



MARIANA DE LIMA SANTOS

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES
ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA (RGAS) EM *Elaeis* spp. E
AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Setaria viridis* A
ESTRESSE SALINO E DE FRIO**

**LAVRAS - MG
2017**

MARIANA DE LIMA SANTOS

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA
(RGAs) EM *Elaeis* spp. E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Setaria viridis* A
ESTRESSE SALINO E DE FRIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

Dr. Manoel Teixeira Souza Junior
Orientador
Dr. Alexandre Alonso Alves
Coorientador

**LAVRAS - MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Santos, Mariana de Lima.

Prospecção e caracterização de genes análogos de resistência
(RGAS) em *Elaeis spp.* e avaliação da tolerância de *Setaria viridis* a
estresse salino e de frio / Mariana de Lima Santos. - 2017.

115 p.

Orientador(a): Manoel Teixeira Souza Júnior.

Coorientador(a): Alexandre Alonso Alves.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Estresse biótico e abiótico. 2. Palma de óleo. 3. Planta modelo.
I. Souza Júnior, Manoel Teixeira. II. Alves, Alexandre Alonso. III.
Título.

MARIANA DE LIMA SANTOS

**PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA
(RGAs) EM *Elaeis* spp. E AVALIAÇÃO DA TOLERÂNCIA DE *Setaria viridis* A
ESTRESSE SALINO E DE FRIO**

**PROSPECTION AND CHARACTERIZATION OF DISEASE RESISTANCE GENE
ANALOGS (RGAs) IN *Elaeis* spp. AND EVALUATION OF *Setaria viridis*
TOLERANCE TO SALT AND COLD STRESS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, área de concentração em Biotecnologia Vegetal, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 24 de abril de 2017.

| | |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Dr. Manoel Teixeira Souza Júnior | EMBRAPA - Agroenergia |
| Dr. Carlos Antônio Ferreira de Sousa | EMBRAPA - Agroenergia |
| Dr. Robert Neil Gerard Miller | UNB |

Dr. Manoel Teixeira Souza Junior
Orientador
Dr. Alexandre Alonso Alves
Coorientador

LAVRAS - MG

2017

Aos verdadeiros amigos que encontrei e que deixaram mais leve e alegre essa jornada,

Ofereço!

Aos meus avós, Maria Lindaura e Euclides (in memoriam), pelo exemplo de vida,

Dedico!

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, em especial ao meu pai Almir, minha mãe Cleunice, minha avó Lindaura e ao meu irmão João, que mesmo à distância sempre me incentivavam a continuar diante da saudade e da solidão que enfrentamos ao ficar longe de casa.

Ao meu “noivorido”, Antonio Carlos, por ter me encorajado a sair de casa e buscar novas conquistas. Pelo amor, carinho e companheirismo. Obrigada por ser essa pessoa que me faz compreender, todos os dias, que a vida deve ser um eterno autoconhecimento para se viver feliz.

Ao meu amigo Calil, que foi mais que um colega de laboratório, não medindo esforços para me ajudar. Amigo de coração, que levarei sempre comigo, repleto de lembranças risonhas e felizes.

A minha amiga Joice, por ter partilhado comigo um lar “pós-graduando” me ensinando que a vida pede de nós um pouco mais de desafio e coragem. Pessoa mais engraçada e desaforada jamais conheci!

Aos meus “coleguinhas” Elias e Vivianny por estarem comigo no momento em que mais precisei. Casal que desejo toda felicidade e prosperidade na “ciência e no amor!”

A Karol, Ana Paula, Valquíria, Nelson, Letícia, Felipe, Rosana, André, Laíse, Júlio, Michelle, Fernando, Dr. Eduardo e ao Dr. Alexandre, por estarem sempre à disposição, seja neste ou em outros trabalhos que me fizeram chegar até aqui.

Ao meu orientador, Dr. Manoel Teixeira, pela orientação, confiança e “puxões de orelha” que muito contribuíram para minha formação.

Ao Dr. Robert, pela ajuda e orientação em todos os momentos em que precisei.

Ao Dr. Gabriel, que com sua didática incrível, me fez conhecer a bioinformática e o quão fascinante ele pode ser.

Ao Dr. Carlos pela generosidade e humildade com que sempre me tratou, me fazendo seguir mesmo diante dos erros e dificuldades.

À Universidade Federal de Lavras e ao programa de Biotecnologia Vegetal, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Muito obrigada!

“Vivendo e aprendendo a jogar
Vivendo e aprendendo a jogar
Nem sempre ganhando
Nem sempre perdendo
Mas, aprendendo a jogar! ”

Guilherme Arantes

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram determinar se a *Setaria viridis* (acesso A10.1) é uma planta tolerante ou sensível aos estresses de salinidade e às baixas temperaturas do ar, buscando subsidiar estudos relativos à utilização dessa espécie como planta-modelo para validar genes de tolerância a estes estresses; além disso, realizar uma abordagem baseada em homologia para identificação e caracterização de RGAS da família NBS-LRR nos genomas de *Elaeis* spp. Para o estresse salino em *Setaria viridis* foram realizados dois ensaios: de germinação em meio de cultura com 0, 30, 60, 90, 120, 150 mM de NaCl, mantendo as plântulas resultantes neste mesmo meio; e no 2º estágio de desenvolvimento em substrato com 0, 2, 4, 6, 8 e 10 g/dm³ de NaCl. Para o estresse de frio, plantas no 3º e 5º estágio de desenvolvimento foram submetidas a 10°C durante seis dias, posteriormente retornando à 25°C. Observou-se que a germinação foi pouco afetada pelo aumento da salinidade, enquanto que área foliar das plântulas e variáveis morfológicas das raízes foram significativamente afetadas. No 2º estágio de desenvolvimento houve redução no tamanho das plantas em função do aumento da salinidade, sendo que em 8 e 10 g/dm³, todas as plantas morreram. Apenas as plantas submetidas a 6 g/dm³ de NaCl sofreram redução na taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) e no índice de concentração de clorofila (ICC). Em todos os tratamentos houve redução nas taxas de condutância estomática (*gs*) e transpiração (*E*). A concentração interna de CO₂ (*Ci*) apresentou valores mais altos nas plantas-controle e menores nas plantas submetidas às menores quantidades de NaCl. Para o estresse de frio, as plantas sofreram redução em *A*, *gs* e *E* em ambos os estádios de desenvolvimento; com exceção da *Ci*, que praticamente dobrou. A massa da parte aérea obtida ao final do ciclo não diferiu entre os tratamentos e estádios, entretanto a produção de sementes no 5º estágio foi negativamente afetada pelo frio. Para a identificação e caracterização de RGA NBS-LRR em *Elaeis* spp. foram utilizadas sequências RGA NBS-LRR identificadas no genoma de *Elaeis guineensis* por meio de um perfil HMM aminocídico e sequências RGA NBS-LRR identificadas no *Draft* de *Elaeis oleifera* por meio de um perfil HMM nucleotídico. Adicionalmente, realizou-se a busca das Janelas Abertas de Leituras (ORF) para as sequências de *E.oleifera* pelo programa ORFFinder e identificação dos motivos dentro das ORFs por meio do programa InterPro. Posteriormente construiu-se uma árvore filogenética a fim de classificar as sequências RGAs NBS-LRR dentro de *Elaeis* spp. O perfil HMM nucleotídeo identificou 45 scaffolds dentro do genoma de *E. oleifera* dos quais 36 ORFs apresentaram domínios estruturais dentro da família NBS-LRR com homólogos em *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Glycine max* e *Arabidopsis thaliana*. A análise filogenética permitiu a classificação das sequências de *Elaeis spp* em sete grupos, sendo CNL, XNL, CN, N, C, TX e TN, além disso a identificação de seis ortólogos em *B distachyon*

Palavras chave: Estresse biótico e abiótico. Palma de óleo. Planta modelo. Validação de genes.

ABSTRACT

The objectives of this work were to determine if *Setaria viridis* (access A10.1) is a plant tolerant or sensitive to salinity stresses and low air temperatures, seeking subsidize studies on the use of this species as a model plant to validate tolerance genes to these stresses. In addition, to perform a homology-based approach for identification and characterization of RGA of the NBS-LRR family in the genomes of *Elaeis* spp. For saline stress in *Setaria viridis* two experiments were carried out: germination in culture medium with 0, 30, 60, 90, 120, 150 mM NaCl, maintaining the resulting seedlings in the same medium; and in the 2nd stage of substrate development with 0, 2, 4, 6, 8 and 10 g / dm³ of NaCl. For cold stress, plants in the 3rd and 5th development stages were submitted to 10°C for six days, then returning to 25°C. It was observed that the germination was little affected by the increase of salinity, while the foliar area of the seedlings and the morphological variables of the roots were significantly affected. In the 2nd stage of development there was a reduction in the size of plants due to the increase of salinity, and in 8 and 10 g/dm³, all the plants died. Only plants submitted to 6 g / dm³ of NaCl had a reduction in the net CO₂ assimilation rate (A) and the chlorophyll concentration index (ICC). In all treatments, there was a reduction in the rates of stomatal conductance (*g_s*) and transpiration (*E*). The internal CO₂ concentration (*C_i*) presented the higher values in the control plants and the lower in the plants submitted to the lower amounts of NaCl. For cold stress, the plants were reduced in A, *g_s* and *E* in both development stages; With the exception of *C_i*, which almost doubled. The aerial part mass obtained at the end of the cycle did not differ between the treatments and stages, however the seed production in the 5th stage was negatively affected by the cold. For the identification and characterization of RGA NBS-LRR in *Elaeis* spp. RBS NBS-LRR sequences identified in the *Elaeis guineensis* genome were used by means of an aminidic HMM profile and RBS NBS-LRR sequences identified in the *Elaeis* Draft. Olefin by means of a nucleotide HMM profile. In addition, the search of the Open Reading Frame (ORF) for the *E. oleifera* sequences by the ORFFinder program and identification of the reasons within the ORFs through the InterPro program. Posteriorly, a phylogenetic tree was constructed in order to classify the RGAs NBS-LRR sequences within *Elaeis* spp. The nucleotide HMM profile identified 45 scaffolds within the *E. oleifera* genome of which 36 ORFs showed structural domains within the NBS-LRR family with homologues in *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*. The phylogenetic analysis allowed the classification of the *Elaeis* spp sequences into seven distinct groups, being CNL, XNL, CN, N, C, TX and TN, besides the identification of six orthologs in *B distachyon*.

Keywords: Biotic and abiotic stress. Oil palm. Plant model. Gene validation

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| | CAPÍTULO 1 - Introdução Geral..... | 12 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2 | REFERENCIAL TEÓRICO..... | 14 |
| 2.1 | Biodiesel..... | 14 |
| 2.2 | Palma de óleo (<i>Elaeis</i> spp.)..... | 16 |
| 2.3 | <i>Setaria viridis</i>..... | 20 |
| 2.4 | Estresses abióticos..... | 22 |
| 2.4.1 | Salinidade..... | 24 |
| 2.4.2 | Frio..... | 26 |
| 2.5 | Estresses bióticos..... | 27 |
| 2.6 | Genes R da família NBS-LRR e Genes Análogos de Resistência (RGA).... | 32 |
| 2.7 | Genômica e Fenômica: prospecção e validação de genes..... | 37 |
| 3 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 41 |
| | REFERÊNCIAS | 42 |
| | CAPÍTULO 2 AVALIAÇÃO DE <i>Setaria viridis</i> (ACESSO A10.1) COMO POTENCIAL PLANTA MODELO PARA A VALIDAÇÃO DE GENES DE TOLERÂNCIA A ESTRESSES ABIÓTICOS..... | 53 |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 55 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 57 |
| 2.1 | Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de <i>Setaria viridis</i>..... | 57 |
| 2.2 | Efeito do estresse salino sobre plantas de <i>Setaria viridis</i> (acesso A10.1) no 2º estádio de desenvolvimento..... | 58 |
| 2.3 | Efeito do estresse por frio sobre plantas jovens e adultas de <i>Setaria viridis</i> | 60 |
| 2.4 | Avaliação das plantas submetidas aos estresses salino e frio e análises estatísticas dos dados..... | 61 |
| 3 | RESULTADOS..... | 64 |
| 3.1 | Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes, desenvolvimento inicial de plântulas e 2º estágio de desenvolvimento da <i>Setaria viridis</i> (acesso A10.1)..... | 64 |
| 3.2 | Efeito do estresse por frio sobre plantas jovens e adultas de <i>Setaria viridis</i> | 71 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 77 |
| 4.1 | Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes, desenvolvimento inicial e 2º estágio de desenvolvimento da <i>Setaria viridis</i> (acesso A10.1)... | 77 |
| 4.2 | Efeito do estresse por frio em plantas jovens e adultas de <i>Setaria viridis</i> (acesso A10.1)..... | 81 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 84 |
| | REFERÊNCIAS..... | 85 |
| | CAPÍTULO 3 ANÁLISE EM LARGA ESCALA DE GENES ANÁLOGOS DE RESISTÊNCIA (RGAS) CODIFICADORES DE DOMÍNIOS NBS NO GÊNERO <i>Elaeis</i> spp..... | 90 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 92 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 96 |
| 2.1 | Identificação de RGAs NBS- LRR no genoma de <i>Elaeis guineensis</i> | 96 |
| 2.2 | Identificação de RGAs NBS-LRR no genoma de <i>Elaeis oleifera</i> | 97 |
| 2.3 | Análise filogenética..... | 97 |
| 3 | RESULTADOS..... | 99 |
| 3.1 | NBS- LRR no genoma de <i>Elaeis guineensis</i> e <i>Elaeis oleifera</i> | 99 |
| 3.2 | Análises filogenéticas para <i>Elaeis</i> spp..... | 104 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 107 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 110 |
| | REFERÊNCIAS..... | 111 |

CAPÍTULO 1 - Introdução Geral

1 INTRODUÇÃO

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB) foi instituído pelo governo brasileiro em seis de dezembro de 2004, objetivando a inclusão deste biocombustível na matriz energética brasileira, mediante a produção e o uso do mesmo de forma sustentável, com inclusão social e geração de emprego e renda. Neste período de doze anos, desde a criação do PNPB, a soja foi a principal fonte de matéria prima, sendo responsável, em média, por aproximadamente 75% de toda a produção desde o início do Programa.

A forte dependência da soja para a produção de biodiesel levou a um desequilíbrio na inclusão regional, e, conseqüentemente, na inclusão social, fazendo com que as regiões Norte e Nordeste pouco contribuíssem para o PNPB. Este desequilíbrio levou o programa a eleger, como uma de suas metas, a promoção da diversificação das fontes vegetais para a produção de biodiesel. A palma de óleo vem se destacando dentre as espécies com potencial contribuição para esta diversificação, devido principalmente à sua alta produtividade de óleo, que chega a ser dez vezes maior que a da soja.

No Brasil, a Embrapa mantém a quase três décadas um programa de melhoramento da palma de óleo, sendo executado pela Embrapa Amazônia Ocidental e pela Embrapa Amazônia Oriental. Este programa objetiva tanto a produção de novos cultivares de *Elaeis guineensis* (a Palma de óleo africana, ou dendê), como também de híbridos interespecíficos desta espécie com a *E. oleifera* (a Palma de óleo americana, ou caiaué). Em decorrência da importância potencial dada à Palma de óleo para a produção de biodiesel, e de outros biocombustíveis, a Embrapa Agroenergia iniciou um programa de pesquisa e desenvolvimento em biotecnologia de *Elaeis* spp. Esse programa foca no uso de ferramentas de biologia avançada (genômica, fenômica, metabolômica, genética molecular, engenharia genética, etc.) para a geração de conhecimento visando aumentar a eficiência deste programa de melhoramento na geração de novos cultivares.

Neste contexto, a Embrapa Agroenergia desenvolve estudos visando prospecção, caracterização e validação de genes candidatos presentes no genoma de *Elaeis* spp. Estes genes e suas sequências reguladoras (promotores, etc.) poderão, no futuro, ser aplicados para o desenvolvimento de cultivares superiores de Palma de óleo, como também de outras espécies, por engenharia genética. Esta prospecção tem se focado em genes de resistência/tolerância a estresses bióticos e abiótico, além de outras características, pelo fato dos mesmos acarretarem grandes prejuízos na agricultura. Estima-se que os gastos com pesticidas agrícolas no Brasil

superam os US\$ 2,7 bilhões por ano (ARAÚJO et al., 2017), e que as perdas por estresse abiótico podem chegar a 70% (MANTRI et al., 2012).

Estudos relacionados a genes de resistência a fatores bióticos demonstraram que as proteínas codificadas por estes apresentam domínios conservados (DANGL; JONES, 2001). Diante desse entendimento, estratégias baseadas na amplificação de motivos dentro desses domínios via PCR propiciaram isolar inúmeros genes análogos de resistência (RGA). Assim, entende-se que os RGAs representam um grupo de potenciais genes de resistência (R) que apresentam função desconhecida e/ou não validadas, mas que codificam esses motivos conservados (YAISH; SAENZ DE MIERA; PEREZ DE LA VEGA, 2004).

Sabendo-se que todos os genes de resistência a doenças clonados em plantas pertencem a várias classes de RGAs, a identificação dos mesmos facilitará o desenvolvimento de marcadores moleculares para o mapeamento de genes R, construção de mapas de haplótipos para identificação de marcadores diagnósticos e a possível implementação de um programa de seleção assistida por marcadores moleculares.

Em relação a estresses abióticos, considera-se que a salinidade é o que mais afeta crescimento e a produtividade das plantas; e o estresse ocasionado pelo frio é um fator relevante na agricultura do sul do Brasil. A salinidade leva a uma restrição na absorção de água e gera toxidez nas folhas, enquanto que a formação de gelo nos tecidos das plantas durante o estresse a frio acarreta sérios danos nas membranas celulares. Considerando que a temperatura é um fator abiótico imprevisível e que o estresse salino é uma condição de estresse permanente, a tolerância intrínseca das culturas nos dois tipos de estresses é extremamente importante.

Em suma, independente do estresse ser biótico ou abiótico, os produtos de genes desempenham um papel-chave nos mecanismos moleculares de resistência ou tolerância (RAO, K. M., RAGHAVENDRA; REDDY, 2006). Nesse sentido, a *Setaria viridis*, tem sido proposta como planta modelo para validação de genes devido a aspectos biológicos favoráveis, a exemplo de ciclo de vida curto, genoma pequeno e autopolinização. As ferramentas de fenotipagem podem ser aliadas em estudos relacionados ao grau de suscetibilidade dessa cultura a diversos estresses, o que pode permitir o uso da mesma para validação de genes de tolerância.

Diante do exposto, os objetivos desse trabalho foram: a) determinar se a *Setaria viridis* (acesso A 10.1) é uma espécie sensível aos estresses de salinidade e frio, podendo assim servir como planta modelo para validação de genes de tolerância a estes estresses; b) realizar uma abordagem baseada em homologia de sequências para a identificação de potenciais RGAs NBS-LRR nos genomas de *Elaeis* spp.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biodiesel

O uso do biodiesel foi regulamentado no Brasil por meio da lei 11.097/2005 objetivando “incrementar, a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional em bases econômicas, sociais e ambientais” (BRASIL, 2005). A melhoria ambiental advém da redução dos gases do efeito estufa emitidos substancialmente pelos combustíveis de origem fóssil e também pela utilização de resíduos como sebo bovino e óleo de fritura para a produção do biodiesel (MAPA, 2014). O biodiesel pode ser produzido por uma série de matérias primas como, por exemplo, óleo de soja, sebo bovino, óleo de algodão, óleo de fritura usado e óleo de palma. Entre 2005 e 2012 foram produzidos e consumidos no Brasil 11 bilhões de litros de biodiesel, o que evitou que 22 milhões de toneladas de CO₂ eq. fossem emitidas para a atmosfera (MAPA, 2014). Além dos danos causados ao meio ambiente, na composição do diesel existem metais pesados que ao se acumularem no organismo humano causam problemas de saúde (UBRABIO, 2015).

