Brasileiro et al., 2015) e na representação dos diferentes genomas desta secção (AA, BB e AABB; Tabela 1).

Tabela 1: Genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo e seus respectivos genomas.

Genótipos	Acesso/ Cultivar	Genoma	Centro de Origem
<i>A. cardenasii</i>	Acesso GKP10017	AA	Bolívia
<i>A. durangensis</i>	Acesso K7988	AA	Argentina
<i>A. stenosperma</i>	Acesso V10309	AA	Brasil
<i>A. villosa</i>	Acesso V12812	AA	Uruguai
<i>A. gregoryi</i> 1	Acesso V6389	BB	Brasil
<i>A. ipaënsis</i>	Acesso KG30076	BB	Bolívia
<i>A. magna</i>	Acesso KG30097	BB	Bolívia
<i>A. batizocoi</i>	Acesso V6389	KK	Bolívia
<i>A. monticola</i>	Acesso V14165	AABB	Argentina
<i>A. duranensis</i> x <i>Arachis ipaënsis</i> *	Acesso V14167 x KG30076	AABB	-
<i>A. hypogaea</i>	Cultivar Caiapó	AABB	-
<i>A. hypogaea</i>	Cultivar Runner	AABB	-
<i>A. hypogaea</i>	Cultivar Tatu	AABB	-

\*Anfidiplóide sintético obtido pela duplicação de um híbrido estéril. *A. duranensis* x *A. ipaënsis* (Simpson, 2001).

Sementes dos 13 genótipos em estudo foram obtidas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG) da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, tratadas com Ethrel 2% (v/v), germinadas em copos plásticos de 500 mL perfurados na parte inferior contendo uma mistura de solo estéril, calcário e master mix, e mantidas em casa de vegetação (Figura 17).

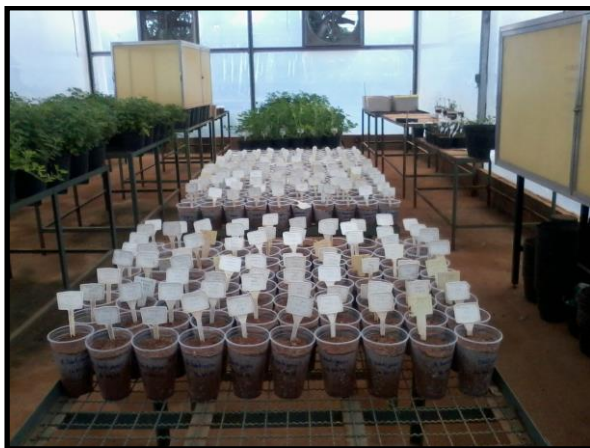


Figura 17: Sementes de genótipos da secção *Arachis* no primeiro dia de plantio. Para os 13 genótipos foram utilizados, em média, 20 indivíduos.

Após, aproximadamente, 30 dias de germinação, as plantas foram divididas em dois grupos: tratado e o controle, com cautela para que cada grupo incluísse plantas em estágio fisiológico similar (Figura 18).



Figura 18: Divisão das plantas em dois grupos: controle (à esquerda) e estressado (à direita).

### 3.2 ENSAIO DE DÉFICIT HÍDRICO GRADUAL

A metodologia utilizada para o ensaio de déficit hídrico gradual foi a descrita por Sinclair & Ludlow (1986). Após os indivíduos de cada genótipo alcançarem aproximadamente 20 folhas expandidas, o solo contido nos copos plásticos foi saturado com água, mantido em repouso por cerca de três horas para eliminar o excesso de água e atingir a capacidade de campo (CC) de 100% (volume máximo aproximado de água que um solo drenado pode armazenar) para então ser estabelecido seu peso inicial. Depois de saturado o solo, todos os copos foram vedados com sacos plásticos até a base da parte aérea da planta, a fim de minimizar a perda de água pela evaporação do solo e permitir somente a transpiração pelas folhas. Em seguida, para cada genótipo, a metade dos indivíduos foi destinada ao grupo controle e a outra metade para o grupo estressado.

Diariamente, no início da manhã, o peso de todos os copos foi registrado. O regime hídrico foi realizado da seguinte forma: todos os indivíduos (grupos controle e estressado) foram mantidos sob condição de reposição de água até que todos aqueles pertencentes ao mesmo genótipo alcançassem CC de 70%. Para tanto, determinou-se que o solo utilizado em um copo de 500 mL, quando em capacidade de campo (CC), continha, em média, 500 g de matéria seca e 120 g de água. Assim, no início do tratamento, foi necessário que, o solo contendo as plantas, perdesse 36 g de água para atingir CC de 70%. Ao atingir este parâmetro, a deficiência hídrica no grupo estressado foi aplicada por meio da não irrigação até o final do experimento. As plantas do grupo controle foram reidratadas diariamente com a quantidade de água correspondente à diferença de peso em relação ao dia anterior que, por sua vez, corresponde à água perdida pela transpiração foliar. Dessa maneira, os indivíduos do grupo controle mantiveram a CC de 70% durante todo o ensaio.

Considerando que houve variação na idade média que cada indivíduo levou para atingir a CC de 70%, os genótipos em estudo foram divididos em: bloco 1 = genótipos que levaram cinco semanas após o plantio para alcançar o estágio estabelecido; bloco 2 = genótipos que levaram seis semanas após o plantio para alcançar o estágio estabelecido; bloco 3 = genótipos cultivados tetraplóides e

anfidiplóide que levaram seis semanas, após o plantio, para alcançar o estágio estabelecido. (Tabela 2).

Tabela 2: Divisão por blocos dos 13 genótipos da secção *Arachis* em estudo baseada em seu estágio fisiológico (cada indivíduo apresentava mais de 20 folhas expandidas) e o tempo necessário para que todos os indivíduos atingissem CC de 70%. CC: capacidade de campo

Genótipos	Tempo necessário para atingir o estágio de 20 folhas expandidas (em semanas)	Idade para CC de 70% (em semanas)
<i>A. gregoryi</i>		
<i>A. monticola</i>	5	6
<i>A. stenosperma</i>		
<i>A. batizocoi</i>		
<i>A. cardenasii</i>		
<i>A. duranensis</i>	6	7
<i>A. ipaënsis</i>		
<i>A. magna</i>		
<i>A. villosa</i>		
<i>A. hypogaea</i> cv. Runner		
<i>A. hypogaea</i> cv. Tatu	5	6
<i>A. hypogaea</i> cv. Caiapó		
<i>A. duranensis</i> x <i>A. ipaënsis</i>		

A taxa de transpiração diária (TR) de cada indivíduo foi calculada pela diferença de peso dos copos entre os sucessivos dias do ensaio. A taxa de transpiração normalizada (NTR) foi então calculada pela razão entre a TR de cada indivíduo do grupo estressado pela média da TR de todos os indivíduos do grupo controle do mesmo genótipo. A NTR reflete a variação da TR diária entre os indivíduos nos dois tratamentos. Para uma dada planta do grupo estressado, este ensaio foi finalizado no dia em que sua NTR atingiu valor igual ou abaixo de 0,3, ou seja, sua transpiração estava pelo menos 70% menor do que a transpiração média de todo o grupo controle. A planta do grupo estressado foi coletada juntamente com uma planta do grupo controle que apresentava NTR igual ou próxima à NTR do grupo total. Para coleta, além do valor da



NTR também foi observado a diferença fenotípica entre os grupos de tratamento. Para cada indivíduo, raízes foram coletadas e congeladas separadamente em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para extração de DNA genômico (gDNA) e RNA total.

### **3.3 EXTRAÇÃO DE gDNA**

Para extração de gDNA, as seguintes soluções foram utilizadas:

- Tampão 2X CTAB: CTAB 2% (p/v), Tris-HCl 100 mM – pH 8,0, EDTA 20 mM – pH 8,0, NaCl 1,4 M, PVP 40 1% (p/v).

- Tampão de precipitação CTAB 1X: CTAB 1X, Tris-HCl 50 mM – pH 8,0, EDTA 20 mM.

- Cloreto de Sódio 1,2 M

- Etanol

Foi macerado em tubo de microcentrífuga de 2 mL, com auxílio de pistilos plásticos, cerca de 200 mg de tecido (folha) com nitrogênio líquido até a obtenção de pó fino. Adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de tampão 2X CTAB e mais 2 $\mu\text{L}$  de 2-mercaptoetanol para cada 1 mL de tampão e os tubos foram incubados em banho-maria a  $60^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos. Foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio-álcool-isoamílico (24:1) e misturou-se até formar uma emulsão. Centrifugou-se à velocidade máxima e temperatura ambiente por 5 minutos. Aproximadamente 300  $\mu\text{L}$  da fase aquosa foi transferida para dois tubos de microcentrífuga de 1,5 mL. Adicionou-se 900  $\mu\text{L}$  de tampão de precipitação CTAB 1X e agitou-se lentamente. Centrifugou-se a 13.200 g por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado formado foi ressuspensionado com 300  $\mu\text{L}$  de NaCl 1,2 M. Os dois tubos contendo a mesma fase aquosa foram misturados e os 600  $\mu\text{L}$  obtidos foram transferidos para um único tubo de microcentrífuga de 2 mL. Centrifugou-se a 12.000 g por 5 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O DNA foi precipitado com 1 mL de etanol 100% (v/v) e misturou-se gentilmente. Centrifugou-se à velocidade máxima por 2 minutos e descartou-se, cuidadosamente, o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com 500  $\mu\text{L}$  de etanol 70% (v/v) e centrifugou-se à velocidade máxima por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado. A lavagem foi repetida. Após a evaporação total do etanol, o

precipitado contendo o DNA foi ressuspenso em 100 µL de TE acrescido de RNase e incubado a 37 °C por 60 minutos.

Para a avaliação qualitativa da integridade do DNA extraído, utilizou-se a análise em eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE, corado com brometo de etídio.

Os produtos de amplificação de gDNA obtidos foram purificados utilizando o kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) e encaminhados para sequenciamento utilizando-se os iniciadores desenhados na sequência *AdEXLB* (Brasileiro et al., 2015), denominados EXPuniF e EXP464R (Anexo 1)

### **3.4 EXTRAÇÃO E ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA**

#### **3.4.1 FORMAÇÃO DE CONJUNTO DE AMOSTRAS (POOLS)**

Antes do início das extrações de RNA total, foram formados três conjuntos de amostras para cada tratamento e para cada genótipo, denominados pools 1 (um), 2 (dois) e 3 (três) (Figura 19). Para cada *pool*, juntou-se o material biológico de três indivíduos do mesmo genótipo, do mesmo tecido (raiz) e do mesmo tratamento que apresentavam NTRs próximas. Além disso, também foi utilizada como critério de seleção dos indivíduos que comporiam o mesmo *pool*, a média do número de dias que cada indivíduo levou para ser coletado.

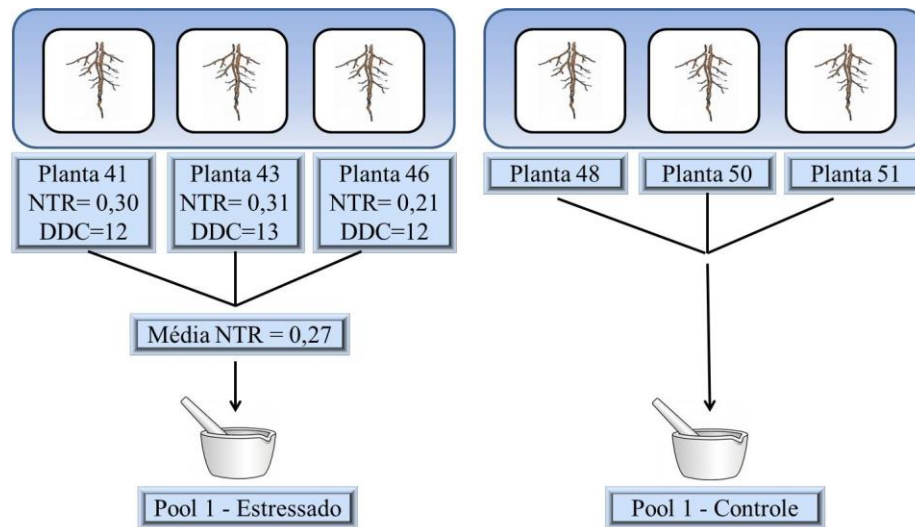


Figura 19: Ilustração da formação do *pool* 1 (um) estressado e o correspondente *pool* 1 (controle). NTR: taxa de transpiração normalizada. DDC: dias de coleta.

Após a formação dos pools, o material biológico de cada *pool* foi macerado junto em almofariz, previamente refrigerado com nitrogênio líquido, até obtenção de um pó fino. Cerca de 650 mg do pó obtido foi transferido para tubo cônico de 15 mL, voltando a ser mantido em nitrogênio líquido até a etapa inicial de extração.

### 3.4.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

Para isolamento de RNA total de raízes de genótipos da secção *Arachis* foi utilizado o protocolo modificado de LiCl (Morgante et al., 2011). As seguintes soluções foram utilizadas:

- Tampão NTES: NaCl 0,1 M; Tris-HCl 0,01 M, EDTA 1 mM; SDS 1% (p/v) e quantidade suficiente de água destilada para 100 mL de tampão;
- Fenol: Clorofórmio: Álcool-isoamílico - Clorofane (25:24:1) –
- Acetato de Sódio - AcNa –3 M, pH 4,5;
- Cloreto de Lítio - LiCl –4 M;
- Água destilada;
- Etanol absoluto a -20°C;
- Etanol 70% (v/v) a -20°C;

- Tampão TAE: Tris-base 40 mM; ácido acético glacial 20 mM e EDTA 1 mM

No primeiro dia de extração foram adicionados tampão NTES e clorofane. Cada um em quantidade equivalente ao volume inicial da amostra (aproximadamente 2,5 mL), e em seguida, centrifugados a 8.000 g a 4 °C. A partir desse ponto, todas as amostras foram constantemente mantidas no gelo. A fase superior aquosa de cada tubo foi então transferida para um novo tubo cônico de 15 mL e adicionou-se 1/10 do volume obtido de AcNa e 2,5 vezes de etanol absoluto gelado. As amostras foram agitadas manualmente, a fim de homogeneizá-las, e incubadas a -20 °C por 2 horas. Após esta precipitação em etanol, as amostras foram centrifugadas a 8.000 g por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado por meio de inversão do tubo. O precipitado (*pellet*) obtido foi ressuscitado em 1 mL de água destilada, transferido para microtubo de polietileno de 1,5 mL e centrifugado a 5000 g por 3 minutos a 4 °C. Transferiu-se então o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta, para microtubo de polietileno de 2,0 mL e adicionou-se o mesmo volume de LiCl. As amostras foram incubadas durante aproximadamente 16 horas a -20 °C. No segundo dia, as amostras precipitadas foram centrifugadas a 13.200 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, por inversão, e o precipitado ressuscitado em 0,5 mL de água destilada. Uma nova precipitação em etanol foi realizada e, em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.200 g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e lavou-se o precipitado com 0,5 mL de etanol 70% (v/v) gelado. Centrifugou-se a 13.200 g por 5 minutos a 4 °C, descartando o sobrenadante. O precipitado foi mantido em temperatura ambiente até evaporação total do etanol para então, o RNA total ser ressuscitado em 35 µL de água destilada.

Para a avaliação qualitativa da integridade do RNA total extraído, utilizou-se a análise em eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v) em tampão TAE e corado com brometo de etídio. A avaliação quantitativa foi realizada pela leitura da absorbância da amostra em comprimento de onda de 260 nm em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000, ThermoScientific), sob a observação dos valores da relação 260/280 nm entre 1,8 e 2,0 U.A (Unidade de Absorbância).

Após a quantificação, 150 µg de RNA total de cada amostra foram purificados em colunas do Kit Invitrap<sup>®</sup> Spin Plant RNA Mini Kit (Invitex) a fim de eliminar eventuais contaminações por proteínas. A qualidade e quantidade das amostras de RNA purificadas foram novamente avaliadas conforme descrito anteriormente.

A fim de eliminar eventuais contaminações das amostras de RNA total com DNA genômico, as amostras foram primeiramente tratadas com desoxirribonuclease (DNase). Para isso, 2 µg de RNA total de cada pool foi tratado com 2U de TURBO<sup>™</sup> DNase (Ambion<sup>®</sup> Applied Biosystem<sup>™</sup>), em uma reação com 10 µL de volume final, a qual foi incubada a 37 °C por uma hora, seguida da desativação da enzima, com 2,5 mM de EDTA por 10 minutos a 65 °C e seguido de resfriamento no gelo por cinco minutos.

### 3.4.3 SÍNTESE DE cDNA

A partir de dados mostrados por (Brasileiro et al., 2015), no presente trabalho, cDNAs foram sintetizados a partir de RNA total extraído somente de raiz, uma vez que os resultados demonstraram maior expressão do gene *EXLB* nesse tecido quando comparado com a expressão obtida em folhas.

Após o tratamento com DNase, cada amostra de RNA total foi utilizada para síntese de cDNA no mesmo tubo, de acordo com (Morgante et al., 2011). Foi adicionado ao volume final de cada amostra um *mix* contendo 1 µL de Anchored Oligo (dT)<sub>20</sub> e iniciador (Invitrogen<sup>®</sup>) a 50mM e 1 µL de dNTPs a 10 mM. Incubaram-se as amostras a 65 °C por cinco minutos e, em seguida, mantidas no gelo por mais cinco minutos. Para a transcrição reversa, foi adicionado em cada amostra um *mix* contendo 4 µL de tampão FS (First Strand Buffer) da enzima, 2 µL de DTT (DL-ditiotreitol) 0,1M e 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperScript III (Invitrogen<sup>™</sup>). Incubou-se a 55 °C por 60 minutos e, por último, a 70 °C por 15 minutos, para desativação da enzima. As reações RT-PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo reagentes com as seguintes concentrações: tampão 10X, MgCl<sub>2</sub> 1,44 mM, dNTP 5 mM, 0,30 µM de cada iniciador, 1,5 U da enzima Taq DNA Polimerase Recombinant (Invitrogen<sup>®</sup>) e 1 µL de cDNA.

Para a reação, foi utilizado um par de iniciadores que amplifica um fragmento de 190 pb, do gene referência que codifica uma *UBIQUITINA (UBI2)* de *A. hypogaea* (Morgante et al., 2011) , pois sua expressão é estável sob condições de estresses biótico (*Meloidogyne arenaria*, *Cescosporidium personatum*) e abiótico (seca) (Anexo 1).

Esta reação foi realizada em termociclador Master Cycle (Eppendorf), sendo submetida a 94°C por 5 minutos, para uma desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos repetitivos de amplificação: 94°C por 30 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e a um ciclo final de extensão a 72°C por 7 minutos. O resultado foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). Os produtos de amplificação de cDNA foram também encaminhados para sequenciamento (nos sentidos “forward” e reverso) utilizando os iniciadores EXPuniF e EXP464R na empresa MacroGen Inc. (Coreia do Sul).

### **3.5 RT-PCR QUANTITATIVA (RT-qPCR)**

Para análise da expressão relativa do gene EXLB foi utilizada a reação em cadeia da polimerase quantitativa via transcrição reversa (RT-qPCR), utilizando cDNA como molde. A reação de RT-qPCR foi realizada no F7300 Real Time PCR System (Applied Biosystem), utilizando-se o reagente Platinum® SYBR® Green RT-qPCR SuperMix-UDG w/ROX (Invitrogen) que contem todos os componentes necessários para amplificação e detecção do DNA por qPCR (Taq DNA Polimerase recombinante, MgCl<sub>2</sub> e dNTP's, exceto os iniciadores da fita molde). A reação foi preparada em um volume final de 10 µL, contendo 5 µL do SuperMix SYBR Green, 0,2 µM de cada iniciador (4AD2F e 4AD2R) e 2 µL do cDNA diluído a 10<sup>-2</sup>. O par de iniciadores utilizado nesta reação foi desenhado na sequência putativa da AdEXLB (Brasileiro et al., 2015), amplificando um fragmento de 150 pb (Anexos 1 e 2).

As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas técnicas (três repetições da mesma amostra) e triplicatas biológicas, pois para cada tratamento (estressado e controle) havia três pools. Como controle negativo foi utilizado o NTC (no template control) que é o mesmo mix de reação utilizado nas demais amostras, porém sem a

adição da fita molde, isto é, sem o cDNA. Os ciclos da RT-qPCR consistiram em quatro etapas: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, e por fim, uma curva de dissociação de 95°C por 15 segundos, 60 °C por 60 segundos e 95°C por 15 segundos. A quantificação relativa da expressão do gene EXLB foi realizada para cada genótipo em relação a dois genes de referência previamente selecionados (Morgante et al., 2011): ACTINA\_1 e UBIQUITINA, conforme anexo 1.

Os dados brutos (raw data) foram importados da plataforma de PCR em tempo real para o programa Real-time PCR Miner 4.0 para cálculo da eficiência, do valor Cq e erros-padrão associados. Em seguida, foi calculada a média de Cq das triplicatas técnicas e biológicas de cada tratamento tanto do gene EXLB (gene-alvo) quanto de ACT1 e UBI2 (genes de referência). Os dados foram posteriormente normalizados e analisados utilizando o programa REST©. A análise, por meio da técnica RT-qPCR, dos níveis relativos de mRNA é realizada primeiramente pela normalização dos valores de Cq do gene-alvo (EXLB) pelos Cq dos dois genes de referência (ACT1 e UBI2).

A quantificação relativa (RQ) é então dada pela razão dos valores normalizados das amostras submetidas ao tratamento pelo das amostras controle. Dessa forma, 1 é o valor inicial comparativo, e portanto, para uma razão acima de 1, entende-se que houve uma regulação positiva da expressão gênica em resposta ao tratamento, enquanto que um valor abaixo de 1, significa que houve uma regulação negativa da expressão gênica.

### **3.6 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA COMPLETA DO CDNA DO GENE *EXPANSINA-LIKE B (EXLB)*.**

Para identificar a sequência nucleotídica completa do cDNA da *EXLB*, foi realizado alinhamento de nucleotídeos entre as seguintes sequências: sequência putativa (contig) da *AdEXLB* (Brasileiro et al., 2015)(Anexo 2); sequência de cDNA da *EXLB* de *A. duranensis* obtida neste estudo (Anexo 3); e sequência de cDNA da *EXLB* de *A. hypogaea* encontrada em banco de dados públicos (Anexo 4) . A partir deste alinhamento (Anexo 5) foi desenhado um par de iniciadores utilizando o programa Primer3Plus disponível em (<http://www.bioinformatics.nl/cgi->

bin/primer3plus/primer3plus.cgi). Os parâmetros utilizados neste programa foram: fragmento amplificado (amplicon) com tamanho de 400-600 pb, iniciadores com tamanho entre 19-22 pb, com temperatura de anelamento entre 59-61°C e porcentagem de bases GC no iniciador entre 45-55%. Estes iniciadores, denominados EXPR e EXPF (anexo 1), amplificam parte da região 5'UTR até o códon de terminação da sequência da *EXLB* e assim foi possível determinar a sequência genômica e codificadora completa da *EXLB* (Anexos 6 e 7).

Em seguida, tanto as sequências genômicas quanto as sequências codificadoras foram alinhadas entre si no programa Clustaw acessado pelo programa BioEdit - Biological Sequence Alignment Editor versão 7.1.9 (Anexos 8 e 9). A partir deste alinhamento e relatos na literatura foi possível determinar o motivo e os resíduos conservados que determinam a qual família a expansina estudada pertence (*EXLB*).

Devido ao alto grau de similaridade apresentada, a porcentagem de identidade foi realizada utilizando o programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versão 6. (Kumar et al., 2000)

Assim, em posse da sequência nucleotídica completa da *EXLB* foi possível estabelecer um modelo de sua estrutura gênica (gene model), por meio do programa Artemis - Genome Browser and Annotation Tool.

### **3.7 ANÁLISE FILOGENÉTICA**

As sequências de aminoácidos deduzidas da *EXLB* dos 13 genótipos da secção *Arachis* juntamente com as sequências de outros genótipos obtidas de bancos de dados públicos foram utilizadas para identificar sua localização na árvore filogenética. A análise foi realizada utilizando o programa MEGA versão 6 (Kumar et al., 2000) com critério de máxima parcimônia e a ferramenta bootstrap (2.000 replicações).



## RESULTADOS

---

### 4.1 ENSAIO DE DÉFICIT HÍDRICO GRADUAL

A resposta à desidratação gradual de cada planta durante o ensaio foi acompanhada por meio da determinação da perda diária de peso das plantas (método gravimétrico) para estimar a TR (Taxa de Transpiração individual). Durante o ensaio, a temperatura variou entre 18,1 e 30,4°C e a umidade relativa, 25,8 a 87%. Devido a características intrínsecas de cada genótipo, observou-se que houve variação no tempo necessário para que apresentassem cerca de 20 folhas expandidas, assim como no tempo necessário para o solo atingir 70% de CC e o ensaio ser iniciado.

A coleta de raízes foi realizada quando a NTR (Taxa de Transpiração Normalizada) do grupo estressado apresentou valor igual ou abaixo de 0,3 quando comparado ao grupo controle, observando-se também a diferença fenotípica entre eles. Uma NTR igual a 0,3 significa que o indivíduo pertencente ao grupo estressado está transpirando apenas 30% quando comparado com todos os indivíduos do grupo controle. Assim, neste trabalho, uma NTR de 0,3 foi considerada como o momento em que o indivíduo atingiu um nível mais alto de estresse hídrico, indicando uma redução de 70% na transpiração dos indivíduos estressados em relação ao controle irrigado. Nesta etapa do déficit hídrico, a capacidade de absorção de água da planta é menor que a sua demanda de transpiração. Isto caracteriza o estágio II do processo de desidratação que se inicia quando o conteúdo de água no solo reduz a 50%, levando ao fechamento estomático e, conseqüentemente, à redução na taxa de transpiração na tentativa de manter o balanço hídrico da planta (Sinclair & Ludlow, 1986).

Como esperado, diferenças fenotípicas entre indivíduos do grupo estressado e indivíduos do grupo controle foram observadas ao longo do ensaio como senescência e murcha das folhas, principalmente quando os indivíduos atingiram uma NTR próxima a 0,3 (Figura 20).

Foi observado que as plantas estressadas de *A. batizocoi*, *A. duranensis*, *A. magna*, *A. monticola* e *A. stenosperma*, mostraram pouca diferença fenotípica em relação ao grupo controle enquanto que os demais genótipos apresentaram senescência

e murcha foliar avançadas. Foi observado ainda que *A. monticola* apresentou um comportamento de TR semelhante ao demais tetraplóides estudados e que o anfidiplóide sintético revelou um padrão de TR mais próximo aos parentais silvestres, *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, do que aos tetraplóides cultivados.

A média da NTR individual para coleta do material vegetal manteve-se homogênea (em torno de 0,25) entre os genótipos (Tabela 3), com exceção de *A. villosa*, que os indivíduos foram coletados ao alcançar NTR próxima a 0,5 (Figura 20 D), pois neste momento já apresentavam senescência foliar muito avançada; e *A. hypogaea* cv Tatu, que apresentou queda súbita da taxa de transpiração de um dia para o outro, com uma média de NTR abaixo do parâmetro pré-estabelecido (NTR=0,19)

Tabela 3: Quantidade de indivíduos utilizados para cada genótipo da secção *Arachis* durante o ensaio de déficit hídrico gradual, TR do grupo estressado, TR média do grupo controle e NTR média dos indivíduos de cada genótipo no momento da coleta. A média da NTR individual é calculada pela razão entre a TR do indivíduo do grupo estressado e a média da TR de todos os indivíduos do grupo controle.