Em 2003, antes mesmo da lei 11.097/2005 ter sido aprovada e sancionada, foram iniciadas discussões e estudos para a elaboração de uma política de biodiesel no Brasil. Nesse contexto foi criado, em 2004, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB)(MADUREIRA; GUERRA, 2014). Desde a sua criação, o programa vem estipulando a mistura do biodiesel ao diesel de petróleo, inicialmente como facultativa, e depois como obrigatória. Em 2008, o governo federal estabeleceu a mistura de 2%, o chamado B2 e a partir de 2013 de 5% (B5) (LEITE; LEAL, 2007). Entretanto, em 2010, a meta estabelecida para 2013 foi atingida. Já no ano de 2014 a ampliação foi de 7% (B7) (AGÊNCIA CÂMARA NOTÍCIAS, 2014).

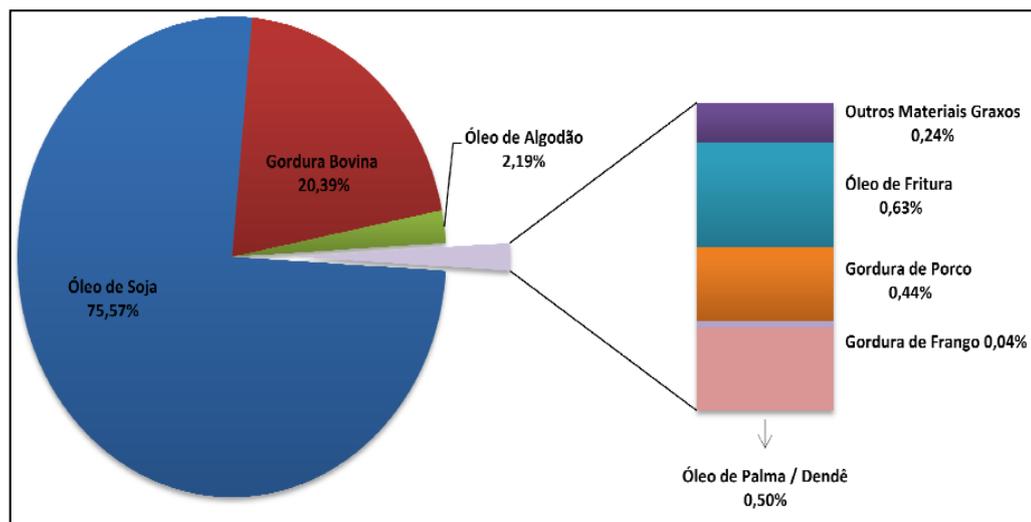
A mais recente atualização da mistura obrigatória, publicado no diário oficial da união em 24 de março de 2016, ampliou a adição de 7% para 8% até o ano de 2017, 9% até 2018 e 10% até 2019. Essa medida prevê ainda que o aumento pode chegar a 15% após o ano de 2019, se os resultados de ensaios com os combustíveis no funcionamento dos motores forem aprovados pelo Conselho de Política Energética (PORTAL BRASIL, 2016).

Em adição a atual porcentagem de biodiesel utilizada, a Ubrabio (União Brasileira do Biodiesel e Bioquerosene) defende a ampliação do chamado B20 Metropolitano (mistura obrigatória de 20% no diesel utilizado nos ônibus urbanos), uma medida já adotada em algumas cidades brasileiras e também em outros países. Segundo o MAPA (2014), cada ponto percentual a mais de biodiesel que é adicionado ao combustível fóssil equivale a aproximadamente a 7,2

milhões de árvores plantadas; em termos de CO₂ eq. Em resumo, o uso do B20 na frota urbana das 40 maiores cidades brasileiras levaria uma redução de 300 milhões de litros de diesel (UBRABIO, 2015), o que proporcionaria uma maior demanda de biodiesel e, por conseguinte um maior incentivo ao desenvolvimento do setor.

Entre as os vegetais fornecedores de matéria prima para a produção de biodiesel, a soja, atualmente, ainda se destaca como a principal fonte, sendo responsável por 75,57% de todo o óleo fornecido para a produção (FIGURA 1) (ANP, 2015). Entretanto, diversificar as fontes dessa matéria prima é importante e também uma meta do PNPB. Entre as espécies que merecem destaque para essa diversificação estão a palma de óleo, o pinhão manso e a macaúba. Além disso, a diversificação das matérias primas para produção de biodiesel leva a um ganho em relação à segurança de mercado e também de logística em regiões não produtoras de soja, agregando, conseqüentemente um benefício tanto ambiental quanto econômico. (ANP, 2014).

Figura 1 – Distribuição das matérias primas utilizadas para a produção de biodiesel nacional no ano de 2015.



Fonte: ANP (2015)

Laviola e Alves (2011) afirmam que definir as matérias-primas para a produção de biocombustíveis é uma questão crucial a ser considerada; evidenciando que o custo final do mesmo depende da utilização de matérias primas adequadas. Dessa forma, estudos que gerem dados para um melhor aproveitamento das mais diversas matérias primas existentes, beneficiam ainda mais a expansão do mercado de biocombustíveis; e, como resultado propicia para o Brasil vantagens significativas no cenário ambiental e econômico.

2.2 Palma de óleo (*Elaeis* spp.)

A palma de óleo é utilizada em muitos setores como na indústria de alimentos, higiene, cosméticos, fármacos, siderurgia, e biocombustível (ABRAPALMA, 2015a; BARCELOS et al., 1995); e é responsável pela maior parte do fornecimento de óleo vegetal consumido no mundo, sendo 33% da produção mundial e 45% da produção de óleo comestível (SINGH et al., 2013a). O gênero *Elaeis* é composto somente por duas espécies, a *Elaeis guineensis*, de origem africana, conhecida popularmente como dende; e a *Elaeis oleifera*, de origem americana, conhecida como caiaué. Ambas apresentam 16 pares de cromossomos ($2n=32$), que se dividem em três grupos a depender do tamanho, sendo um cromossomo longo, sete médios e oito pequenos (CORLEY; TINKER, 2003).

O gênero *Elaeis* pertence à classe Liliopsida, ordem Arecales e família *Arecaceae*, antiga família *Palmae* (DRANSFIELD et al., 2005). É uma cultura alógama e monóica. O fruto é do tipo drupa ou baga (MIRANDA et al., 2001), com formato ovoide. É classificada como monocotiledônea pela posição assimétrica do embrião e por apresentar somente um cotilédone na semente (MORENO, 1984 apud MAIA, 2016 p 3.). As duas espécies do gênero são morfologicamente muito semelhantes, a principal diferença entre as espécies é que no caiaué os folíolos se apresentam dispostos em um mesmo plano sobre a raque, dando um aspecto liso as folhas diferentemente do dendê (FARIAS, 2014).

No dendê existem três diferentes tipos de endocarpo em relação à espessura do mesmo, sendo eles: dura (D), pisífera (P) e tenera (T), sendo o último resultado do cruzamento entre os dois primeiros. Esta característica é controlada por herança monogênica de interação alélica do tipo codominante. O tipo dura se caracteriza por ter endocarpo espesso, o tenera endocarpo intermediário e o pisífera endocarpo ausente (FIGURA 2). Do fruto, são extraídos dois tipos de óleos, o óleo de palma ou azeite de dendê que é extraído do mesocarpo e o óleo de palmiste extraído do endosperma (RIOS et al., 2012), (FIGURA 3). O primeiro é utilizado nas indústrias de cosméticos, farmacêutica, siderúrgica e também de biocombustíveis, e o segundo na indústria alimentícia e de produção de sabão.

Estudos anteriores indicavam que o genoma de *E. oleifera* era cerca de metade do tamanho de *E. guineensis*, e que o genoma do híbrido entre as duas espécies era maior do que os genomas parentais (MADON et al., 2008; RIVAL et al., 1997; SRISAWAT et al., 2005). Entretanto, Camillo et al. (2014), ao realizarem um trabalho com o objetivo de reavaliar o tamanho dos genomas, concluíram que o tamanho do genoma de *E. guineensis*, *E. oleifera* e do híbrido é de $4,32 \pm 0,173$, $4,43 \pm 0,018$ e $4,40 \pm 0,016$ picogramas (pg) respectivamente,

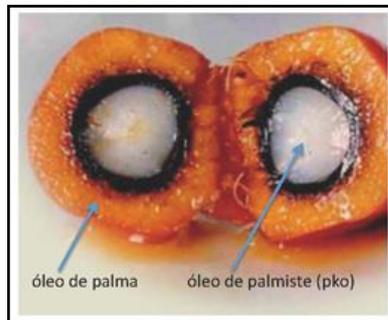
correspondendo a aproximadamente 2 gigabase (Gb). Estes resultados mostram que os genomas das duas espécies são semelhantes em tamanho, apesar de *E. oleifera* ser um pouco maior, e que o híbrido apresenta um genoma próximo a média dos parentais.

Figura 2 – Frutos de *Elaeis guineensis* com diferentes tipos de endocarpo.



Fonte: Corley; Tinker (2003).

Figura 3 – Fruto de *Elaeis guineensis*.



Fonte: Akira (2012).

As espécies que compõem este gênero podem cruzar entre si e produzir descendentes férteis. Desta forma as características benéficas de ambas as espécies constituem a variabilidade utilizada pelos programas de melhoramento. O dendê já é amplamente cultivado comercialmente, e a ele pode-se agregar alguns dos caracteres benéficos do caiaué. Entre estas características estão a tolerância a terrenos úmidos, resistência a pragas, doenças e anomalias, como por exemplo, ao amarelecimento fatal (AF), principal anomalia que afeta a cultura na América Latina.

A *E. oleifera* também possui um óleo com elevada taxa de ácidos graxos insaturados e com maior fluidez do que o óleo de *E. guineensis*, tendo assim um maior valor comercial. Além disso, apresenta um menor crescimento vertical o que poderia permitir um período mais longo de exploração comercial (RIOS et al., 2012; VIÉGAS; MÜLLER, 2001). Nesse sentido, a Embrapa iniciou o programa de melhoramento voltado para o desenvolvimento de híbridos interespecíficos dessas espécies em 1980, com o objetivo de aliar a produtividade do dendezeiro do tipo tenera e a resistência apresentada pelo caiaué.

Como resultado do melhoramento, observou-se que em regiões de incidência do AF os híbridos apresentaram-se como resistentes, lançando assim o cultivar BRS Manicoré. Em 2010, o estado do Pará, local de alta incidência do AF já contava com aproximadamente dois mil hectares de híbridos interespecíficos (RIOS et al., 2012). Entretanto, apesar deste avanço, muitas doenças acarretam grandes prejuízos nos cultivos da palma de óleo no mundo (TABELA 1), o que representa uma ameaça em potencial para os cultivos brasileiros (CARVALHO; SANTOS, 2013). Os fungos *Ganoderma boninense* e *Fusarium oxysporum*, por exemplo, representam perdas que podem chegar a 80% em cultivos importantes na Ásia e África (ARIFFIN; IDRIS; SINGH, 2000; DE FRANQUEVILLE; RENARD, 1990). no Brasil, as doenças que causam as maiores perdas econômicas são a fusariose e o anel vermelho (BOARI, 2008).

Tabela 1 – Exemplos de doenças descritas na palma de óleo.

| Doença | Referência |
|-----------------------------|---|
| Mancha foliar de cercospora | TRINDADE, 1997 |
| Mancha foliar de viveiro | TRINDADE, 1997 |
| Antracnose | TRINDADE, 1997 |
| Necroses foliares | TRINDADE, 1997 |
| Anel vermelho | TRINDADE, 1997 |
| Fusariose | COOPER; FLOOD; REES, 2011; TRINDADE, 1997 |
| Podridão-do-colmo | COOPER; FLOOD; REES, 2011; FLOOD, 2006 |
| Podridão-da-coroa | CARVALHO; SANTOS, 2013 |
| Mancha anular | BOARI, 2008; BRAZILIO et al., 2012 |
| Marchitez sorpresiva | BOARI, 2008 |
| Podridão dos brotos | BOARI, 2008 |

Fonte: Do autor (2017).

Devido à grande dependência do óleo de soja como fonte de matéria prima para a produção de biocombustíveis, outras espécies oleaginosas têm sido estudadas como fonte de diversificação desta matéria prima. Uma cultura que tem ganhado grande destaque é a palma de óleo, por apresentar uma alta capacidade de produção de óleo por unidade de área. Como incentivo ao uso da palma de óleo para a produção de biocombustíveis, o programa de produção sustentável da palma de óleo foi lançado em 2010, tendo como principal objetivo disciplinar e promover a expansão do cultivo desta cultura no Brasil (PORTAL BRASIL, 2010).

Adicionalmente, o ZAE-Dendê (Zoneamento agroecológico do dendezeiro para as áreas desmatadas da Amazônia Legal), que engloba sete estados da federação (Acre, Amapá, Amazonas, Mato Grosso, Pará, Rondônia e Roraima), propiciou “conhecer e espacializar o potencial agroecológico da produção da cultura do dendezeiro” (EMBRAPA, 2010), também se caracterizando como um mecanismo utilizado pelo Brasil para propiciar a expansão sustentável do cultivo da palma de óleo.

Os maiores produtores do óleo de palma são a Indonésia, Malásia e Tailândia (ABRAPALMA, 2015b). Em 2010 a UNIAMERICA, mostrou que o Brasil era o 11º país entre os maiores produtores mundiais. Em 2011 a ABRAPALMA através de dados do USDA Foreign Agricultural Service, indicou que o Brasil já era o 9º, produzindo 300 mil toneladas, sendo que a maior parte desta produção era proveniente do estado do Pará.

A ABRAPALMA mostrou ainda que a palma de óleo apresenta vantagens em relação a outras oleaginosas, como maior produtividade de óleo e poder ser plantada em áreas degradadas, o que contribui no sequestro de carbono e conseqüentemente leva a uma diminuição nos problemas ambientais relacionados às mudanças climáticas. Além disso, a palma de óleo é capaz de produzir, com somente 10% da área plantada de soja, a mesma quantidade de óleo (AGROANALYSIS, 2014), o que reafirma a alta capacidade de produção desta cultura.

É notório que o interesse pela palma de óleo não é recente. Segundo a AGROANALYSIS (2014), desde meados dos anos 70 a produção do óleo de palma, sofreu um crescimento significativo, passando de uma produção que atendia a demanda local para uma cultura de interesse mundial, tendo crescido 167% entre 1998 e 2010 (SOUZA JÚNIOR, 2011). O gênero apresenta cultivares melhoradas com sistema de produção definido, sendo já comercialmente explorado, o que coloca a palma de óleo como preferida em relação a espécies produtoras de óleo ainda não domesticadas.

Dois estudos realizados por pesquisadores do escritório de óleo de Palma da Malásia (MPOB) foram importantes para o desenvolvimento de pesquisas genômicas na Palma de óleo. Um desses estudos foi responsável por elucidar, em parte, a origem das espécies de palma de óleo. Os autores sequenciaram o genoma de *E. guineensis* que resultou em um tamanho de 1,8 gigabase (Gb) em 16 scaffolds (1 por cromossomo). Um total de 1,535Gb de dados de sequência e transcriptoma foram montados e utilizados para predizer, pelo menos, 34,802 genes, incluindo genes da biossíntese de óleo e homólogos de WRINKLED1 (WRI1), e outros reguladores da transcrição, que são altamente expressos na amêndoa (endosperma). No mesmo estudo, foi montado ainda as sequências do *draft* de *Elaeis oleifera* que, segundo os autores, parece ter

divergido no Novo Mundo. Duplicações segmentares de braços cromossômicos define a origem palaeotetraploide das palmeiras (SINGH et al., 2013a). Estes resultados podem ser encontrados no banco de dados do NCBI.

Além do estudo supracitado, os pesquisadores do MPOB, descreveram o mapeamento e identificação do gene Shell, responsável pelas diferentes formas de frutos (SINGH et al., 2013b). Usando o mapeamento de homozigose por sequenciamento, foram encontradas duas mutações independentes no domínio de ligação ao DNA de um homólogo do gene MADS-box SEEDSTICK (STK), que controla a identidade do óvulo e o desenvolvimento de sementes em *Arabidopsis*, o gene Shell. O tipo tenera contém uma versão normal do gene Shell e uma versão mutada, essa combinação se traduz por um rendimento de óleo maior que o tipo dura.

Para os pesquisadores do MPOB as sequências do genoma da palma de óleo permitem a descoberta de genes para características importantes, bem como alterações epigenéticas e somaclonais que restringem o uso de clones em plantações comerciais. Além disso, a mutação encontrada no fruto tipo tenera, explica uma das características economicamente mais importantes na palma de óleo, e tem implicações para a produção global. Adicionalmente, a obtenção de um marcador genético permitiria acelerar o processo de seleção e reduzir a superfície cultivada.

Na Embrapa Agroenergia, estudos voltados para essa cultura já foram desenvolvidos, a exemplo da caracterização de sítios polimórficos, sequências repetitivas e estabelecimento de coleção nuclear de caiaué (FILHO, 2015), estudo da diversidade genética e estrutura populacional de *E. oleifera* por meio de DArTSeq (PEREIRA, 2015), prospecção de genes tecido específico e metabólitos em *Elaeis* spp. (VARGAS, 2014) e caracterização do desenvolvimento floral de *E. oleifera* (FARIAS, 2014). Além dos estudos supracitados, a Embrapa conta ainda com a versão 1.0 do Draft do genoma de *E. oleifera*, acesso Manicoré, que auxilia na prospecção de genes e marcadores genéticos de interesse.

2.3 *Setaria viridis*

A *Setaria viridis* é uma planta pertencente à ordem *Cyperales*, gênero *Setaria*, família *poaceae* (Gramíneas). É uma planta diplóide ($2n = 2x = 18$), conhecida popularmente como rabo de raposa verde. O genoma é relativamente pequeno, aproximadamente 510 Mb (BRUTNELL et al., 2010). Essa espécie tem sido estudada visando a sua utilização como planta modelo para estudos de genética reversa objetivando a validação de genes e promotores. As plantas modelos já utilizadas foram importantes para muitas descobertas científicas, como mecanismos fundamentais que são conservadas em todas as espécies de plantas. Entretanto, há

uma necessidade de novas plantas modelos que se encaixam em muitos outros processos biológicos que até então as plantas modelos disponíveis não se enquadram.

Uma planta modelo muito conhecida e utilizada na comunidade científica é a *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), outro exemplo é o arroz (*Oryza sativa*). Devido as suas características, como ciclo de vida curto, genoma pequeno, autopolinização, estatura pequena, variando entre 15 a 40 cm, a *Setaria italica* e seu ancestral selvagem *Setaria viridis*, estão sendo propostas como plantas modelo, especialmente no que se refere a estudos de fotossíntese de C4 (BRUTNELL et al., 2010; JIANG; BARBIER; BRUTNELL, 2013). As duas espécies possuem um genoma pequeno o que representa por exemplo um quinto do tamanho do genoma do milho, espécie da mesma família destas (XIANMIN et al., 2014).

No que se refere à genética vegetal, as descobertas em modelos genéticos adiantados tais como, ervilha (*Pisum sativum*) e milho (*Zea mays*), foram essenciais nos conhecimentos das bases para a genética moderna. Os conhecimentos iniciais gerados pelas plantas modelos e o desenvolvimentos dessa área de pesquisa permitiram grandes avanços no melhoramento de plantas, especialmente na chamada era genômica.

O sistema fotossintético C4 é considerado mais eficiente se comparado ao C3 que é encontrado na maioria das plantas verdes. Segundo Xianmin et al. (2014), o grupo de espécies pertencentes à subfamília *Panicoidae*, que é a maior das gramíneas, englobam espécies C4 e também culturas importantes, a exemplo do milho (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum bicolor*), cana de açúcar (*Saccharum officinarum*), milheto (*Pennisetum glaucum*), painço foxtail (*Setaria italica*), milho comum (*Panicum miliaceum*) e capim-elefante (*Pennisetum purpureum*); além de algumas culturas candidatas a produção de biocombustíveis. O autor reforça ainda que, pelo fato dessas plantas supracitadas apresentarem um relacionamento evolutivo com um modelo *Setaria*, a mesma pode facilitar a genômica funcional para estas culturas.