Genótipo	Nº de indivíduos	Média TR* Estressado	Média TR Controle	Média NTR* (coleta)
<i>A. batizocoi</i>	26	2,65	4,28	0,25 ± 0,18
<i>A. cardenasii</i>	24	4,69	6,96	0,25 ± 0,04
<i>A. duranensis</i>	26	3,96	6,33	0,23 ± 0,09
<i>A. gregoryi</i>	12	5,43	6,48	0,25 ± 0,06
<i>A. ipaënsis</i>	23	4,93	6,52	0,22 ± 0,03
<i>A. magna</i>	14	4,7	6,63	0,23 ± 0,07
<i>A. monticola</i>	24	8,03	9,72	0,3 ± 0,06
<i>A. stenosperma</i>	14	4,7	5,06	0,29 ± 0,03
<i>A. villosa</i>	17	4,6	4,73	0,48 ± 0,05
<i>A. hypogaea</i> cv. -Caiapó	20	6,06	8,27	0,25 ± 0,08
<i>A. hypogaea</i> cv. -Runner	29	6,11	8,58	0,26 ± 0,06
<i>A. hypogaea</i> cv. -Tatu	27	7,46	10,9	0,19 ± 0,04
<i>A. duranensis</i> x <i>A. ipaënsis</i>	21	5,22	6,43	0,34 ± 0,08
Média	21	5,3	6,99	0,27

\* TR: Taxa de Transpiração

\* NTR: Taxa de Transpiração Normalizada

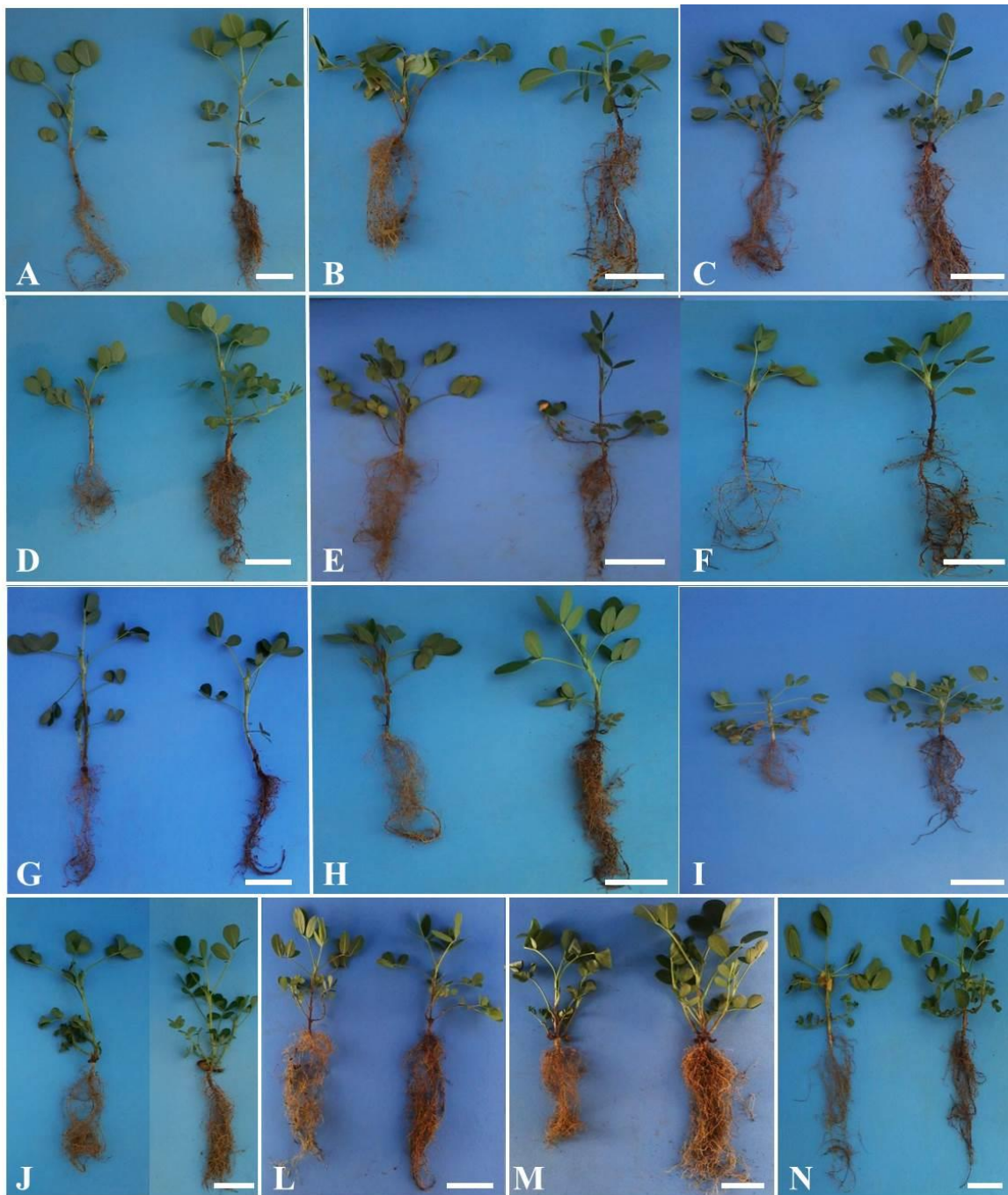


Figura 20: Genótipos da secção *Arachis* utilizados no ensaio de déficit hídrico gradual apresentando diferentes fenótipos em resposta a este estresse hídrico. Os pares de indivíduos de cada genótipo estão apresentados conforme o tratamento submetido. À esquerda: indivíduos submetidos ao ensaio ( $NTR \leq 0,3$ ). A) *A. batizocoi*, B) *A. cardenasii*, C) *A. duranensis*, D) *A. gregoryi*, E) *A. ipaënsis*, F) *A. magna*, G) *A. monticola*, H) *A. stenosperma*, I) *A. villosa*, J) Anfidiplóide (*A. duranensis* x *A. ipaënsis*), L) *A. hypogaea* cv Caiapó, M) *A. hypogaea* cv Runner, N) *A. hypogaea*-cv Tatu. Barra: 5cm

Analisando-se a média do número de dias entre o início do ensaio até o último dia de coleta de cada genótipo, observou-se que *A. batizocoi* (genoma KK) apresentou uma diminuição da TR mais lenta e gradual em resposta ao estresse submetido, com o tempo médio de 19 dias para atingir a NTR de coleta igual ou menor que 0,3. Por outro lado, a média dos demais genótipos foi de 10 dias para o genótipo AA, 12 dias para o genótipo BB e 8 dias para o genótipo AABB (Figura 21)

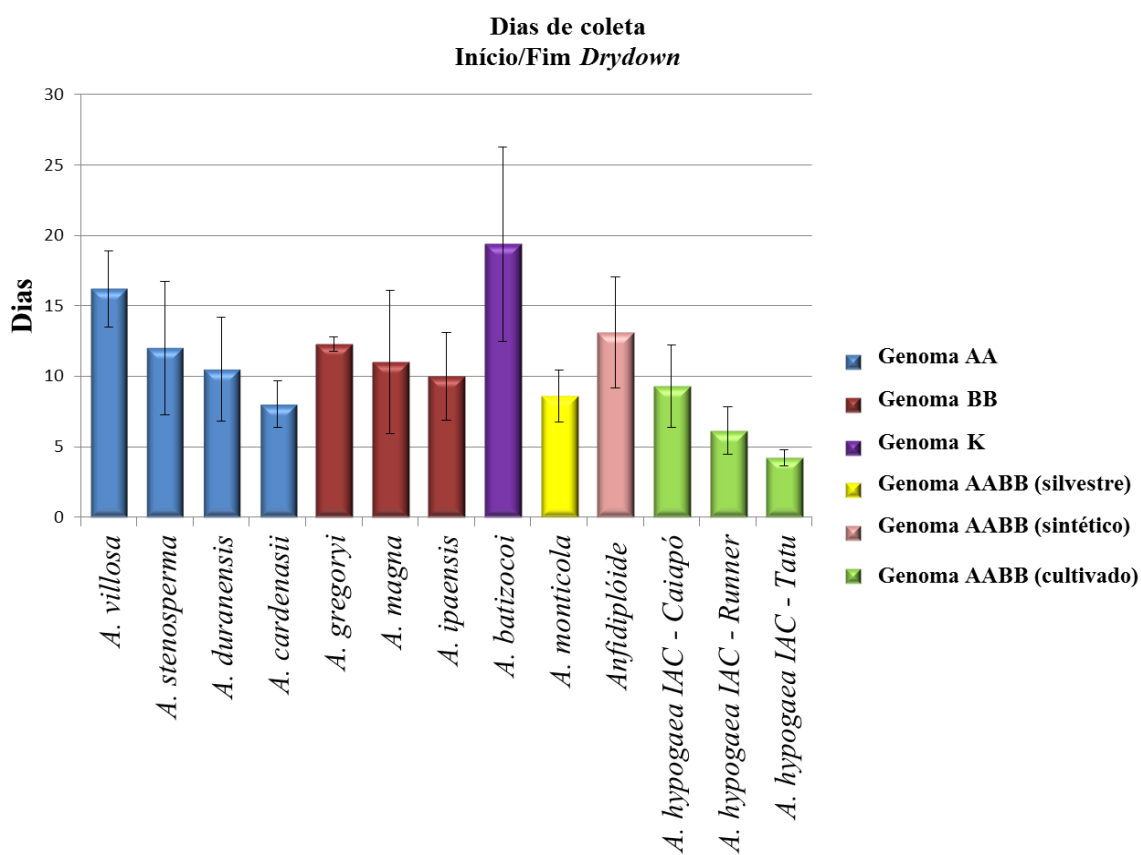


Figura 21: Média de dias decorridos entre o início do ensaio de déficit hídrico gradual e o dia da coleta do último indivíduo para cada genótipo estudado.

## 4.2 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE CDNA.

Atualmente, o protocolo de precipitação com cloreto de lítio (LiCl) tem sido bastante utilizado na precipitação de RNA devido a qualidade de RNA obtida. No entanto, contaminação com gDNA ainda pode ocorrer, pois como o RNA contido no citoplasma pode estar contaminado com DNA cromossomal, devido à quebra do núcleo durante a preparação, alguns procedimentos de extração de RNA não são capazes de eliminar o DNA genômico por completo (Rio et al., 2010). Visando qualidade e rendimento, o protocolo de extração de RNA total utilizado neste estudo resultou em produtos com contaminação por gDNA, sendo necessário tratamento posterior com DNase. Contudo, a eficiência deste protocolo pode ser observada por meio da intensidade das bandas esperadas visualizadas e as leituras de absorbância obtidas (dados não mostrados) (Figura 22).

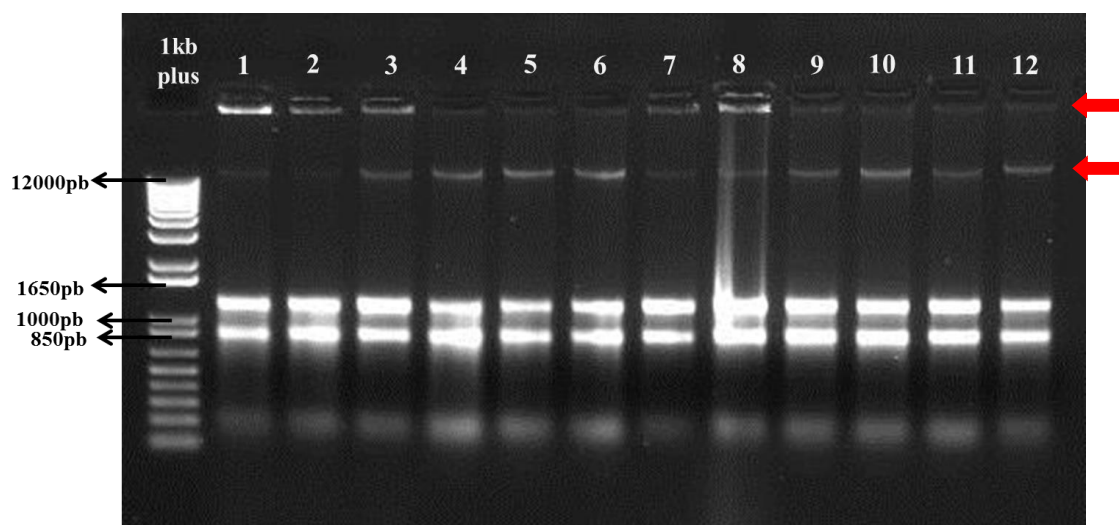


Figura 22: Gel de agarose a 1% (p/v), corado com brometo de etídio, contendo RNA total de raiz dos seguintes genótipos: (1-3, 7) *A. batizocoi* – Controle; (4-6) *A. magna* – Estressado; (8) *A. cardenasii* – Controle, (9-12) *A. cardenasii* Estressado. ( ← ) indica contaminação por gDNA.

O RNA total extraído foi então tratado com DNase para eliminar as contaminações com gDNA (Figura 23). Por meio de eletroforese em gel, o não aparecimento de bandas acima de 12000 pb indicou a ausência de gDNA e assim, o material foi purificado e em

seguida, cada amostra foi utilizada para síntese de cDNA. Para avaliar a qualidade do cDNA sintetizado foi realizada técnica de RT-PCR utilizando um par de iniciadores do gene *UBI2*, que possui uma expressão estável entre as amostras (Morgante et al., 2011).

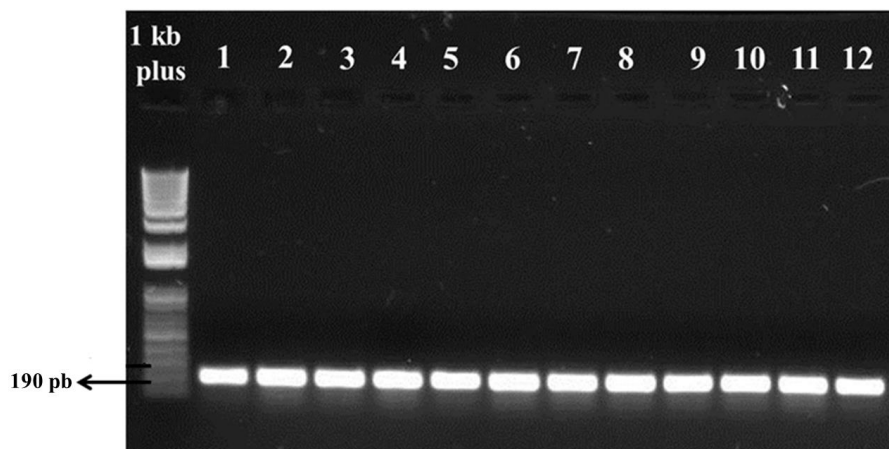


Figura 23: Gel de agarose 1% (p/v) contendo o produto de amplificação por RT-PCR utilizando como molde o cDNA sintetizado a partir de amostras de raízes de: (1-2) *A. gregoryi* – Estressado; (3) *A. ipaënsis* – Controle; (4-5) Anfidiplóide – Controle e Estressado; (6-7) *A. magna* - Controle e Estressado; (8-9) *A. hypogaea* cv Runner – Estressado; (10-11) *A. stenosperma* – Estressado; (12) *A. hypogaea* cv Tatu – Controle.

Após a reação de RT-PCR, todas as amostras de cDNA amplificaram um fragmento de 190 pb, correspondente ao produto de amplificação do par de iniciadores utilizado (*UBI2*), comprovando que a síntese de cDNA foi obtida com êxito.

Em uma RT-PCR semi-quantitativa, a intensidade das bandas pode indicar a expressão do gene utilizado. A intensidade observada para *UBI2* confirma a expressão estável desse gene referência (Morgante et al., 2011) nas amostras de cDNA. Como os iniciadores desenhados para o gene *UBI2* flanqueiam um intron (intron-spanning primers), amostras de cDNA com potencial contaminação de gDNA deveriam amplificar um fragmento de 336 pb na reação de RT-PCR. Assim, a eliminação da contaminação com DNA genômico pelo tratamento com DNase nas amostras de cDNA foi confirmada pela ausência de fragmento de 336 pb.

#### 4.3 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *EXLB* EM RAÍZES DE 13 GENÓTIPOS DA SECÇÃO *ARACHIS*

Após a síntese de cDNA dos 13 genótipos e confirmação da ausência de contaminação por gDNA, a reação de RT-qPCR foi realizada e concluída com êxito. A eficiência de amplificação da PCR e o valor Cq para todas as amostras após as reações de RT-qPCR foram obtidos com sucesso utilizando-se o programa Real-time PCR Miner 4.0 (Tabela 4). Observa-se que a média da eficiência dos dois genes de referência (*ACT1* e *UBI2*) e do gene-alvo (*EXLB*) foi semelhante, com diferença de 0,01% entre eles, indicando maior acurácia na quantificação da *EXLB*, utilizando esses genes como normalizadores. Esta eficiência indica também que as reações de RT-qPCR, tanto do gene-alvo quanto dos genes de referência, ocorreram de maneira semelhante e, uma vez que a eficiência está diretamente relacionada ao número final de cópias dos genes, esta eficiência também é um fator normalizador a ser utilizado para comparar os resultados entre o gene *EXLB* e os genes de referência.

Tabela 4: Média da eficiência do gene-alvo (*EXLB*) e dos dois genes de referência utilizados (*ACT1* e *UBI2*) dos 13 genótipos da secção *Arachis* obtida pelo programa Real-time PCR Miner 4.0.

Genótipos	Média da eficiência <i>EXLB</i>	Média da eficiência <i>ACT1</i>	Média de eficiência <i>UBI2</i>
<i>A. batizocoi</i>			
<i>A. cardenasii</i>			
<i>A. hypogaea</i> cv Caiapó	0,85	0,85	0,85
<i>A. duranensis</i>			
<i>A. gregoryi</i>			
<i>A. ipaënsis</i>			
<i>A. duranensis</i> x <i>A. ipaënsis</i>	0,84	0,84	0,85
<i>A. magna</i>			
<i>A. monticola</i>			
<i>A. hypogaea</i> cv Runner			
<i>A. stenosperma</i>	0,85	0,85	0,85
<i>A. hypogaea</i> cv Tatu			
<i>A. villosa</i>	0,84	0,85	0,85

Foi calculada a média de Cq das triplicatas técnicas das amostras de cada genótipo e a média de cada tratamento, tanto para *EXLB* quanto para *ACT1* e *UBI2* (Tabela 5). Cq é a interseção entre a curva de amplificação e o limiar da fase exponencial, assim quanto maior o valor de Cq, menor a quantidade inicial de cDNA. Observou-se que os valores de Cq obtidos nas amostras dentro do grupo controle são semelhantes assim como no grupo estressado indicando que a quantidade de moléculas de cDNA no início da amplificação foi ideal para alcançar o limiar da fase exponencial. Já entre os tratamentos (controle e estressado) os valores variáveis de Cq sugerem que pode haver maior amplificação da *EXLB* nas amostras estressadas (menor valor de Cq) quando comparadas com as amostras do grupo controle (maior valor de Cq). E ainda observou-se que entre os genótipos há divergência significativa sugerindo uma expressão diferencial do gene *EXLB* em cada genótipo estudado.

Tabela 5: média do ponto Cq por tratamento (obtido pelo algoritmo *Miner*) dos 13 genótipos. Cq; *quantification cycle*

Genótipo	Gene-alvo/Referência	Tratamento	Média (Cq/Pool)
<i>A. batizocoi</i>	<i>EXLB</i>	Controle	26,549 ± 1,73
		Estressado	22,644 ± 0,47
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,108 ± 1,20
		Estressado	21,988 ± 0,47
<i>A. cardenasii</i>	<i>EXLB</i>	Controle	26,840 ± 0,88
		Estressado	22,961 ± 0,91
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	22,857 ± 0,73
		Estressado	22,242 ± 1,15
<i>A. hypogaea cv Caiapó</i>	<i>EXLB</i>	Controle	27,024 ± 1,65
		Estressado	23,003 ± 0,25
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,584 ± 0,46
		Estressado	23,069 ± 0,66
<i>A. duranensis</i>	<i>EXLB</i>	Controle	27,588 ± 0,78
		Estressado	23,508 ± 0,90
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,204 ± 2,84
		Estressado	22,647 ± 0,81
<i>A. gregoryi</i>	<i>EXLB</i>	Controle	31,811 ± 1,32
		Estressado	24,525 ± 0,67
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	25,590 ± 1,24
		Estressado	23,716 ± 0,46



Genótipo	Gene-alvo/Referência	Tratamento	Média (Cq/Pool)
<i>A. ipaënsis</i>	<i>EXLB</i>	Controle	28,872 ± 0,49
		Estressado	24,280 ± 0,36
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,691 ± 0,72
		Estressado	22,310 ± 0,27
<i>A. duranensis x A. ipaënsis</i>	<i>EXLB</i>	Controle	27,090 ± 0,79
		Estressado	24,293 ± 0,45
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,553 ± 0,88
		Estressado	23,775 ± 0,22
<i>A. magna</i>	<i>EXLB</i>	Controle	27,748 ± 0,24
		Estressado	24,327 ± 1,10
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,799 ± 0,39
		Estressado	22,602 ± 0,48
<i>A. monticola</i>	<i>EXLB</i>	Controle	27,026 ± 0,62
		Estressado	23,665 ± 0,55
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,515 ± 0,14
		Estressado	22,480 ± 0,56
<i>A. hypogaea cv Runner</i>	<i>EXLB</i>	Controle	27,176 ± 0,26
		Estressado	21,303 ± 0,73
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,907 ± 1,66
		Estressado	21,039 ± 0,32
<i>A. stenosperma</i>	<i>EXLB</i>	Controle	29,581 ± 0,58
		Estressado	26,500 ± 3,57
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	24,625 ± 0,10
		Estressado	24,147 ± 0,92
<i>A. hypogaea cv Tatu</i>	<i>EXLB</i>	Controle	26,910 ± 0,61
		Estressado	22,417 ± 0,55
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,330 ± 0,39
		Estressado	22,308 ± 0,09
<i>A. villosa</i>	<i>EXLB</i>	Controle	29,121 ± 3,11
		Estressado	23,224 ± 2,19
	<i>ACT1/UBI2</i>	Controle	23,624 ± 2,28
		Estressado	22,042 ± 1,74

Após a normalização, a quantificação relativa (RQ), ou seja, os níveis relativos de mRNA foram analisados utilizando-se o programa REST<sup>®</sup>, por meio da razão entre *EXLB* e os genes de referência (*ACT1* ou *UBI2*) no valor 1 (um) como inicial comparativo (Tabela 6). Assim, foi observado que para sete, dos 13 genótipos analisados, a RQ mostrou um perfil de expressão positivamente regulado de maneira significativa ( $p < 0,05$ ) entre as plantas submetidas ao estresse hídrico e seus controles: (Tabela 6; Figura 24). Mesmo não sendo significativos, os valores de RQ para os outros

seis genótipos foram também positivos, isto é, o gene *EXLB* tem um regulação positiva em resposta ao déficit hídrico para todos os 13 genótipos aqui testados.

Durante o presente trabalho, as análises da expressão do gene *EXLB* por RT-qPCR revelaram que os genótipos *A. gregoryi* (genoma BB) e *A. villosa* (genoma AA) mostraram a maior expressão relativa sob estresse hídrico dentre os 13 genótipos da secção *Arachis*, com uma regulação positiva de 28 e 23 vezes, respectivamente, maior que o controle não-estressado (Tabela 6). Por outro lado, *A. magna* mostrou a RQ mais baixa, embora significativa, e de regulação positiva (3,64 vezes).

Tabela 6: Expressão relativa dos 13 genótipos utilizados. P-value < 0,05 indica efeito significativo, assim todos os genótipos que apresentaram este parâmetro foram positivamente regulados. RQ: Quantificação relativa

Genótipo	RQ	P-value	Resultado
<i>A. cardenasii</i>	7,338	0,061	-
<i>A. duranensis</i>	8,187	0	Positivo
<i>A. stenoperma</i>	5,446	0,276	-
<i>A. villosa</i>	22,82	0,012	Positivo
<i>A. gregoryi</i>	28,16	0,081	-
<i>A. ipaënsis</i>	10,814	0,075	-
<i>A. magna</i>	3,647	0,032	Positivo
<i>A. batizocoi</i>	5,467	0	Positivo
Anfidiplóide	8,474	0,052	-
<i>A. monticola</i>	7,82	0	Positivo
<i>A. hypogaea</i> cv. -Caiapó	8,51	0,033	Positivo
<i>A. hypogaea</i> cv. -Runner	13,711	0	Positivo
<i>A. hypogaea</i> cv. -Tatu	11,715	0,08	-

- : genótipos que não foram estatisticamente significativos.

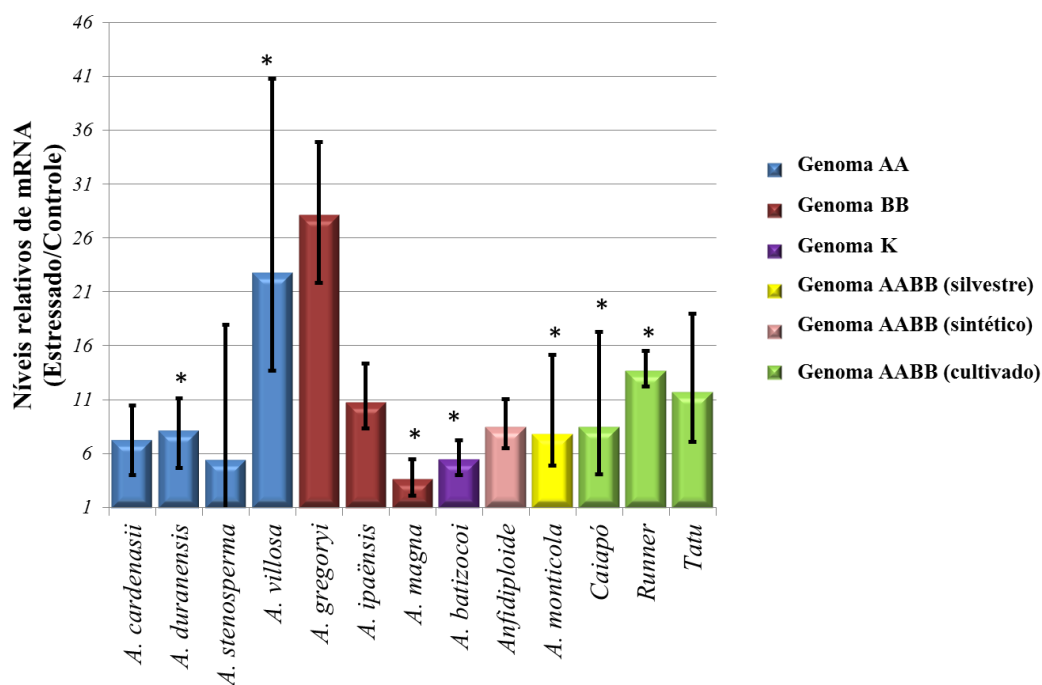


Figura 24: Análise da quantificação relativa (RQ) dos 13 genótipos da secção *Arachis* submetidos ao déficit hídrico gradual. Os níveis relativos de mRNA (razão entre amostras estressadas e controle) estão representados por barras e o desvio-padrão das três repetições biológicas pelas linhas verticais. Dados normalizados com os genes de referência *ACT1* e *UBI2*. mRNA: RNA mensageiro.

A partir dos dados gerados pelo ensaio de déficit hídrico gradual e pela análise RT-qPCR foi possível comparar a média de dias decorridos no ensaio até a coleta do último indivíduo (DDC) e a RQ (Figura 25). Entre a DDC e a RQ o coeficiente de correlação de Pearson foi igual a 0,096, logo, concluiu-se que há uma fraca correlação positiva ou covariação diretamente proporcional entre as variáveis uma vez que o valor do coeficiente foi próximo a 0. O coeficiente de correlação de Pearson mede o grau de correlação entre duas variáveis e pode variar de -1 a +1, sendo que -1 indica que há uma covariação inversamente proporcional entre as variáveis e +1 indica que há uma covariação diretamente proporcional.