Além das características biológicas favoráveis apresentadas pela *S. viridis*, já foi constatado a eficiente transformação genética desta pelo método *Agrobacterium* (MARTINS et al., 2015). Segundo os autores da pesquisa esse protocolo de transformação irá contribuir significativamente para a adoção dessa espécie como planta modelo adicionando seu emprego na pesquisa aplicada, incluindo os relacionados com a tolerância ao estresse abiótico e o melhoramento relacionado à quantidade de biomassa para a produção de etanol de segunda geração (2G), na cana de açúcar, por exemplo.

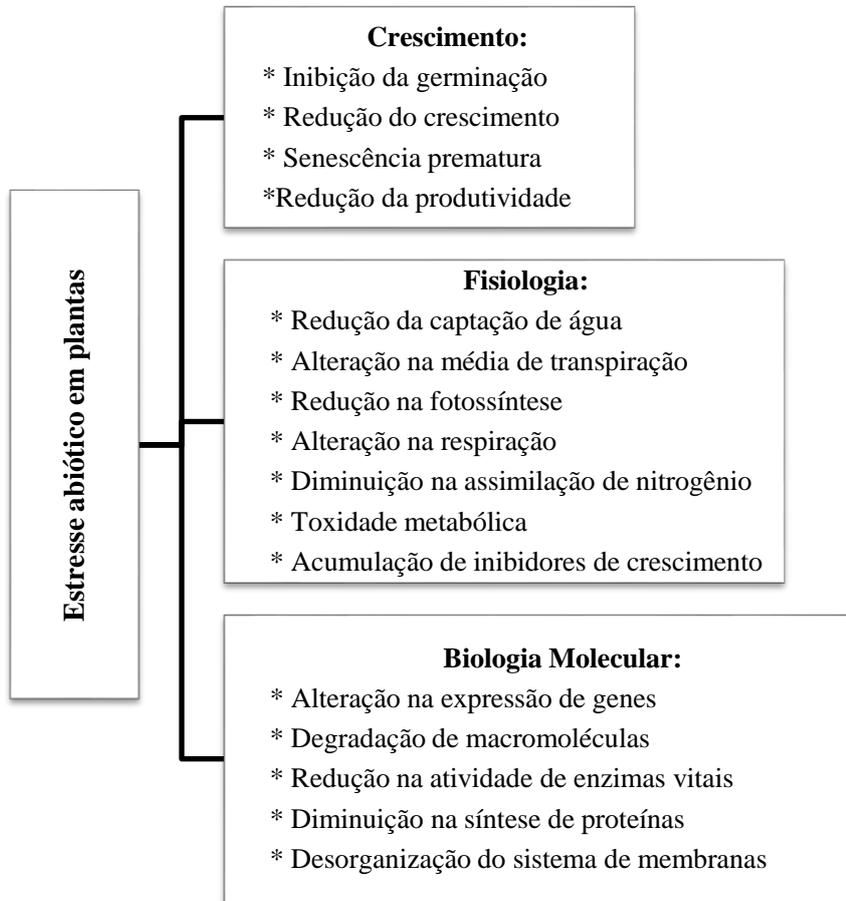
2.4 Estresses abióticos

Estresse em plantas pode ser definido como um “fator externo que exerce uma influência desvantajosa sobre a planta” (TAIZ; ZEIGER, 2004). Alguns fatores podem se tornar estressantes em poucos minutos, outros, no entanto podem levar dias, semanas ou meses. Sabe-se que estes desempenham um papel importante na distribuição das espécies, pois cada uma se expressa diferencialmente ao mesmo tipo de estresse (TAIZ; ZEIGER, 2004).

As culturas estão sujeitas a diversos estresses, sejam eles de origem biótica ou abiótica. Dentre os abióticos estão o estresse hídrico, a salinidade do solo, frio (resfriamento e congelamento), calor, acidez do solo, luz, deficiência ou excesso de nutrientes, metais pesados entre outros. Muitas vezes, esses estresses afetam a planta simultaneamente e levam a respostas similares. Um exemplo disso é o que ocorre quando a planta está sujeita a um solo salino que dificulta a absorção de água e, conseqüentemente, leva a um estresse hídrico (OLIVEIRA; ALENCAR; GOMES-FILHO, 2013). As respostas das plantas a fatores abióticos são diversas, a depender do estresse que a mesma está sofrendo. Entretanto, de forma geral estas estão relacionadas ao crescimento, mecanismos fisiológicos e moleculares (RAO; RAGHAVENDRA; REDDY, 2006), (FIGURA 4).

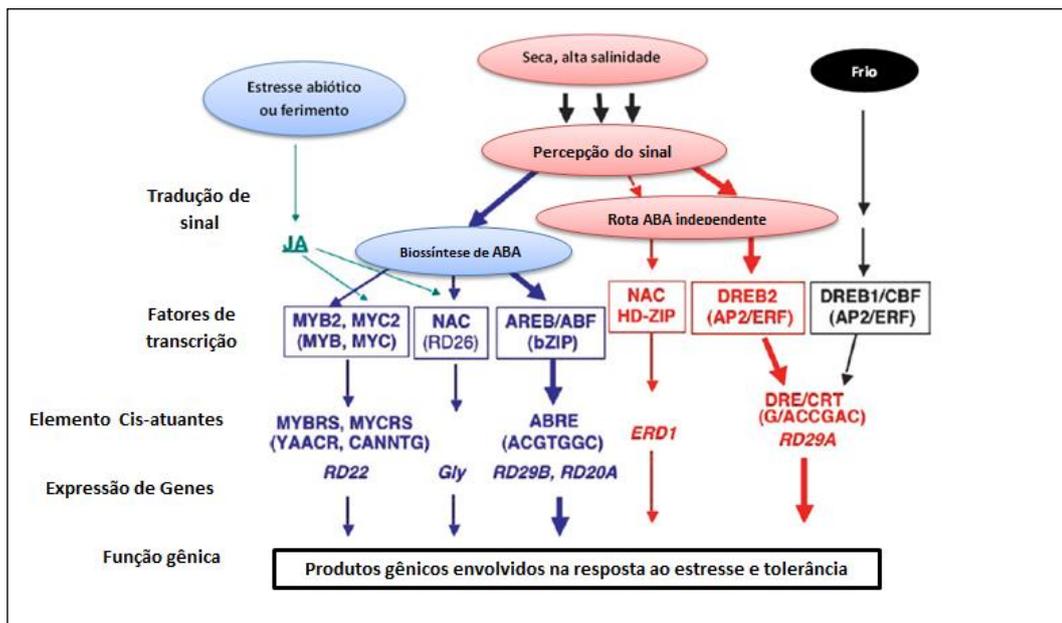
Genes selecionados em estudos objetivando tolerância a fatores abióticos codificam enzimas envolvidas na biossíntese de diversos osmoprotetores, detoxificantes e fatores de transcrição envolvidos na expressão, regulação gênica e tradução de sinais em resposta ao estresse. Estes últimos apresentam grande importância na engenharia genética para o melhoramento de características relacionadas à tolerância à seca, salinidade, frio entre outros, pois participam no processo inicial da percepção e sinalização do estresse (NEPOMUCENO et al., 2011). Para Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki e Seki (2003), existem pelo menos seis vias de tradução de sinais em respostas ao estresse a seca, alta salinidade e frio. Três delas são ABA dependente e três são ABA independente, sendo estas seis vias as mais estudadas (NEPOMUCENO et al., 2011) (FIGURA 5).

Figura 4 – Respostas comuns ao estresse abiótico.



Fonte: adaptado de Rao; Raghavendra; Reddy (2006).

Figura 5 – Fatores de transcrição envolvidos na indução de genes de resposta ao estresse abiótico.



Fonte: Adaptado Shinozaki, Yamaguchi-Shinozaki e Seki (2003).

2.4.1 Salinidade

Sabe-se que a salinização dos solos é decorrente de dois fatores: causas naturais, a exemplo do intemperismo das rochas e através da ação humana, principalmente pela irrigação. Grande parte das terras agricultáveis foi e ainda vem sendo salinizadas graças à ação humana, com a utilização de água com níveis consideráveis de sal. Em 2005, a FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) já afirmava que 45 milhões de hectares (19,5%) das áreas irrigadas no mundo são afetadas pela salinidade. Esse fato é preocupante já que salinidade afeta o crescimento e a produtividade da planta, pois desvia energia para a aclimatação ao estresse.

A salinidade do solo é uma condição caracterizada por uma concentração elevada de sais solúveis (MUNNS; TESTER, 2008). As plantas podem ser classificadas quanto a respostas a essa salinidade em halófitas e glicófitas. As plantas halófitas apresentam condições fisiológicas capazes de suportar altas concentrações de sal na solução do solo, enquanto que as glicófitas, que representam a maioria das plantas cultivadas, suportam níveis mais baixos (WILLADINO; CAMARA, 2010). Um solo salino que reduz significativamente o rendimento da maioria das culturas é aquele com aproximadamente 40mM de NaCl que é relativo a uma condutividade elétrica (Ece) 4 dS m⁻¹ gerando uma pressão osmótica de cerca de 0,2 MPa (MUNNS; TESTER, 2008).

As plantas são capazes de absorver água quando as forças de absorção dos tecidos das raízes são superiores as forças de retenção de água no solo; entretanto, a presença de sais leva a uma maior força de retenção da água no solo, ou seja, um aumento da pressão osmótica. Coelho et al. (2014) afirmaram que foram observadas respostas lineares e crescentes dos teores de umidade nos solos em função do aumento da salinidade. Segundo o autor, esses resultados foram consequências das quantidades de sais solúveis na solução do solo que levaram a limitações na absorção de água pela planta, deixando seu potencial osmótico mais negativo.

Dentre os efeitos causados pela salinidade o primeiro deles é, justamente, o de efeito osmótico ou “fase osmótica” que ocorre no início do stress ou em condições moderadas. Entretanto, esse efeito pode atingir um nível tal que a planta não apresentará mais forças de sucção suficiente para superar a pressão osmótica, mesmo em solos húmidos, levando a assim a uma seca fisiológica (DIAS; BLANCO, 2010).

Nesta primeira fase a planta pode estabelecer uma série de reações como restrição à abertura estomática e assimilação do CO₂. Esses sintomas, na verdade, se caracterizam como uma resposta fisiológica da planta aos efeitos negativos causados pelo sal, mas que são

considerados mecanismos normais em situações adversas. Em condições mais avançadas, a planta pode ir para uma segunda fase do estresse que é denominada fase tóxica ou iônica. Esta fase é caracterizada pelo acúmulo de íons salinos no citosol, e que difere entre as diversas espécies a depender da capacidade de compartimentalização de íons salinos e o balanço K^+/Na^+ no citosol (SILVEIRA et al., 2010).

A salinidade dos solos afeta os processos fisiológicos das plantas, dentre eles um dos mais prejudicados é a fotossíntese. A redução da área foliar para evitar a perda de água pode levar, conseqüentemente, a queda na área de captação da energia da luz (WANG; SHANNON; GRIEVE, 2001); além disso, o acúmulo de íons nos cloroplastos atinge os processos bioquímicos e fotoquímicos envolvidos na fotossíntese. Feijão et al. (2013) descreveram que o excesso de íons tóxicos gerados pela salinidade dos solos leva a uma competição na absorção e transporte de nutrientes dentro das plantas, o que provoca um distúrbio nutricional. Sabe-se que o nitrogênio é um elemento fundamental na constituição de várias biomoléculas essenciais a exemplo dos ácidos nucléicos e proteínas e tem a sua captação prejudicada por esse estresse.

As fases iniciais de desenvolvimento das culturas são afetadas pelo índice de concentração de sal no solo. Ribeiro et al. (2016) relataram que as sementes de maracujazeiro-amarelo toleraram os sais apenas até $1,5 \text{ dS m}^{-1}$ e Albuquerque et al. (2016) que a cultura do pepino pode ser irrigados com água salina de até $1,8 \text{ dS m}^{-1}$ durante a sua fase de crescimento inicial, com breves perdas no crescimento. Qados (2011), utilizando concentrações de 0, 60, 120, 240 mM de NaCl observou que a altura, número de folhas, área foliar, pesos frescos e seco da parte aérea, conteúdo de clorofila 'a', 'b' e carotenoides foram negativamente afetadas com o aumento da concentração de sal em feijoeiro *Vicia faba* (L.).

Em contraste, Mendonça et al. (2010) observaram que mudas de *Eucalyptus*, submetidas ao nível máximo de salinidade ($8,33 \text{ dS m}^{-1}$), não apresentavam queda significativa no valor de SPAD (índice da intensidade da cor verde nas folhas) e rendimento quântico potencial do fotossistema II (F_v/F_m), o que pode ser um indicativo de tolerância destas espécies à salinidade. Ressaltando ainda que as reduções da biomassa seca e área foliar dos indivíduos estudados foram relacionadas a estratégias de resistência das plantas ao estresse salino.

Os estudos supracitados demonstram que as culturas respondem diferencialmente ao estresse salino. Para Munns e Tester (2008), o mecanismo fisiológico responsável pela tolerância à salinidade está diretamente relacionado ao crescimento da planta. No entanto, é necessário reconhecer se esse está sendo limitado pelo efeito osmótico do sal que está presente no solo ou pelo efeito tóxico do sal dentro da planta. Segundo aqueles autores, a redução do

crescimento da parte aérea da planta ocorre em duas fases: uma rápida, que é devido à pressão osmótica externa, e uma mais lenta, em consequência do acúmulo de Na^+ nas folhas.

O crescimento das plantas é uma característica diferencialmente afetada quando as espécies estão sob estresse salino. Entre os cereais, o arroz (*Oryza sativa*) é considerado o mais sensível e a cevada (*Hordeum vulgare*) é a mais tolerantes (MUNNS; TESTER, 2008). Em adição ao crescimento das plantas, Yi; Ma e Li (2007), descrevem que a maior parte dos estudos do impacto salino tem sido focado nas características morfológicas e fisiológicas da parte aérea da planta; tais como fotossíntese, transpiração, processo metabólico, glândula salina, regulação osmótica, atividade enzimática e germinação das sementes.

2.4.2 Frio

O resfriamento representa uma temperatura que seja baixa para o crescimento normal da planta, mas não suficientemente baixa que permita a formação de gelo. Nessas condições ocorre o chamado dano por resfriamento, o crescimento torna-se mais lento, as folhas apresentam lesões, há uma queda na fotossíntese, translocação de carboidratos, taxas respiratórias e síntese proteica. Esses danos podem ser minimizados se a exposição for lenta e gradual, a exposição repentina, no entanto, leva ao choque a frio o que pode aumentar as chances de dano (TAIZ; ZEIGER, 2004; THAKUR et al., 2010).

Cada planta apresenta níveis de temperaturas para seu bom crescimento e desenvolvimento, plantas de habitats quentes apresentam sintomas de lesão em baixas temperaturas. Espécies como milho, soja, algodão, tomate e banana apresentam sinais de lesão por exposição a temperaturas abaixo de 15°C (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007; YADAV, 2010). Selecionar plantas para resistência ao frio em campo é um procedimento complexo, pois é difícil prevê o acontecimento, duração e intensidade e ainda separar seus efeitos de outros elementos, levando assim a pesquisas utilizando condições controladas (ROZZETTO, 2015).

Na cultura do arroz, por exemplo, a incidência de baixas temperaturas em diversos países vem sendo estudada. A faixa de temperatura ótima para essa cultura é de 25°C a 30°C sendo que abaixo de 20°C é prejudicial ao desenvolvimento da planta (YOSHIDA, 1981). De forma geral o arroz é uma cultura sensível a baixas temperaturas o que também está relacionado ao estágio de desenvolvimento da planta (CRUZ; MILACH, 2000).

Em plantas sensíveis ao frio, os lipídeos da bicamada das membranas tendem a solidificar em um estado semicristalino o que torna as membranas menos fluídas. A fotossíntese e a respiração são exemplos de mecanismos afetados, pois há um dano nas membranas dos cloroplastos e mitocôndrias. Diferença na conformação da membrana é um dos aspectos que

diferenciam plantas resistentes das sensíveis. Inicialmente os cristais de gelo se formam nos espaços intercelulares e nos vasos, e o crescimento desses cristais causa o deslocamento da água líquida das células para a região extracelular causando assim uma desidratação excessiva (MAHAJAN; TUTEJA, 2005; TAIZ; ZEIGER, 2004; XIN; BROWSE, 2000).

Um levantamento feito por Siebeneichler et al. (2000), mostra que alterações morfológicas nas plantas podem ocorrer após um estresse térmico. Os autores relatam que em *Solanum commersonii* as folhas se tornaram 39% mais espessas e a área foliar cinco vezes menor quando expostas a 12/9°C e 5/2°C (noite/dia), quando comparadas aos indivíduos cultivados a temperaturas mais altas (20/ 16°C dia/ noite); e que o espinafre, quando exposto a temperaturas baixas desenvolve duas ou três camadas de parênquima paliçádico e retardo no desenvolvimento. Num estudo realizado por esse mesmo autor foi constatado que o estresse por frio em cultivares de feijão causa espessamento da lâmina foliar e redução no crescimento das plantas. Para os autores, essas alterações são resultado da adaptação das plantas ao novo ambiente.

A glicina betaína é um dos solutos que se acumulam nos cloroplastos de certas plantas halotolerantes quando estas são expostas a estresse salino ou frio. Um estudo realizado por Hayashi et al. (1997) objetivou transformar a *Arabidopsis thaliana* com o gene CodA, que codifica a colina oxidase, a enzima que converte a colina em glicina betaína. Como resultado, observou-se que a planta acumulou a glicina betaína, o que aumentou a sua tolerância ao estresse salino e ao frio.

Cruz e Milach (2000) afirmaram que cada estágio de desenvolvimento do arroz apresenta a ativação de genes diferentes para a tolerância ao frio e que os principais estudos para caracterizar cada estágio resultam de experimentos com a utilização de condições controladas. Esse tipo de ensaio permite caracterizar somente o fator frio sem a interferência de demais fatores, o que realça a adequação de ensaios usando tais condições.

2.5 Estresses bióticos

Os agentes bióticos, como bactérias, vírus, nematoides e protozoários podem afetar a planta das mais diversas formas como debilitar o hospedeiro por absorção continua de nutrientes, destruir ou causar distúrbios das células do hospedeiro como consequência da liberação de toxinas, enzimas ou substâncias reguladoras de crescimento, afetar tecidos condutores entre outros (MICHEREFF, 2001).

Vários conceitos de doença surgiram desde que a fitopatologia se estabeleceu como uma ciência. Entretanto, a definição de Gaümann (1946) é a mais aceita pelos fitopatologistas, pois o mesmo estabeleceu que doença é “um processo dinâmico, no qual hospedeiro e patógeno, em íntima relação com o ambiente, se influenciam mutuamente, do que resultam modificações morfológicas e fisiológicas (MICHEREFF, 2001). Assim o desenvolvimento da doença decorre da relação entre três fatores, ambiente, patógeno e hospedeiro.

Inicialmente as plantas apresentam mecanismos físicos e químicos para impedirem a entrada, colonização e inibição ao desenvolvimento do patógeno. Dentre os mecanismos físicos pode-se citar a cutícula, os estômatos e os tricomas. Estes últimos podem exsudar substâncias inibidoras ou, devido à quantidade dos mesmos, interferir na continuidade do filme de água afetando a penetração do patógeno. Entre os químicos, pode-se citar os compostos fenólicos ou ácidos hidrocarboxílicos, que são substâncias fungitóxicas, antibacterianas e antiviróticas (STANGARLIN et al., 2010).