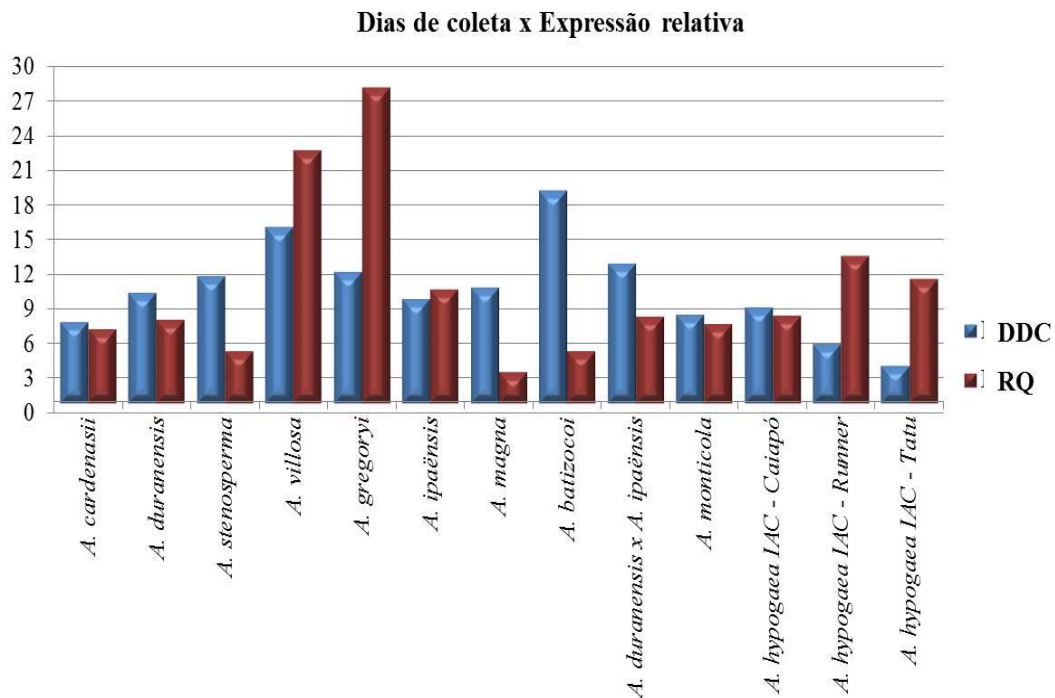


Figura 25: Comparação entre a média de dias de coleta e os níveis relativos de mRNA dos 13 genótipos. DDC: dias de coleta; RQ: Expressão relativa.

Foi possível, ainda, comparar as mudanças da NTR dos genótipos diploides e dos genótipos tetraplóides ao longo de todo ensaio de déficit hídrico gradual. Foi observado que os genótipos diploides apresentaram comportamento mais conservativo do que os tetraplóides, exceto o anfidiplóide que se assemelhou aos genótipos diploides. E ainda, estes resultados foram similares aos apresentados por Leal-Bertioli et al. (2012) (Figura 26).

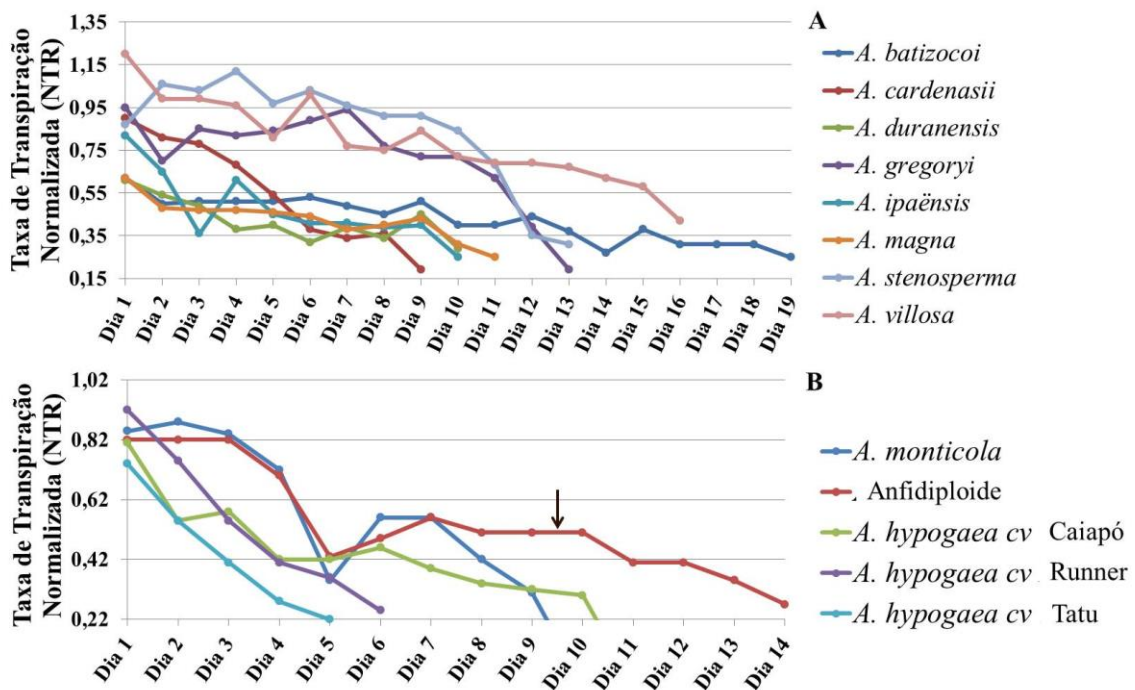


Figura 26: Taxa de Transpiração Normalizada dos genótipos diploides (A) e dos tetraplóides (B) durante o ensaio de déficit hídrico gradual

#### 4.4 IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA SEQUÊNCIA NUCLEOTÍDICA DO CDNA E DO GDNA DO GENE *EXLB*.

Para a identificação da sequência codificadora da *EXLB*, um par de iniciadores (Expuni\_“Foward” e Exp464\_Reverso) foi desenhado a partir da sequência do transcrito (contig) da *AdEXLB*. Esse contig possui 825 pb e foi identificado no banco de dados público do NCBI com o número JR342047 (Anexo 2). Assim, estes iniciadores foram utilizados para amplificar uma região de domínios conservados do gene *EXLB* para que a amplificação ocorresse em todos os 13 genótipos utilizados.

As amostras de cDNA amplificaram um produto de 464 pb, correspondente ao produto de amplificação dos iniciadores utilizados (Expuni\_“Foward” e Exp464\_Reverso). Estes mesmos iniciadores também foram utilizados para amplificar o gDNA de quatro genótipos (*A. duranensis* e *A. magna*, para a identificação da presença de introns (Figura 27).

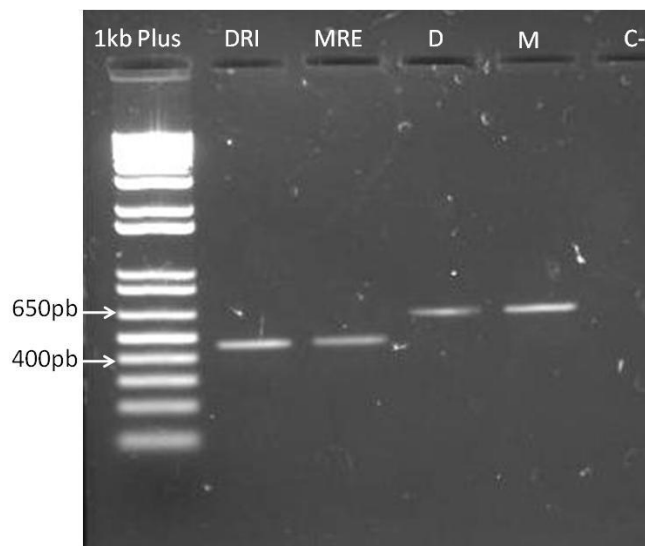


Figura 27 – RT-PCR de cDNA de raízes de *A. duranensis* (DRI) e *A. magna* (MRE), representando os 13 genótipos estudados D e M = gDNA de raízes de *A. duranensis* e *A. magna* utilizados, respectivamente, como molde da PCR. (C-) Controle negativo da reação.

Os produtos de amplificação de cDNA obtidos para cada um dos 13 genótipos foram sequenciados e as sequências obtidas foram alinhadas (Anexo 8). O alinhamento entre a sequência nucleotídica dos 13 genótipos da secção *Arachis* revelou altos níveis de similaridade (entre 97,09 e 99,02%), conforme já havia sido descrito para outras expansinas de plantas (Sampedro & Cosgrove 2005), porém com a presença de alguns SNPs (polimorfismos de base única).

Observou-se a presença de 11 SNPs entre os 13 genótipos analisados (Tabela 7; Anexo 8). Dos 11 SNPs encontrados, quatro são sinônimos, três são não-sinônimos conservativos e quatro são não-sinônimos e não-conservativos. SNPs são o tipo mais frequente de variação encontrada no DNA sendo, portanto, uma rica fonte de variabilidade genética (Brookes, 1999). Estão distribuídos em todo o genoma podendo estar localizados na região de introns, exons, regiões intergênicas e promotores. Estes termos, “sinônimos e não-sinônimos”, são usados para SNPs que estão localizados nas

regiões codificantes dos genes (exons). Denomina-se, então, como SNPs sinônimo aqueles que possuem diferentes nucleotídeos que codificam o mesmo aminoácido e não-sinônimo aqueles que diferentes nucleotídeos codificam diferentes aminoácidos. SNPs não-sinônimos ainda podem ser classificados em conservativos, ou seja, o aminoácido produzido possui propriedades físico-químicas semelhantes ao que deveria ter sido sem a ocorrência da mutação; e não-conservativo, onde o aminoácido produzido é totalmente diferente.

Assim, os quatro SNPs não-sinônimos e não-conservativos observados entre os 13 genótipos da seção *Arachis* podem resultar em diferenças na estrutura da proteína, uma vez que três destes SNPs estão localizados no domínio I da EXLB.

Com a localização destes SNPs foi possível também identificar a frequência (Fs) de haplótipos entre os 13 genótipos (Tabela 8). A partir dos dados obtidos, observou-se que *A. cardenasii* e *A. ipaënsis* compartilham o mesmo haplótipo, assim como *A. gregoryi*, *A. stenosperma* e *A. villosa*. Quanto aos genótipos tetraplóides, estes compartilham o mesmo haplótipo e possuem um SNP exclusivo (SNP 8).

Tabela 7: Características de cada SNP encontrado em alinhamento das sequências codificadoras (cDNA) do gene *EXLB* (ATG-TAG) dos 13 genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit. ALA: Alanina. ASP: Asparagina. CYS: Cisteína. GLU: Glutamina. ILE: Isoleucina. LEU: Leucina. PRO: Prolina. SER: Serina. THR: Treonina. TRY: Tirosina. VAL: Valina. SNP: polimorfismos de base única. SNP\_NSC: não-sinônimo conservativo. SNP\_S: sinônimo. SNP\_NSNC: não-sinônimo e não-conservativo.

SNP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<b>Genótipo</b>	<i>A. cardenasii</i> <i>A. ipaënsis</i>	<i>A. duranensis</i> Tetraplóides	<i>A. Magna</i>	<i>A. stenosperma</i> <i>A. villosa</i> <i>A. gregoryi</i>	<i>A. cardenasii</i> <i>A. ipaënsis</i> <i>A. magna</i> <i>A. batizocoi</i>	<i>A. cardenasii</i> <i>A. ipaënsis</i> <i>A. magna</i>	<i>A. stenosperma</i> <i>A. villosa</i> <i>A. gregoryi</i>	Tetraplóides	<i>A. batizocoi</i>	<i>A. stenosperma</i> <i>A. villosa</i> <i>A. gregoryi</i>	<i>A. duranensis</i> Tetraplóides
<b>Posição</b>	31	55	339	360	371	380	383	432	459	480	656
<b>Local</b>	Exon 1	Exon 1	Exon 3	Exon 3	Exon 3	Exon 3	Exon 3	Exon 3	Exon 3	Exon 3	Exon 4
<b>Base frequente</b>	G	T	A	C	A	C	A	C	C	C	G
<b>Base Mutante</b>	A	G	T	G	C	T	T	T	G	T	C
<b>Base do códon</b>	1	1	3	3	2	2	2	3	3	3	2
<b>Aminoácido frequente</b>	<b>GTT</b> Valina (VAL)	<b>TTA</b> Leucina (LEU)	<b>CCA</b> Prolina (PRO)	<b>GCC</b> Alanina (ALA)	<b>GAT</b> Asparagina (ASP)	<b>GCA</b> Alanina (ALA)	<b>GAG</b> Glutamina (GLU)	<b>TGC</b> Cisteína (CYS)	<b>GTC</b> Valina (VAL)	<b>TAC</b> Tirosina (TYR)	<b>AGT</b> Serina (SER)
<b>Aminoácido mutante</b>	<b>ATT</b> Isoleucina (ILE)	<b>GTA</b> Valina (VAL)	<b>CCT</b> Prolina (PRO)	<b>GCG</b> Alanina (ALA)	<b>GCT</b> Alanina (ALA)	<b>GTA</b> Valina (VAL)	<b>GTG</b> Valina (VAL)	<b>TGT</b> Cisteína (CYS)	<b>GTG</b> Valina (VAL)	<b>TAT</b> Tirosina (Tyr)	<b>ACT</b> Treonina (THR)
<b>Mutação</b>	SNP_NSC	SNP_NSC	SNP_S	SNP_NSC	SNP_NSNC	SNP_NSNC	SNP_NSNC	SNP_S	SNP_S	SNP_S	SNP_NSNC



Tabela 8: Frequência (Fs) de haplótipos por SNPs entre os 13 genótipos da secção *Arachis* estudados. Cores iguais indicam genótipos que compartilham o mesmo haplótipo.

Genoma	SNP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
BB	<i>A. magna.</i>	G	T	T	C	C	T	A	C	C	C	G
KK	<i>A. batizocoi</i>	G	T	A	C	C	C	A	C	G	C	G
AA	<i>A. cardenasii</i>	A	T	A	C	C	T	A	C	C	C	G
BB	<i>A. ipaënsis</i>	A	T	A	C	C	T	A	C	C	C	G
AA	<i>A. stenosperma</i>	G	T	A	G	A	C	T	C	C	T	G
AA	<i>A. villosa</i>	G	T	A	G	A	C	T	C	C	T	G
BB	<i>A. gregoryi</i>	G	T	A	G	A	C	T	C	C	T	G
AA	<i>A. duranensis</i>	G	G	A	C	A	C	A	C	C	C	C
AABB	<i>A. monticola</i>	G	G	A	C	A	C	A	T	C	C	C
AABB	<i>Anfidiplóide</i>	G	G	A	C	A	C	A	T	C	C	C
AABB	<i>A. hypogaea</i>	G	G	A	C	A	C	A	T	C	C	C
AABB	<i>A. hypogaea</i>	G	G	A	C	A	C	A	T	C	C	C
AABB	<i>A. hypogaea</i>	G	G	A	C	A	C	A	T	C	C	C
Fs	-	0,2	0,5	0,1	0,2	0,3	0,2	0,2	0,4	0,1	0,2	0,5

Os produtos de amplificação de gDNA obtidos dos quatro genótipos citados acima também foram sequenciados e um alinhamento foi realizado entre eles (Anexo 9) a fim de aumentar a identidade entre o alinhamento das sequências.

O alinhamento de gDNA mostrou também alto grau de similaridade e a presença de dois SNPs localizados na região não-traduzida (5'UTR), quatro SNPs no exon 1 e seis SNPs no intron 1 (Tabela 9).

Tabela 9: Características de cada SNP encontrado em alinhamento das sequências nucleotídicas do gDNA de *EXLB* de quatro genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit.

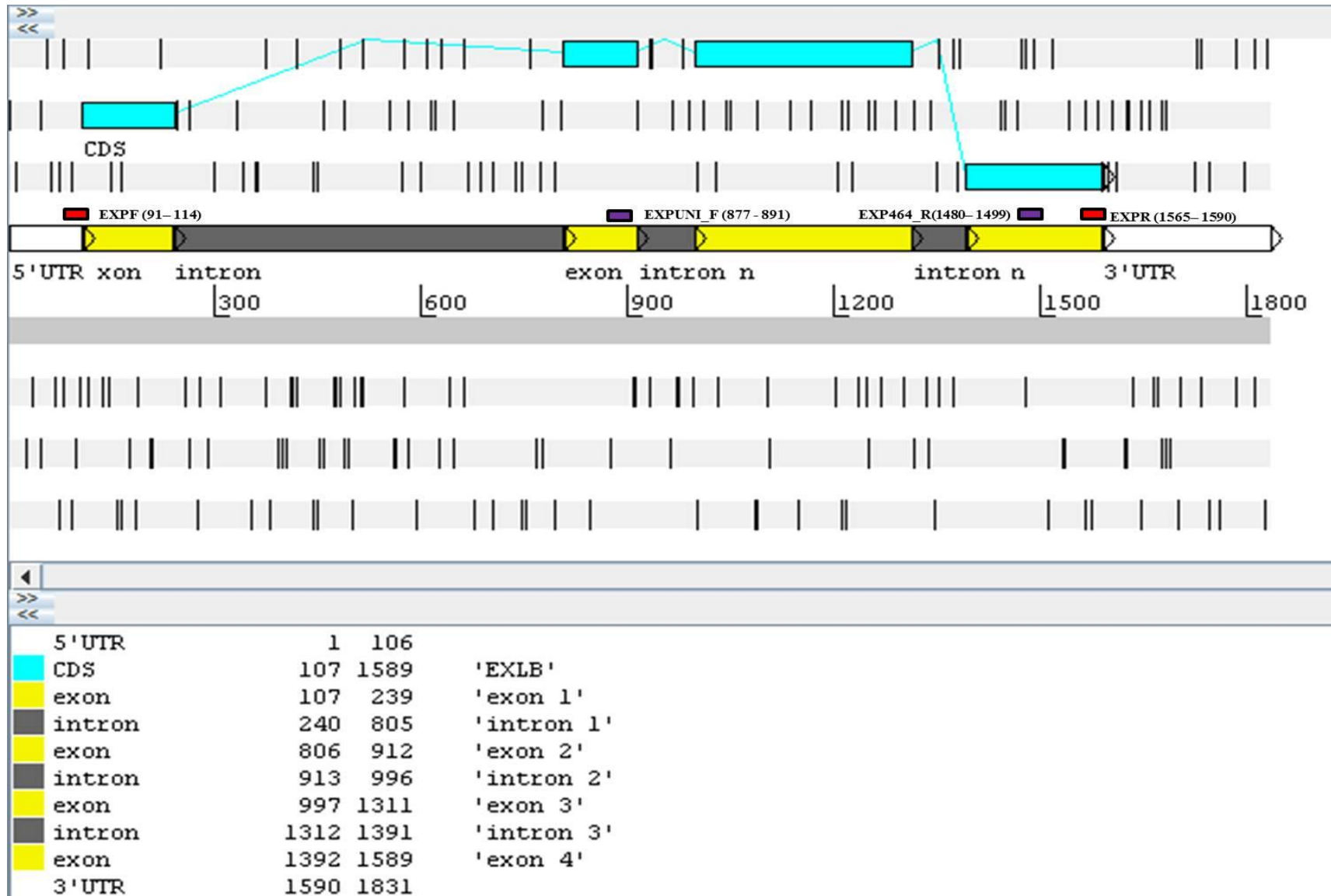
SNP	Genótipo	Posição	Local
1	<i>A. duranensis</i>	18	5'UTR
2	<i>A. duranensis</i> <i>A. hypogaea cv Runner</i>	33	5'UTR
3	A <i>A. stenosperma</i>	129	Exon 1
4	<i>A. duranensis, A. hypogaea cv Runner</i>	168	Exon 1
5	<i>A. duranensis, A. magna, A. stenosperma</i> <i>A. hypogaea cv Runner</i>	194	Exon 1
6	<i>A. hypogaea cv Runner</i>	223	Exon 1
7	<i>A. duranensis</i>	262	Intron 1
8	<i>A. magna</i>	350	Intron 1
9	<i>A. duranensis, A. magna, A. stenosperma</i> <i>A. hypogaea cv Runner</i>	391	Intron 1
10	<i>A. stenosperma</i>	399	Intron 1
11	<i>A. magna</i>	433	Intron 1
12	<i>A. duranensis, A. magna, A. stenosperma</i> <i>A. hypogaea cv Runner</i>	511	Intron 1

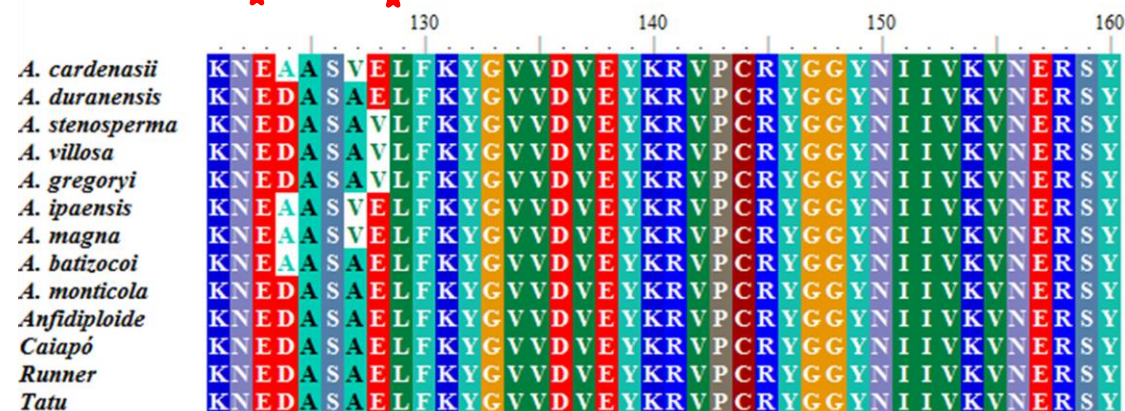
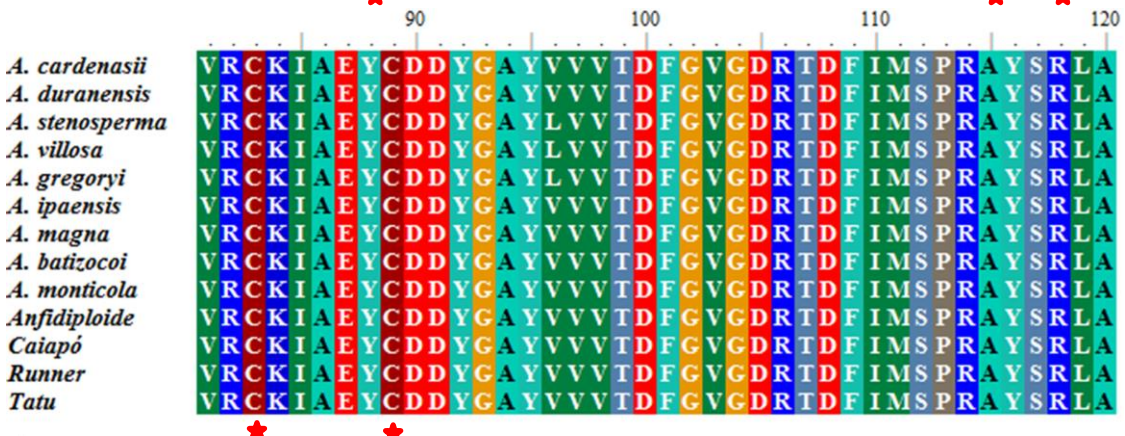
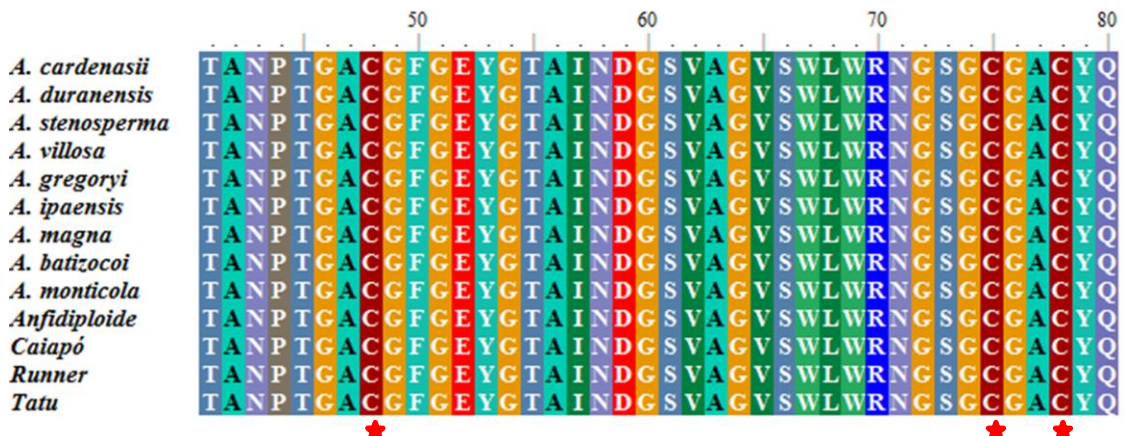
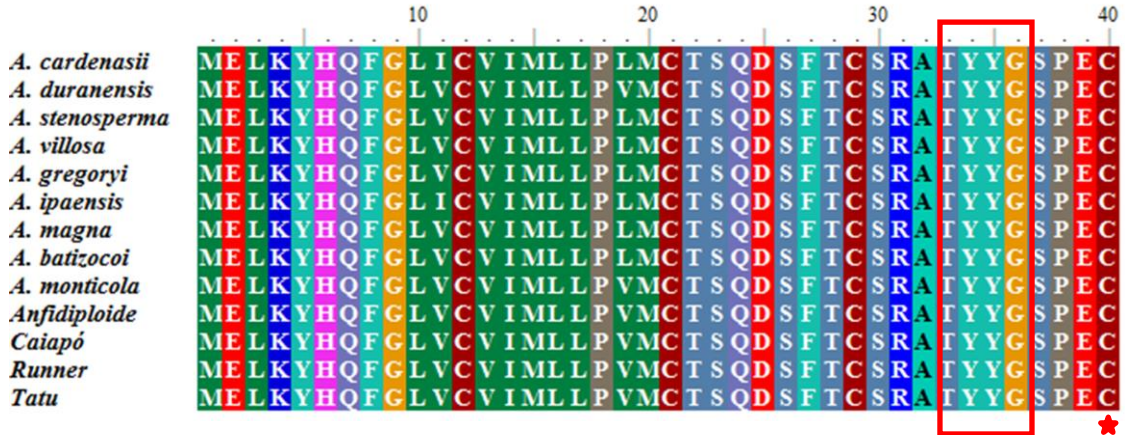
Para identificar e caracterizar a sequência nucleotídica completa do gene que codifica *EXLB*, a sequência codificadora da *AdEXLB* e a sequência codificadora de *A. duranensis* obtida neste estudo foram alinhadas com o cDNA de *A. hypogaea* encontrado em banco de dados público (NCBI). A partir deste alinhamento foi possível estabelecer um modelo da estrutura gênica (gene model) da *EXLB* de *A. duranensis* (Figura 28). Esta estrutura apresenta quatro exons [exon 1 (133 pb) exon 2 (107 pb); exon 3 (315 pb) e exon 4 (198 pb)]. Esse modelo forma assim uma ORF de 753 pb. O modelo também estabelece a presença de três introns [intron 1 (566 pb), intron 2 (84 pb) e intron 3 (80 pb)], uma região 3'UTR de 242 pb e uma região 5'UTR de 106 pb.

O alinhamento da sequência de 250 aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA de cada genótipo também identificou regiões altamente conservadas (Figura 29). Além dos resíduos conservados entre as expansinas, foi possível identificar o resíduo conservado (TYYG) comum somente entre as famílias *EXLB*, seis resíduos de cisteínas e quatro resíduos de triptofanos (Figura 30)

(Cosgrove, 1999; Wu et al., 2001; Yennawar et al., 2006). As cisteínas de gérmen de trigo formam várias ligações dissulfeto que estabilizam a estrutura da proteína, logo, sugere-se que a porção N-terminal das expansinas também seja estabilizada por essas ligações de maneira análoga (Shcherban et al., 1995). Quanto aos resíduos conservados de triptofanos, estes possuem espaçamento semelhante aos triptofanos encontrados no domínio da celulase. Além disso, triptofanos e aminoácidos relacionados à estrutura, como a fenilalanina e a tirosina, são importantes para as ligações entre açúcares em outras proteínas. Então, sugere-se que a porção C-terminal das expansinas seja responsável pela ligação desta proteína com a celulose e glicanos de parede celular.