O combate a doenças em plantas é um processo contínuo devido à corrida evolutiva entre planta e patógeno. O sistema de defesa a estresses em plantas, diferentemente do sistema imunológico em animais, não funciona como uma rede circulatória com ação de um sistema imune; neste, cada célula vegetal é capaz de se defender por meio de uma combinação de defesas constitutivas e induzidas (LAMB, 1989 apud STASKAWICZ, 1995, p. 661).

Existem nas plantas dois tipos de receptores imunes, os receptores de reconhecimento de padrões (PRR), que reconhecem padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) na matriz extracelular ou na membrana plasmática (BOLLER; FELIX, 2009), e que permite o processo de imunidade disparada por PAMP, a PTI (PAMP Triggered immunity), e as proteínas R, que reconhecem os efetores dos patógenos e iniciam o processo de imunidade disparada por efetores, a ETI (Effector - Triggered immunity) (QI et al., 2011).

Moléculas microbianas, a exemplo dos lipooligossacarídeos de bactérias gram-negativas, flagelinas e glucanas bacterianas, quitina existentes nas paredes celulares dos fungos, e glicoproteínas de oomicetos, são alguns exemplos de PAMPs (ZHANG; ZHOU, 2010). Os efetores, ao contrário das PAMP, que são essenciais na sobrevivência dos patógenos (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997), visam especificamente os mecanismos de defesa da planta.

Os receptores PRRs são proteínas transmembranas que geralmente apresentam repetições ricas em leucina (LRRs) ou motivo de lisina (LysM) no domínio extracelular, região responsável pelo reconhecimento do ligante (BECK et al., 2012). Quando PAMPs ou efetores são reconhecidos, o sistema imune das plantas é ativado, ocorrendo assim a PTI. Essa ativação

está baseada em mudanças nos níveis de cálcio no citoplasma, produção de espécies reativas de oxigênio e cascata de sinalização via MAP-quinases (*mitogen activated protein kinases*). Hormônios reguladores como ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) são responsáveis por amplificar essas vias de sinalização, o que resulta na ativação de fatores de transcrição e de genes de defesa, fitoalexinas, lignificação de tecidos, deposição de calose e outros reforços da parede celular (DALIO et al., 2014; GRANT; LAMB, 2006).

Na ETI ocorre o reconhecimento de efetores do patógeno pelas proteínas R do hospedeiro. Esses efetores podem ser divididos em apoplásticos, quando atuam na superfície ou nos espaços intercelulares e citoplasmáticos, quando se translocam através da membrana celular (BLOCK et al., 2008). Em *Fusarium oxysporum lycopersici*, fungo patogênico de interação modelo para estudos em tomate, 11 proteínas efetoras denominadas de proteínas six (*secreted in xylem*) já foram identificadas (FILHO; DIANESE; CUNHA, 2015). Outros exemplos são o gene efector Avr - Xa1 em *Xanthomonas oryzae*, com um gene de resistência Xa1 correspondente em *Oryza sativa* e *Perenospora parasitica* que apresenta o gene efector AvrRPP1A com um gene de resistência RPP1 correspondente em *A. thaliana* (DALIO et al., 2014).

Assim como descrito para PTI, na ETI ocorre uma cascata de sinalização e amplificação dessas vias de sinalização, resultando, porém, nesta fase, na ativação de fatores de transcrição de genes de defesa, levando assim a resistência sistêmica adquirida (SAR) ou resistência sistêmica induzida (TSUDA; KATAGIRI, 2010) Na ETI, o reconhecimento do gene AVR (efector) pelo gene R provoca uma cadeia de eventos de transdução de sinal, que leva a ativação de mecanismos de defesa como a resposta de hipersensibilidade (HR), síntese de proteínas antimicrobianas e metabólitos, espessamento da parede celular e obstrução dos vasos (MILLER et al., 2008).

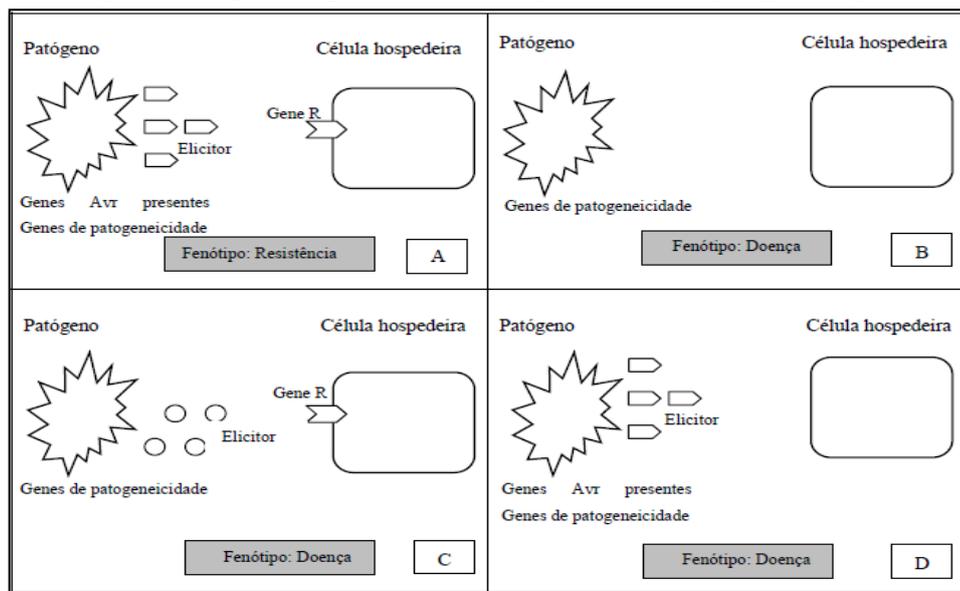
Entende-se, portanto, que para o desenvolvimento da doença existe uma interação planta-patógeno. O reconhecimento de raça específica é tido como qualitativa, nesta um ou poucos genes principais estão envolvidos, sendo uma interação gene a gene. A interação não específica é definida como quantitativa, onde existe interação entre genes de pequeno efeito que são eficazes para vários patógenos. A imunidade disparada por efetores pode ser explicada por quatro tipos de modelos, o gene a gene, o guarda, o ziguezague e decoy.

A mais antiga teoria para explicar a resposta imune em plantas é a gene a gene de Flor (1942), sendo que está é uma resistência raça específica ou vertical. Na teoria gene a gene a planta possui um gene de resistência (R) e o patógeno um gene de avirulência (Avr). No contato da planta com o patógeno o produto do gene R reconhece o produto do gene Avr levando a uma

casca de sinais e respostas de defesa. Para o autor da teoria “para cada gene que condiciona uma reação de resistência no hospedeiro existe um gene complementar no patógeno que condiciona a avirulência”. Estudos posteriores mostraram que o alelo de avirulência (Avr) do patógeno codifica uma molécula efetora que por sua vez é reconhecida por um receptor codificado pelo alelo R da planta hospedeira (BESPALHOK; GUERRA; OLIVEIRA, 2007).

Podem ocorrer quatro tipos de combinações no sistema patógeno hospedeiro. Seguindo a figura 6 a primeira combinação (A) demonstra que existe uma reação de incompatibilidade, a planta apresenta um gene R relativo ao gene Avr do patógeno e, portanto, a infecção não ocorre. Note ainda que o termo incompatibilidade se refere ao patógeno, sendo ele o incompatível para desencadear a doença. Se qualquer um dos genes dessa interação está inativo ou ausente o resultado é o desenvolvimento da doença (DANGL; JONES, 2001).

Figura 6 – Quatro tipos de combinações na interação gene a gene.



Fonte: Emediato (2009).

É possível notar que na combinação B, ao contrário do A, ocorre uma reação de compatibilidade, porém nesse caso nem a planta e nem o patógeno apresentam os genes. Na combinação C ocorre a reação de compatibilidade, porém ambos possuem o gene AVR e R, entretanto o gene AVR do patógeno não é detectado pelo gene R da planta que não é correspondente ao mesmo, não havendo assim reconhecimento de ambas as partes. Na combinação D o patógeno possui o gene AVR, mas o hospedeiro não apresenta o gene R. A incompatibilidade do patógeno em relação ao hospedeiro leva a resistência, entretanto os patógenos estão em contínua evolução para quebrar esse mecanismo.

Estudos posteriores não comprovaram que havia ao certo ou somente uma interação direta entre um gene do hospedeiro e do patógeno, levando assim a formulação de outras hipóteses, a exemplo da hipótese guarda. Acredita-se nesta que existe uma interação indireta, ou seja, o reconhecimento ocorre entre o efector do patógeno e uma segunda proteína do hospedeiro denominada *garde*. Essa interação é, por sua vez, percebida pela proteína R (proteína guarda), ativando assim a resistência do hospedeiro (GŁOWACKI; MACIOSZEK; KONONOWICZ, 2011). O que ocorre então, é que a proteína R “guarda” uma segunda proteína denominada “gardee”, a qual é alvo da proteína Avr (MARATHE; DINESH-KUMAR, 2003). Um exemplo disso é o que ocorre com a proteína RPM1 de *A. thaliana*. Esta não interage diretamente com a proteína Avr (avrRPM1) correspondente, em vez disso a proteína RIM4 interage com o avrRPM, gerando uma sinalização para a RPM1 (proteína derivada do gene R) que por sua vez vai desencadear uma resposta de hipersensibilidade. (MACKEY et al., 2002).

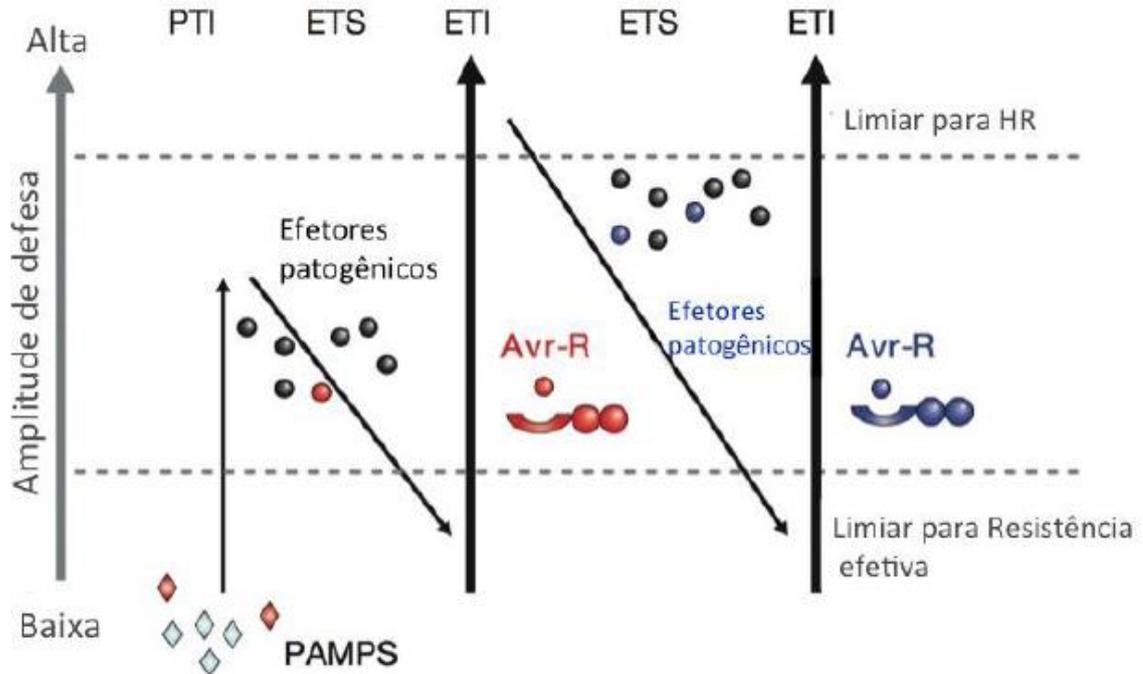
Essa hipótese é considerada plausível para um modelo evolutivo, pois não seria vantajoso para o patógeno ter um alelo de avirulência, com o fim exclusivo de ‘alertar’ o hospedeiro (DE WIT, 2002), mostrando também que a interação planta-patógeno envolve pelo menos mais um gene no hospedeiro. No modelo Decoy, acredita-se também que ocorra uma interação indireta. Neste modelo, em algumas interações planta-patógeno, o hospedeiro produz proteínas específicas, que são similares a alvos de elicitores patogênicos. A única função dessas proteínas *decoy* é de se ligar ao efector e atuar como um mediador nas interações com proteínas R (VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008).

Boyd et al. (2013), com o objetivo de discutir os avanços científicos na compreensão da genética de interações planta-patógeno, mostraram que a atual compreensão das interações planta-patógeno e resistência envolvem duas vias: a planta deve ser capaz de reconhecer e se defender, e o agente deve ser capaz de manipular a defesa da planta para criar um ambiente para seu desenvolvimento, havendo assim uma evolução dos genes para permitir essa comunicação.

Nesse sentido, para Jones; Dangl (2006), o sistema de defesa da planta pode ser representado por um modelo de quatro fases denominado “zig-zag”, (FIGURA 7). A primeira linha de defesa da planta envolve o reconhecimento do patógeno, ou seja, o reconhecimento dos PAMPs, que por sua vez vão desencadear a resposta de defesa do vegetal, a PAMP - triggered immunity (PTI). Se o agente patogênico por sua vez, for capaz de suprimir os componentes da PTI, desencadeia a segunda linha de defesa, gerando assim uma suscetibilidade disparada por efetores (ETS). Se um efector é reconhecido por uma proteína NB-LRR da planta, a ETI é ativada, sendo esta uma amplificação da PTI. A ETI permite a indução da morte celular e resposta de hipersensibilidade, caracterizando a terceira linha de defesa. Os isolados dos

patógenos podem evoluir, perdendo ou ganhando novos efetores, permitindo assim que o mesmo suprima a ETI. Essa seleção favorece novos alelos NB-LRR para reconhecimento dos efetores recém-adquiridos, resultando novamente em ETI (JONES; DANGL, 2006).

Figura 7 – Modelo Zig-Zag do sistema imune em plantas.



Legenda: Na fase 1 as plantas detectam os (PAMPs / mAmps, losangos vermelhos) através dos receptores de reconhecimento padrões (PRRs) para desencadear a imunidade disparada por PAMPs (PTI). Na fase dois os patógenos de sucesso produzem efetores que interferem com a PTI, resultando em suscetibilidade desencadeada por efetores (ETS). Na fase 3, se um efector (indicado em vermelho) é reconhecido por uma proteína da planta NB-LRR, a imunidade disparada por efetores (ETI) é ativada, sendo uma versão amplificada de PTI. Na fase 4, isolados do patógeno podem evoluir, perdendo efetores (em vermelho) ou ganhar novos efetores (em azul), permitindo que o patógeno suprima ETI.

Fonte: Jones e Dangl (2006).

Os genes R reconhecem um grande número de patógenos diferentes, apesar disso compartilham sequências e motivos estruturais que apresentam considerável semelhança o que sugere que as interações proteína-proteína, os componentes de sistemas receptores e a sinalização nas respostas de defesa das plantas sejam semelhantes (MILLER et al., 2008).

2.6 Genes R da família NBS-LRR e Genes Análogos de Resistência (RGA)

Em 1995, Staskawicz já afirmava que a clonagem molecular e estudo dos genes R foram importantes para permitir que as plantas resistissem a uma grande variedade de agentes patogênicos, revelando ainda que as proteínas codificadas por estes genes possuem várias características em comum. Para o autor, na época, esses resultados sugeriam que as plantas podiam ter evoluído mecanismos comuns de transdução de sinal para a expressão de resistência

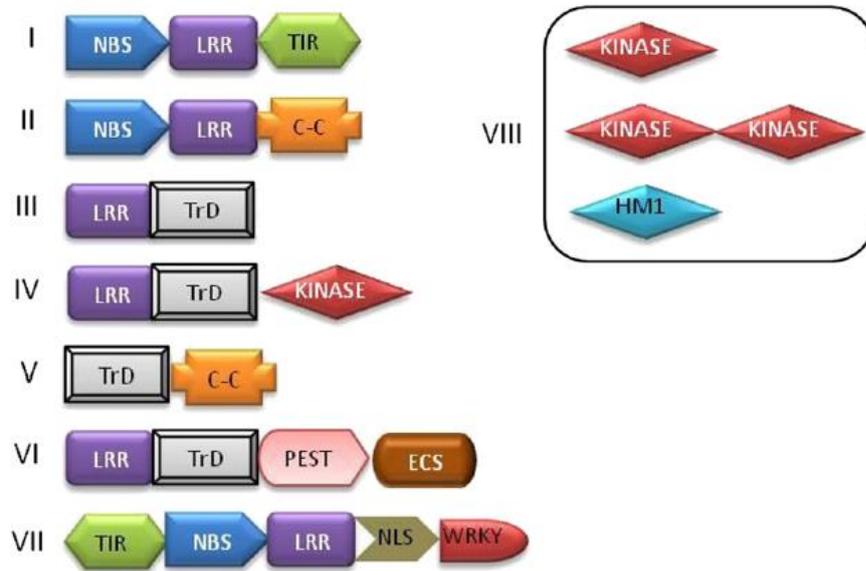
a uma vasta gama de agentes patogênicos não relacionados. Vários estudos atuais confirmam esse pensamento e adicionam que estas características em comum são os domínios conservados. Diversas espécies de plantas codificam proteínas estruturalmente semelhantes, o que sugere um elevado grau de conservação entre as vias que as plantas utilizam para desencadear resposta de defesa (BENT, 1996).

A partir da homologia e função bioquímica dos seus domínios, os produtos proteicos dos genes R puderam ser agrupados em famílias (DANGL; JONES, 2001). Até o momento, pelo menos oito classes de genes R são reconhecidas com base na organização de motivos de aminoácidos conservados e seus domínios de membrana (GURURANI et al., 2012; BOYD et al., 2013) (FIGURA 8). Entretanto, a família NBS-LRR representa o maior grupo de genes de resistência em plantas já clonados (DANGL; JONES, 2001; GUIMARÃES et al., 2005; ROMMENS; KISHORE, 2000). Além disso, a única função relatada para essa família é a resistência a doenças (DANGL; JONES, 2001; MEYERS; KAUSHIK; NANDETY, 2005), levando ao entendimento que a maioria dos genes de resistência em planta pertence a famílias que codificam motivos pertencentes aos domínios NBS e LRR (YAISH; SAENZ DE MIERA; PEREZ DE LA VEGA, 2004).

A família NBS-LRR apresenta duas subclasses, a TIR (*Toll interleucine receptor*) NBS e não TIR NBS baseados em aminoácidos localizados no N terminal (MILLER et al., 2008). O NBS pode estar ligado a um *coiled coil* (CC) no N terminal ou um NLS e WRKY, totalizando assim quatro subfamílias. Sendo, portanto: NBS- LRR com motivo TIR no N- terminal, NBS-LRR com motivo CC no N-terminal, NBS-LRR com N-terminal sem motivo CC e NBS-LRR com motivo TIR no N-terminal, um domínio WRKY (proteína ativadora transcricional) e um domínio NLS (sinal de localização nuclear) (FIGURA 9).

O domínio NBS apresenta motivos altamente conservados, como o P-loop, Kinase-2, GLPL, RNBS-D entre outros (LEE et al., 2003) (FIGURA 10). Já o domínio LRR (repetições ricas em leucina) é localizado no C-terminal e confere resistência a diversos patógenos como bactérias, fungos, vírus e nematoides (ROSSI et al., 1998). O comprimento mais comum de uma LRR é de 24 resíduos, mas *repeats* contendo entre 20 e 29 resíduos também são encontrados. Esse domínio distingue-se por uma sequência consenso que consistem predominantemente de resíduos de leucina (KOBÉ; DEISENHOFER, 1994) e é altamente irregular e variável (BENT, 1996). Essa alta taxa de mutação no LRR contribui para a variabilidade genética necessária para o reconhecimento específico de diversos agentes patogênicos (MILLER et al., 2008).