Figura 28: Modelo da estrutura gênica (gene model) do gene *EXLB* que codifica a proteína EXPANSINA-LIKE B em *A duranensis* por meio do programa Artemis. A região 5'UTR e a região 3'UTR estão representadas pela cor branca e apresentam, respectivamente, 106 pb e 242 pb. Os exons (cor amarela), em ordem crescente, apresentam, respectivamente: 133 pb, 107 pb, 315 pb e 198 pb. Os introns (cor cinza), apresentam: 566 pb, 84 pb e 80 pb. As barras em vermelho indicam a localização do par de iniciadores EXPF e EXPR e as barras em lilás, o par de iniciadores EXPUNI\_F e EXP464).





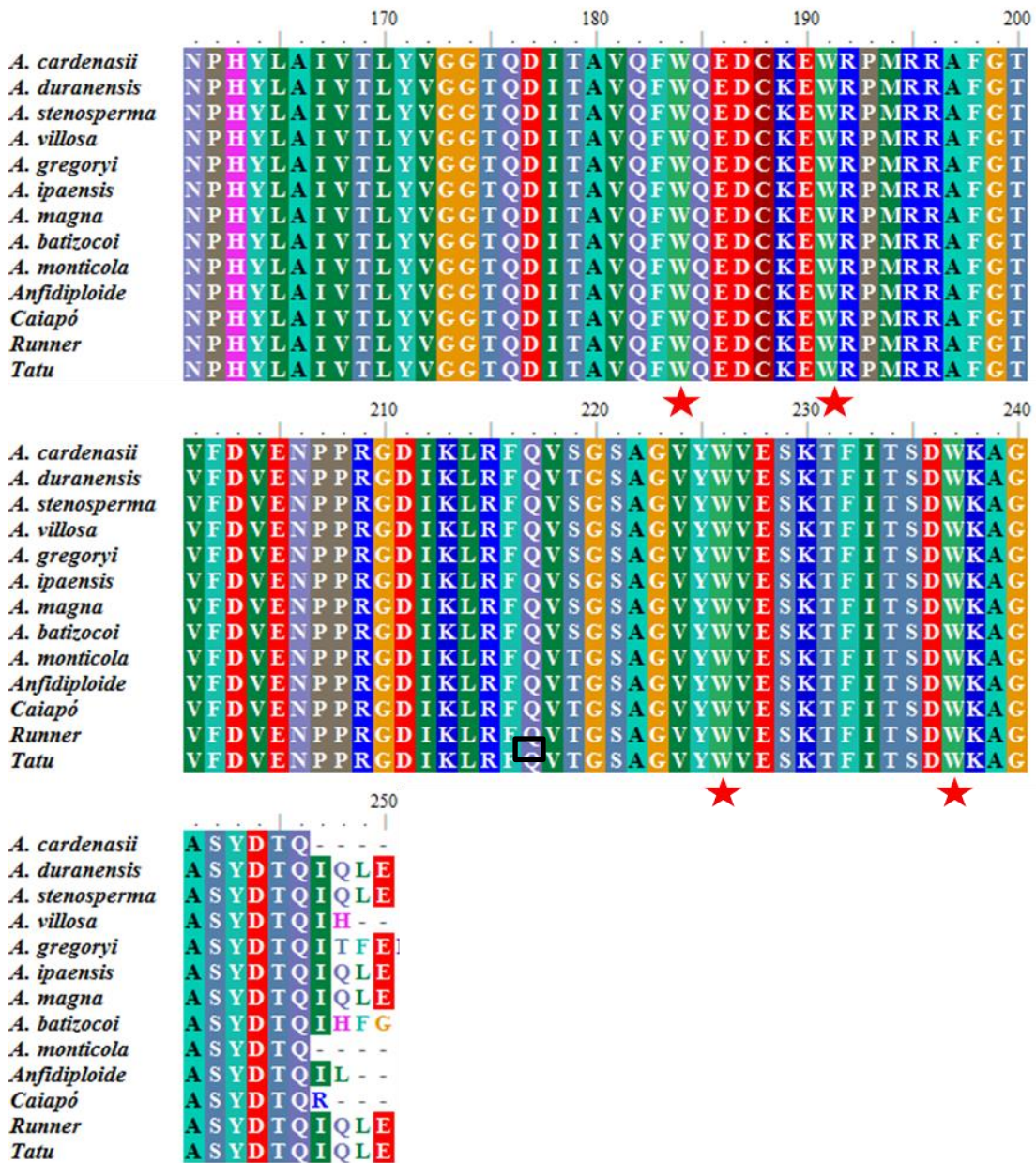


Figura 29: Alinhamento entre as seqüências de aminoácidos dos 13 genótipos da secção *Arachis* por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit (■) Indica resíduo conservado característico da família EXLB, TYYG. (★) indica cisteínas (C) e triptofanos (W) conservados.

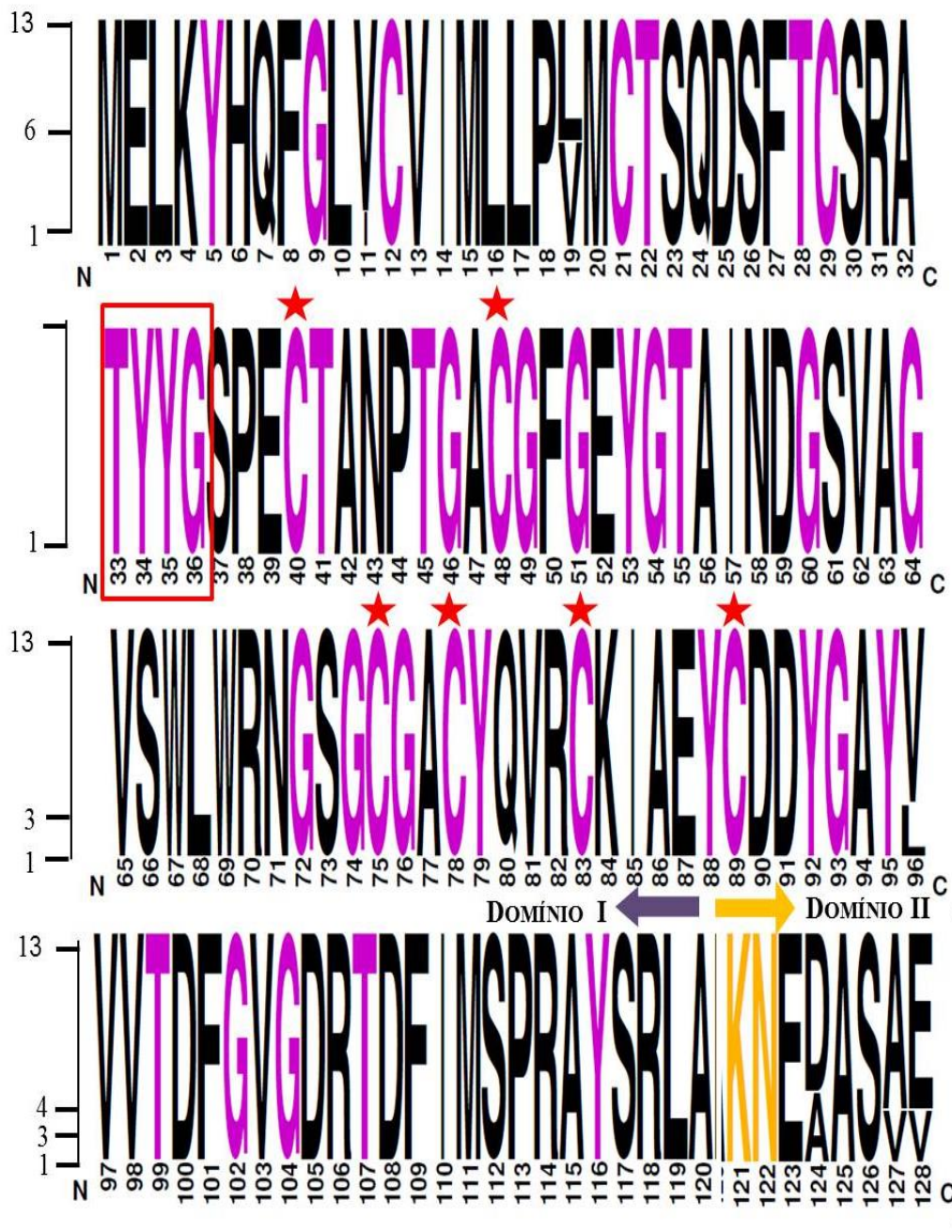
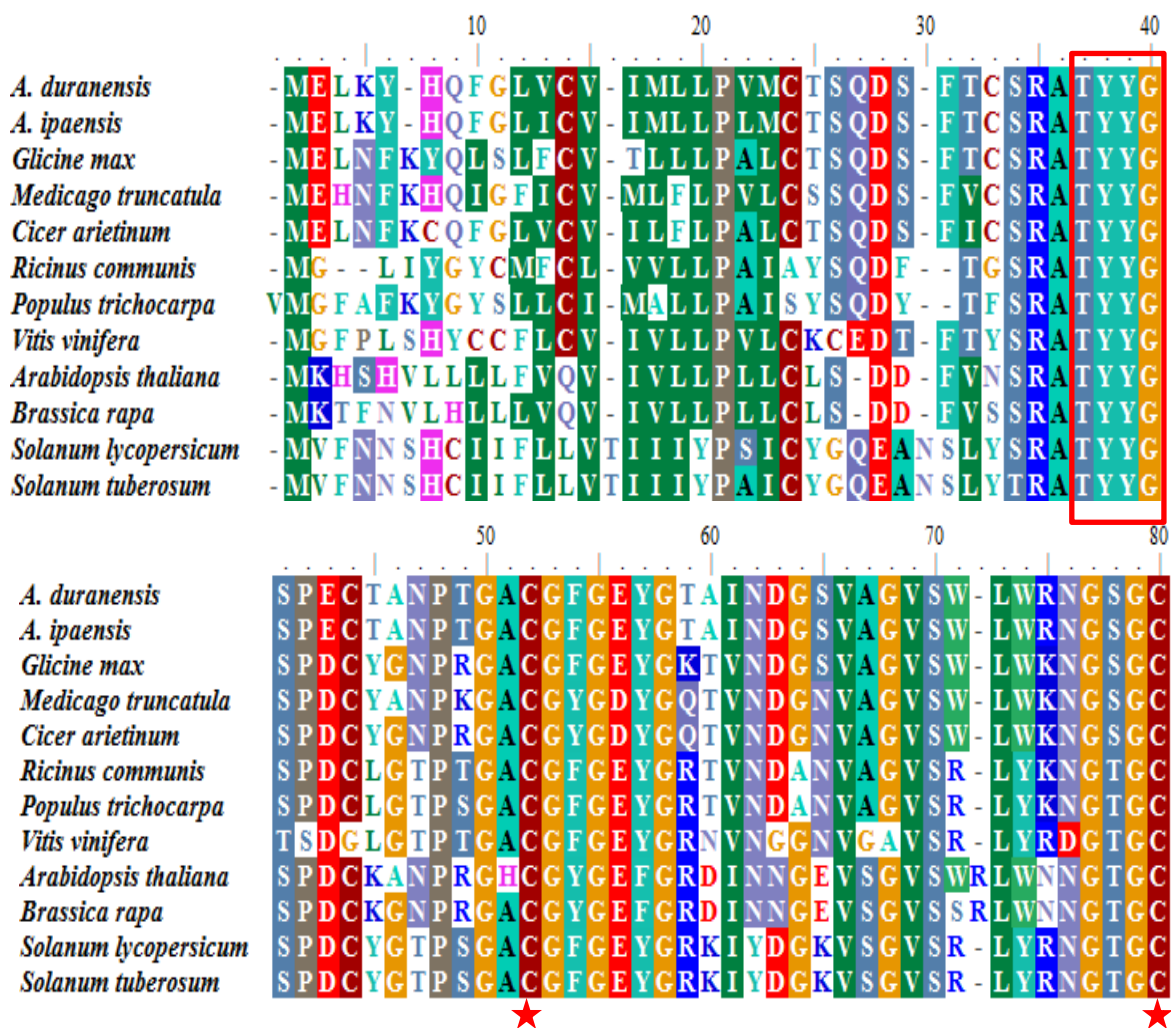




Figura 30: Conservação da sequência de aminoácidos da EXLB entre os 13 genótipos da secção *Arachis*. Logo de seqüências gerado com *WebLogo* e manualmente alinhados. Nestes logos, a altura das letras indica a frequência do aminoácido correspondente. O resíduo conservado entre as famílias EXLB está envolto por caixa em vermelho. (★) indica cisteínas (C) e triptofanos (W) conservados. O limite entre os dois domínios estão indicados por setas: domínio I (←) e domínio II (→).



Com o alinhamento da sequência de 250 aminoácidos deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do cDNA da *EXLB* de *A. duranensis* e *A. ipaensis* com outras sequências depositadas em banco de dados, foi possível observar o alto grau de conservação desta família gênica também entre genótipos da secção *Arachis* e outras leguminosas, indicando que este gene pode ser derivado da evolução de uma mesma sequência ancestral (Figura 31). Além da similaridade, a presença de sequências específicas, como o motivo TYYG e os resíduos conservados de cisteínas e triptofanos, confirmam que estas sequências pertencem à família EXLB estudada.



		90	100	110	120																																			
<i>A. duranensis</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	A	E	Y	C	D	D	Y	G	A	Y	V	V	V	T	D	F	G	V	G	D	R	T	D	F	I	M	S	P	R	A
<i>A. ipaensis</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	A	E	Y	C	D	D	Y	G	A	Y	V	V	V	T	D	F	G	V	G	D	R	T	D	F	I	M	S	P	R	A
<i>Glicine max</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	P	Q	F	C	D	E	N	G	A	Y	V	V	V	T	D	Y	G	E	G	D	R	T	D	F	I	M	S	P	R	A
<i>Medicago truncatula</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	P	E	L	C	D	E	N	G	A	Y	V	V	V	T	D	F	G	V	G	D	R	T	D	F	I	M	S	P	R	G
<i>Cicer arietinum</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	P	Q	L	C	D	E	N	G	A	Y	V	I	V	T	D	Y	G	V	G	D	R	T	D	F	I	M	S	P	R	G
<i>Ricinus communis</i>	G	G	C	Y	Q	V	R	C	K	A	P	Q	I	C	S	D	D	G	V	N	V	V	V	T	D	Y	G	E	G	D	K	T	D	F	I	L	S	S	R	A
<i>Populus trichocarpa</i>	G	G	C	Y	Q	V	R	C	K	A	P	N	L	C	T	D	D	G	V	N	V	V	V	T	D	Y	G	E	G	D	K	T	D	F	I	L	S	P	R	A
<i>Vitis vinifera</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	P	K	L	C	A	D	V	G	M	K	V	V	V	T	D	H	G	G	D	D	T	D	F	I	L	S	R	H	G	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	P	P	H	C	S	E	E	G	V	Y	V	V	A	T	D	S	G	E	G	D	G	T	D	F	I	L	S	P	K	A
<i>Brassica rapa</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	I	P	P	H	C	N	E	E	G	V	Y	V	V	A	T	D	Y	G	E	G	H	G	T	D	F	V	F	S	P	K	A
<i>Solanum lycopersicum</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	V	P	G	H	C	T	D	E	G	T	K	I	V	V	T	D	H	G	E	G	D	H	T	D	F	I	L	S	V	R	A
<i>Solanum tuberosum</i>	G	A	C	Y	Q	V	R	C	K	V	P	G	H	C	T	D	E	G	T	K	I	V	V	T	D	H	G	E	G	D	H	T	D	F	I	L	S	V	R	A

★                      ★                      ★

		130	140	150	160																																			
<i>A. duranensis</i>	Y	S	R	L	A	K	N	E	D	A	S	A	E	L	F	K	Y	G	V	D	V	E	Y	K	R	V	P	C	R	Y	G	G	Y	N	I	I	V	K	V	
<i>A. ipaensis</i>	Y	S	R	L	A	K	N	E	A	A	S	V	E	L	F	K	Y	G	V	D	V	E	Y	K	R	V	P	C	R	Y	G	G	Y	N	I	I	V	K	V	
<i>Glicine max</i>	Y	S	R	L	G	R	N	A	D	A	S	A	E	L	F	K	Y	G	V	M	D	V	E	Y	R	R	V	P	C	R	Y	G	G	Y	N	L	L	V	K	V
<i>Medicago truncatula</i>	Y	S	K	L	G	K	N	G	D	A	S	A	E	L	F	K	Y	G	V	D	I	E	Y	K	R	I	P	C	K	Y	N	G	Y	N	I	L	F	K	V	
<i>Cicer arietinum</i>	Y	S	K	L	G	K	N	G	D	A	S	V	E	L	F	K	Y	G	V	D	V	E	Y	K	R	V	P	C	K	Y	N	G	Y	N	V	L	L	K	V	
<i>Ricinus communis</i>	Y	A	R	L	A	R	P	N	-	M	A	A	E	L	F	A	Y	G	V	D	I	E	Y	R	R	I	S	C	R	Y	A	G	Y	N	V	M	F	K	V	
<i>Populus trichocarpa</i>	Y	A	R	M	A	H	P	N	-	M	A	V	E	L	I	A	Y	G	V	D	V	E	F	R	R	I	P	C	R	Y	S	G	Y	N	L	M	F	K	V	
<i>Vitis vinifera</i>	F	S	M	L	A	R	P	N	-	K	A	A	D	L	F	A	Y	G	V	V	G	I	E	Y	R	R	V	P	C	Q	Y	P	G	S	N	I	F	F	K	V
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Y	G	R	M	A	R	P	G	-	T	E	N	Q	L	Y	S	F	G	V	V	N	V	E	Y	Q	R	I	P	C	R	Y	A	G	Y	N	L	V	Y	K	I
<i>Brassica rapa</i>	Y	G	R	M	A	R	P	G	-	T	E	D	Q	L	Y	S	F	G	V	V	D	V	E	Y	Q	R	V	P	C	K	Y	D	G	Y	N	L	V	Y	K	V
<i>Solanum lycopersicum</i>	Y	S	D	M	A	T	S	G	-	M	A	N	H	L	L	A	Y	G	V	D	V	E	Y	R	R	V	P	C	T	Y	Y	G	Y	N	L	M	I	K	V	
<i>Solanum tuberosum</i>	Y	S	D	M	A	T	S	G	-	M	A	N	H	L	L	A	Y	G	V	D	V	E	Y	R	R	V	P	C	T	Y	Y	G	Y	N	L	M	I	K	V	

★

		170	180	190	200																																			
<i>A. duranensis</i>	N	E	R	S	Y	N	P	H	Y	L	A	I	V	T	L	Y	V	G	G	T	Q	D	I	T	A	V	Q	F	W	Q	E	D	C	K	E	W	R	P	M	R
<i>A. ipaensis</i>	N	E	R	S	Y	N	P	H	Y	L	A	I	V	T	L	Y	V	G	G	T	Q	D	I	T	A	V	Q	F	W	Q	E	D	C	K	E	W	R	P	M	R
<i>Glicine max</i>	H	E	H	S	R	N	P	H	Y	L	A	I	V	I	L	Y	L	G	G	T	Y	D	V	T	A	V	E	L	W	Q	E	D	C	Q	E	W	R	R	M	R
<i>Medicago truncatula</i>	H	E	R	S	K	N	P	H	Y	L	A	I	L	I	L	Y	V	G	G	T	N	D	V	T	A	V	Q	L	W	Q	E	D	C	K	E	W	R	P	M	R
<i>Cicer arietinum</i>	H	D	R	S	K	N	P	H	Y	L	A	I	L	V	L	Y	V	G	G	T	N	D	V	I	A	V	Q	L	W	Q	E	D	C	Q	E	W	R	T	M	R
<i>Ricinus communis</i>	H	E	H	S	R	F	P	E	Y	L	A	I	V	V	L	Y	Q	G	G	Q	N	D	I	L	A	V	Q	I	W	Q	E	D	C	K	E	W	L	G	M	R
<i>Populus trichocarpa</i>	H	E	H	S	R	F	P	D	Y	L	A	I	L	L	Y	Q	A	G	Q	N	E	I	L	A	V	E	L	W	Q	E	D	C	K	E	W	R	G	M	R	
<i>Vitis vinifera</i>	H	E	N	S	R	F	P	D	Y	L	A	L	V	M	L	Y	Q	A	G	L	S	D	I	T	A	V	D	I	W	Q	E	D	S	Q	A	W	K	G	M	R
<i>Arabidopsis thaliana</i>	H	E	K	S	Y	N	P	H	Y	L	A	I	L	V	L	Y	V	G	G	V	N	D	I	L	A	V	E	V	W	Q	E	D	C	K	E	W	R	R	M	R
<i>Brassica rapa</i>	H	E	K	S	Y	N	P	H	Y	L	A	V	L	I	L	Y	V	G	G	V	N	D	I	L	A	V	E	A	W	Q	E	D	C	K	E	W	R	R	M	R
<i>Solanum lycopersicum</i>	H	E	H	S	R	F	C	N	Y	L	A	I	V	P	I	Y	Q	S	G	A	F	D	I	E	A	V	E	V	W	Q	A	D	C	K	E	W	K	G	M	R
<i>Solanum tuberosum</i>	H	E	H	S	R	F	C	N	Y	L	A	I	V	P	I	Y	Q	S	G	A	F	D	I	E	A	V	E	V	W	Q	A	D	C	K	E	W	R	G	M	R

★

★

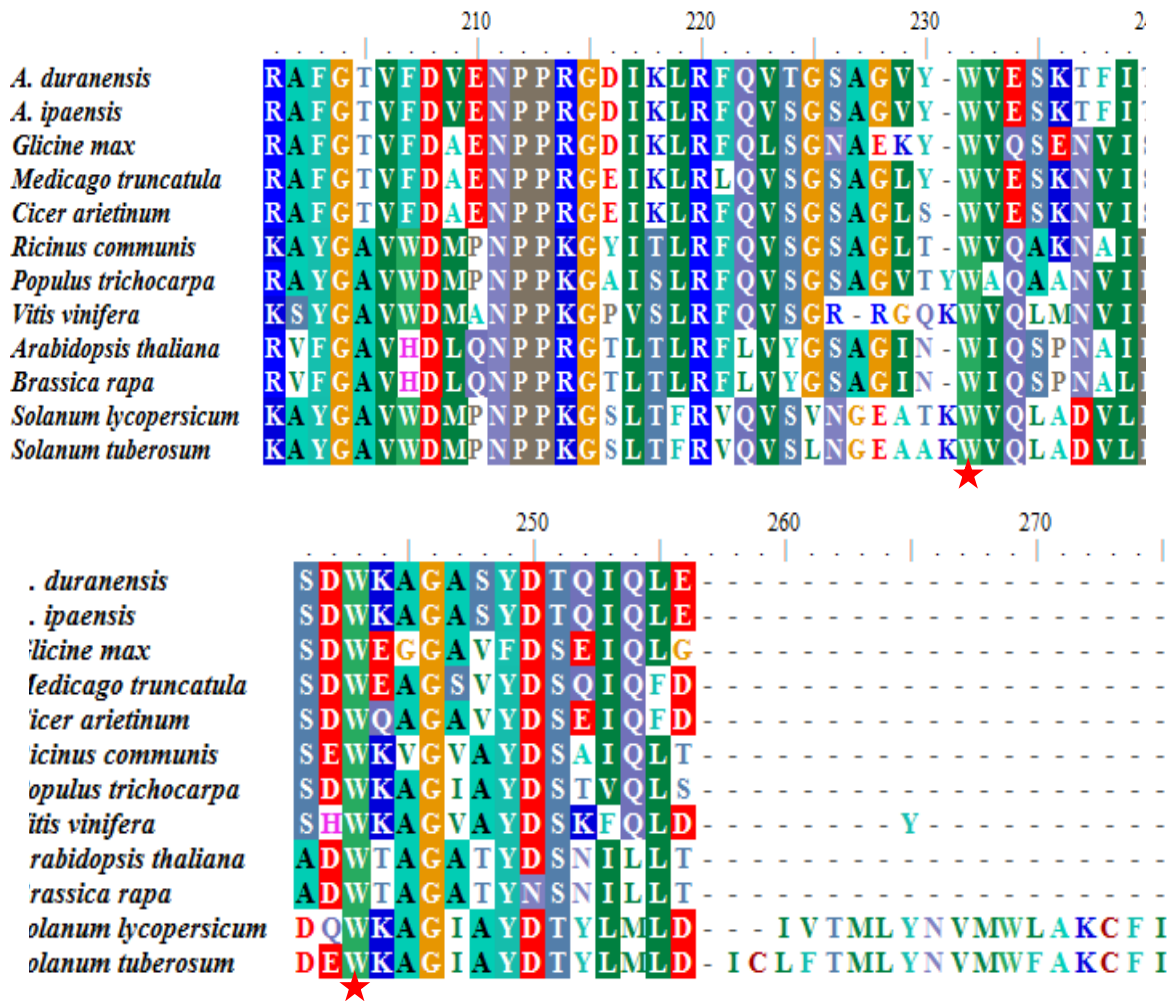


Figura 31: Alinhamento entre a sequência de aminoácidos de *A. duranensis* e *A. ipaensis* e as sequências de *Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Cicer arietinum*, *Ricinus communis*, *Populus trichocarpa*, *Vitis vinifera*, *Arabidopsis thaliana*, *Brassica rapa L.*, *Solanum lycopersicum* e *Solanum tuberosum*, disponíveis em bancos de dados públicos NCBI). (   ) sequência conservada entre as famílias EXLB. ( ★ ) indica as cisteínas (C) e triptofanos (W) conservados.

#### 4.5 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS

Sequências da mesma proteína, mas de espécies diferentes também podem ser comparadas a fim de deduzir relações evolutivas. Sendo assim, uma árvore filogenética resultante do alinhamento da sequência de aminoácidos dos 13 genótipos da secção *Arachis* com as sequências de aminoácidos de soja (*Glycine max*), *Medicago truncatula*, grão-de-bico (*Cicer arietinum* L.) *Arabidopsis thaliana* e *Brassica oleraceae*. foi construída utilizando o programa MEGA versão 6 (Kumar et al., 2000) (Figura 32).

Foram observados vários clados na árvore filogenética sendo que a posição dos ramos de *Glycine max*, *Medicago truncatula* e *Cicer arietinum*, são semelhantes ao estudo de (Champagne et al., 2007). *Arabidopsis thaliana* possui sequência discrepante quando comparada às sequências dos 13 genótipos da secção *Arachis*, atuando na construção da árvore filogenética como grupo externo (outgroup), ou seja, um grupo próximo ao grupo estudado, mas diferente dele. Conforme alinhamento, os clusters foram formados de acordo com as características comuns entre as sequências. Assim notou-se que *Glycine max* é evolutivamente mais próxima da secção *Arachis* e que os clados formados pelos genótipos desta secção são definidos pelos SNPs apresentados devido ao alto grau de conservação da *EXLB*.

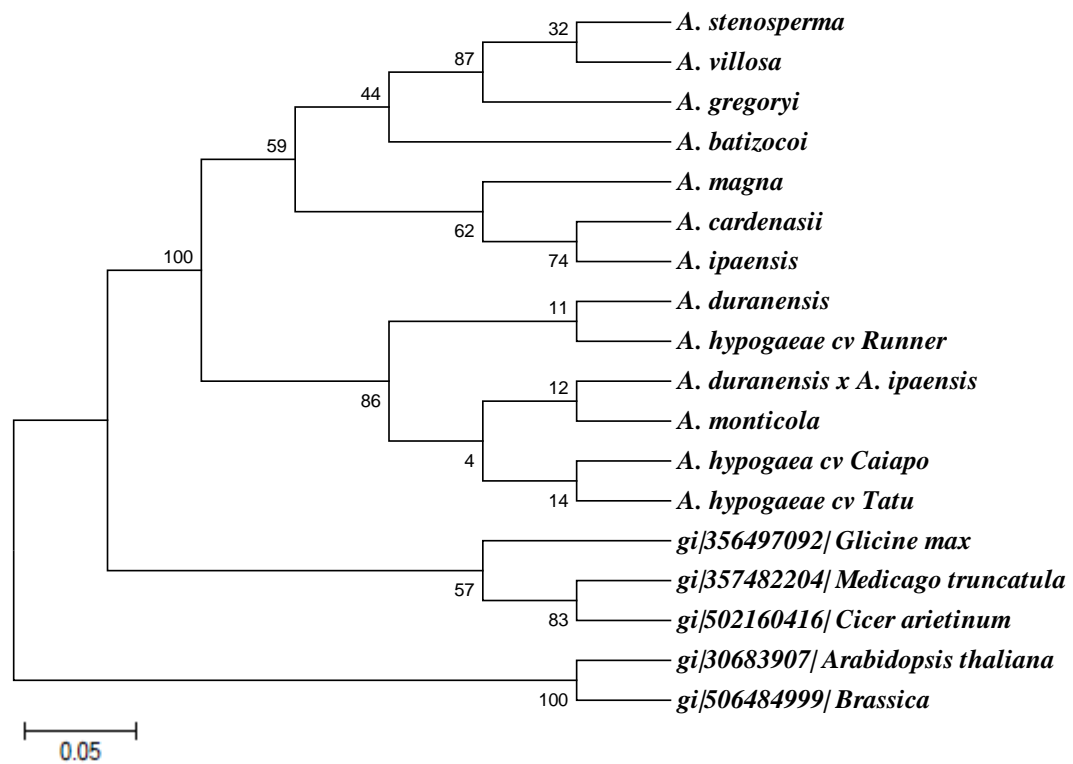


Figura 32: Árvore filogenética usando o método máxima parcimônia com sequências protéicas da EXLB e outras sequências similares. Os números próximos de cada nó representam os valores bootstrap.

## DISCUSSÃO

---

### 5.1 RESPOSTA DE 13 GENÓTIPOS DA SECÇÃO *ARACHIS* AO DÉFICIT HÍDRICO GRADUAL.

Dentre os fatores responsáveis por afetar negativamente a produtividade, o déficit hídrico é um dos que causam maior impacto, pois seus efeitos afetam todos os estádios de desenvolvimento da planta (Cavalcante et al., 2009).

Para expressar a quantidade de água e determinar o déficit hídrico do solo, vários índices podem ser utilizados (Martins et al., 2008): a quantidade total de água armazenada no solo (QTA), a capacidade de água disponível (CAD) definida pelo intervalo de umidade entre a capacidade de campo (CC) e o ponto de murcha permanente (PMP) (Conceição, 2012), a fração de água facilmente disponível (FAD) que indica a fração de água que pode ser consumida sem que haja déficit hídrico para a planta (Conceição, 2010) e a fração de água transpirável no solo (FATS) dada pela razão entre a quantidade de água disponível no solo e a quantidade total de água transpirável (Sinclair & Ludlow, 1986). (Ritchie et al., 1972) sugeriram que a resposta fisiológica das plantas ao déficit hídrico devia ser avaliada em função da água disponível no solo e esta proposta foi aprofundada por Sinclair & Ludlow (1986). Segundo (Santos & Carlesso, 1998), dentre os métodos que podem ser utilizados para expressar a quantidade de água e determinar o déficit hídrico do solo, o índice FATS parece ser o conceito que mais se aproxima como indicador real de água no solo que pode ser extraída pelas plantas para transpiração, uma vez que este índice indica o momento em que ocorre o fechamento estomático em resposta ao déficit hídrico e o grau de tolerância a este estresse (Ray & Sinclair, 1997; Souza et al., 2014). Além disso, alguns estudos com transgênicos de amendoim foram realizados utilizando o método de déficit hídrico gradual, onde vários padrões de resposta ao estresse foram observados, incluindo a relação NTR-FATS (Bhatnagar-Mathur et al., 2007; Devi et al., 2011; Leal-Bertioli et al., 2012).

O amendoim (*A. hypogaea*) é cultivado em regiões com alta variabilidade temporal e espacial da precipitação pluvial e, apesar de ser uma planta mesófila, ou seja, necessita de moderada umidade para sobrevivência, possui boa adaptação à seca

(Araújo & Ferreira, 1997). Estudos indicam que, dentro desta espécie, há genótipos mais aclimatados à baixa disponibilidade de água do que outros devido às diferentes características morfológicas e fisiológicas que apresentam (Painawadee et al., 2009). No presente estudo, estas características também podem ter influenciado o tempo necessário para que cada genótipo atingisse o estágio de 20 folhas expandidas estabelecido para o início do ensaio de déficit hídrico gradual. As fases de crescimento e desenvolvimento entre os genótipos da seção *Arachis* cultivados tetraplóides, por exemplo, são definidas variando apenas de acordo com o local e as condições climáticas onde são cultivados.

No entanto, ainda que o amendoim cultivado demonstre boa adaptabilidade à ambientes secos, a disponibilidade de água é extremamente necessária para otimizar seu potencial produtivo. Existem várias características que foram desenvolvidas pelas plantas ao longo da evolução para poder sobreviver em ambientes com pouca disponibilidade de água. Entre as características relacionadas à tolerância à seca o controle da taxa de transpiração mediada pelo fechamento estomático é uma das primeiras estratégias utilizadas pelas plantas para manter seu balanço hídrico sob condições de déficit hídrico. Esta taxa de transpiração não é afetada até que o volume de água contido no solo exija sua redução em razão da baixa disponibilidade de água no solo (Sinclair & Ludlow, 1986). Ritchie et al. (1972) propôs que a taxa de transpiração de plantas em solo seco e de plantas irrigadas não seria alterada até que restasse apenas um terço da água disponível no solo. Posteriormente, Sinclair & Ludlow (1986) confirmaram essa resposta, estabelecendo que o limite máximo da taxa de transpiração para a sobrevivência das plantas submetidas ao estresse deve ser de 10% da taxa de transpiração das plantas mantidas irrigadas. No presente estudo, para avaliar o perfil de transpiração de 13 genótipos da seção *Arachis*, foi, então, utilizado o método descrito por Sinclair & Ludlow (1986). Entretanto, o índice FATS não foi calculado, pois a quantidade de água no solo deve ser 0 (zero), ou seja, a planta deve ser induzida à morte para que este índice seja calculado. Assim, o índice FATS tornou-se inviável para este estudo devido à necessidade de extração de RNA total para análise da expressão da *EXLB*, impossibilitando qualquer análise das mudanças da NTR (Taxa de Transpiração Normalizada) em função da FATS e também traçar um

perfil de transpiração para cada genótipo. Este dado seria usado na comparação com outros estudos de espécies de leguminosas e verificar-se-ia a possibilidade de semelhanças na resposta ao déficit hídrico por meio da taxa de transpiração. Assim, foi observada apenas a TR (Taxa de Transpiração Individual) e a variação da NTR dos genótipos estudados.

Observou-se que *A. batizocoi* levou 19 dias entre o início do ensaio de déficit hídrico gradual e a coleta do último indivíduo, sendo considerado o genótipo com maior intervalo de tempo para alcançar os padrões de coleta estabelecidos (NTR = 0,3). Este genótipo não apresentou sintomas visuais de desidratação como murcha e senescência foliar, no entanto, foi observado o fechamento dos folíolos denominado paraheliotropismo. Este movimento no qual a lâmina foliar é mantida paralela à direção da radiação solar tem sido relatado em algumas leguminosas como soja (Rakocevic et al., 2011) e *Phaseolus* spp L. com o propósito de diminuir o efeito da radiação solar e da perda de água (Bielenberg et al., 2003).

Por outro lado, apesar da média da NTR individual de todos os 13 genótipos ter sido homogênea, somente *A. villosa* apresentou senescência foliar avançada ao atingir NTR próxima a 0,5. Este também foi o segundo genótipo com maior intervalo de tempo para coleta do último indivíduo (16 dias) ainda que a NTR para coleta não tenha sido aquela estabelecida para todos os outros genótipos (NTR = 0,3). É provável que este comportamento diferencial de *A. villosa* submetida a déficit hídrico esteja associado à sua plasticidade fenotípica proveniente de seu ambiente nativo semi-árido (Uruguai). A determinação da área foliar, da matéria seca da parte aérea e a relação raiz/parte aérea seriam variáveis importantes para avaliar o desempenho desse genótipo na tentativa de esclarecer este comportamento diferenciado (Correia & Nogueira, 2004).

Ainda foi observado que *A. hypogaea* cv Runner obteve a menor média de NTR registrada (NTR = 0,19) e também o menor tempo até a coleta do último indivíduo (5 dias). A queda súbita na taxa de transpiração de um dia para outro mostrou que, dentre os 13 genótipos utilizados, este genótipo apresentou o comportamento menos conservativo, condizente aos dados mostrados por Leal-Bertioli et al. (2012).



Esta diferença de intervalo de tempo entre os genótipos para alcançar a NTR imposta sugere, então, que pode haver especificidade de cada genótipo para os mecanismos de resposta ao estresse submetido e também que suas diferenças fisiológicas podem influenciar nesta diferença.

Os demais genótipos, individualmente, não mostraram diferença fenotípica significativa em função da NTR de 0,3.

Analisando-se ainda a média de dias decorridos entre o início do ensaio e a última coleta de cada genótipo e a NTR individual, observou-se que os genótipos apresentaram resposta ao déficit hídrico imposto semelhante aos resultados mostrados por Leal-Bertioli et al. (2012). Segundo os autores, os genótipos silvestres diploides e o anfidiplóide (tetraplóide sintético) apresentaram resposta ao estresse hídrico submetido mais conservativa, ou seja, ocorreu um decréscimo lento em sua taxa de transpiração em resposta à redução da disponibilidade hídrica do solo. Por outro lado, os genótipos tetraplóides cultivados e silvestre (*A. hypogaea* e *A. monticola*) apresentaram comportamento menos conservativo, isto é, a taxa de transpiração permaneceu similar e somente quando os níveis de água no solo foram consideravelmente baixos, a taxa de transpiração foi reduzida. Essa diferença de comportamento dos genótipos diploides silvestres pode estar ligada ao local de origem, uma vez que foram coletados na região semiárida do Caco Argentino, Bolívia, Brasil e Uruguai (Leal-Bertioli et al., 2007). Genótipos localizados nestas regiões são caracterizados por crescimento lento, baixa taxa de fotossintética e de transpiração etc. Esta estratégia conservativa torna-se, então, benéfica para estas espécies de ambientes sem irrigação, uma vez que o armazenamento de água é significativo para que se mantenham até o final do período de seca (Munns et al., 2010; Donovan et al., 2011). Já o comportamento dos cultivados e silvestre tetraplóides pode estar relacionado com a condutância estomática que mantém os estômatos abertos até que o solo esteja seco (Leal-Bertioli et al., 2012). Estes genótipos possuem como local de origem, regiões com alta disponibilidade de recursos, logo, apresentam crescimento rápido e alta taxa de transpiração e fotossintética. Além disso, esta resposta menos conservativa, também chamada de estratégia aquisitiva, é útil para cultivares de ambientes irrigados, pois a produtividade

pode ser mantida para os períodos entre as irrigações, já que o uso exacerbado de água é dirigido para o seu rápido desenvolvimento (floração e maturação de grãos precoces).

Ainda que neste estudo não tenha sido avaliada a condutância estomática dos genótipos e calculada a FATS, é provável que os genótipos silvestres que apresentaram taxa de transpiração similar e com redução gradual em resposta ao ensaio são os mais adaptados às condições de déficit hídrico. Isso porque o fechamento estomático permite a conservação da água assim que o solo começa a desidratar mesmo que o conteúdo de água no solo ainda esteja alto (Devi et al., 2009). No amendoim cultivado (*A. hypogaea*), Devi et al. (2009) demonstraram que os genótipos com melhor adaptação às condições de déficit hídrico são aqueles que apresentam elevada eficiência de transpiração (TE).

## **5.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO GENE *EXLB* EM 13 GENÓTIPOS DA SECÇÃO *ARACHIS* SUBMETIDOS AO DÉFICIT HÍDRICO GRADUAL.**

Atualmente, o estudo da expressão gênica tem sido considerado uma ferramenta importante para esclarecer os processos biológicos a nível molecular (Lockhart & Winzeler, 2000; Leal-Bertioli et al., 2003). Esses estudos possibilitam a identificação de genes-chave na resposta a diferentes tipos de estresse comparando-se, por exemplo, a expressão gênica de um conjunto de genes de um determinado organismo sob condições normais e quando submetido a algum tipo de estresse. Os mecanismos de resposta molecular ao déficit hídrico têm sido analisados, entre outros, por meio do estudo da modulação da expressão de genes que respondem a este estresse (Deng et al., 2009; Dias et al., 2012).

Estudos realizados por Brasileiro et al. (2015), demonstraram que o gene *EXLB* em *A. duranensis* apresenta maior expressão na raiz quando comparado com a expressão obtida em folhas. Uma análise global do perfil de expressão da *EXLB* em videira foi realizada em vários órgãos e estádios de desenvolvimento, no entanto, sua expressão foi restrita, dentre outros órgãos, à raiz, caule e ráquis (Dal Santo et al., 2013). Sendo assim, com aparente expressão diferencial da *EXLB* em raízes, para este

estudo foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de RNA total extraído apenas de raiz dos 13 genótipos da secção *Arachis*.

Atualmente, a análise da expressão gênica tem sido realizada, de preferência, pela técnica de RT-qPCR. Esta técnica requer a normalização dos níveis de mRNA entre amostras de diferentes tratamentos por meio da comparação da expressão do gene-alvo com a de um gene de referência. Assim, é fundamental que o gene de referência utilizado não possua variação significativa de expressão entre as amostras (Zhao & Fernald, 2005). No estudo de Morgante et al. (2011), os iniciadores que amplificam os genes de referência *ACT1* e *UBI2* foram desenhados para quatro genótipos da secção *Arachis* (*A. magna*; *A. duranensis*; *A. stenosperma* e *A. hypogaea*) submetidas a estresses biótico e abiótico. Sendo assim, os dados aqui apresentados corroboram a alta estabilidade da expressão destes genes de referência, uma vez que a média de sua eficiência permaneceu estável em todos os 13 genótipos utilizados, proporcionando maior precisão e confiabilidade na análise da expressão do gene-alvo. Assim, é possível afirmar que estes genes de referência não tiveram sua expressão influenciada pelo tratamento o qual as plantas foram submetidas e corroboram a sua estabilidade para os demais nove genótipos da secção *Arachis*.

Para *A. batizocoi*, observa-se que, comparando-se com os demais genótipos, a DDC (média de dias de coleta) é alta (em torno de 19 dias) enquanto que a RQ do gene *EXLB* é relativamente baixa (5,46 vezes). Segundo o coeficiente de Pearson, há uma fraca correlação entre a média de dias de coleta e a expressão relativa da *EXLB* para todos os 13 genótipos, assim para este genótipo, o fato de ter levado mais dias para atingir uma NTR de 0,3, ou seja, ter tido um comportamento mais conservador em relação à sua resposta ao estresse, não foi refletido em uma maior expressão da *EXLB*. Desse modo, o aumento da atividade da expansina aparenta ser uma resposta à baixa disponibilidade de água no solo.

*A. cardenasii* (DDC=8; RQ=7,34) , *A. duranensis* (DDC=13; RQ= 8,19), *A. ipaënsis* (DDC=10; RQ=10,82), *A. magna* (DDC= 11; RQ= 3,65), e *A. stenosperma* (DDC=12; RQ= 5,45), também mostraram que a DDC não refletiu em um aumento na expressão da *EXLB*. Estes resultados, para *A. duranensis* e *A. magna* correspondem aos apresentados por Leal-Bertioli et al. (2012), ou seja, ambos os genótipos mostraram um

perfil de transpiração mais conservativo quando comparados com os genótipos cultivados e o silvestre tetraplóide ainda que a diferença de ploidia não seja indicativo de aumento de expressão da *EXLB*.

Por outro lado, *A. gregoryi* e *A. villosa* apresentaram resultado oposto. Com uma RQ de 28,16 e 22,82 vezes, as maiores obtidas entre os 13 genótipos estudados, respectivamente, estes genótipos apresentam um aumento da expressão da *EXLB* que pode estar relacionado a uma resposta imediata ao estresse submetido.

Por fim, dentre os cinco genótipos tetraplóides utilizados, *A. hypogaea* c.v. Runner e *A. hypogaea* cv Tatu apresentaram comportamento menos conservativo (estratégia aquisitiva) conforme estudo de Leal-Bertioli et al. (2012), pois somente quando os níveis de água no solo estavam consideravelmente baixos, a taxa de transpiração foi reduzida. Para estes genótipos, então, foi observado um aumento da RQ em um curto intervalo de tempo quando comparado com os outros genótipos diploides e tetraplóides (DDC= 6; RQ= 13,71 e DDC= 4 dias; RQ= 11,72, respectivamente), indicando que o aumento da expressão da *EXLB* pode ser um comportamento em resposta ao estresse submetido.

Considerando então os resultados acima, *A. gregoryi* e *A. villosa* que obtiveram níveis relativos de mRNA altos se comparado com os genótipos restantes, este genótipos podem ser utilizados para análise da expressão temporal e espacial da *EXLB* por meio da técnica de hibridização *in situ* a fim de verificar se a RQ obtida pela técnica RT-qPCR confere com a expressão observada no tecido.

Neste estudo foi constatado que o anfidiplóide (*A. duranensis* x *A. ipaënsis*) utilizado apresenta um padrão de taxa de transpiração semelhante a seus parentais. Esse resultado é consistente com o fato de que grande parte do genoma da parental doadora é incorporado ao genoma da planta receptora (Leal-Bertioli et al., 2003) . Observa-se também que este genótipo apresenta comportamento mais conservador quando comparado com os genótipos tetraplóides cultivados. Os resultados para o anfidiplóide são esperados, uma vez que o cruzamento do qual foi originado é considerado recente se comparado a *A. hypogaea* (tetraplóide) que surgiu há milhares de anos.

Para minimizar a perda da produção, estudos voltados para o melhoramento genético do amendoim cultivado têm buscado introgridir características de interesse agrônômico que foram perdidas ao longo de seu processo de domesticação. No entanto, o uso de genótipos silvestres em programas de melhoramento é dificultado devido à diferença de ploidia, uma vez que os genótipos silvestres são diploides (AA ou BB,) e o amendoim cultivado é alotetraplóide (AABB). Atualmente, a estratégia mais utilizada consiste no cruzamento de espécies dos dois genomas distintos, obtendo-se híbridos diploides estéreis (AB) que ao serem tratados com colchicina tornam-se férteis, produzindo indivíduos AABB (anfidiplóides) capazes de um novo cruzamento com um cultivado (Santos et al., 2013) . Assim, é importante observarmos o comportamento de um anfidiplóide sob condições limitadas de água visando a busca por características úteis para os genótipos cultivados, uma vez que compartilham a mesma ploidia.

Assim, tanto os genótipos diploides quanto os tetraplóides apresentaram comportamentos semelhantes aos apresentados por Leal-Bertioli et al. (2012), mostrando que os genótipos diploides podem ter características mais favoráveis do que os genótipos tetraplóides quando submetidos a esse estresse hídrico (Leal-Bertioli et al., 2012) Entretanto, ainda segundo estes autores, algumas características relacionadas ao déficit hídrico, como densidade e dimensão dos estômatos, área foliar e densidade de tricomas, são substancialmente modificadas pela poliploidização. Assim, ainda que os genótipos tetraplóides apresentem comportamento menos conservativo, estas características em conjunto podem compensar essa estratégia menos favorável (Leal-Bertioli et al., 2012).

### **5.3 CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA DO GENE *EXLB* EM GENÓTIPOS DA SECCÃO *ARACHIS*.**

A sequência completa da sequência codificadora do gene *EXLB* foi obtida a partir da junção da *AdEXLB*, cDNA da *EXLB* de um representante dos 13 genótipos (*A. duranensis*) e cDNA de *A. hypogaea* encontrado em banco de dados públicos. Todas as sequências deduzidas de aminoácidos analisadas mostraram os dois domínios característicos da superfamília das expansinas: um homólogo ao domínio catalítico da

família 45 de glicosil hidrolase (GH45) e o outro homólogo ao grupo 2 de pólen alergênicos de gramíneas, cuja função parece estar relacionada com a ligação de polissacarídeos (Cosgrove, 1997b; Zhu et al., 2014). A partir dessa estrutura conclui-se que a expansina, objeto desse estudo, pertence à família EXLB, ainda pouco estudada tanto em plantas quanto em outros organismos.

Entre os 13 genótipos aqui estudados, observaram-se mutações pontuais em poucos nucleotídeos. Polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphism-SNP*) ocorrem quando um nucleotídeo é trocado por outro qualquer (Griffin & Smith, 2000). Estas modificações podem ser encontradas tanto nas regiões codificantes de proteínas (exons) quanto nas regiões não codificantes (introns). O alinhamento de sequências de nucleotídeos entre os 13 genótipos mostra que, dos 11 polimorfismos encontrados, quatro são sinônimos, ou seja, não há alteração na sequência protéica e três são não-sinônimos e conservativos, onde a mutação não altera o aminoácido produzido. Entretanto, cada tipo de proteína possui uma estrutura tridimensional que lhe confere uma função específica e esta função depende de sua sequência de aminoácidos. Assim existem regiões dessa sequência que são essenciais para suas funções biológicas e outras que não as afetam (Wolters et al., 2000). Neste alinhamento foram observados ainda quatro polimorfismos não-sinônimos e não-conservativos, ou seja, o novo aminoácido possui natureza química diferente do anterior, podendo levar a uma alteração na estrutura da proteína. Considerando que esta mutação está localizada no domínio I da expansina, domínio este responsável pela função de relaxamento e extensão da parede celular, esta mutação não sinônima e não conservativa pode não somente alterar a estrutura desta proteína como também influenciar seu local de atuação, Também observou-se que o SNP 8 é exclusivo para o genótipos tetraplóides podendo ser uma considerado um marcador genético importante para estudos filogenéticos de evolução dentro da espécie.

Assim, considerando que houve uma variação na expressão da *EXLB* nos genótipos em estudo e também que sua estrutura gênica é conservada nos 13 genótipos, essa diferença de expressão pode derivar de uma regulação transcricional diferenciada. Uma mutação na sequência do promotor, por exemplo, pode diminuir a sua eficiência e, conseqüentemente, diminuir a taxa de transcrição do gene (Thompson et al., 1993).

O alinhamento de gDNA realizado com quatro genótipos da secção *Arachis* também revelou alto grau de similaridade e com SNPs localizados na região 5'UTR, exon e intron. Diversos mecanismos e etapas estão envolvidos no controle de tradução do mRNA (Tuller et al., 2010). Entretanto, a maior parte deste controle ocorre na etapa de iniciação, onde a menor subunidade do ribossomo liga-se à extremidade 5' do mRNA e esta desliza ao longo da molécula de RNA até o códon de iniciação (AUG). Assim, SNPs intrônicos podem influenciar o *splicing* do mRNA, assim como um SNP na região 5'UTR pode conter motivos capazes de regular aspectos da função do transcrito como sua eficiência de tradução (Krawczak et al., 1992).

As quatro famílias das expansinas apresentam estruturas semelhantes como a presença de dois domínios precedidos por um peptídeo sinal (Cosgrove, 2000). Segundo dados mostrados por Sampedro & Cosgrove (2005), a família EXLB está mais presente em soja que em *Arabidopsis*, arroz, feijão e *Medicago truncatula*. Conforme alinhamento realizado entre os 13 genótipos da secção *Arachis* e outras espécies incluindo a soja, esta possui maior similaridade com a EXLB encontrada em *Arachis*. Conforme Zhu et al. (2014), genes da mesma família devem apresentar estrutura semelhante, ou seja, com o mesmo número de exons. Dessa forma, o gene *EXLB* encontrado neste estudo possui quatro exons assim como as outras espécies com sequência semelhante. Ainda que no estudo acima (Zhu et al., 2014) o gene encontrado em soja apresente cinco exons, existem variações na estrutura do gene das famílias EXPA e EXLB, com vários genes contendo diferentes quantidades de exons, sendo estas duas famílias consideradas menos conservadas do que EXPB e EXLA (Zhu et al., 2014). Ressalta-se ainda que pode haver diferença na estrutura do gene *EXLB* em relação a outros genes da mesma família, conforme mostrado no estudo de Dal Santo et al. (2013). Neste estudo, o gene *EXLB* encontrado em videira apresentou estrutura idêntica à um gene *EXLA* e diferenças com genes *EXLB*, sugerindo que as famílias podem ter sofrido eventos de duplicação gênica independente e, conseqüentemente, gerado genes parálogos com sobreposição completa ou parcial de suas funções.

#### **5.4 RELAÇÕES FILOGENÉTICAS ENTRE OS 13 GENÓTIPOS DA SECCÃO *ARACHIS* ESTUDADOS.**

A filogenia representa a relação evolutiva entre um conjunto ou grupo de organismos (Saitou & Imanishi, 1989; Hall, 2004). Determina, então, a história evolutiva do gene, da função ou da espécie, caracteriza ancestrais e estima o tempo de divergência entre dois organismos desde o último ancestral compartilhado.

Poucos estudos filogenéticos foram realizados até o momento para a superfamília das expansinas. Com a disponibilidade do genoma completo de *Arabidopsis* e arroz foi possível identificar genes dessa superfamília, analisar suas regiões promotoras e localizar os íntrons (Sampedro et al., 2006). A presença de transcritos altamente conservados da *EXPA* em uma pteridófita (*Marsilea quadrifolia*) e também em musgos sugere que as *EXPA* tem sido altamente conservadas durante a evolução de plantas terrestres e, ainda, análises da estrutura do gene e da sequência de aminoácidos de *Arabidopsis* e arroz indicam que *EXPA* e *EXPB* evoluíram de um único ancestral comum (Lee et al., 2001). Além disso, análises filogenéticas dessas mesmas espécies mostraram inúmeras duplicações de genes em linhagens diferentes provavelmente acarretadas por um erro de recombinação, um evento de retrotransposição ou a duplicação de um cromossomo inteiro.

Segundo (Sampedro et al., 2005), *EXPA* é a maior das famílias com 34 genes em arroz e 26 genes em *Arabidopsis*, contra apenas um gene em cada espécie da *EXLB*. De acordo com este estudo, o último ancestral comum de monocotiledôneas e eudicotiledôneas possuíam de 15 a 17 genes que codificam uma proteína expansina, sendo apenas dois pertencentes à família *EXLB*. Portanto, devido à pouca disponibilidade de dados, análises em outros genomas faz-se necessária para maiores esclarecimentos quanto à filogenia desta superfamília, em particular a família *EXLB*.

Conforme descrito anteriormente, o domínio GH45, localizado na região N-terminal das expansinas, já foi encontrado em outras proteínas similares de organismos como *Dyctiostelium*, fungos, nematoides e moluscos. Contudo, estes genes codificam proteínas que não compartilham a estrutura do gene com expansinas de plantas, logo, esta diferença na estrutura indica que expansinas de plantas evoluíram separadamente destes genes de outros organismos (Choi et al., 2006).