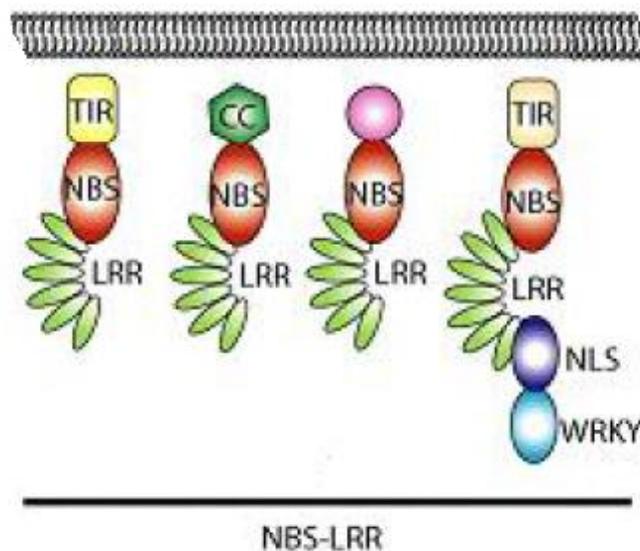
Figura 8 – Principais classes de genes de resistência (R) em plantas baseadas na organização dos domínios funcionais.



Legenda: LRR: repetições ricas em leucina, NBS: sítio de ligação de nucleotídeo, TIR/Toll/ Receptor de interleucina-1, C-C: bobina enrolada (coiled-coil), TrD: domínio transmembrana, PEST: Proteína de domínio de degradação (prolina-glicina-serina treonina), ECS - domínio de sinalização celular de endocitose; NLS - Sinal de localização nuclear; WRKY: domínio de aminoácidos, HM1 - enzima *Helminthosporium carbonum* toxina redutase.

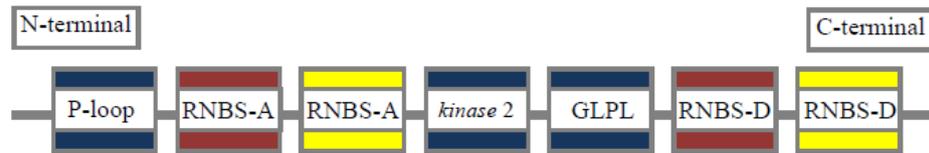
Fonte: Gururani et al. (2012).

Figura 9 – Representação das duas subclasses, a TIR (*Toll interleucine receptor*) NBS e não TIR NBS.



Fonte: Adaptado de Emediato (2009).

Figura 10 – Alguns dos motivos conservados dentro do domínio NBS.



Legenda: Retângulos azuis representam motivos presentes em TIR e não-TIR; retângulos vermelhos os motivos não-TIR e retângulos amarelos os motivos TIR.

Fonte: Emediato (2009).

Amaral et al. (2006) relatam que os produtos do gene NBS- LRR são geralmente compostos por três principais domínios, sendo eles: um domínio N-terminal variável de cerca de 200 aminoácidos, um domínio NBS de 300 aminoácidos e um mais variável, o LRR. Acrescentando ainda que se acredita que o domínio NBS participa da tradução de sinal provocada pelo patógeno, enquanto que o domínio LRR participa no reconhecimento do patógeno. Estudos mostram que os *loci* dessa família podem ser encontrados em *singletons* ou em *clusters* (HOLUB, 2001).

Observa-se pelo exposto que os genes de resistência apresentam similaridades estruturais, especialmente na família NBS-LRR. Dentre deste contexto estão os genes análogos de resistência (RGAs), que apresentam função desconhecida e/ou não validadas, mas que codificam esses motivos conservados (YAISH; SAENZ DE MIERA; PEREZ DE LA VEGA, 2004). Trabalhos baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores (*primers*) degenerados objetivando buscar domínios conservados na família NBS-LRR já resultaram em genes candidatos para resistência em várias culturas (TABELA 2).

O trabalho de Amaral et al., (2006) com objetivo de procurar RGAs em *Carica papaya* L. e *Vasconcellea cauliflora* Jacq. A. DC utilizou três combinações de *primers* degenerados, sendo o *primer* sense com anelamento no motivo P-loop (três variações), combinado com o *primer* antisense no motivo RNBS-D (uma variação); ambos motivos dentro do domínio NBS. Como resultado obteve sucesso em uma combinação de *primers* que foi clonada e sequenciada. O alinhamento múltiplo demonstrou que *C. papaya* compartilha sequências conservadas descritas em genes de resistência.

Os autores realçam que depois de encontrado esse tipo de marcador pode resultar em uma série de aplicações a exemplo de sonda para rastrear genes em bibliotecas de cDNA, marcador em seleção assistida e ainda obter resistência pela superexpressão no genoma da planta. Afirmam ainda que “esforços para encontrar novos análogos de genes de resistência devem continuar, principalmente para fornecer bases para o desenvolvimento de plantas de

mamão transgênicas com resistência a doenças” afirmação que pode, evidentemente, ser estendido para outras culturas.

Tabela 2 – Estudos com a utilização de primers degenerados para a busca de domínios conservados na família NBS-LRR.

| Cultura | Autor |
|----------------|--|
| Batata | LEISTER et al., 1996 |
| Milho | COLLINS et al., 1998 |
| Girassol | GENTZBITTEL et al., 1998 |
| Alface | SHEN et al., 1998 |
| Brassica | JOYEUX et al., 1999 |
| Arroz | MAGO; NAIR; MOHAN, 1999 |
| Feijão | RIVKIN; VALLEJOS; MCCLEAN, 1999 |
| Citros | DENG et al., 2000 |
| Café | NOIR et al., 2001 |
| Grão de Bico | HUETTEL et al., 2002 |
| Uva | DONALD et al., 2002 |
| Trigo | LACOCK et al., 2003 |
| Soja | HE et al., 2003 |
| Maça | LEE et al., 2003 |
| Lentilha | AISH; SÁENZ DE MIERA; PÉREZ DE LA VEGA, 2004 |
| Sorgo | TOTAD; FAKRUDIN; KURUVINASHETTI, 2005 |
| Amendoim | GUIMARÃES et al., 2005 |
| Banana | MILLER et al., 2008 |
| Framboesa | SAMUELIAN et al., 2008 |
| Manga | LEI et al., 2014 |
| Amora-preta | AFANADOR-KAFURI et al., 2015 |
| Ervilha | DJEBBI et al., 2015 |

Fonte: Do autor (2017).

Estes trabalhos, bem como diversos outros empregando RGAs para diferentes espécies, revelam a utilidade desses marcadores em estudos genéticos, evolutivos e de melhoramento visando resistência de plantas a doenças.

RGAs podem também ser identificados em genomas sequenciados com o auxílio de ferramentas de bioinformática (TABELA 3). Uma revisão publicada por Sekhwal et al. (2015), com o objetivo de avaliar os recentes avanços em estudos das estruturas e funções do

RGAs, trouxe essa nova abordagem. O autor relata os vários métodos de bioinformática que tem sido aplicado para identificar RGAs, a exemplo de alinhamento de sequencias utilizando o BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), análise filogenética, análise de motivos e domínios usando ferramentas como Hidden Markov Model (HMM), SMART, Prosite, Pfam e InterProScan5.

Tabela 3 – Estudos com a utilização de ferramentas da bioinformática para a busca de domínios conservados na família NBS-LRR.

| Cultura | Autor |
|--------------------------------|--|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | MEYERS et al., 2003 |
| Arroz | WANG et al., 2004 |
| <i>Medicago truncatula</i> | AMELINE-TORREGROSA et al., 2008 |
| Sorgo | MACE et al., 2014 |
| Tomate | ANDOLFO; JUPE; WITEK, 2014 |
| Trigo, cevada e centeio | BOUKTILA et al., 2014; GU et al., 2015 |
| Mamão | PORTER et al., 2009 |
| Nabo | MUN et al., 2009 |
| Batata | JUPE et al., 2012 |
| <i>Brachypodium distachyon</i> | TAN; WU, 2012 |
| Milho | CHENG et al., 2012 |
| <i>Setaria italica</i> | ZHU et al., 2014 |

Fonte: Do autor (2017).

2.7 Genômica e Fenômica: prospecção e validação de genes

O desenvolvimento tecnológico aplicado a biologia, especialmente com o advento do sequenciamento dos genomas, propiciou um acúmulo extremamente elevado de dados biológicos que em determinado momento não puderam ser mais explorados por ferramentas computacionais não especializadas, surgindo assim a bioinformática. Ficou claro que uso e/ou desenvolvimento de softwares específicos para a análise desse grande volume de dados tornou-se fundamental. Com o avanço da bioinformática foi possível agrupar as informações em um banco de dados disponível para todo o mundo o que facilitou a interligação e desenvolvimento dos estudos. Segundo Prosdocimi (2007), “um banco de dados pode ser considerado uma coleção de dados inter-relacionados, projetado para suprir as necessidades de um grupo específico de aplicações e usuários”.

Avanços nas tecnologias de sequenciamento levaram a uma drástica redução nos custos e também no desenvolvimento de ferramentas que permitem a análise de genomas inteiros. Entretanto, o grande desafio na era pós-genoma é obter anotações de alta qualidade (YANDELL; ENCE, 2012), desse modo o potencial completo das sequências genômicas podem ser dirigidos a estudos funcionais e análise comparativa (LOVELAND et al., 2012).

Tomando-se como exemplo a identificação de RGAs em genomas anotados de plantas, ou em sequências expressas, as etapas para identificação e caracterização desses RGAs seguem basicamente quatro passos: (1) um banco de dados de RGA em plantas, incluindo todas as sequências de genes de plantas e proteínas conhecidas, é gerado; (2) as pesquisas de BLAST contra a base de dados de RGA são realizadas para a identificação de sequências candidatas; (3) usando os RGA candidatos como entrada, diversas ferramentas de software são empregadas para detectar vários domínios e motivos conservados; e (4) um script de classificação é necessário para agrupar os RGA candidatos em classe de acordo com sua estrutura de domínios e motivos ou uma combinação destes (FIGURA 11) (SEKHWAL et al., 2015).

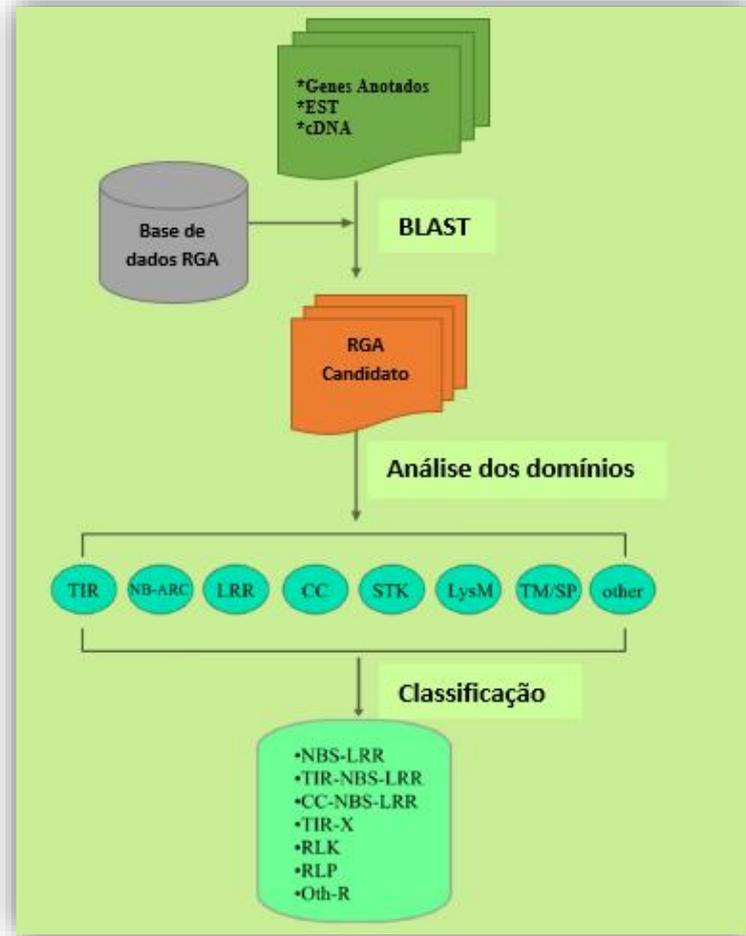
Nota-se pelo exemplo, que a criação dos bancos de dados e o avanço da bioinformática foram fundamentais para automatização dos processos relacionados à pesquisa genética. Do mesmo modo, muitas outras estratégias podem ser usadas a fim de prospectar genes nesses conjuntos de dados. Entretanto, é preciso entender que o desafio central da análise genética moderna é compreender a interação da informação genômica com fatores externos como estresses de origem biótica e abiótica, por exemplo. Esses fatores externos criam um fenótipo interno que inclui propriedades celulares e fisiológicas. Estes fenótipos internos, por sua vez, moldam os fenótipos externos que podem ser mais facilmente medidos com técnicas não invasivas de alto rendimento (GROSSKINSK et al., 2015).

Para entender esse caminho percorrido do genoma até o fenótipo, o conhecimento evoluiu para o que hoje se conhece como a era das ômicas: genômica, transcriptômica, proteômica, metabolômica, fisionômica e fenômica (FIGURA 12). Cada uma delas está relacionada a uma etapa desde o código genético até a manifestação da característica, entretanto todas elas de alguma forma se relacionam com a bioinformática.

A genômica avançou muito nos últimos anos com o desenvolvimento de genotipagem altamente robotizada. Entretanto, a fenotipagem não acompanhou esse avanço, tornando-se um fator limitante das análises genéticas. Para Weber e Broman (2001) era necessário que existisse uma fenotipagem de precisão e em larga escala para que a mesma pudesse ser devidamente associada a informações genômicas. Atualmente, a fenômica ou fenotipagem de próxima

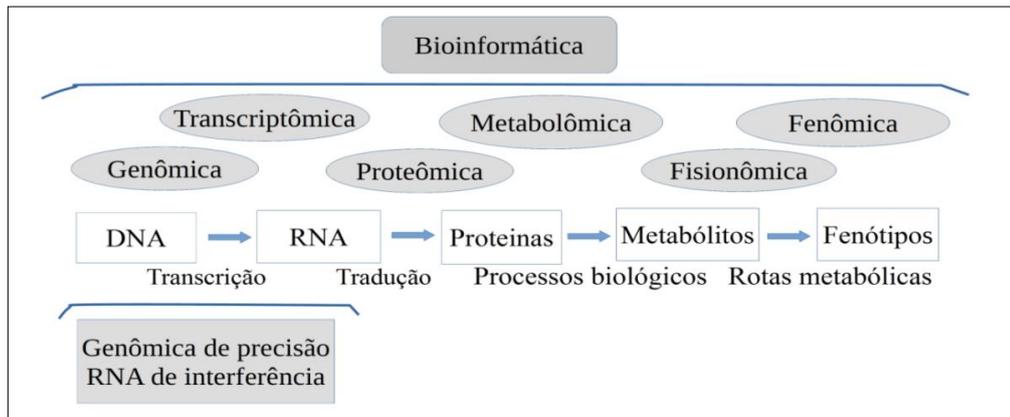
geração (Next Generation Phenotyping) que é a fenotipagem em larga escala e com alta acurácia está em desenvolvimento e traz grandes progressos (COBB et al., 2013).

Figura 11 – Procedimento comum para identificação e caracterização de RGAs em plantas.



Fonte: Adaptado de Sekhwal et al. (2015).

Figura 12 – Trilha das ômicas e as relações entre si com os processos biológicos.



Fonte: Borém e Frische-Neto (2013).

Essa nova abordagem tem surgido para suprir as necessidades dos programas de melhoramento que requerem fenotipagem dos indivíduos em grande escala, precisão, reprodutibilidade e exploração de novas características tanto em condições controladas quanto em campo, diferindo assim das técnicas tradicionais (SOUSA et al., 2015).

Sousa et al. (2015) expõem que existe a proposta de que a fenômica seja associada como um complemento ao sequenciamento do genoma e que o mapa genótipo-fenótipo associado a genótipo-ambiente já está sendo alvo de pesquisas relacionada à tolerância de plantas a estresse abiótico. Entretanto, os autores ainda argumentam que há quem discorde, afirmando que apesar dos avanços já obtidos é preciso um grande desenvolvimento da fenômica para que a mesma alcance o patamar de desenvolvimento obtido pela genômica. Este avanço tem se tornado possível através de estruturas denominadas plataformas de fenotipagem de plantas e que já tem sido explorada em países da Europa, Oceania e nos Estados Unidos da América além de iniciativas na América do Sul incluindo o Brasil.

Dentre as ferramentas utilizadas pela fenômica estão as câmeras digitais para captura e análise de imagens, a exemplo da área foliar; as câmeras de infravermelho, que podem mostrar gradientes de temperatura e que estão diretamente relacionados com a dissipação de energia; o uso de imagens geradas por detectores de fluorescência e índices de concentração de clorofila. O IRGA, *Infrared Gas Analyzer*, por exemplo, foi um dos equipamentos pioneiros; sendo que com o mesmo é possível medir parâmetros como taxa de assimilação líquida de carbono, taxa de fotossíntese e transpiratória (BORÉM; FRISCHE-NETO, 2013).

Mendonça et al. (2010) relatam que características relacionadas à fotossíntese, como por exemplo, a fluorescência da clorofila e o teor de clorofila tem sido utilizada para identificar diferenças em respostas fisiológicas de espécies ou cultivares, sob estresse salino, por diversos autores. Jamil et al. (2007) acrescentam ainda que quando as plantas crescem sob estresse de salinidade, a sua atividade fotossintética diminui levando a um menor conteúdo de clorofila.

Para responder aos estresses abióticos e bióticos as plantas desencadeiam várias respostas, que vão desde alterações na expressão gênica e metabolismo celular até alterações na taxa de crescimento e produção de biomassa (MARTINS et al., 2007). Dessa forma, os bancos de dados disponíveis e as ferramentas de bioinformática representam uma via de prospecção de genes para os diversos tipos de estresses. A fenotipagem, por sua vez, permite que esses genes prospectados sejam melhor validados através da quantificação da expressão da característica de interesse.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As mudanças climáticas globais ocasionadas por ações antrópicas através da liberação deliberada de CO₂ na atmosfera tem sido, em grande parte, devido ao modelo energético utilizado durante os dois últimos séculos. O desenvolvimento de biocombustíveis, como o biodiesel, tem sido uma proposta bem-sucedida para mitigar danos futuros e presentes ocasionados pelo uso desse modelo energético, que é altamente dependente de fontes não renováveis. A diversificação das matérias primas para produção deste biodiesel, proposta pelo PNPB, se constitui também, uma iniciativa de extrema importância, pois possibilita a inclusão de regiões não produtoras de soja, além de gerar maior segurança na produção e mercado por meio da não dependência de um conjunto limitado de matérias primas.

Estudos genéticos que propõem a prospecção de RGAs visam incorporar aos programas de melhoramento da palma de óleo características benéficas, propiciando reduzir prejuízos fortuitos causados por agentes bióticos através da viabilização de cultivares resistentes. Além disso, o uso de genética reversa para a validação de genes candidatos a tolerância/resistência a estresses abióticos e bióticos, necessitam de plantas modelo, que, além das características inerentes a este tipo de planta, apresentem também suscetibilidade aos estresses alvo. É o que propõe os estudos de respostas a estresses em *Setaria viridis*, que dentre as plantas modelos disponíveis é a evolutivamente mais próxima da palma de óleo e de outras espécies bioenergéticas monocotiledôneas, a exemplo da cana de açúcar e da macaúba.