Uma árvore filogenética foi construída a partir de proteínas deduzidas de sequências de aminoácidos dos 13 genótipos da secção *Arachis* aqui estudados e de outras culturas como soja (*Glycine max*), *Medicago truncatula*, grão-de-bico (*Cicer arietinum*), arábida e *Brassica rapa*. A árvore filogenética resultante separou os genótipos pertencentes à secção *Arachis* das outras culturas, como o esperado. Apesar do alto grau de similaridade das sequências, *A. duranensis* (genoma AA) está próxima de *A. hypogaea* cv Runner (genoma AABB) provavelmente devido a esta primeira ser sua parental doadora. Um polimorfismo não sinônimo conservativo foi encontrado em *A. stenosperma* (genoma AA) e *A. gregoryi* (genoma BB) sendo, então, evolutivamente próximas neste estudo, mas agrupadas em clados diferentes. Entretanto, foi encontrado um polimorfismo não-sinônimo não-conservativo em *A. ipaënsis* e *A. magna* (genoma BB), sugerindo que a separação de *A. ipaënsis* do clado de *A. hypogaea* seja proveniente da ausência deste polimorfismo nos genótipos de *A. hypogaea*. A partir destas análises, observou-se que o baixo nível de polimorfismo da *EXLB* encontrado na secção *Arachis* dificulta o estabelecimento da relação filogenética entre os 13 genótipos utilizados causando a separação dos genótipos em clados diferentes ainda que sejam evolutivamente próximos. Segundo (Gimenes et al., 2002), *A. hypogaea* (AABB), *A. monticola* (AABB), *A. duranensis* (AA), e *A. ipaënsis* (BB) deveriam estar agrupados no mesmo clado, uma vez que estes genótipos diploides são os doadores do genoma de *A. hypogaea*.

Tendo em vista que pragas, doenças e estresses abióticos afetam negativamente o setor agrícola brasileiro, estudos têm buscado melhor compreensão das respostas das plantas aos diferentes estresses por meio da prospecção e identificação de genes responsivos a eles (Edwards & Batley, 2010). Entretanto, as funções biológicas destes genes para características agrônômicas de interesse ainda não estão caracterizadas. O aumento da expressão das expansinas pode estar relacionado ao controle da perda de água em plantas submetidas ao déficit hídrico, indicando que estas proteínas possuem um grande potencial de aplicação biotecnológica para serem utilizadas em programas de melhoramento genético visando a tolerância à seca.

Com base neste contexto e no perfil de expressão diferencial da *EXLB* encontrado em 13 genótipos da secção *Arachis*, este gene possui grande potencial

como estratégia de tolerância à baixa disponibilidade de água. Sendo assim, pode ser considerado um forte candidato para ser validado como responsivo ao déficit hídrico por meio de isolamento e clonagem em vetores de expressão em plantas e posterior expressão em plantas transgênicas.

## CONCLUSÃO

---

- Este é o primeiro estudo de caracterização da estrutura gênica da *EXPANSINA-LIKE B (EXLB)*, no qual foram utilizados 13 genótipos da secção *Arachis*: nove silvestres, três cultivados e um anfidiplóide. Esta estrutura apresenta quatro exons e três introns caracterizando uma sequência codificadora de 753 pb. Assim, a expansina estudada pertence à família EXPANSINA-LIKE B (EXLB) devido à presença de componentes estruturais conservados e possui um alto grau de conservação de sequência, uma vez que a sequência codificadora da *EXLB* possui de 97,09 a 99,02% de similaridade entre os 13 genótipos estudados;
- O gene *EXLB* foi positivamente regulado e essa regulação de expressão variou entre os 13 genótipos da secção *Arachis*. Entretanto, dentre os 13 genótipos, *A. villosa* e *A. gregoryi* apresentaram os maiores níveis de expressão relativa (23 e 28 vezes, respectivamente) quando comparado com o grupo controle; e *A. magna* apresentou o menor nível (3,64 vezes);
- Foram identificados 11 SNPs na sequência codificadora de 753 pb sequenciados para os 13 genótipos. Três haplótipos se formaram baseados nos 11 SNPs. Desses haplótipos 2 se destacam: I) *A. gregoryi* e *A. villosa* pela alta expressão relativa comparada aos outros haplótipos, sugerindo uma relação entre a expressão relativa e os SNPs encontrados nestes dois genótipos; II) *A. duranensis* e todos os tetraplóides utilizados, uma vez que *A. duranensis* é um dos parentais dos tetraplóides estudados nesse trabalho. Destaca-se ainda o SNP 8, que somente ocorre entre os genótipos tetraplóides, e pode ser um potencial marcador genético para a identificação destes genótipos.
- As relações filogenéticas entre os 13 genótipos da secção *Arachis* foram comprometidas devido ao alto grau de conservação no cDNA do gene *EXLB* (753 pb) dos 13 genótipos.

## PERSPECTIVAS

---

Tendo em vista os resultados obtidos nesse trabalho, abaixo são listadas algumas perspectivas de uso desses dados pela equipe *Arachis*.

- Avaliar os efeitos da *EXLB* e de suas variações de expressão, por meio de transformação de arábido, antes da sua introdução em amendoim. As plantas de arábido deverão ser submetidas a diferentes estresses abióticos utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.
- Utilizar sistemas simples de expressão gênica, como plantas compostas com raízes transgênicas induzidas por *Agrobacterium rhizogenes*, para verificar a expressão específica da *EXLB* em raízes sob ataque de patógenos, como nematoides.
- Identificar o número de cópias da *EXLB* no genoma de *A. duranensis* e *A. ipaënsis* por meio da técnica Southern Blot visando saber a possibilidade de modelar a expressão desse gene.
- Estudar a superfamília das expansinas no genoma de *A. duranensis* e *A. ipaënsis*, recentemente sequenciadas, por meio de análises *in silico*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Agroenergia, 2013. Anuário estatístico da Agroenergia. 1, 221-233.
- Almeida, P.S.R., Saddi, V.A., 2007. Monitoramento de residual mínima em leucemia mieloide crônica por PCR em tempo real. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 29, 387-391.
- Andberg, M., Penttilä, M., Saloheimo, M., 2015. Swollenin from *Trichoderma reesei* exhibits hydrolytic activity against cellulosic substrates with features of both endoglucanases and cellobiohydrolases. *Bioresource Technology* 181, 105-113.
- APG, 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105-121.
- Araújo, W.F., Ferreira, L.G.R., 1997. Efeito do déficit hídrico durante diferentes estádios do amendoim. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32, 481-484.
- Baccelli, I., Luti, S., Bernardi, R., Scala, A., Pazzagli, L., 2014. Cerato-platanin shows expansin like activity on cellulosic materials. *Applied Microbiology and Biotechnology* 98, 175-184.
- Bhatnagar-Mathur, P., Devi, M.J., Reddy, D.S., Lavanya, M., Vadez, V., Serraj, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Sharma, K.K., 2007. Stress-inducible expression of At DREB1A in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) increases transpiration efficiency under water-limiting conditions. *Plant Cell Reports* 26, 2071-2082.
- Bielenberg, D.G., Miller, J.D., Berg, V.S., 2003. Paraheliotropism in two *Phaseolus* species: combined effects of photon flux density and pulvinus temperature, and consequences for leaf gas exchange. *Environmental and Experimental Botany* 49, 95-105.
- Bolonhezi, D., Godoy, I.J., Santos, R.C., 2013. Manejo cultural do amendoim. O agronegócio do amendoim no Brasil. *Embrapa* 1, 185-237.
- Brasileiro, A.C.M., Morgante, C.V., Araujo, A.C.G., Leal-Bertioli, S.C.M., Silva, A.K., Martins, A.C.Q., Vinson, C.C., Santos, C.M.R., Bonfim, O., Togawa, R.C., Saraiva, M.A.P., Bertioli, D.J., Guimaraes, P.M., 2015. Transcriptome profiling of wild *Arachis* from water-limited environments uncovers drought tolerance candidate genes. *Plant Molecular Biology Reporter* 1, 1-17.
- Bray, E.A., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103, 1035-1040.

- Brooker, R.J., Widmaier, E.P., Graham, L.E., 2011. Extracellular matrix and cell walls. Biology. Mc Graw Hill, p. 570.
- Brookes, A.J., 1999. The essence of SNPs. *Gene* 234, 177-186.
- Brotman, Y., Briff, E., Viterbo, A., Chet, I., 2008. Role of swollenin, an expansin-like protein from *Tricoderma*, in plant root colonization. *Plant Physiology* 147, 779-789.
- Brummel, D.A., Harpster, M.H., Civello, P.M., Palys, J.M., Bennett, A.B., Dunsmuir, P., 1999. Modification of expansin protein abundance in tomato fruit alters softening and cell wall polymer metabolism during ripening. *The Plant Cell* 11, 2203-2216.
- Budzinski, I., Santos, T., Sera, T., Pot, D., Vieira, L.G., Pereira, L.F., 2011. Expression patterns of three  $\alpha$ -expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. *Plant Biology* 13, 462-471.
- Bustin, S.A., 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology* 25, 169-193.
- Campos-Mondragón, M.G., Calderón de La Barca, A.M., Durán-Prado, A., Campos-Reyes, R.M., Oliart-Ros, J., Ortega-García, L.A., Medina-Juárez, O., 2009. Nutricional composition of new peanut (*Arachis Hypogaea* L.) cultivars. *Grasas y Aceites* 60, 161-167.
- Carey, R.E., Cosgrove, D.J., 2007. Portrait of the expansin superfamily in *Physcomitrella patens*: comparisons with angiosperm expansin. *Annals of Botany* 99, 1131-1141.
- Carey, R.E., Hepler, N.K., Cosgrove, D.J., 2013. *Selaginella moellendorffii* has a reduced and highly conserved expansin with genes more closely related to angiosperms than to bryophytes. *BioMed Central Plant Biology* 13, 1-12.
- Cavalcante, A.C.R., Cavallini, M.C., Lima, N.R.C.B., 2009. Estresse por déficit hídrico em plantas forrageiras. *Documentos. Embrapa Caprinos e Ovinos* 1, 1-47.
- Champagne, C.M.E., Goliber, T.E., Wojciechowski, M.F., Mei, R.W., Townsley, B.T., Wang, K., Paz, M.M., Geeta, R., Sinha, N.R., 2007. Compound leaf development and evolution in the legumes. *The Plant Cell* 19, 3369-3378.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C., 2002. How plants cope with water stress in the field - photosynthesis and growth. *Annals of Botany* 89, 907-916.

Chen, F., Dahal, P., Bradford, K.J., 2001. Two tomato expansin genes show divergent expression and localization in embryos during seed development and germination. *Plant Physiology* 127, 928-936.

Chen, F., Nonogaki, H., Bradford, K.J., 2002. A gibberellin-regulated xyloglucan endotransglycosylase gene is expressed in the endosperm cap during tomato seed germination. *Journal of Experimental Botany* 53, 215-223.

Cho, H., Cosgrove, D.J., 2002. Regulation of root hair initiation and expansin gene expression in arabidopsis. *The Plant Cell* 14, 3237-3253.

Cho, H.T., Kende, H., 1997. Expression of expansin genes is correlates with growth in deepwater rice. *The Plant Cell* 9, 1661-1671.

Choi, D., Cho, H., Lee, Y., 2006. Expansin: expanding importance in plant growth and development. *Physiologia Plantarum* 126, 511-518.

Conceição, M.A.F., 2010. Balanço hídrico em fruteiras. Circular Técnica. Embrapa Uva e Vinho 1, 1-12.

Conceição, M.A.F., 2012. Estratégias de manejo para aumentar a eficiência do uso da água na viticultura irrigada. Comunicado Técnico. Embrapa Uva e Vinho 2, 1-8.

Correia, K.G., Nogueira, R.J.M.C., 2004. Avaliação do crescimento do amendoim (*Arachis hypogaea* L.) submetido a déficit hídrico. *Revista de Biologia e Ciência da Terra* 4, 1-7.

Cosgrove, D.J., 1997a. Creeping walls, softening fruit, and penetrating pollen tubes: the growing roles of expansins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5504-5505.

Cosgrove, D.J., 1997b. Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell* 9, 1031-1041.

Cosgrove, D.J., 1998. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiology* 118, 333-339.

Cosgrove, D.J., 1999. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular* 50, 391-417.

Cosgrove, D.J., 2000. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* 407, 321-326.

Cosgrove, D.J., 2015. Plant expansins: diversity and interactions with plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 25, 162-172.

Cosgrove, D.J., Bedinger, P., Durachko, D.M., 1997. Group I allergens of grass pollen as cell wall-loosening agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 6559-6564.

Custodio, A.R., Seijo, G., Valls, J.F.M., 2013. Characterization of brasilian accessions of wild *Arachis* species of section *Arachis* (Fabaceae) using heterocromatin detection and fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genetics and Molecular Biology* 36, 364-370.

Dal Santo, S., Vannozzi, A., Tornielli, G.B., Fasoli, M., Venturini, L., Pezzotti, M., Zenoni, S., 2013. Genome-wide analysis of the expansin gene superfamily reveals grapevine-specific structural and functional characteristics. *PLoS One* 8, 1-14.

Deng, X., Fu, F., Ni, N., Li, W., 2009. Differential gene expression in response to drought stress in maize seedling. *Agricultural Sciences in China* 8, 767-776.

Devi, M.J., Bhatnagar-Mathur, P., Sharma, K.K., Serraj, R., Anwar, S.Y., Vadez, V., 2011. Relationships between transpiration efficiency and its surrogate traits in the rd29A:DREB1A transgenic lines of groundnut. *Journal Agronomy & Crop Science* 197, 272-283.

Devi, M.J., Sinclair, T.R., Vadez, V., Krishnamurthy, L., 2009. Peanut genotypic variation in transpiration efficiency and decreased transpiration during progressive soil drying. *Field Crops Research* 114, 280-285.

Dias, F.G., Neves-Borges, A.C., Viana, A.A., Mesquita, R.O., Romano, E., Grossi-de-Sá, F.M., Nepomuceno, A.L., Loureiro, M.E., Alves-Ferreira, M., 2012. Expression analysis in response to drought stress in soybean: shedding light on the regulation of metabolic pathway genes. *Genetics and Molecular Biology* 35, 222-232.

Donovan, L.A., Maherali, H., Caruso, C.M., Huber, H., Kroon, H., 2011. The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends in Ecology & Evolution* 26, 88-95.

Drapala, P., 2009. Peanuts add good option for crop rotation scheme. *Mississippi Crop Report*. Mississippi State University 1, 1.

Dwivedi, S.L., Crouch, J.H., Nigam, S.N., Ferguson, M.E., 2003. Molecular breeding of groundnut for enhanced productivity and food security in the semi-arid tropics: opportunities and challenges. *Advances in Agronomy* 80, 153-221.

Edwards, D., Batley, J., 2010. Plant genome sequencing: applications for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal* 8, 2-9.



- Fávero, A.P., Moraes, S.A., Garcia, A.A.F., Valls, J.F.M., Vello, N.A., 2009. Characterization of rust, early and late leaf spot resistance in wild and cultivated peanut germplasm. *Scientia Agricola* 66, 110-117.
- Favero, E., Diesel, V., 2008. A seca enquanto um hazard e um desastre: uma revisão teórica. *Aletheia* 27, 198-209.
- Folegatti, M.V., Sánchez-Román, R.M., Coelho, R.D., Frizzone, J.A., 2007. Gestão dos recursos hídricos e agricultura irrigada no Brasil. *Águas do Brasil: análises estratégicas*. USP 1, 15-23.
- Freitas, S.M., Margarido, M.A., Negri Neto, A., 2003b. Modelo de previsão para área plantada com amendoim das águas no estado de São Paulo. *Informações Econômicas* 33, 21-27.
- Gao, Q., Guo, Q.F., Xing, S.C., Zhao, M.R., Li, F., Wang, W., 2007. The characteristics of expansins in wheat coleoptiles and their responses to water stress. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology* 33, 402-410.
- Georgelis, N., Nikolaidis, N., Cosgrove, D.J., 2014. Biochemical analysis of expansin-like proteins from microbes. *Carbohydrate Polymers* 100, 17-23.
- Gimenes, M.A., Lopes, C.R., Valls, J.F.M., 2002. Genetic relationships among *Arachis* species based on AFLP. *Genetics and Molecular Biology* 25, 349-353.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30, 503-512.
- Gookin, T.E., Hunter, D.A., Reid, M.S., 2003. Temporal analysis of alpha and beta-expansin expression during floral opening and senescence. *Plant Science* 164, 769-781.
- Gregory, W.C.; Krapovickas, A.; Gregory, M. P. 1980. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. *Advances in Legumes Sciences* 1, 469-481.
- Griffin, T.J., Smith, L.M., 2000. Single-nucleotide polymorphism analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. *Trends in Biotechnology* 18, 77-84.
- Guo, W., Zhao, J., Li, X., Qin, L., Yan, X., Liao, H., 2011. A soybean  $\beta$ -expansin gene GmEXPB2 intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses. *The Plant Journal* 66, 541-552.
- Gutierrez, L., Mauriat, M., Pelloux, J., Bellini, C., Van Wuytswinkel, O., 2008. Towards a systematic validation of references in real-time RT-PCR. *The Plant Cell* 20, 1734-1735.
- Hall, B.G., 2004. *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual*. Sinauer Associates Sunderland.

- Hammons, R.O. 1994. The origin and history of the groundnut. In: The groundnut crop - a scientific basis for improvement. p. 24-42.
- Han, F., Peng, Y., Xu, L., Xiao, P., 2014. Identification, characterization, and utilization of single copy genes in 29 angiosperm genomes. *Biomed Central Genomics* 15, 1-9.
- Harb, A., Krishnan, A., Ambavaram, M.M.R., Pereira, A., 2010. Molecular and physiological analysis of drought stress in *Arabidopsis* reveals early responses leading to acclimation in plant growth. *Plant Physiology* 154, 1254-1271.
- Hayward-Lester, A., Oefner, P.J., Sabatini, S., Doris, P.A., 1995. Accurate and absolute quantitative measurement of gene expression by single-tube RT-PCR and HPLC. *Genome Research* 5, 494-499.
- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J., Williams, P.M., 1996. Real time quantitative PCR. *Genome research* 6, 986-994.
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., Watson, R., 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology* 11, 1026-1030.
- Hill, G.M., 2002. Peanut by-products fed to cattle. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 18, 295-315.
- Hoson, T., Soga, K., Mori, R., Saiki, M., Nakamura, Y., Wakabayashi, K., Kamisaka, S., 2002. Stimulation of elongation growth and cell wall loosening in rice coleoptiles under microgravity conditions in space. *Plant and Cell Physiology* 43, 1067-1071.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., Zumla, A., 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity* 6, 279-284.
- IBGE, 2012. Estatística da produção agrícola. p. 76.
- Jones, L., McQueen-Mason, S., 2004. A role for expansins in dehydration and rehydration of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Federation of European Biochemical Societies* 559, 61-65.
- Keller, E., Cosgrove, D.J., 1995. Expansins in growing tomato leaves. *The Plant Journal* 8, 795-802.
- Kende, H., Bradford, K., Brummell, D., Cho, H., Cosgrove, D.J., Fleming, A., Gehring, C., Lee, Y., McQueen-Mason, S., Rose, J., 2004. Nomenclature for members

of the expansin superfamily of genes and proteins. *Plant Molecular Biology* 55, 311-314.

Kerff, F., Amoroso, A., Herman, R., Sauvage, E., Petrella, S., Filée, P., Charlier, P., Joris, B., Tabuchi, A., Nikolaidis, N., 2008. Crystal structure and activity of *Bacillus subtilis* YoaJ (EXLX1), a bacterial expansin that promotes root colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 16876-16881.

Kochert, G., Stalker, H.T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C.R., Moore, K., 1996. RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 83, 1282-1291.

Krapovickas, A., Gregory, W.C., 1994. Taxonomy of the genus *Arachis* (Leguminosae). *Bonplandia* 8, 1-186.

Krawczak, M., Reiss, J., Cooper, D.N., 1992. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Human Genetics* 90, 41-54.

Kudla, U., Qin, L., Milac, A., Kielak, A., Maissen, C., Overmars, H., Popeijus, H., Roze, E., Petrescu, A., Smant, G., 2005. Origin, distribution and 3D-modeling of Gr-EXPB1, an expansin from the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Federation of European Biochemical Societies* 579, 2451-2457.

Kumar, S.; Tamura, K.; Jacobsen, I., Nei, N., 2000. MEGA: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 2.0.

Lavia, G.I., 2000. Chromosome studies in wild *Arachis* (Leguminosae). *Caryologia* 53, 277-281.

Leal-Bertioli, S.C.M., Bertioli, D.J., Guimarães, P.M., Pereira, T.D., Galhardo, I., Silva, J.P., Brasileiro, A.C.M., Oliveira, R.S., Silva, P.I.T., Vadez, V., 2012. The effect of tetraploidization of wild *Arachis* on leaf morphology and other drought-related traits. *Environmental and Experimental Botany* 84, 17-24.

Leal-Bertioli, S.C.M., Guimarães, P.M., Fávero, A.P., Moretzsohn, M.C., Proite, K., Bertioli, D.J., 2003. Amendoim selvagem: uma fonte de resistência a pragas. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* 31, 116-119.

Leal-Bertioli, S.C.M., Vadez, V., Guimarães, P.M., Silva, P.I.T., Moraes, L.F.M.V., Bertioli, D.J., Araujo, A.C.G., 2007. Avaliação de espécies silvestres de *Arachis*, híbridos e cultivares de amendoim para características relacionadas à resposta ao estresse hídrico. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia: Boletim de pesquisa e desenvolvimento* 166, 17.

- Lee, Y., Choi, D., Kende, H., 2001. Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology* 4, 527-532.
- Li, F., Xing, S., Guo, Q., Zhao, M., Zhang, J., Gao, Q., Wang, G., Wang, W., 2011. Drought tolerance through over-expression of the expansin gene *TaEXPB23* in transgenic tobacco. *Journal of Plant Physiology* 168, 960-966.
- Li, L., Bedinger, P.A., Volk, C., Jones, A.D., Cosgrove, D.J., 2003a. Purification and characterization of four  $\beta$ -expansins (*Zea m 1* isoforms) from maize pollen. *Plant Physiology* 132, 2073-2085.
- Li, Y., Jones, L., McQueen-Mason, S., 2003b. Expansins and cell growth. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 603-610.
- Li, Z., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1993. An oat coleoptile wall protein that induces wall extension in vitro and that is antigenically related to a similar protein from cucumber hypocotyls. *Planta* 191, 349-356.
- Lin, Z., Ni, Z., Zhang, Y., Yao, Y., Wu, H., Sun, Q., 2005. Isolation and characterization of 18 genes encoding  $\alpha$ - and  $\beta$ -expansins in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Genetics and Genomics* 274, 548-556.
- Lizana, X.C., Riegel, R., Gomez, L.D., Herrera, J., Isla, A., McQueen-Mason, S.J., Calderini, D.F., 2010. Expansins expression is associated with grain size dynamics in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Experimental Botany* 61, 1147-1157.
- Lockhart, D.J., Winzeler, E.A., 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405, 827-836.
- Lourenzani, W.L., Lourenzani, A.E.B.S., 2006. Potencialidades do agronegócio brasileiro de amendoim. XLIV Congresso da Sociedade Brasileira de Economia e Sociologia Rural, 1-17.
- Lü, P., Kang, M., Jiang, X., Dai, F., Gao, J., Zhang, C., 2013. *RhEXPA4*, a rose expansin gene, modulates leaf growth and confers drought and salt tolerance to *Arabidopsis*. *Planta* 237, 1547-1559.
- Ma, N., Wang, Y., Qiu, S., Kang, Z., Che, S., Wang, G., Huang, J., 2013. Overexpression of *OsEXPA8*, a root-specific gene, improves rice growth and root system architecture by facilitating cell extension. *PloS One* 8, 1-10.
- Martins, F.B., Streck, N.A., Silva, J.C., Morais, W.W., Susin, F., Navroski, M.C., Vivian, M.A., 2008. Deficiência hídrica no solo e seu efeito sobre transpiração, crescimento e desenvolvimento de mudas de duas espécies de eucalipto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* 32, 1297-1306.

Martins, R.M., 2013. Amendoim: o mercado brasileiro no período de 2000 a 2011. O agronegócio do amendoim no Brasil. Embrapa 2, 21-43.

McQueen-Mason, S., Cosgrove, D.J., 1994. Disruption of hydrogen bonding between plant cell wall polymers by proteins that induce wall extension. Proceedings of the National Academy of Sciences 91, 6574-6578.

McQueen-Mason, S., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1992. Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. The Plant Cell 4, 1425-1433.

Michael, A.J., 1996. A cDNA from pea petals with sequence similarity to pollen allergen, cytokinin-induced and genetic tumour-specific genes: identification of a new family of related sequences. Plant Molecular Biology 30, 219-224.

Mitra, J., 2001. Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants. Current Science 80, 758-763.

Miyamoto, K., Ueda, J., Takeda, S., Ida, K., Hoson, T., Masuda, Y., Kamisaka, S., 1994. Light-induced increase in the contents of ferulic and diferulic acids in cell walls of *Avena coleoptiles*: its relationship to growth inhibition by light. Physiologia Plantarum 92, 350-355.

Moore, J.P., Vicré-Gibouin, M., Farrant, J.M., Driouich, A., 2008. Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. Physiologia Plantarum 134, 237-245.

Moretzsohn, M.C., Gouvea, E.G., Inglis, P.W., Leal-Bertioli, S.C.M., Valls, J.F.M., Bertioli, D.J., 2013. A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. Annals of Botany 111, 113-126.

Morgante, C.V., Guimarães, P.M., Martins, A.C.Q., Araújo, A.C.G., Leal-Bertioli, S.C.M., Bertioli, D.J., Brasileiro, A.C.M., 2011. Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. Biomed Central Research Notes 4, 1-11.

Munns, R., James, R.A., Sirault, X.R.R., Furbank, R.T., Jones, H.G., 2010. New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. Journal of Experimental Botany 61, 3499-3507.

Nogueira, R.J.M.C., Távora, F.J.A.F., Albuquerque, M.B., Nascimento, H.H.C., Santos, R.C., 2013. Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea* L.). O agronegócio do amendoim. Embrapa 2, 73-113.

Ogasawara, S., Shimada, N., Kawata, T., 2009. Role of an expansin-like molecule in *Dictyostelium* morphogenesis and regulation of its gene expression by the signal

transducer and activator of transcription protein Dd-STATA. *Development, Growth & Differentiation* 51, 109-122.

Olarte-Lozano, M., Mendoza-Núñez, M.A., Pastor, N., Segovia, L., Folch-Mallol, J., Martínez-Anaya, C., 2014. PcEx11 a novel acid expansin-like protein from the plant pathogen *Pectobacterium carotovorum*, binds cell walls differently to BsEXLX1. *PLoS One* 9, 1-8.

Ouyang, K.X., Liu, M.Q., Pian, R.Q., Liu, S.S., Chen, X.Y., 2012. Isolation and analysis of  $\alpha$ -expansin genes in the tree *Anthocephalus chinensis* (Rubiaceae). *Genetics and Molecular Research* 12, 1061-1073.

Painawadee, M., Jogloy, S., Kesmala, T., Akkasaeng, C., Patanothai, A., 2009. Identification of traits related to drought resistance in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Asian Journal of Plant Sciences* 8, 120-128.

Pande, S., Rao, J.N., 2001. Resistance of wild *Arachis* species to late leaf spot and rust in greenhouse trials. *Plant Disease* 85, 851-855.

Paque, S., Mouille, G., Grandont, L., Alabadí, D., Gaertner, C., Goyallon, A., Muller, P., Primard-Brisset, C., Sormani, R., Blázquez, M.A., 2014. Auxin binding protein links cell wall remodeling, auxin signaling, and cell expansion in Arabidopsis. *The Plant Cell* 26, 280-295.

Pereira, L.S., Cordery, I., Iacovides, I., 2009. Coping with water scarcity: Addressing the challenges. *Springer Science & Business Media*, 1 278-279.

Pien, S., Wyrzykowska, J., McQueen-Mason, S., Smart, C., Fleming, A., 2001. Local expression of expansin induces the entire process of leaf development and modifies leaf shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98, 11812-11817.

Popper, Z.A., 2008. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology* 11, 286-292.

Price, A.H., Cairns, J.E., Horton, P., Jones, H.G., Griffiths, H., 2002. Linking drought-resistance mechanisms to drought avoidance in upland rice using a QTL approach: progress and new opportunities to integrate stomatal and mesophyll responses. *Journal of Experimental Botany* 53, 989-1004.

Qin, L., Kudla, U., Roze, E.H.A., Goverse, A., Popeijus, H., Nieuwland, J., Overmars, H., Jones, J.T., Schots, A., Smant, G., 2004. Plant degradation: a nematode expansin acting on plants. *Nature* 427, 30-30.

Rakocevic, M., Neumaier, N., Oliveira, G.M., Nepomuceno, A.L., Farias, J.R.B., 2011. Respostas heliotrópicas de cultivares de soja em três estádios fenológicos e dois regimes hídricos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 45, 661-670.

Rao, N.K., Reddy, L.J., Bramel, P.J., 2003. Potential of wild species for genetic enhancement of some semi-arid food crops. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50, 707-721.

Ray, J.D., Sinclair, T.R., 1997. Stomatal closure of maize hybrids in response to drying soil. *Crop Science* 37, 803-807.

Reddy, T.Y., Reddy, V.R., Anbumozhi, V., 2003. Physiological responses of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) to drought stress and its amelioration: a critical review. *Plant Growth Regulation* 41, 75-88.

Rio, D.C., Ares, M., Hannon, G.J., Nilsen, T.W., 2010. Removal of DNA from RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*.

Ritchie, J.T., Burnett, E., Henderson, R.C., 1972. Dryland evaporative flux in a subhumid climate: III. Soil water influence. *Agronomy Journal* 64, 168-173.

Robledo, G., Seijo, G., 2008. Characterization of the *Arachis* (Leguminosae) D genome using fluorescence in situ hybridization (FISH) chromosome markers and total genome DNA hybridization. *Genetics and Molecular Biology* 31, 717-724.

Robledo, G., Seijo, G., 2010. Species relationships among the wild B genome of *Arachis* species (section *Arachis*) based on FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection: a new proposal for genome arrangement. *Theoretical and Applied Genetics* 121, 1033-1046.

Roeck, A., Sila, D.N., Duvetter, T., Van Loey, A., Hendrickx, M., 2008. Effect of high pressure/high temperature processing on cell wall pectic substances in relation to firmness of carrot tissue. *Food Chemistry* 107, 1225-1235.

Rose, J.K.C., Lee, H.H., Bennett, A.B., 1997. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94, 5955-5960.

Saitou, N., Imanishi, T., 1989. Relative efficiencies of the Fitch-Margoliash, maximum-parsimony, maximum-likelihood, minimum-evolution, and neighbor-joining methods of phylogenetic tree construction in obtaining the correct tree. *Molecular Biology and Evolution* 6, 514-525.

Saloheimo, M., Paloheimo, M., Hakola, S., Pere, J., Swanson, B., Nyssönen, E., Bhatia, A., Ward, M., Penttilä, M., 2002. Swollenin, a *Trichoderma reesei* protein with sequence similarity to the plant expansins, exhibits disruption activity on cellulosic materials. *European Journal of Biochemistry* 269, 4202-4211.

Sampedro, J., Carey, R.E., Cosgrove, D.J., 2006. Genome histories clarify evolution of the expansin superfamily: new insights from the poplar genome and pine ESTs. *Journal of Plant Research* 119, 11-21.

Sampedro, J., Cosgrove, D.J., 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* 6, 242.241-242.211.

Sampedro, J., Lee, Y., Carey, R.E., Pamphilis, C., Cosgrove, D.J., 2005. Use of genomic history to improve phylogeny and understanding of births and deaths in a gene family. *The Plant Journal* 44, 409-419.

Santiago, A.D., Rosseto, R., [s. d.]. Cana-de-açúcar. Rotação e reforma. Embrapa. In: [http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeacucar/arvore/CONTAG01\\_75\\_22122006154841.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/canadeacucar/arvore/CONTAG01_75_22122006154841.html)

Santos, J.F., Godoy, I.J., Michelotto, M.D., Fávero, A.P., 2013. Resistência à mancha preta e qualidade agrônômica de plantas RC1F2 de cruzamentos do híbrido anfidiplóide (*Arachis ipaensis* x *A. duranensis*) com o amendoim cultivado (*A. hypogaea*). *Bioscience Journal* 29, 280-287.

Santos, R.F., Carlesso, R., 1998. Déficit hídrico e os processos morfológico e fisiológico das plantas. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 2, 287-294.

Scarpellini, J.R., Nakamura, G., 2002. Controle do tripses *Enneothrips flavens* (Moulton, 1941)(Thysanoptera: Thripidae) e efeito na produtividade do amendoim. *Arquivos do Instituto Biológico* 69, 85-88.

Scarpin, L.J., Mundo, M., 2013. Dificuldade do produtor de amendoim em implantar o sistema de rotação de cultura com a cana-de-açúcar em áreas de usinas. *Simpósio Nacional de Tecnologia em Agronegócio, Ourinhos/SP*, pp. 1-3.

Schaffer, C.C., 2012. Mapeamento espacial e modelagem da distribuição potencial do gênero *Arachis* (Fabaceae) no Brasil e análise da ocorrência em Unidades de Conservação. Departamento de Botânica. Universidade de Brasília, p. 160.

Schipper, O., Schaefer, D., Reski, R., Fleming, A., 2002. Expansins in the bryophyte *Physcomitrella patens*. *Plant Molecular Biology* 50, 789-802.

Seijo, G., Lavia, G.I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D., Moscone, E.A., 2004. Physical mapping of the 5S and 18S–25S rRNA genes by FISH as evidence that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid progenitors of *A. hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 91, 1294-1303.

Seijo, G., Lavia, G.I., Fernández, A., Krapovickas, A., Ducasse, D.A., Bertioli, D.J., Moscone, E.A., 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis*



*hypogaea*, Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. American Journal of Botany 94, 1963-1971.

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K., 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. The Plant Cell 13, 61-72.

Shcherban, T.Y., Shi, J., Durachko, D.M., Gultinan, M.J., McQueen-Mason, S.J., Shieh, M., Cosgrove, D.J., 1995. Molecular cloning and sequence analysis of *expansins-a* highly conserved, multigene family of proteins that mediate cell wall extension in plants. Proceedings of the National Academy of Sciences 92, 9245-9249.

Silveira, C.E.S., Amaral, L.I.V., 2000. Parede celular vegetal. Universa 1, 65-100.

Sinclair, T.R., Ludlow, M.M., 1986. Influence of soil water supply on the plant water balance of four tropical grain legumes. Functional Plant Biology 13, 329-341.

Souza, A.T., Streck, N.A., Heldwein, A.B., Bisognin, D.A., Winck, J.E.M., Rocha, T.S.M., Zanon, A.J., 2014. Transpiration and leaf growth of potato clones in response to soil water deficit. Scientia Agricola 71, 96-104.

Suzuki, H., Vuong, T.V., Gong, Y., Chan, K., Ho, C., Master, E.R., Kondo, A., 2014. Sequence diversity and gene expression analyses of expansin-related proteins in the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete carnosae*. Fungal Genetics and Biology 72, 115-123.

Taiz, L., Zeiger, E., 2006. Paredes celulares: estrutura, biogênese e expansão. Artmed Fisiologia Vegetal. 5, 339-363.

Tate, E.L., Gustard, A., 2000. Drought definition: a hydrological perspective. Springer.

Thompson, M.W., McInnes, R.R., Willard, H.F., 1993. Genética médica 5. ed. Guanabara Koogan, pp. 30-40.

Tuller, T., Carmi, A., Vestsigian, K., Navon, S., Dorfan, Y., Zaborske, J., Pan, T., Dahan, O., Furman, I., Pilpel, Y., 2010. An evolutionarily conserved mechanism for controlling the efficiency of protein translation. Cell 141, 344-354.

Uzunian, A., Birner, E., 2008. A célula: membrana e permeabilidade Biologia. Harbra 1, 71-87.

Valls, J.F.M., 2005. Recursos genéticos de *Arachis*: avanços no conhecimento botânico e a situação atual de conservação e uso. Agrociencia 9, 123-132.

Van Pelt-Verkuil, E., Van Belkum, A., Hays, J.P., 2008. Principles and technical aspects of PCR amplification. Springer p. 160.

- VanGuilder, H.D., Vrana, K.E., Freeman, W.M., 2008. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* 44, 619-626.
- Vannerum, K., Huysman, M.J.J., Rycke, R., Vuylsteke, M., Leliaert, F., Pollier, J., Lütz-Meindl, U., Gillard, J., De Veylder, L., Goossens, A., 2011. Transcriptional analysis of cell growth and morphogenesis in the unicellular green alga *Micrasterias* (Streptophyta), with emphasis on the role of expansin. *Biomed Central Plant Biology* 11, 1-17.
- Veiga, R.F.A., Queiroz-Voltan, R.B., Valls, J.F.M., Favero, A.P., Barbosa, W., 2001. Caracterização morfológica de acessos de germoplasma de quatro espécies brasileiras de amendoim-silvestre. *Bragantia* 60, 167-176.
- Wojciechowski, M. F.; Lavin, M.; Sanderson, M. J. 2004. A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid matK gene resolves many well supported subclades within the family. *American Journal of Botany* 91, 1846-1862
- Wolters, P., Powell, W., Lagudah, E., Snape, J., Henderson, K., 2000. Nucleotide diversity at homoeologous loci in wheat. *Plant and Animal Genome Conference* 1, 103-103.
- Wu, Y., Meeley, R.B., Cosgrove, D.J., 2001. Analysis and expression of the  $\alpha$ -*expansin* and  $\beta$ -*expansin* gene families in maize. *Plant Physiology* 126, 222-232.
- Wu, Y., Sharp, R.E., Durachko, D.M., Cosgrove, D.J., 1996. Growth maintenance of the maize primary root at low water potentials involves increases in cell-wall extension properties, expansin activity, and wall susceptibility to expansins. *Plant Physiology* 111, 765-772.
- Xing, S.C., Li, F., Guo, Q.F., Liu, D.R., Zhao, X.X., Wang, W., 2009. The involvement of an expansin gene *TaEXPB23* from wheat in regulating plant cell growth. *Biologia Plantarum* 53, 429-434.
- Xu, B., Janson, J.C., Sellos, D., 2001. Cloning and sequencing of a molluscan endo-beta-1,4-glucanase gene from the blue mussel, *Mytilus edulis*. *European Journal of Biochemistry* 268, 3718-3727.
- Xu, P., Cai, X., Wang, Y., Xing, L., Chen, Q., Xiang, C., 2014. HDG11 upregulates cell-wall-loosening protein genes to promote root elongation in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 1, 1-11.
- Yan, A., Wu, M., Yan, L., Hu, R., Ali, I., Gan, Y., 2014. AtEXP2 is involved in seed germination and abiotic stress response in Arabidopsis. *PloS One* 9, 1-10.

Yennawar, N.H., Li, L., Dudzinski, D.M., Tabuchi, A., Cosgrove, D.J., 2006. Crystal structure and activities of EXPB1 (*Zea m 1*), a  $\beta$ -expansin and group-1 pollen allergen from maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 14664-14671.

Zhang, N., Hasenstein, K.H., 2000. Distribution of expansins in graviresponding maize roots. *Plant and Cell Physiology* 41, 1305-1312.

Zhao, M., Han, Y., Feng, Y., Li, F., Wang, W., 2012. Expansins are involved in cell growth mediated by abscisic acid and indole-3-acetic acid under drought stress in wheat. *Plant Cell Reports* 31, 671-685.

Zhao, S., Fernald, R.D., 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *Journal of Computational Biology* 12, 1047-1064.

Zhu, Y., Wu, N., Song, W., Yin, G., Qin, Y., Yan, Y., Hu, Y., 2014. Soybean (*Glycine max*) expansin gene superfamily origins: segmental and tandem duplication events followed by divergent selection among subfamilies. *Biome Central Plant Biology* 14, 1-19.

## ANEXOS

---

Anexo 1: Tabela com os iniciadores utilizados.

<b>Iniciador</b>	<b>“Forward”</b>	<b>“Reverso”</b>
<b><i>UBI2</i></b>	AAGCCGAAGAAGATCAAGCAC	GGTTAGCCATGAAGGTTCCAG
<b><i>ACT_1</i></b>	TGGTCTCGGTTTCCTGAGTT	AATACCACTCCAAAGCAAACG
<b><i>4AD2</i></b>	CGCAGCTACAACCCACACTA	AGTGTTTGATGTTGAGAACCCA
<b><i>EXP464*</i></b>	GCTATGGCGGAATGGATCT	GGTTCCAAGTGACTGGCAGT
<b><i>EXP</i></b>	AGTGCTTCATCTCAAAATGGAAC	TGATACTCAAATCCAGCTTGAATAGA

\* O iniciador “forward” para EXP464 foi denominado EXPuniF.

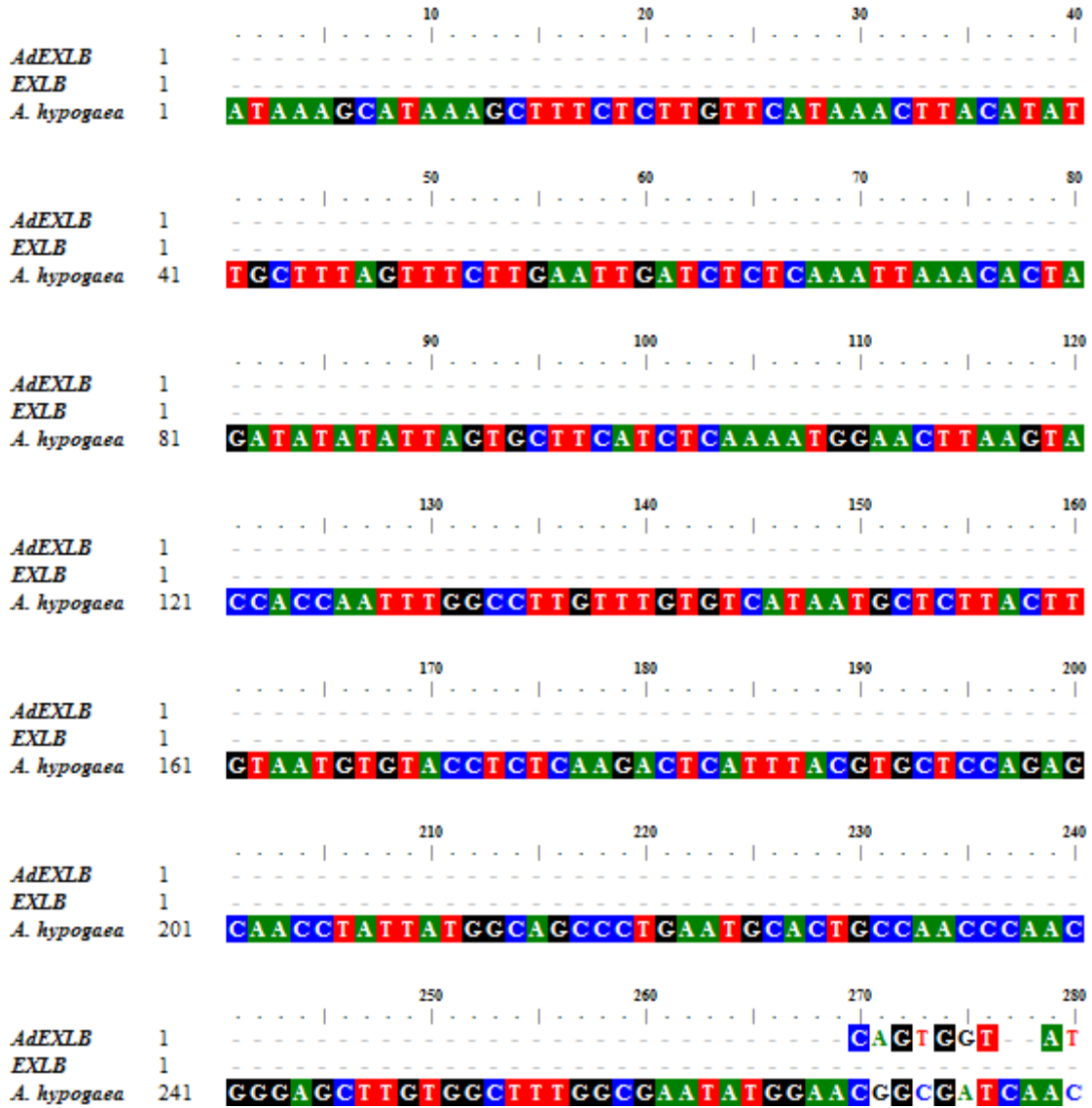
Anexo 2: Sequência putativa da *EXLB* (*AdEXLB*) de *A. duranensis* (848 pb) obtida pelo estudo de Brasileiro et al. (2015) com a localização do par de iniciadores EXPuniF e EXP464R realçados em amarelo.

CAGTGGTATCAACGCAGAGTGGCAGGCGTGTCTTG**GCTATGGCGGAATGGATCT**GGCT  
GTGGTGCATGCTATCAAGTTAGGTGCAAAATAGCAGAATACTGCGATGACTATGGAGC  
ATATGTAGTGGTAACAGACTTCGGCGTGGGAGACAGAACCGACTTCATTATGAGTCCA  
CGTGCTTATTCAAGATTGGCCAAGAACGAAGATGCATCTGCAGAGCTTTTTCAAATAC  
GGTGTGGTGGACGTAGAATACAAGAGGGTACCATGCAGATACGGTGGCTATAACATCA  
TAGTCAAGGTGAATGAGCGCAGCTACAACCCACACTACTTAGCCATTGTAACCTCTCTA  
TGTTGGTGGAACACAAGACATAACTGCCGTTTCTGAGTTCTGGCAGGAAGATTGCAAAGAA  
TGGAGGCCAATGCGAAGGGCGTTTGGGACAGTGTGATGTTGAGAACCCACCAAGGG  
GTGACATAAAGTTAA**GGTTCCAAGTGAAGTGGCAGT**GCAGGGGTTTATTGGGTAGAGTC  
CAAGACCTTTATCACCAGTGATTGGAAGGCTGGAGCATCTTATGATACTCAAATCCAG  
CTTGAATAGAAAAATAAACAAATAAATAAATGTACTTGCTCACTAGTAATTTATTGTC  
CACTCTATGAATGTTTCTGTGAGCTCTCTCTATGTTTTAGTGCTCTTTGTATTTGTGA  
CTAGACTAAGATTATGGGCATTCATCTACTTGTCTGGAATTTGGATGAATAACACTA  
TAAAAAGCACCTAGCTGTTCTTGATTAGTATTTTGCAGCCAGTGGCATTAGAAATTCC  
CTGATACTCCATATACTTAATATATCACGCTTATCT

Anexo 3: Sequência codificadora do gene *EXLB* (853 pb) de *A. hypogaea* (ID: 225598755) utilizada nos alinhamentos com o cDNA da *AdEXLB* e o cDNA da *EXLB* de *A. duranensis* obtido por meio do ensaio de déficit hídrico gradual.

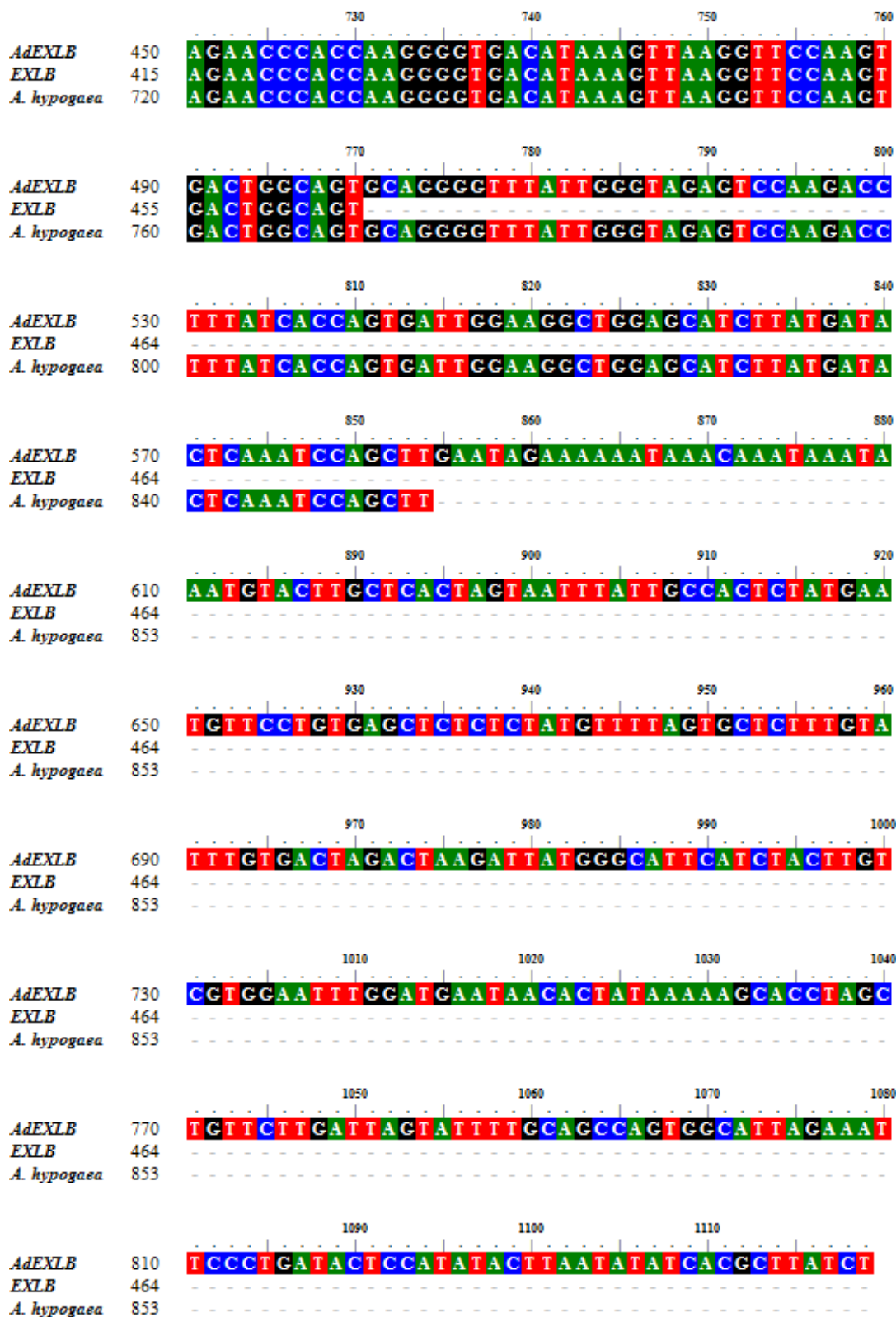
```
ATAAAGCATAAAGCTTTCTCTTGTTTCATAAACTTACATATTGCTTTAGTTTCTTGAAT
TGATCTCTCAAATTAACACTAGATATATATTAGTGCTTCATCTCAAAATGGAACTTA
AGTACCACCAATTTGGCCTTGTTTGTGTCATAATGCTCTTACTTGTAATGTGTACCTC
TCAAGACTCATTTACGTGCTCCAGAGCAACCTATTATGGCAGCCCTGAATGCACTGCC
AACCCAACGGGAGCTTGTGGCTTTGGCGAATATGGAACGGCGATCAACGATGGCAGCG
TGGCAGGCGTGTCTTGGCTATGGCGGAATGGATCTGGCTGTGGTGCATGCTATCAAGT
TAGGTGCAAAATAGCAGAATACTGCGATGACTATGGAGCATATGTAGTGGTAACAGAC
TTCGGCGTGGGAGACAGAACCGACTTCATTATGAGTCCACGTGCTTATTCAAGATTGG
CCAAGGACGAAGATGCATCTGCAGAGCTTTTCAAGTACGGTGTGGTGGACGTAGAATA
CAAGAGGGTACCATGTAGATACGGTGGCTATAACATCATAGTCAAGGTGAATGAGCGC
AGCTACAACCCACACTACTTAGCCATTGTA ACTCTCTATGTTGGTGGAACACAAGACA
TAACTGCCGTTTCAGTTCTGGCAGGAAGATTGCAAAGAATGGAGGCCAATGCGAAGGGC
GTTTGGGACAGTGTTTGATGTTGAGAACCACCAAGGGGTGACATAAAGTTAAGGTTT
CAAGTGA CTGGCAGTGCAGGGGTTTATTGGGTAGAGTCCAAGACCTTTATCACCAGTG
ATTGGAAGGCTGGAGCATCTTATGATACTCAAATCCAGCTT
```

Anexo 4: Alinhamento entre as sequências nucleotídicas do gene *AdEXLB*, o cDNA da *EXLB* de *A. duranensis* obtido neste estudo e o cDNA de *A. hypogaea* (ID: 225598755), com a localização do par de iniciadores EXPuniF e EXP464R.