Assim, estudos voltados para características relacionadas à tolerância/resistência a estresses biótico e/ou abióticos buscam viabilizar estratégias de engenharia genética e edição de genes para a agregação de valor a cadeia produtiva da palma de óleo, espécie que apresenta grande potencial para uma maior contribuição na diversificação das matérias primas para a produção de biodiesel.

REFERÊNCIAS

- ABRAPALMA. **Óleo da palma no dia a dia**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/oleo-da-palma-no-dia-a-dia/>>. Acesso em: 6 mar. 2017a.
- ABRAPALMA. **A palma no Brasil e no mundo | ABRAPALMA – Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/a-palma-no-brasil-e-no-mundo>>. Acesso em: 16 fev. 2017b.
- AFANADOR-KAFURI, L. et al. Identifying and Analyzing the Diversity of Resistance Gene Analogs in Colombian *Rubus* Genotypes. **Plant Disease**, v. 99, n. 7, p. 994–1001, jul. 2015.
- AGÊNCIA CÂMARA NOTÍCIAS. **Deputados aprovam aumento de mistura de biodiesel e etanol em combustíveis - Câmara Notícias - Portal da Câmara dos Deputados**. Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/camaranoticias/noticias/politica/472508-deputados-aprovam-aumento-de-mistura-de-biodiesel-e-etanol-em-combustiveis.html>>. Acesso em: 6 mar. 2017.
- AGROANALYSIS. **Mercado & Negócios - Óleo de palma - O crescimento da indústria global**. Disponível em: <<http://www.agroanalysis.com.br/2/2014/mercado-negocios/oleo-de-palma-o-crescimento-da-industria-global>>. Acesso em: 16 fev. 2017.
- AKIRA, R. **fruta palma & palmiste 260**. Disponível em: <<http://www.japudo.com.br/saboaria/introducao/fruta-palma-palmiste-260/>>. Acesso em: 12 mar. 2017.
- ALBUQUERQUE, J. R. T. DE et al. Crescimento inicial e tolerância de cultivares de pepino sob estresse salino. **Revista Brasileira de Agricultura Irrigada**, v. 10, n. 2, p. 486–495, 2016.
- AMARAL, P. DE P. R. et al. Identification and characterization of a resistance gene analog (RGA) from the *Caricaceae* Dumort family. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 28, n. 3, p. 458–462, dez. 2006.
- AMELINE-TORREGROSA, C. et al. Identification and Characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in the Model Plant *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 146, n. 1, p. 5–21, 2008.
- ANDOLFO, G.; JUPE, F.; WITEK, K. Defining the full tomato NB-LRR resistance gene repertoire using genomic and cDNA RenSeq. **BMC plant**, v. 14, n. 1, p. 120, 2014., 2014.
- ANP. Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis - SRP. **Boletim Mensal de Biodiesel**, 2014.
- ANP. Superintendência de Refino, Processamento de Gás Natural e Produção de Biocombustíveis. **Boletim Mensal de Biodiesel**, 2015.
- ARAÚJO, I. M. M. DE et al. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117–129, abr. 2017.
- ARRIFFIN, D.; IDRIS, A.; SINGH, G. Status of Ganoderma in oil palm. In: FLOOD J; BRIDGE PD; HOLDERNESS M. **Ganoderma diseases of perennial**. p. 49–68.

- BARCELOS, E. et al. A cultura do dendê. **Coleção Plantar**, 1995.
- BECK, M. et al. The INs and OUTs of pattern recognition receptors at the cell surface. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n. 4, p. 367–374, ago. 2012.
- BENT, A. F. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. **The Plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1757–1771, out. 1996.
- BESPALHOK, F. J. C.; GUERRA, E. P.; OLIVEIRA, .R. **Melhoramento para resistência a doenças**. Curitiba: UFPR, 2007.
- BLOCK, A. et al. Phytopathogen type III effector weaponry and their plant targets. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 11, n. 4, p. 396–403, ago. 2008.
- BOARI, A. Estudos realizados sobre o amarelecimento fatal do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil. **Embrapa Amazônia Oriental. Documentos**, 2008.
- BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, jun. 2009.
- BORÉM, A.; FRISCHE-NETO, R. Ômicas: abrindo a caixa preta do fenótipo. In: BORÉM, A.; FRISCHE-NETO, R. **Ômicas 360° - Aplicações e Estratégias para o Melhoramento de Plantas**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013. p. 289.
- BOUKTILA, D. et al. Large-scale analysis of NBS domain-encoding resistance gene analogs in *Triticeae*. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 3, p. 598–610, set. 2014.
- BOYD, L. A. et al. Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. **Trends in genetics : TIG**, v. 29, n. 4, p. 233–40, abr. 2013.
- BRASIL. **Lei nº 11.097, Dispõe sobre a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira; altera as Leis nos 9.478, de 6 de agosto de 1997, 9.847, de 26 de outubro de 1999 e 10.636, de 30 de dezembro de 2002; e dá outras providências**. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111097.htm>. Acesso em: 6 mar. 2017.
- BRAZILIO, M. et al. O Dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) - Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos**, v. 2, n. 1, p. 27–45, 2012.
- BRUTNELL, T. P. et al. *Setaria viridis*: a model for C4 photosynthesis. **The Plant cell**, v. 22, n. 8, p. 2537–2544, 2010.
- CAMILLO, J. et al. Reassessment of the Genome Size in *Elaeis guineensis* and *Elaeis oleifera*, and Its Interspecific Hybrid. **Genomics insights**, v. 7, p. 13–22, 2014.
- CARVALHO, E. DE A.; SANTOS, T. DE P. F. DOS. **Doenças da Palma de Óleo no Contexto da Expansão do Cultivo no Estado do Pará**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95012/1/Doc389.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2017.
- CHENG, Y. et al. Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize. **FEBS Journal**, v. 279, n. 13, p. 2431–2443, jul. 2012.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants.

Trends in Plant Science, v. 12, n. 10, p. 444–451, out. 2007.

COBB, J. N. et al. Next-generation phenotyping: requirements and strategies for enhancing our understanding of genotype–phenotype relationships and its relevance to crop improvement. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 126, n. 4, p. 867–887, 8 abr. 2013.

COELHO, J. B. M. et al. Ponto de murcha permanente fisiológico e potencial osmótico de feijão caupi cultivado em solos salinizados. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 7, p. 708–713, jul. 2014.

COLLINS, N. C. et al. The Isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 10, p. 968–978, out. 1998.

COOPER, R. M.; FLOOD, J.; REES, R. W. Ganoderma boninense in Oil Palm Plantations: Current Thinking on Epidemiology, Resistance and Pathology. **The Planter**, v. 87, n. 1024, 2011.

CORLEY, R. H. V; TINKER, P. B. The Classification and Morphology of the Oil Palm. In: CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. **The oil Palm**. 4. ed. Blackwell Science Ltd, 2003. p. 368.

CRUZ, R. P. DA; MILACH, S. C. K. Melhoramento genético para tolerância ao frio em arroz irrigado. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 30, n. 5, p. 909–917, 2000.

DALIO, R. J. D. et al. Efeitos nas interações planta-patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 22, p. 25–68, 2014.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 14 jun. 2001.

DE FRANQUEVILLE, H.; RENARD, J. Improvement of oil palm vascular wilt tolerance—results and development of the disease at the R. Michaux plantation. **Oleagineux (France)**, v. 45, n. 10, p. 399–405, 1990.

DE WIT, P. J. G. M. Plant biology On guard. **Nature**, v. 416, n. 6883, p. 801–803, 25 abr. 2002.

DENG, Z. et al. Cloning and characterization of NBS-LRR class resistance-gene candidate sequences in citrus. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, n. 5, p. 814–822, 10 out. 2000.

DIAS, N. DA S.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na Planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. DA S; LACERDA, C. F. **DE Manejo da salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 22.

DJEBBI, S. et al. Identification and characterization of novel NBS-LRR resistance gene analogues from the pea. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 2, p. 6419–6428, 11 jun. 2015.

DONALD, T. M. et al. Identification of resistance gene analogs linked to a powdery mildew resistance locus in grapevine. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 104, n. 4, p. 610–618, 1 mar. 2002.

DRANSFIELD, J. et al. A new phylogenetic classification of the palm family, Arecaceae. **Kew Bulletin**, v. 60, n. September, p. 559–569, 2005.

- EMBRAPA. **Zoneamento agroecológico do dendezeiro para as áreas desmatadas da Amazônia Legal - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-produtos-processos-e-servicos/-/produto-servico/1248/zoneamento-agroecologico-do-dendezeiro-para-as-areas-desmatadas-da-amazonia-legal>>. Acesso em: 16 fev. 2017.
- EMEDIATO, F. L. **Caracterização de genes análogos de resistência (RGAs) em cultivares de *Musa acuminata* contrastantes em resistência a estresses bióticos**. 2009. 96p. Dissertação (Mestrado em Ciências genômicas e Biotecnologia) Universidade Católica de Brasília, 2009.
- FAO. **Salt-affected soils**. Disponível em: <<http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/>>. Acesso em: 9 fev. 2017.
- FARIAS, M. P. DE. **Caracterização do desenvolvimento floral de *E. oleifera* (H.B.K) Cortés**. 2014. 73 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia vegetal)-Universidade federal de Lavras, 2014.
- FEIJÃO, A. R. et al. Nitrato modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 10–19, 2013.
- FILHO, J. A. F. **Caracterização de sítios polimórficos e sequências repetitivas, e estabelecimento de coleção nuclear de caiaué [*Elaeis oleifera* (kunth) cortés]**. 2015. 113 p. *Dissertação* (Mestrado em Biotecnologia vegetal)-Universidade federal de Lavras, 2015.
- FILHO, R. C.; DIANESE, ÈRICO DE C.; CUNHA, M. G. DA. Aspectos moleculares da interação *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici e o Tomateiro. **Revisão Anual de Patologia de Plantas - RAPP**, v. 23, 2015.
- FLOOD, J. A Review of Fusarium Wilt of Oil Palm Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. elaeidis. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, 2006.
- FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, set. 1971.
- GENTZBITTEL, L. et al. Cloning of molecular markers for disease resistance in sunflower, *Helianthus annuus* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 3–4, p. 519–525, 30 mar. 1998.
- GŁOWACKI, S.; MACIOSZEK, V.; KONONOWICZ, A. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 16, n. 1, p. 1–24, 1 jan. 2011.
- GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, n. 4, p. 414–420, ago. 2006.
- GROSSKINSK, D. K. et al. Plant phenomics and the need for physiological phenotyping across scales to narrow the genotype-to-phenotype knowledge gap. **Journal of Experimental Botany**, v. Vol. 66, n. n° 18, p. 5429–5440, 2015.
- GU, L. et al. Dynamic evolution of NBS–LRR genes in bread wheat and its progenitors. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 290, n. 2, p. 727–738, 5 abr. 2015.
- GUIMARÃES, P. M. et al. Desenvolvimento de marcadores moleculares para análogos a

- genes de resistência em *Arachis* spp. silvestres. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 6, p. 663–667, dez. 2005.
- GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, p. 51–65, 2012.
- HAYASHI, H. et al. Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 12, n. 1, p. 133–42, jul. 1997.
- HE, C.-Y. et al. Isolation and characterization of a full-length resistance gene homolog from soybean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 106, n. 5, p. 786–793, mar. 2003.
- HOLUB, E. B. THE ARMS RACE IS ANCIENT HISTORY IN ARABIDOPSIS, THE WILDFLOWER. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, n. 7, p. 516–527, jul. 2001.
- HUETTEL, B. et al. Resistance gene analogues of chickpea (*Cicer arietinum* L.): isolation, genetic mapping and association with a *Fusarium* resistance gene cluster. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 105, n. 2–3, p. 479–490, 1 ago. 2002.
- JAMIL, M. et al. Salinity reduced growth PS2 photochemistry and chlorophyll content in radish. **Scientia Agricola**, v. 64, n. 2, p. 111–118, 2007.
- JIANG, H.; BARBIER, H.; BRUTNELL, T. Methods for Performing Crosses in em *Setaria viridis* em, a New Model System for the Grasses. **Journal of Visualized Experiments**, n. 80, 1 out. 2013.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 16 nov. 2006.
- JOYEUX, A. et al. Genetic mapping of plant disease resistance gene homologues using a minimal *Brassica napus* L. population. **Genome**, v. 42, n. 4, p. 735–743, ago. 1999.
- JUPE, F. et al. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 75, 2012.
- KOBE, B.; DEISENHOFER, J. The leucine-rich repeat: a versatile binding motif. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 19, n. 10, p. 415–421, out. 1994.
- LACOCK, L. et al. Functional and comparative analysis of expressed sequences from *Diuraphis noxia* infested wheat obtained utilizing the conserved Nucleotide Binding Site. **African Journal of Biotechnology**, v. 2, n. 4, p. 75–81, 30 abr. 2003.
- LAMB, 1989 in: STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5211, p. 661–7, 5 maio 1995.
- LAVIOLA, B.; ALVES, A. Matérias-primas potenciais para a produção de biodiesel: situação atual e perspectivas. **Simpósio Brasileiro de Agropecuária sustentável**, 2011.
- LEE, S.-Y. et al. Comparative analysis of superfamilies of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species. **Molecular genetics and genomics : MGG**, v. 269, n. 1, p. 101–8, abr. 2003.
- LEI, X. et al. Isolation and characterization of NBS-LRR resistance gene analogues from mango. **Biotechnology, biotechnological equipment**, v. 28, n. 3, p. 417–424, 4 maio 2014.

- LEISTER, D. et al. A PCR-based approach for isolating pathogen resistance genes from potato with potential for wide application in plants. **Nature Genetics**, v. 14, n. 4, p. 421–429, dez. 1996.
- LEITE, R. C. DE C.; LEAL, M. R. L. V. O biocombustível no Brasil. **Novos Estudos - CEBRAP**, n. 78, p. 15–21, jul. 2007.
- LOVELAND, J. E. et al. Community gene annotation in practice. **Database**, v. 2012, n. 0, p. bas009-bas009, 20 mar. 2012.
- LOZANO, R. et al. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava genome. v. 16, n. 1, p. 360, 2015.
- MACE, E. et al. The plasticity of NBS resistance genes in sorghum is driven by multiple evolutionary processes. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 253, 26 dez. 2014.
- MACKAY, D. et al. RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 108, n. 6, p. 743–754, 2002.
- MADON, M. et al. Application of flow cytometry for estimation of nuclear dna content in *Elaeis*. **Journal of Oil Palm Research**, v. 20, n. JUNE, p. 447–452, 2008.
- MADUREIRA, J. M.; GUERRA, S. M. G. Programa nacional de produção e uso do biodiesel: divergências sobre os resultados sociais da política de biocombustíveis. **Revista Políticas Públicas**, v. 18, n. 2, p. 659–670, 2014.
- MAGO, R.; NAIR, S.; MOHAN, M. Resistance gene analogues from rice: cloning, sequencing and mapping. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 99, n. 1, p. 50–57, 23 jul. 1999.
- MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–158, 2005.
- MANTRI, N. et al. Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future. In: **Abiotic Stress Responses in Plants metabolism, productivity and sustainability**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 1–19.
- MAPA. **Benefícios ambientais da produção e do uso do biodiesel**. Disponível em: <http://www.bsbios.com/media/adminfiles/relatorio_biodiesel_p_web.pdf>. Acesso em: 16 fev. 2017.
- MARATHE, R.; DINESH-KUMAR, S. P. Plant defense: one post, multiple guards?! **Molecular cell**, v. 11, n. 2, p. 284–6, fev. 2003.
- MARTINS, A. et al. Defesa de plantas: Sinalização química e espécies reativas de oxigênio. **Revista Trópica – Ciências Agrárias e Biológicas V**, v. 1, n. 9, 2007.
- MARTINS, P. K. et al. A simple and highly efficient Agrobacterium-mediated transformation protocol for *Setaria viridis*. **Biotechnology Reports**, v. 6, p. 41–44, 2015.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295–8, 31 out. 1997.
- MENDONÇA, A. V. R. et al. Características fisiológicas de mudas de *Eucalyptus* spp

submetidas a estresse salino. **Ciência Florestal**, v. 20, n. 2, p. 255–267, 30 jun. 2010.

MEYERS, B. C. et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 15, n. 4, p. 809–34, abr. 2003.

MEYERS, B. C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R. S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 129–134, abr. 2005.

MICHEREFF, S. Fundamentos de fitopatologia. **Recife-PE: UFRPE**, 2001.

MILLER, R. N. et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 8, 2008.

MIRANDA, I. P. D. A. et al. Frutos de palmeiras da Amazônia. Presidência da República, Ministério da Ciência e Tecnologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 2001

MORENO, 1984 in: MAIA, P. S. P. **Resistência de genótipos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) ao ataque de *Opsiphanes invirae* Hübner, 1808 (Lepidoptera: nymphalidae) no Estado do Pará**. 2016. 63p. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Estadual Paulista, 2016

MUN, J.-H. et al. Genome-wide identification of NBS-encoding resistance genes in *Brassica rapa*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 282, n. 6, p. 617–631, 17 dez. 2009.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651–681, jun. 2008.

NEPOMUCENO, A. et al. Plantas geneticamente modificadas para tolerância a estresses ebióticos. In: BORÉM, A.; ALMEIDA, G. **Plantas geneticamente modificadas: desafios e oportunidades para regiões tropicais**. p. 390.

NOIR, S. et al. Origin, diversity and evolution of NBS-type disease-resistance gene homologues in coffee trees (*Coffea* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, v. 265, n. 4, p. 654–662, 2001.

OLIVEIRA, A. B. DE; ALENCAR, N. L. M.; GOMES-FILHO, E. Comparison Between the Water and Salt Stress Effects on Plant Growth and Development. **INTECH Open Access Publisher**, 16 jan. 2013.

PEREIRA, V. M. **Diversidade genética e estrutura populacional de *Elaeis oleifera* por meio de dartseq**. 2015. 129 p Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal de Lavras, 2015.

PORTAL BRASIL. **Governo Federal lança Programa de Produção Sustentável de Óleo de Palma**. Disponível em: <<http://www.incra.gov.br/governo-federal-lanca-programa-de-producao-sustentavel-de-oleo-de-palma>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

PORTAL BRASIL. **Aumento do biodiesel no diesel ajudará Brasil a cumprir metas ambientais, afirma Dilma — Portal Brasil**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/governo/2016/03/aumento-do-biodiesel-no-diesel-ajudara-brasil-a-cumprir-metas-ambientais-afirma-dilma>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

PORTER, B. W. et al. Genome-wide analysis of *Carica papaya* reveals a small NBS

resistance gene family. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, n. 6, p. 609–626, 5 jun. 2009.

PROSDOCIMI, F. **Curso online introdução à bioinformática**. Disponível em: <http://www2.bioqmed.ufrj.br/prosdocimi/FProsdocimi07_CursoBioinfo.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2017.

QADOS, A. M. S. A. Effect of salt stress on plant growth and metabolism of bean plant *Vicia faba* (L.). **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, v. 10, n. 1, p. 7–15, 2011.

QI, Y. et al. Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 7, p. 702–708, set. 2011.

RAO, K. M., RAGHAVENDRA, A. S.; REDDY, K. J. **Physiology and molecular biology of stress tolerance in plants**. Springer Science & Business Media, 2006.

RIBEIRO, A. A. et al. Emergência do maracujazeiro-amarelo sob estresse salino em diferentes substratos / emergency of yellow passion fruit under salt stress on different substrates. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 27, 21 mar. 2016.

RIOS, S. DE A. et al. **Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiuaé (*Elaeis oleifera* (H. B. K.) Cortes)**. - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/amazonia-ocidental/busca-de-publicacoes/-/publicacao/949588/recursos-geneticos-de-palma-de-oleo-elaeis-guineensis-jacq-e-caiuae-elaeis-oleifera-h-b-k-cortes>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

RIVAL, A. et al. Comparative flow cytometric estimation of nuclear DNA content in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq) tissue cultures and seed-derived plants. **Plant Cell Reports**, v. 16, n. 12, p. 884–887, 1 out. 1997.