			330	340	350	360
<i>AdEXLB</i>	50		G A T C T G G C T G T G G T G C A T G C T A T C A A G T T A G G T G C A A A A T			
<i>EXLB</i>	15		G A T C T G G C T G T G G T G C A T G C T A T C A A G T T A G G T G C A A A A T			
<i>A. hypogaea</i>	321		G A T C T G G C T G T G G T G C A T G C T A T C A A G T T A G G T G C A A A A T			
			370	380	390	400
<i>AdEXLB</i>	90		A G C A G A A T A C T G C G A T G A C T A T G G A G C A T A T G T A G T G G T A			
<i>EXLB</i>	55		A G C A G A A T A C T G C G A T G A C T A T G G A G C A T A T G T A G T G G T A			
<i>A. hypogaea</i>	361		A G C A G A A T A C T G C G A T G A C T A T G G A G C A T A T G T A G T G G T A			
			410	420	430	440
<i>AdEXLB</i>	130		A C A G A C T T C G G C G T G G G A G A C A G A A C C G A C T T C A T T A T G A			
<i>EXLB</i>	95		A C A G A C T T C G G C G T G G G A G A C A G A A C C G A C T T C A T T A T G A			
<i>A. hypogaea</i>	401		A C A G A C T T C G G C G T G G G A G A C A G A A C C G A C T T C A T T A T G A			
			450	460	470	480
<i>AdEXLB</i>	170		G T C C A C G T G C T T A T T C A A G A T T G C C C A A G A A C G A A G A T G C			
<i>EXLB</i>	135		G T C C A C G T G C T T A T T C A A G A T T G C C C A A G A A C G A A G A T G C			
<i>A. hypogaea</i>	441		G T C C A C G T G C T T A T T C A A G A T T G C C C A A G A A C G A A G A T G C			
			490	500	510	520
<i>AdEXLB</i>	210		A T C T G C A G A G C T T T T T C A A A T A C G G T G T G G T G G A C G T A G A			
<i>EXLB</i>	175		A T C T G C A G A G C T T T T T C A A A T A C G G T G T G G T G G A C G T A G A			
<i>A. hypogaea</i>	481		A T C T G C A G A G C T T T T T C A A A T A C G G T G T G G T G G A C G T A G A			
			530	540	550	560
<i>AdEXLB</i>	250		A T A C A A G A G G G T A C C A T G C A G A T A C G G T G G C T A T A A C A T C			
<i>EXLB</i>	215		A T A C A A G A G G G T A C C A T G C A G A T A C G G T G G C T A T A A C A T C			
<i>A. hypogaea</i>	520		A T A C A A G A G G G T A C C A T G C A G A T A C G G T G G C T A T A A C A T C			
			590	600	610	620
<i>AdEXLB</i>	290		A T A G T C A A G G T G A A T G A G C G C A G C T A C A A C C C A C A C T A C T			
<i>EXLB</i>	255		A T A G T C A A G G T G A A T G A G C G C A G C T A C A A C C C A C A C T A C T			
<i>A. hypogaea</i>	560		A T A G T C A A G G T G A A T G A G C G C A G C T A C A A C C C A C A C T A C T			
			610	620	630	640
<i>AdEXLB</i>	330		T A G C C A T T G T A A C T C T C T A T G T T G G T G G A A C A C A A G A C A T			
<i>EXLB</i>	295		T A G C C A T T G T A A C T C T C T A T G T T G G T G G A A C A C A A G A C A T			
<i>A. hypogaea</i>	600		T A G C C A T T G T A A C T C T C T A T G T T G G T G G A A C A C A A G A C A T			
			650	660	670	680
<i>AdEXLB</i>	370		A A C T G C C G T T C A G T T C T G G C A G G A A G A T T G C A A A G A A T G G			
<i>EXLB</i>	335		A A C T G C C G T T C A G T T C T G G C A G G A A G A T T G C A A A G A A T G G			
<i>A. hypogaea</i>	640		A A C T G C C G T T C A G T T C T G G C A G G A A G A T T G C A A A G A A T G G			
			690	700	710	720
<i>AdEXLB</i>	410		A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A G T G T T T G A T G T T G			
<i>EXLB</i>	375		A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A G T G T T T G A T G T T G			
<i>A. hypogaea</i>	680		A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A G T G T T T G A T G T T G			





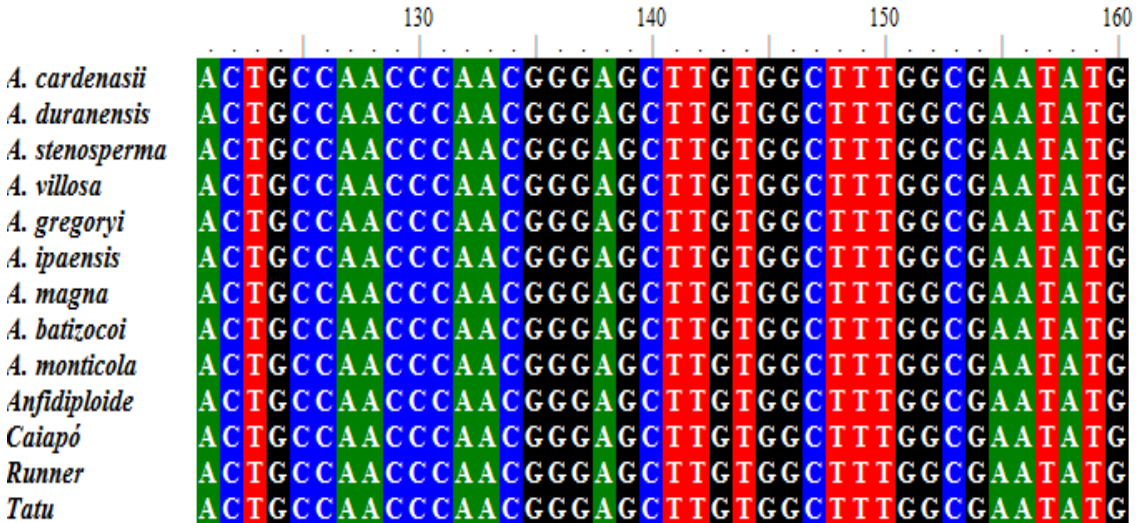
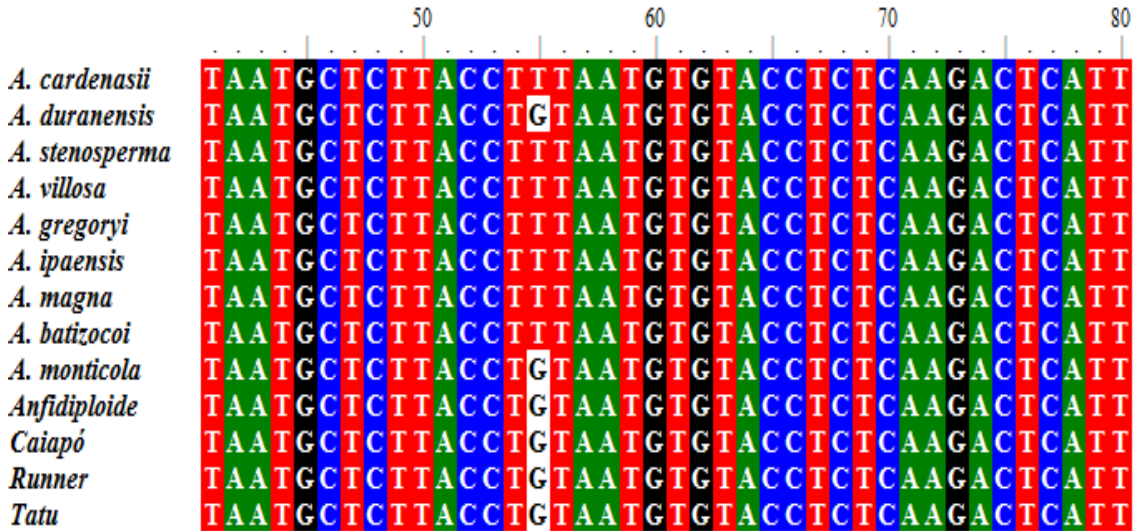
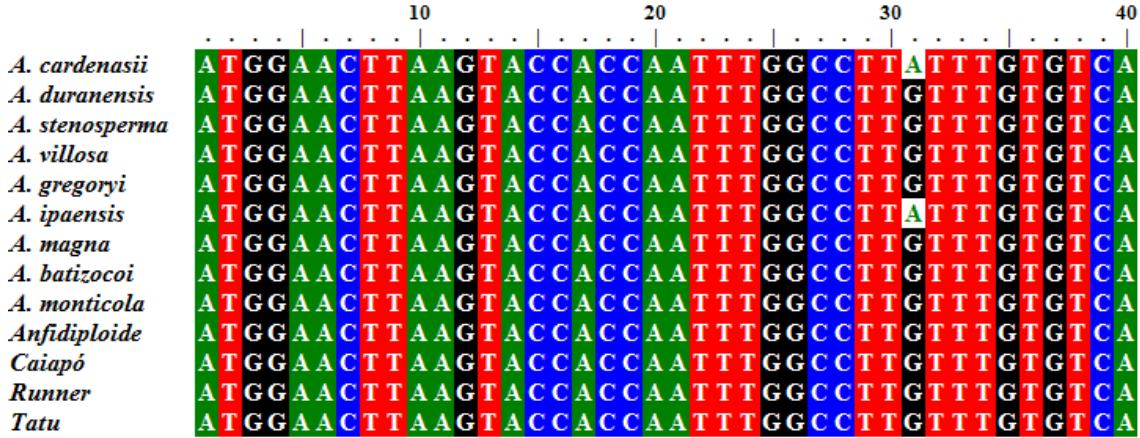
Anexo 5: Sequência genômica completa da *EXLB* (1.831 pb) de *A. duranensis* obtida por meio do alinhamento do anexo 5. A localização do par de iniciadores EXPuniF e EXP464R está em realce amarelo e do par de iniciadores EXPF e EXPR em realce verde. Em negrito está a localização dos códons de iniciação (ATG) e terminação (TAG).

ATAAAGCATAAAGCTTTCTCTTGTTTCATATACTTACATATATGCTTTAGTTTCTTGAA  
TTGATCCTCAAATTAACACTAGATATATATT**AGTGCTTCATCTCAAAATGGA**ACTTA  
AGTACCACCAATTTGGCCTTATTTGTGTCATAATGCTCTTACCTTTAATGTGTACCTC  
TCAAGACTCATTTACGTGCTCCAGAGCAACCTATTATGGCAGCCCTGAATGCACTGCC  
AACCCAAGTACGTGAAACTCTTCTATCCCTTAATGCATTTTCAGTCATGGATACTCT  
ACATTTTGAGAAATTTCAATTTTCTTCTTGTACTCTCTTTTGTAATATATAAAAGTACC  
TTTATCTTTGATAAAAAAGACAATTAATTCACCGTATCTTGTATATATCTATACTTAT  
TTTATCACTCTTAAATTCTGCTGTGGTCCCATTTTAACATTAGATTATGTTTAATATC  
CAATTTTCACTACTTTTAAATGTTAACATCACTCACTCAATATATCTATTAATACACA  
CACACACACACATGTCTTTTCCCATGTGCAATGAAACTATCATTTTCTGACTAGGAAT  
TAGGATATTTCATATTTGACACAACATAATGCATGATCTTGATGTTATGAAACAACAA  
TTATCTTCTAAGCAAAGAAGATTAGCTTGAGAACTTTACTTTTGGTGATGCATGCTCC  
TCCATTAAGATGCAACCAAAGACAAAAAGGTGCAACATGAAGGTGTTAATATTATTG  
CATAAGCAATGTTATATGAATTAATTTTTTCCCCTCTAAACCCCAAATAGCGGGAGC  
TTGTGGCTTTGGCGAATATGGAACGGCGATCAACGATGGCAGCGTGGCAGGCGTGTCT  
TG**GCTATGGCGGAATGGATCT**GGCTGTGGTGCATGCTATCAAGTAACACTTGCATTTG  
TTTAATGATGTTGTGTTTGCCATTCCATTCCATCATTGATTTATCAAATATAAATGGT  
GGTGAATCAGGTTAGGTGCAAATAGCAGAATACTGCGATGACTATGGAGCATATGTA  
GTGGTAACAGACTTCGGCGTGGGAGACAGAACCGACTTCATTATGAGTCCACGTGCTT  
ATTCAAGATTGGCCAAGAACGAAGCTGCATCTGTAGAGCTTTTCAAATACGGTGTGGT  
GGACGTAGAATACAAGAGGGTACCATGCAGATACGGTGGCTATAACATCATAGTCAAG  
GTGAATGAGCGCAGCTACAACCCACACTACTTAGCCATTGTAACCTCTCTATGTTGGTG  
GAACACAAGACATAACTGCCGTTTCAGTTCTGGCAGGTACTAATATGCACATGTATTCA  
TTTATTGATCAATAATTAGTTGCATATATTGGAGATTTAACTTGATTGATGGAGCAGG  
AAGATTGCAAAGAAATGGAGGCCAATGCGAAGGGCGTTTGGGACAGTGTTTGTGTTGA  
GAACCCACCAAGGGTGACATAAAGTTAA**GGTTCCAAGTGACTGGCAGT**GCAGGGGTT  
TATTGGGTAGAGTCCAAGACTTTTATCACCAGTGATTGGAAGGCTGGAGCATCTTAT**AG**  
**ATACTCAAATCCAGCTTGAATAGA**AAATATAAACAAATAAATAAATGTACTTGCTCAC  
TAGTAATTTATTGCCACTCTATGAATGTTCTGTGAGCTATCTCTATGTTTTAGTGCT  
AAGATTATGGGCATTCATCTACTTGTGCTGGAATTTGGATGAATAACACTAAAAAGCA  
CCTAGCTGTTCTTCTTTATTGTATTTTGCAGCCAATGGCATTAGAAATCCCTGATA  
CTCCATATACTTAATATATCCCCTTATCTGAT

Anexo 6: Sequência codificadora completa do gene *EXLB* de *A. duranensis* (753 pb), representante dos 13 genótipos da secção *Arachis* utilizados, com a localização dos iniciadores EXPF e EXPR realçados em amarelo. Em negrito está a localização dos códons de iniciação (ATG) e terminação (TAG).

**AGTGCTTCATCTCAAAAATGGAACT**TAAGTACCACCAATTTGGCCTTATTTGTGTCAT  
AATGCTCTTACCTTTAATGTGTACCTCTCAAGACTCATTTACGTGCTCCAGAGCAAC  
CTATTATGGCAGCCCTGAATGCACTGCCAACCCAACGGGAGCTTGTGGCTTTGGCGA  
ATATGGAACGGCGATCAACGATGGCAGCGTGGCAGGCGTGTCTTGGCTATGGCGGAA  
TGGATCTGGCTGTGGTGCATGCTATCAAGTTAGGTGCAAAATAGCAGAATACTGCCA  
TGACTATGGAGCATATGTAGTGGTAACAGACTTCGGCGTGGGAGACAGAACCGACTT  
CATTATGAGTCCACGTGCTTATTCAAGATTGGCCAAGAACGAAGCTGCATCTGTAGA  
GCTTTTCAAATACGGTGTGGTGGACGTAGAATACAAGAGGGTACCATGCAGATACGG  
TGGCTATAACATCATAGTCAAGGTGAATGAGCGCAGCTACAACCCACACTACTTAGC  
CATTGTAACCTCTCTATGTTGGTGGAAACACAAGACATAACTGCCGTTTCAGTTCTGGCA  
GGAAGATTGCAAAGAATGGAGGCCAATGCGAAGGGCGTTTGGGACAGTGTGTTGATGT  
TGAGAACCACCAAGGGGTGACATAAAGTTAAGGTTCCAAGTGAGTGGCAGTGCAGG  
GGTTTATTGGGTAGAGTCCAAGACTTTTATCACCAGTGATTGGAAGGCTGGAGCATC  
TTA**TGATACTCAAATCCAGCTTGAATAG**A

Anexo 7: Alinhamento da sequência codificadora (cDNA) dos 13 genótipos da secção *Arachis* utilizados neste estudo, por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit.



130 140 150 160

*A. cardenasii*  
*A. duranensis*  
*A. stenosperma*  
*A. villosa*  
*A. gregoryi*  
*A. ipaensis*  
*A. magna*  
*A. batizocoi*  
*A. monticola*  
Anfidiploide  
Caiapó  
Runner  
Tatu

ACTGCCAA C CCAACGGGAGC TTGTGGC TTTGGC GAATATG

170 180 190 200

*A. cardenasii*  
*A. duranensis*  
*A. stenosperma*  
*A. villosa*  
*A. gregoryi*  
*A. ipaensis*  
*A. magna*  
*A. batizocoi*  
*A. monticola*  
Anfidiploide  
Caiapó  
Runner  
Tatu

GAA C GGC GA TCAA C GATGG CAGCG TGG CAGGC GTGT CTTG

210 220 230 240

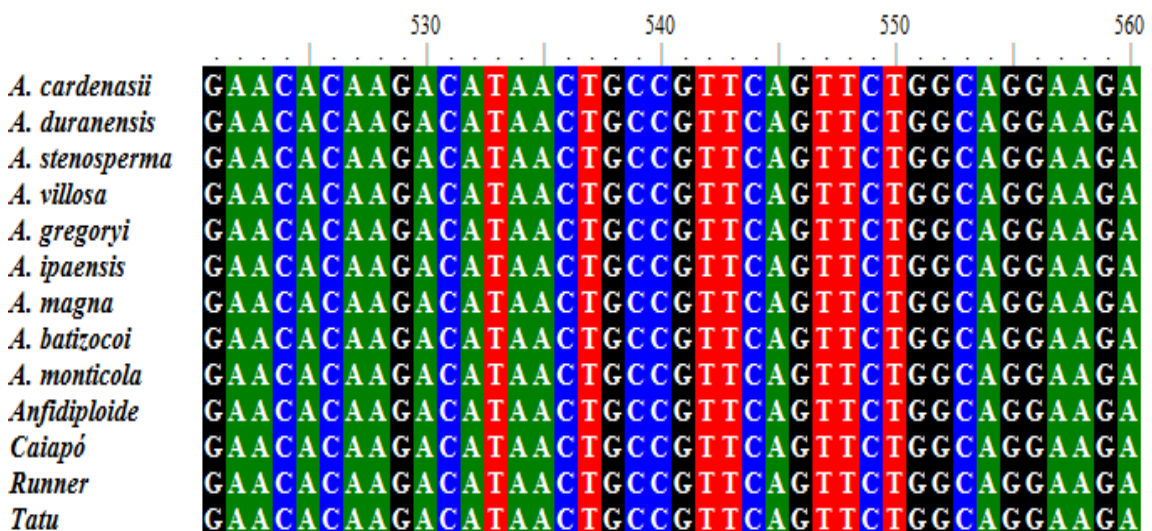
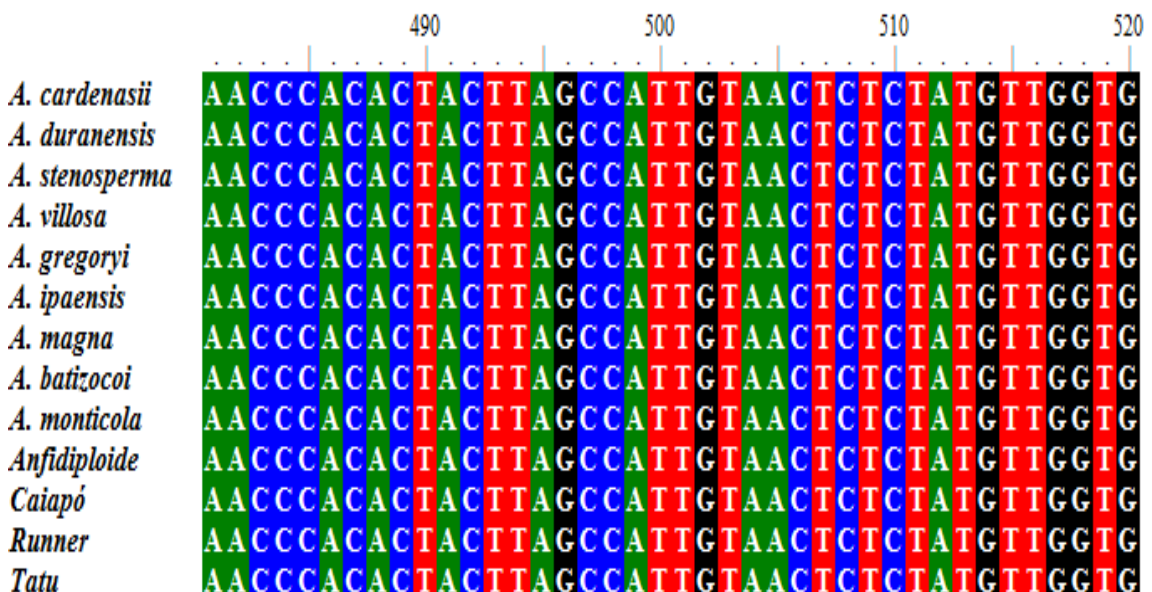
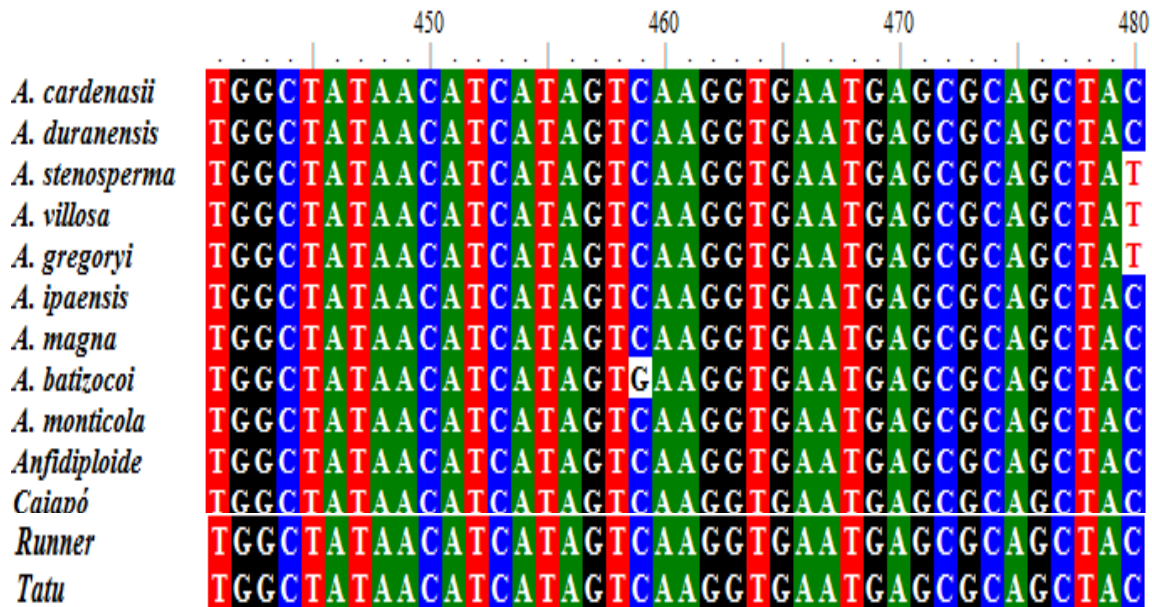
*A. cardenasii*  
*A. duranensis*  
*A. stenosperma*  
*A. villosa*  
*A. gregoryi*  
*A. ipaensis*  
*A. magna*  
*A. batizocoi*  
*A. monticola*  
Anfidiploide  
Caiapó  
Runner  
Tatu

GCTATGG C GGAATGGATCTGG C TGTGG TGCA TGC TATCAA

	290	300	310	320																																				
<i>A. cardenasii</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>A. duranensis</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>A. stenosperma</i>	C	A	T	A	T	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C	
<i>A. villosa</i>	C	A	T	A	T	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C	
<i>A. gregoryi</i>	C	A	T	A	T	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C	
<i>A. ipaensis</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>A. magna</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>A. batizocoi</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>A. monticola</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>Anfidiploide</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>Caiapó</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C
<i>Runner</i>	C	A	T	A	T	G	T	A	G	T	G	G	T	A	A	C	A	G	A	C	T	T	C	G	G	C	G	T	G	G	G	A	G	A	C	A	G	A	A	C

	330	340	350	360																																				
<i>A. cardenasii</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>A. duranensis</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>A. stenosperma</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	G
<i>A. villosa</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	G
<i>A. gregoryi</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	G
<i>A. ipaensis</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>A. magna</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	T	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>A. batizocoi</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>A. monticola</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>Anfidiploide</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>Caiapó</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>Runner</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C
<i>Tatu</i>	C	G	A	C	T	T	C	A	T	T	A	T	G	A	G	T	C	C	A	C	G	T	G	C	T	T	A	T	T	C	A	A	G	A	T	T	G	G	C	C

	370	380	390	400																																				
<i>cardenasii</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	C	T	G	C	A	T	C	T	G	T	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>duranensis</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>stenosperma</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	T	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>villosa</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	T	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>gregoryi</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	T	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>ipaensis</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	C	T	G	C	A	T	C	T	G	T	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>magna</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	C	T	G	C	A	T	C	T	G	T	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>batizocoi</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	C	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>monticola</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>nfidiploide</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>aiapó</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>unner</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G
<i>utu</i>	A	A	G	A	A	C	G	A	A	G	A	T	G	C	A	T	C	T	G	C	A	G	A	G	C	T	T	T	T	C	A	A	A	T	A	C	G	G	T	G

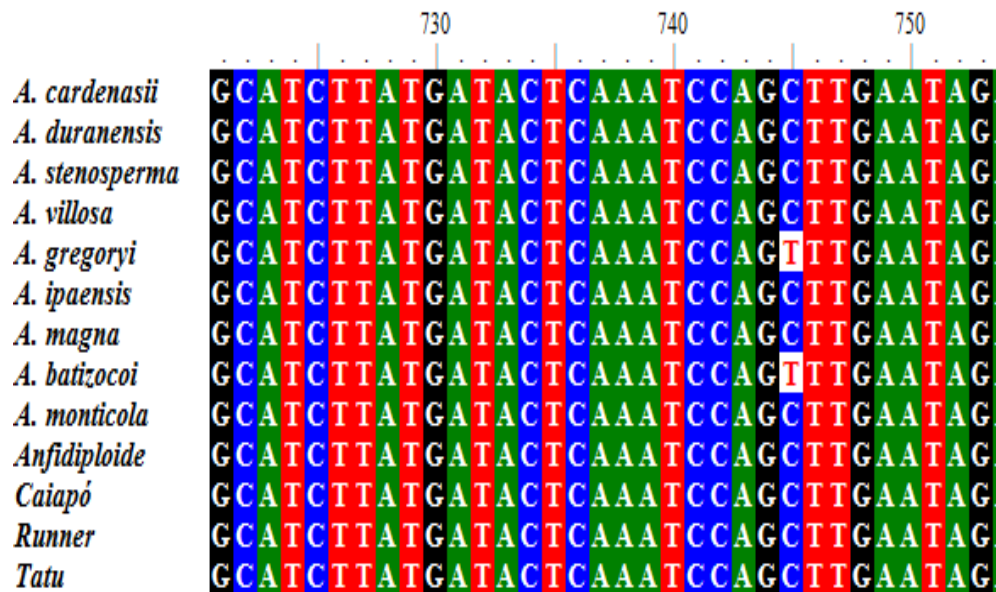
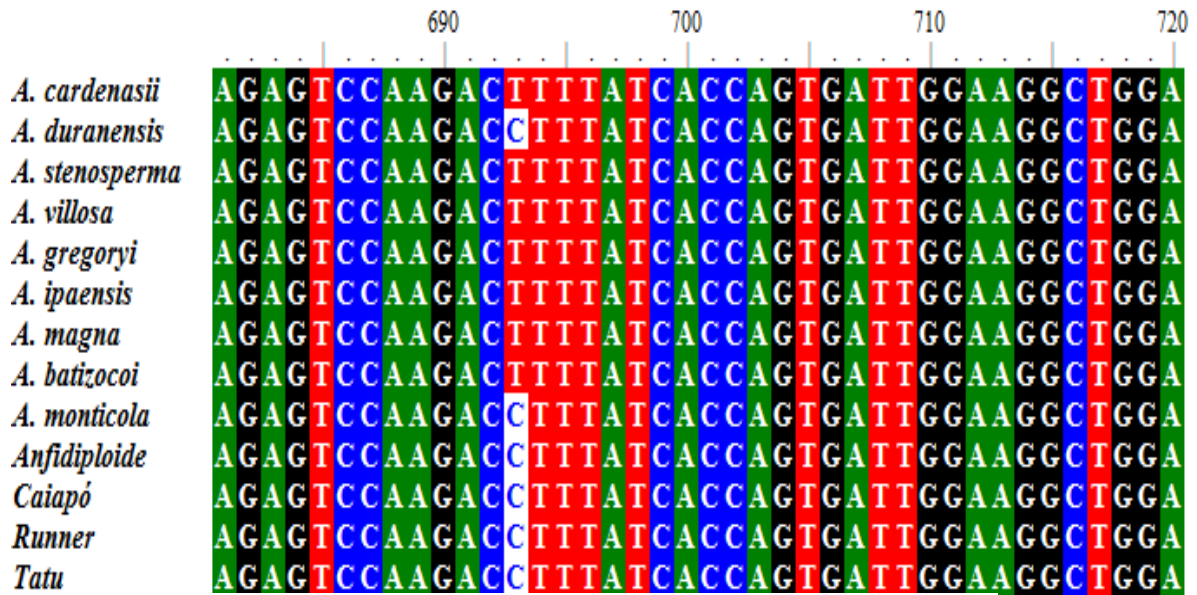


	570	580	590	600
<i>A. cardenasii</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. duranensis</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. stenosperma</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. villosa</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. gregoryi</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. ipaensis</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. magna</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. batizocoi</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>A. monticola</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>Anfidiploide</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>Caiapó</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>Runner</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			
<i>Tatu</i>	T T G C A A A G A A T G G A G G C C A A T G C G A A G G G C G T T T G G G A C A			

	610	620	630	640
<i>A. cardenasii</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. duranensis</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. stenosperma</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. villosa</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. gregoryi</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. ipaensis</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. magna</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. batizocoi</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>A. monticola</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>Anfidiploide</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>Caiapó</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>Runner</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			
<i>Tatu</i>	G T G T T T G A T G T T G A G A A C C A C C A A G G G G T G A C A T A A A G T			

	650	660	670	680
<i>A. cardenasii</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. duranensis</i>	T A A G G T T C C A A G T G A C T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. stenosperma</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. villosa</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. gregoryi</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. ipaensis</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. magna</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. batizocoi</i>	T A A G G T T C C A A G T G A G T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>A. monticola</i>	T A A G G T T C C A A G T G A C T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>Anfidiploide</i>	T A A G G T T C C A A G T G A C T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>Caiapó</i>	T A A G G T T C C A A G T G A C T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>Runner</i>	T A A G G T T C C A A G T G A C T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			
<i>Tatu</i>	T A A G G T T C C A A G T G A C T G G C A G T G C A G G G G T T T A T T G G G T			





Anexo 8: Alinhamento da sequência nucleotídica de gDNA de quatro genótipos da secção *Arachis*, utilizados neste estudo, por meio da ferramenta Clustaw acessado pelo programa BioEdit.