RIVKIN, M. I.; VALLEJOS, C. E.; MCCLEAN, P. E. Disease-resistance related sequences in common bean. **Genome**, v. 42, n. 1, p. 41–7, fev. 1999.

ROMMENS, C. M.; KISHORE, G. M. Exploiting the full potential of disease-resistance genes for agricultural use. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 120–125, abr. 2000.

ROSSI, M. et al. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 17, p. 9750–4, 18 ago. 1998.

ROZZETTO, D. S. **Tolerância ao frio em germoplasma exótico de arroz na fase reprodutiva (*Oryza sativa* L.)**. 2015. 84 p. dissertação (Mestrado em ciências)-Universidade de São Paulo, 2015.

SAMUELIAN, S. K. et al. Isolation and linkage mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and classification among 270 Rosaceae NBS-LRR genes. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 4, p. 881–896, 10 out. 2008.

SEKHWAL, M. K. et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19248–19290, 2015.

SHEN, K. A. et al. Resistance Gene Candidates Identified by PCR with Degenerate Oligonucleotide Primers Map to Clusters of Resistance Genes in Lettuce. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 8, p. 815–823, ago. 1998.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current opinion in plant biology**, v. 6, n. 5, p. 410–7, out. 2003.

SIEBENEICHLER, S. C. et al. Efeitos da baixa temperatura no crescimento e nos teores de açúcares solúveis e de prolina em dois cultivares de feijão. **Revista Ceres**, v. 47, p. 495–510, 2000.

SILVEIRA, J. A G. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. In: **Manejo da salinidade na agricultura: Estudos básicos e aplicados: INCTSal. cap**, v. 11, p. 161-180, 2010.

SINGH, R. et al. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 335–339, 24 jul. 2013a.

SINGH, R. et al. The oil palm SHELL gene controls oil yield and encodes a homologue of SEEDSTICK. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 340–4, 15 ago. 2013b.

SOUSA, C. A. F. DE et al. Nova abordagem para a fenotipagem de plantas: conceitos, ferramentas e perspectivas (New approach for plant phenotyping: concepts, current tools and perspectives). **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 8, n. 0, p. 660–672, 2015.

SOUZA JÚNIOR, M. PD&I em suporte ao melhoramento genético de palma de óleo na Embrapa. **Agroenergia em Revista, (Palma para o dendê)**, n. 2, p. 10–11, 2011.

SRISAWAT, T. et al. Flow cytometric analysis of oil palm: a preliminary analysis for cultivars and genomic DNA alteration. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 645–652, 2005.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógeno. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2010.

STASKAWICZ, B. J. et al. Molecular genetics of plant disease resistance. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5211, p. 661–7, 5 maio 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed.artmed, 2004.

TAN, S.; WU, S. Genome Wide Analysis of Nucleotide-Binding Site Disease Resistance Genes in *Brachypodium distachyon*. **Comparative and Functional Genomics**, p. 1–12, 2012.

THAKUR, P. et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 429–443, 2010.

TOTAD, A. S.; FAKRUDIN, B.; KURUVINASHETTI, M. S. Isolation and characterization of resistance gene analogs (RGAs) from sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). **Euphytica**, v. 143, n. 1–2, p. 179–188, jan. 2005.

TRINDADE, D. Doenças do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: KIMATI, H. ET AL. **Manual de fitopatologia: Volume 2: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres,

1997.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 13, n. 4, p. 459–465, 1 ago. 2010.

UBRABIO. **B20: menos poluição e mais economia - UBRABIO**. Disponível em: <http://www.ubrablo.com.br/1891/noticias/b20menospoluicaoemaiseconomia_251523/>. Acesso em: 16 fev. 2017.

UNIAMERICA. **Estatísticas. Maiores Produtores Mundiais de Óleo de Palma: 2000 – 2010**. Disponível em: <http://www.uniamericabrasil.com.br/portugues/estatisticas_2.php>. Acesso em: 16 fev. 2017.

VAN DER HOORN, R. A. L.; KAMOUN, S. From Guard to Decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. **The Plant cell**, v. 20, n. 8, p. 2009–17, ago. 2008.

VARGAS, L. H. G. **Prospecção de Gens de Tecido Específico e Metabólitos em *Elaeis spp.*** 2014.139 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Vegetal)-Universidade Federal de Lavras, 2014.

VIÉGAS, I. DE J. M.; MÜLLER, A. A. **A cultura do dendezeiro na amazônia brasileira**. Belém: Embrapa, 2001.

WANG, D.; SHANNON, M. C.; GRIEVE, C. M. Salinity reduces radiation absorption and use efficiency in soybean. **Field Crops Research**, v. 69, n. 3, p. 267–277, 2001.

WANG, Y. et al. Genome-wide identification of NBS genes in japonica rice reveals significant expansion of divergent non-TIR NBS-LRR genes. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 271, n. 4, p. 402–415, 1 maio 2004.

WEBER, J. L.; BROMAN, K. W. Genotyping for human whole-genome scans: past, present, and future. **Advances in genetics**, v. 42, p. 77–96, 2001.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**, v. 6, n. 11, 2010.

XIANMIN, D. et al. Initiation of *Setaria* as a model plant. **Frontiers of Agricultural Science and Engineering**, v. 1, n. 1, p. 16, 2014.

XIN, Z.; BROWSE, J. Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. **Plant, Cell and Environment**, v. 23, n. 9, p. 893–902, set. 2000.

YADAV, S. K. Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 30, n. 3, p. 515–527, set. 2010.

YAISH, M. W. .; SAENZ DE MIERA, L. E. S. DE; PEREZ DE LA VEGA, M. Isolation of a family of resistance gene analogue sequences of the nucleotide binding site (NBS) type from *Lens* species. **Genome**, v. 47, n. 4, p. 650–659, ago. 2004.

YANDELL, M.; ENCE, D. A beginner's guide to eukaryotic genome annotation. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 5, p. 329–342, 18 abr. 2012.

YI, L.; MA, J.; LI, Y. Impact of salt stress on the features and activities of root system for three desert halophyte species in their seedling stage. **Science in China Series D: Earth**

Sciences, v. 50, n. S1, p. 97–106, jun. 2007.

YOSHIDA, S. **Fundamentals of Rice Crop Science - Shouichi Yoshida - Google Livros**. The international rice research institute, 1981.

ZHANG, J.; ZHOU, J.-M. Plant Immunity Triggered by Microbial Molecular Signatures. **Molecular Plant**, v. 3, n. 5, p. 783–793, set. 2010.

ZHU, Y. B. et al. Bioinformatic analysis of the nucleotide binding site-encoding disease-resistance genes in foxtail millet (*Setaria italica* (L.) Beauv.). **funpecrp.com.br Genetics and Molecular Research Genet. Mol. Res**, v. 13, n. 133, p. 6602–6609, 2014.

CAPÍTULO 2

Avaliação de *Setaria viridis* (acesso A10.1) como potencial planta modelo para a validação de genes de tolerância a estresses abióticos

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar se o acesso A10.1 de *Setaria viridis* é tolerante ou não à salinidade, bem como às baixas temperaturas do ar, buscando subsidiar futuros estudos relativos à utilização dessa espécie como planta-modelo para a validação de genes de tolerância a tais estresses. Inicialmente, sementes de *S. viridis* foram submetidas à germinação em meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl (0, 30, 60, 90, 120, 150 mM). As plântulas resultantes foram mantidas no meio usado para germinação durante os estádios iniciais de desenvolvimento. Em outro experimento, plantas no 2º estágio de desenvolvimento foram submetidas a estresse salino mediante adição de quantidades crescentes de NaCl (0, 2, 4, 6, 8 e 10 g/dm³) ao substrato. Observou-se que a germinação das sementes foi pouco afetada pelo NaCl, caindo de 98% no controle para 89 e 82% em 120 e 150 mM de NaCl, respectivamente. Houve uma relação praticamente linear entre o aumento na concentração de NaCl e a redução na área foliar e nos valores das variáveis morfológicas das raízes. As plântulas mantidas sob 150 mM de NaCl apresentaram, em média, apenas 8% da área foliar das plantas-controle. As variáveis radiculares mais negativamente afetadas foram volume, comprimento por volume e comprimento, com uma queda de 88,73; 86,01 e 77,78%, respectivamente. Já o diâmetro foi o menos afetado, apresentando uma queda de apenas 15,94%. Quando o NaCl foi aplicado no 2º estágio de desenvolvimento, houve redução no tamanho das plantas à medida em que se aumentou a quantidade de NaCl até 6 g/dm³; nas concentrações acima deste valor (8 e 10 g/dm³), todas as plantas morreram. Apenas as plantas submetidas a 6 g/dm³ de NaCl sofreram redução tanto na taxa de assimilação líquida de CO₂ quanto no ICC; porém, todas as plantas que receberam NaCl, independentemente da quantidade, sofreram redução nas taxas de condutância estomática e transpiração. A concentração interna de CO₂ (*C_i*) apresentou os valores mais altos nas plantas-controle e os menores valores foram observados nas plantas submetidas às menores quantidades de NaCl. À medida que se aumentou a quantidade de NaCl, houve, também, aumento em *C_i*, de forma que em 6 g/dm³ de NaCl, os valores de *C_i* não diferiram estatisticamente do controle. Para o estresse de frio, plantas no 3º e 5º estágio de desenvolvimento foram submetidas a 10°C durante seis dias, posteriormente retornando à 25°C. Estas plantas sofreram redução nas taxas de assimilação líquida de CO₂, condutância estomática ao vapor d'água e transpiração, em ambos os estádios de desenvolvimento; por outro lado a concentração interna de CO₂ praticamente dobrou. Após o retorno a 25°C, as plantas do 3º estágio recuperaram as taxas de trocas gasosas mais rapidamente do que as no 5º estágio. A massa da parte aérea obtida ao final do ciclo não diferiu entre os tratamentos, independentemente do estágio no qual o estresse foi aplicado. A produção de sementes, por sua vez, foi negativamente afetada pelo frio, mas somente quando o mesmo foi aplicado no 5º estágio de desenvolvimento.

Palavras-chave: Salinidade, frio, fenotipagem, fenômica, germinação de sementes.

ABSTRACT

The objective of this work was to determine if the A10.1 access of *Setaria viridis* is tolerant or not to the salinity, as well as the low air temperatures, seeking to subsidize future studies regarding the use of this species as a model plant for the validation of tolerance genes to such stresses. Initially, *S. viridis* seeds were submitted to germination in culture medium with different concentrations of NaCl (0, 30, 60, 90, 120, 150 mM). The resulting seedlings were maintained in the medium used for germination during the early stages of development. In another experiment, plants in the second development stage were subjected to saline stress by adding increasing amounts of NaCl (0, 2, 4, 6, 8 and 10 g/dm³) to the substrate. It was observed that seed germination was slightly affected by NaCl, decreasing from 98% in control to 89 and 82% in 120 and 150 mM NaCl, respectively. There was a practically linear relationship between the increase in NaCl concentration and the reduction in leaf area and the values of the roots morphological areas. Seedlings kept under 150 mM NaCl presented, on average, only 8% of the leaf area of the control plants. The most negatively affected root variables were volume, length by volume and length, with a fall of 88,73; 86,01 and 77,78%, respectively. The diameter was the least affected, with a drop of only 15,94%. When NaCl was applied in the 2nd development stage, there was a reduction in the size of the plants as the amount of NaCl increased up to 6 g/dm³; at concentrations above this value (8 and 10g/dm³), all plants died. Only the plants submitted 6 g/dm³ of NaCl have suffered reduction in both the net assimilation rate of CO₂ and in the ICC; however, all the plants that have received NaCl, independently of the quantity, suffered a reduction in the rates of stomatal conductance and transpiration. The internal CO₂ concentration (*C_i*) presented the highest values in the control plants and the lowest values were observed in the plants submitted to the lowest amounts of NaCl. As the amount of NaCl increased, there was also an increase in *C_i*, so that at 6 g/dm³ NaCl, the *C_i* values did not differ statistically from the control. For cold stress, plants in the 3rd and 5th stages of development were submitted to 10°C for six days, then returning to 25°C. These plants suffered a reduction in the rates of CO₂ net assimilation, stomatal conductance to water vapor and transpiration, at both stages of development; on the other hand the internal concentration of CO₂ practically doubled. After returning to 25°C, the plants of the 3rd stage recovered gas exchange rates faster than those in the 5th stage. The aerial part mass obtained at the end of the cycle did not differ between treatments, independently of the stage at which stress was applied. Seed production, in turn, was negatively affected by the cold, but only when it was applied in the 5th stage of development.

Keywords: Salinity, cold, phenotyping, phenomics, seeds germination.

1 INTRODUÇÃO

Os estresses abióticos, de maneira geral, acarretam grandes perdas à agricultura mundial. Alta salinidade, seca, frio, e calor, influenciam negativamente a sobrevivência, produção de biomassa e rendimento das principais culturas em até 70% (MANTRI et al., 2012). A salinidade é um dos estresses abióticos mais preocupantes. Estima-se que mais de 6% dos solos do mundo sejam afetados pela salinidade (MUNNS; TESTER, 2008). O uso de água com quantidades consideráveis de sais e o uso excessivo de fertilizantes são as principais causas desse problema (PEDROTTI; CHAGAS; RAMOS, 2015). Estimativas da FAO (2017), indicam que, dos atuais 230 milhões de hectares de terras irrigadas, 45 milhões são afetados pelo excesso de sal, o que corresponde a 19,5%.

A salinidade faz com que as forças de retenção de água no solo sejam maiores do que as forças responsáveis pelo processo de absorção de água pelas raízes (DIAS; BLANCO, 2010), o que ocasiona uma redução do potencial osmótico levando inicialmente a um estresse por déficit hídrico. Posteriormente, se a planta não conseguir compartimentalizar as excessivas quantidades de sal que entram no citoplasma, este pode alcançar níveis tóxicos e, conseqüentemente, causar a senescência prematura das folhas mais velhas. A senescência foliar, por sua vez, poderia reduzir a área foliar fotossintética da planta e afetar o crescimento drasticamente (MUNNS, 2002).

As plantas sensíveis à salinidade se caracterizam por não suportarem o déficit hídrico ocasionado pela redução do potencial osmótico e as altas taxas de íons no citoplasma. Por outro lado, as plantas tolerantes são capazes de abrigar maiores quantidades de íons no citoplasma, diminuindo o efeito tóxico do mesmo e permitindo um gradiente osmótico mais favorável para absorção de água pelas raízes (GUPTA; HUANG, 2014). Essa tolerância pode estar relacionada a genes únicos responsivos, ligados a mecanismos bioquímicos e moleculares para tolerar o estresse salino, os quais estariam ausentes em plantas sensíveis (PARIHAR et al., 2015).

Além das altas taxas de salinidade dos solos, as baixas temperaturas restringem o cultivo de espécies sensíveis ao frio em muitas regiões. Apenas um terço da área total de terra está livre de gelo, e cerca de 42% apresentam quedas regulares de temperaturas abaixo de 20°C (JUNTTILA; ROBBERECHT, 1999). Na Região sul do Brasil, as temperaturas podem chegar abaixo de 0°C, acompanhada de geadas (NERY, 2005), o que dificulta o cultivo da cana de açúcar, por exemplo, espécie que apresenta grande demanda para a produção de biocombustíveis. Além da cana de açúcar, culturas importantes como arroz, milho, soja,

algodão e tomate, também, são sensíveis ao resfriamento e incapazes de tolerar a formação de gelo em seus tecidos (CHINNUSAMY; ZHU; ZHU, 2007).

As baixas temperaturas do ar causam redução nas taxas metabólicas, diminuição na fluidez das membranas celulares, danos aos cloroplastos e às moléculas de clorofila, reduzindo assim a taxa fotossintética (CRUZ et al., 2010; STHAPIT; WITCOMBE; WILSON, 1995). Pode ocorrer, ainda, atraso na taxa de desenvolvimento diário das folhas e floração, abscisão das flores, esterilidade do pólen e diminuição no rendimento dos frutos (THAKUR et al., 2010). A variação no nível de tolerância ao frio é geneticamente determinada, bem como influenciada pela intensidade e duração do estresse, além do estágio de desenvolvimento da planta no momento da exposição (JANSKÁ et al., 2010).

A compreensão dos mecanismos pelos quais as plantas percebem os sinais ambientais para ativar respostas adaptativas é de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias de melhoramento e transgenia, pelo fato dos mesmos estarem diretamente ligados a genes de adaptação ao estresse (MANTRI et al., 2012). Dessa forma, iniciativas que visem o melhoramento genético para tolerância a estresses abióticos viabilizam o cultivo de espécies em áreas originalmente consideradas inapropriadas, permitindo a expansão das áreas agrícolas, utilizando estas espécies.

Devido a aspectos biológicos favoráveis, a *Setaria viridis* vem sendo estudada para se tornar uma planta modelo para validação desses genes de tolerância a estresses (JIANG; BARBIER; BRUTNELL, 2013). Entretanto, para que seja utilizada em estudos de validação de genes, é necessário que, além de características inerentes a uma planta modelo, a *S. viridis* apresente suscetibilidade aos estresses alvo. Considerando que a adaptação ao estresse está relacionada à capacidade das plantas de manter níveis metabólicos que permitam a realização de mecanismos fisiológicos vitais, mesmo em condições desfavoráveis, parâmetros como a taxa de fotossíntese e transpiração, concentração intracelular de CO₂, concentração de clorofila, área foliar, biomassa e morfologia de raiz são capazes de caracterizar as respostas das plantas ao estresse e, conseqüentemente, separar plantas tolerantes das sensíveis (FERRAZ et al., 2012; SILVA et al., 2011).

Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi determinar por meio de dados fenotípicos o grau de susceptibilidade de *S. viridis* (acesso A10.1) ao excesso de sais no substrato, bem como às baixas temperaturas do ar, buscando subsidiar os estudos relativos à utilização dessa espécie como planta modelo para a validação de genes de tolerância ao estresse salino e/ou ao frio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de *Setaria viridis*

Sementes de *S. viridis* (acesso A10.1) foram submetidas à quebra de dormência pelo tratamento com ácido sulfúrico (1000 μM) por 15 minutos. Após a remoção do ácido sulfúrico pelo enxague exaustivo em água destilada, as sementes foram submetidas à desinfecção em solução com hipoclorito de sódio (2%) e Tween 20[®] (0.1%). Em seguida, as sementes foram secas em papel de filtro estéril e transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura com diferentes concentrações de NaCl.

Utilizou-se o meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) a 1/2 força e pH 5,8 para a germinação das sementes. No seu preparo, foram adicionados os seguintes produtos, nas seguintes quantidades: 2,15 g.L⁻¹ de meio MS, 1 ml.L⁻¹ de vitaminas, 20 g.L⁻¹ de sacarose, 2,0 g.L⁻¹ de Phytigel, e 100 mg.L⁻¹ de inositol. Tomaram-se alíquotas com volume padronizado do meio MS, às quais foram acrescentadas quantidades crescentes de NaCl, de forma a se obter concentrações salinas de 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM. As alíquotas salinizadas foram autoclavadas por 20 minutos e, por fim, distribuídas em placas de Petri.

Para este ensaio foram utilizadas quatro placas de Petri para cada concentração salina e semeadas 20 sementes em cada uma delas. Um total de 24 placas de Petri contendo sementes foram acondicionadas em uma câmara de crescimento Conviron[®] modelo Adaptis 1000TC (Controlled Environments Inc., Winnipeg, Canada) e mantidas sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luz de $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Esse ensaio foi repetido por duas vezes.

A taxa de germinação das sementes foi avaliada sete dias após o semeio. Foram consideradas germinadas as sementes que originaram plântulas compostas de parte aérea e sistema radicular. Aos nove dias após o semeio, determinou-se a área foliar e variáveis relacionadas à morfologia do sistema radicular das plântulas.

A área foliar das plântulas foi determinada por meio da técnica de fluorescência de clorofila por imagem, utilizando-se um fluorômetro Walz modelo IMAGING-PAM versão Maxi (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha). Para isso, as plântulas foram previamente mantidas no escuro por 30 minutos e, em seguida, submetidas a uma rotina que mede, inicialmente a fluorescência inicial (F_0), com a menor intensidade luminosa possível, e a fluorescência máxima (F_m), a partir de um pulso de luz saturante ($2800 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). O software Imaging Win, que controla o equipamento, permite a determinação da área que gera

um sinal de fluorescência a partir da imagem de qualquer parâmetro. Para as plântulas de *S. viridis*, a área foliar foi estimada a partir da área de emissão do sinal de fluorescência máxima (Fm). O cálculo da área é independente da concentração de clorofila e da intensidade do sinal de fluorescência.

Para a determinação das variáveis relacionadas à morfologia do sistema radicular, utilizou-se o sistema de escaneamento de raízes Regent *WinRHIZO* v. 4.0 (Regent Systems, Quebec, Canadá), acoplado a um *scanner* profissional Epson XL 10000, equipado com unidade de luz adicional (TPU). As raízes foram dispostas em uma cuba de acrílico de 20x30 cm (de comprimento) contendo uma lâmina de água. As imagens geradas foram avaliadas em duas plantas por placa, determinando-se as seguintes variáveis: comprimento total de raízes (cm), área projetada total (cm²), área superficial total (cm²), diâmetro médio (mm), comprimento por volume (cm/m³) e volume das raízes (cm³).

2.2 Efeito do estresse salino sobre plantas de *Setaria viridis* (acesso A10.1) no 2º estágio de desenvolvimento

Inicialmente, foi conduzido um ensaio preliminar com o objetivo de se determinar o tempo necessário para que o sal adicionado ao substrato entrasse em equilíbrio com a solução. Este período de tempo pode ser considerado como o período mínimo necessário de incubação, a partir do qual a medida de condutividade elétrica (CE), com base no extrato de saturação, estabiliza-se no meio. Para a realização desse ensaio, foram preparadas soluções com as seguintes concentrações salinas: 0, 30, 60, 90, 120 e 150 mM de NaCl, em cinco repetições. Determinou-se a CE de cada uma dessas soluções.

A seguir, aplicou-se ao substrato uma quantidade padrão de cada solução salina, suficiente para alcançar a máxima capacidade de retenção de água (capacidade de campo). O substrato foi mantido em câmara de crescimento Conviron® modelo PGW40 (Controlled Environments, Winnipeg, Canada), sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60%, e intensidade de luz de 500 μmol m⁻²s⁻¹, com monitoramento diário do peso visando reposição da água evaporada. A reposição foi feita com água destilada, retornando o vaso com o substrato ao seu peso original. A retirada da solução do substrato para as medições de CE foi realizada com o auxílio de uma bomba de vácuo Büchi® modelo V-700 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estado Unidos da América).

Após o ensaio preliminar, para o experimento que veio a seguir, as sementes de *S. viridis* (acesso A10.1) foram submetidas à quebra de dormência, esterilização, secagem e semeio

conforme descrito no item 2.1, sem adição de NaCl ao meio. Foram semeadas 20 sementes em cada placa de Petri, as quais foram acondicionadas em uma câmara de crescimento Conviron® modelo Adaptis 1000TC (Controlled Environments Inc., Winnipeg, Canada) e mantidas sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$ e intensidade de luz de $150\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

Sete dias após o semeio, as plântulas originadas foram transplantadas individualmente para vasos de 0,2 L contendo 100 g de substrato e, depois, estas plantas foram cultivadas em uma câmara de crescimento Conviron® modelo PGW40 (Controlled Environments, Winnipeg, Canada) sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60% e intensidade de luz de $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

O substrato utilizado para este experimento foi preparado mediante mistura de terra, substrato comercial (Bioplant® - www.bioplant.com.br) e vermiculita, na proporção (2:1:1; v/v/v). Antes da mistura, a vermiculita e o substrato comercial foram autoclavados por 30 minutos, e a terra esterilizada em 121°C a 1 atm por 30 minutos.

Quando as plântulas atingiram o segundo estágio de desenvolvimento, aos sete dias após o transplante (14 dias após a semeadura) (MARTINS et al., 2016), foram submetidas a diferentes quantidades de NaCl no substrato: controle (sem NaCl), tratamento 1 (0,2 g), tratamento 2 (0,4 g), tratamento 3 (0,6 g), tratamento 4 (0,8 g), tratamento 5 (1,0 g), sendo utilizadas 10 plantas para cada tratamento. Vasos contendo a mesma quantidade de substrato, porém sem plantas, também receberam as mesmas quantidades de NaCl, no total de cinco vasos por tratamento. O objetivo foi de estimar a quantidade do sal em solução que poderia ser removido pelas plantas.

A adição de NaCl foi realizada através da dissolução do mesmo na quantidade de água suficiente apenas para atingir a capacidade de campo (100% de retenção de água), com base no peso do vaso. Durante todo o experimento, a reposição de água em cada vaso foi realizada de forma que retornasse ao peso inicial na capacidade de campo. O mesmo ocorreu com os vasos que continham apenas substrato, sem plantas. O ensaio foi conduzido durante 12 dias.

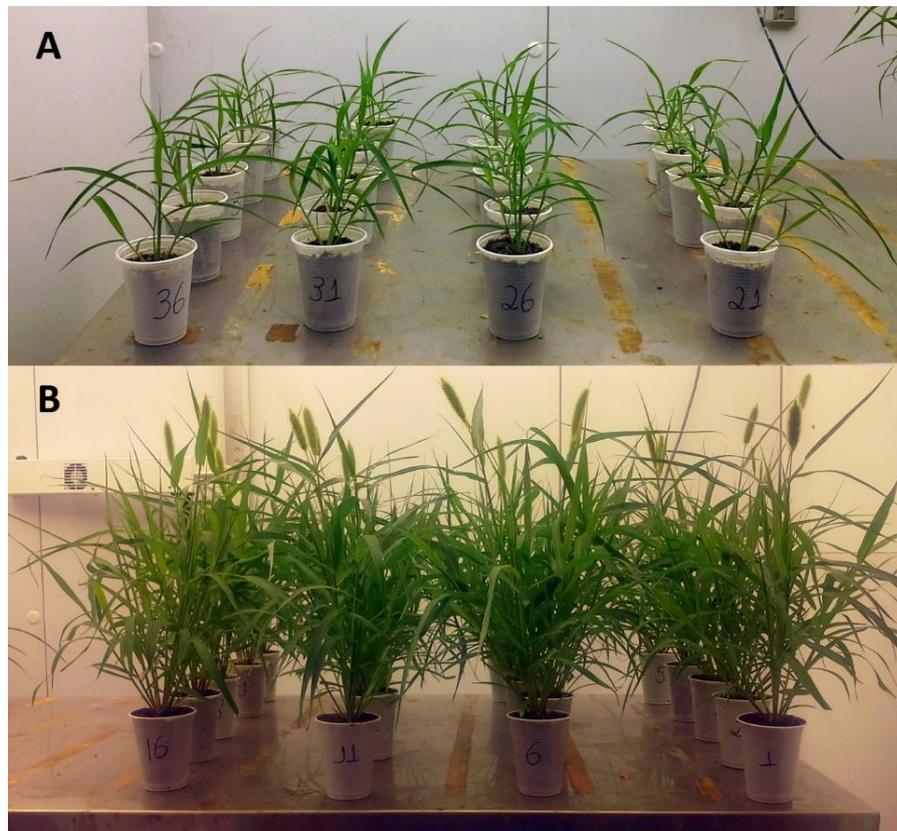
Oito dias após a aplicação do sal no substrato, foram coletadas duas plantas de cada tratamento para a determinação do peso, o qual foi adicionado ao peso final do vaso, visando corrigir o cálculo da quantidade diária de água necessária para fazer com que o substrato retornasse a 100% da capacidade de campo.

2.3 Efeito do estresse por frio sobre plantas jovens e adultas de *Setaria viridis*

Sementes de *S. viridis* (acesso A10.1) foram submetidas à quebra de dormência, esterilização, secagem, semeio e germinação, conforme descrito no item anterior. Foram semeados dois grupos de sementes, com um intervalo de 14 dias. Sete dias após a germinação, as plântulas foram transplantadas para vasos com capacidade de 0,2 L, contendo 120 g de substrato. Estas foram cultivadas em uma câmara de crescimento Conviron® modelo PGW40 (Controlled Environments, Winnipeg, Canada), sob fotoperíodo de 16/8 horas (luz/escuro), temperatura de $25\pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 60%, e intensidade de luz de $500\ \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, até o início do estresse.

Aos 15 e 29 dias após o transplântio (15 e 29 DAT), quando se encontravam no 3° e 5° estágio de desenvolvimento (MARTINS et al., 2016) respectivamente (FIGURA 1), 15 plantas foram submetidas ao frio. Enquanto que cinco plantas, nos mesmos estágios de desenvolvimento, permaneceram sob condição de cultivo (controle). Para a submissão ao frio, as plantas, previamente cultivadas a $25\pm 2^\circ\text{C}$, foram submetidas a uma queda gradual na temperatura (1°C a cada 4 minutos) do ar da câmara de crescimento até atingir 10°C , permanecendo assim por seis dias. As demais variáveis ambientais, tais como temperatura, umidade relativa e intensidade luminosa não sofreram alterações.

Figura 1 – Estádios de desenvolvimento das plantas de *Setaria viridis* (acesso A10.1) imediatamente antes da submissão ao estresse por frio.



Legenda: (A) plantas aos 15 dias após o transplante (15 DAT, 3º estágio) e (B) plantas aos 29 dias após o transplante (29 DAP, 5º estágio).

Fonte: Do autor (2017).

2.4 Avaliação das plantas submetidas aos estresses salino e frio e análises estatísticas dos dados

Durante o período experimental no qual as plantas foram submetidas ao estresse salino, retiraram-se amostras da solução do substrato em cada vaso, com e sem plantas, com o auxílio de uma bomba de vácuo Büchi® modelo V-700 (Sigma-Aldrich, Missouri, Estado Unidos da América). Nessas amostras foram determinadas a condutividade elétrica e o potencial hídrico, utilizando-se um condutímetro Hanna modelo HI98311 (Hanna Instruments, Rhode Island, Estados Unidos) e um medidor de potencial hídrico Decagon modelo WP4C (Decagon Devices, Pullman, Estado Unidos), respectivamente. As medidas foram realizadas no final do experimento, para os vasos com plantas, e quatro dias após a adição do sal, para os vasos contendo apenas substrato.

A avaliação das plantas sob estresse salino e frio ocorreu basicamente pela medição das trocas gasosas, utilizando-se o analisador de gases por infravermelho (IRGA) LI-COR modelo

6400XT (LI-COR, Nebraska, EUA). A radiação fotossinteticamente ativa foi configurada para $1,500 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, o CO_2 no interior da câmara foi mantido em torno de $400 \mu\text{mol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ e a temperatura foi fixada em 25°C . Para o experimento de estresse de frio a temperatura da câmara foi fixada em 10°C . Procedeu-se à determinação das seguintes variáveis: *A* - Taxa de assimilação líquida de CO_2 ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$); *g_s* - taxa de condutância estomática ao vapor d'água ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$); *E* - taxa de transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$); e *C_i* - concentração intracelular de CO_2 ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{mol}^{-1}$). As avaliações foram realizadas na folha mais jovem completamente expandida.

Nas plantas submetidas ao estresse salino, no 2º estágio de desenvolvimento, além das trocas gasosas, foi também avaliado o índice de concentração de clorofila na folha mais jovem completamente expandida. Essa medição foi feita por meio do clorofilômetro portátil (modelo CCM-200, Opti-Science). Foram realizadas cinco leituras em uma área pré-determinada da folha. As duas leituras mais discrepantes foram excluídas, sendo utilizadas apenas as três leituras restantes para o cálculo da média.

Para o experimento de estresse salino, no 2º estágio de desenvolvimento, as plantas foram medidas apenas ao final do experimento, ou seja, doze dias após o início do estresse. No experimento de estresse de frio foram realizadas oito avaliações, sendo a primeira quando as plantas-controle e aquelas que seriam submetidas ao frio ainda se encontravam na temperatura normal de cultivo (Dia 1). Depois, foram realizadas mais seis medições diárias durante o período de estresse, iniciando-se a partir do dia 3, após o início do tratamento por frio. Por fim, a oitava avaliação, foi realizada durante o período de recuperação, dois dias após o aumento da temperatura para 25°C .

A parte aérea e as sementes das plantas foram colhidas separadamente, aos 52 dias após o transplântio. Depois, foram secas em estufa a 72°C , com ventilação forçada, até a obtenção de massa constante e, em seguida, pesadas, para a determinação da massa seca. O peso de toda a estrutura da inflorescência madura foi tomado como o peso das sementes.

Os dados de germinação foram submetidos à análise de variância utilizando o delineamento em blocos casualizados com quatro repetições. Cada ensaio, separadamente, foi considerado como um bloco. Os dados do experimento de salinidade no 2º estágio de desenvolvimento foram submetidos à análise de variância utilizando o delineamento inteiramente casualizado. As médias de ambos os experimentos foram comparadas pelo teste Tukey ($\alpha: 0,05$), utilizando o programa estatístico Assistat versão 7.7 (SILVA, 2014). Os dados de área foliar e parâmetros de raiz foram submetidos à análise de regressão linear com o uso da função abline do software R (R CORE TEAM, 2017).

Para avaliação dos dados de frio, sortearam-se cinco plantas dentre as quinze submetidas ao estresse. Os dados de trocas gasosas mensurados neste ensaio foram plotados em gráficos utilizando o software R (R CORE TEAM, 2017). Os dados de biomassa da parte aérea e das sementes nos dois estádios de desenvolvimento foram submetidos à análise de variância, considerando-se o delineamento experimental inteiramente casualizados com repetições, sendo cinco repetições no controle e cinco repetições no tratamento. As médias foram comparadas pelo teste Tukey (α : 0,05).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes, desenvolvimento inicial de plântulas e 2º estágio de desenvolvimento da *Setaria viridis* (acesso A10.1)

De maneira geral, o aumento da concentração salina no substrato, em maior ou menor grau, alterou as respostas das variáveis medidas, tanto relativas à germinação das sementes quanto ao desenvolvimento inicial das plântulas de *S. viridis*. Ocorreu uma alta percentagem de germinação das sementes tanto no controle quanto nos tratamentos em que a concentração salina atingiu até 90 mM de NaCl. A partir de 120 mM de NaCl no substrato, a percentagem de germinação das sementes foi reduzida. Enquanto o controle apresentou 98% de germinação, as sementes mantidas em meio com concentrações salinas de 120 e 150 mM de NaCl apresentaram percentagem de germinação de 89 e 82%, respectivamente (TABELA 1).

Tabela 1 - Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre a germinação das sementes de *S. viridis* sob diferentes concentrações de NaCl.

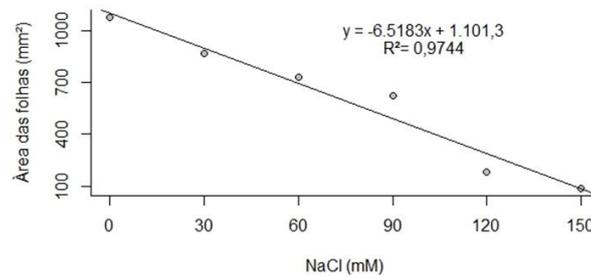
| Concentração de NaCl (mM) | % de sementes germinadas |
|---------------------------|--------------------------|
| 0 | 98a ± 3,72 |
| 30 | 95ab ± 4,17 |
| 60 | 98a ± 5,30 |
| 90 | 95ab ± 4,96 |
| 120 | 89bc ± 6,23 |
| 150 | 82c ± 9,64 |
| CV% | 5.84 |

Médias seguidas de mesma letra nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2017).

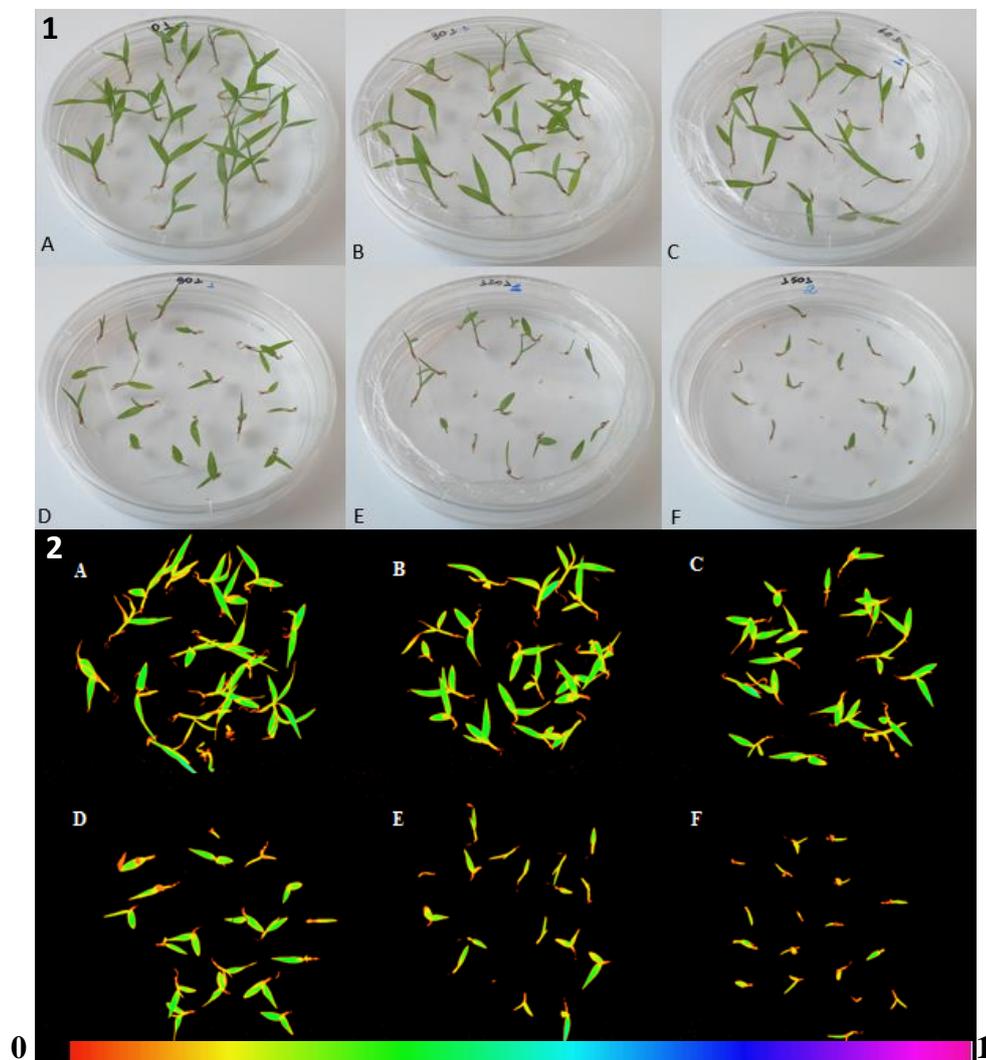
Diferentemente da germinação das sementes, a parte aérea das plântulas de *S. viridis* foi drasticamente afetada pelo aumento da concentração salina no substrato, ocasionando uma relação praticamente linear entre o aumento na concentração de NaCl e a redução na área foliar (FIGURAS 2 e 3). O efeito do aumento da concentração salina sobre a área foliar foi tão forte que as plântulas mantidas sob 150 mM de NaCl apresentaram, em média, apenas 8 % da área foliar das plantas-controle.

Figura 2 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato sobre a área foliar das plântulas de *Setaria viridis* (acesso A10.1).



Fonte: Do autor (2017).

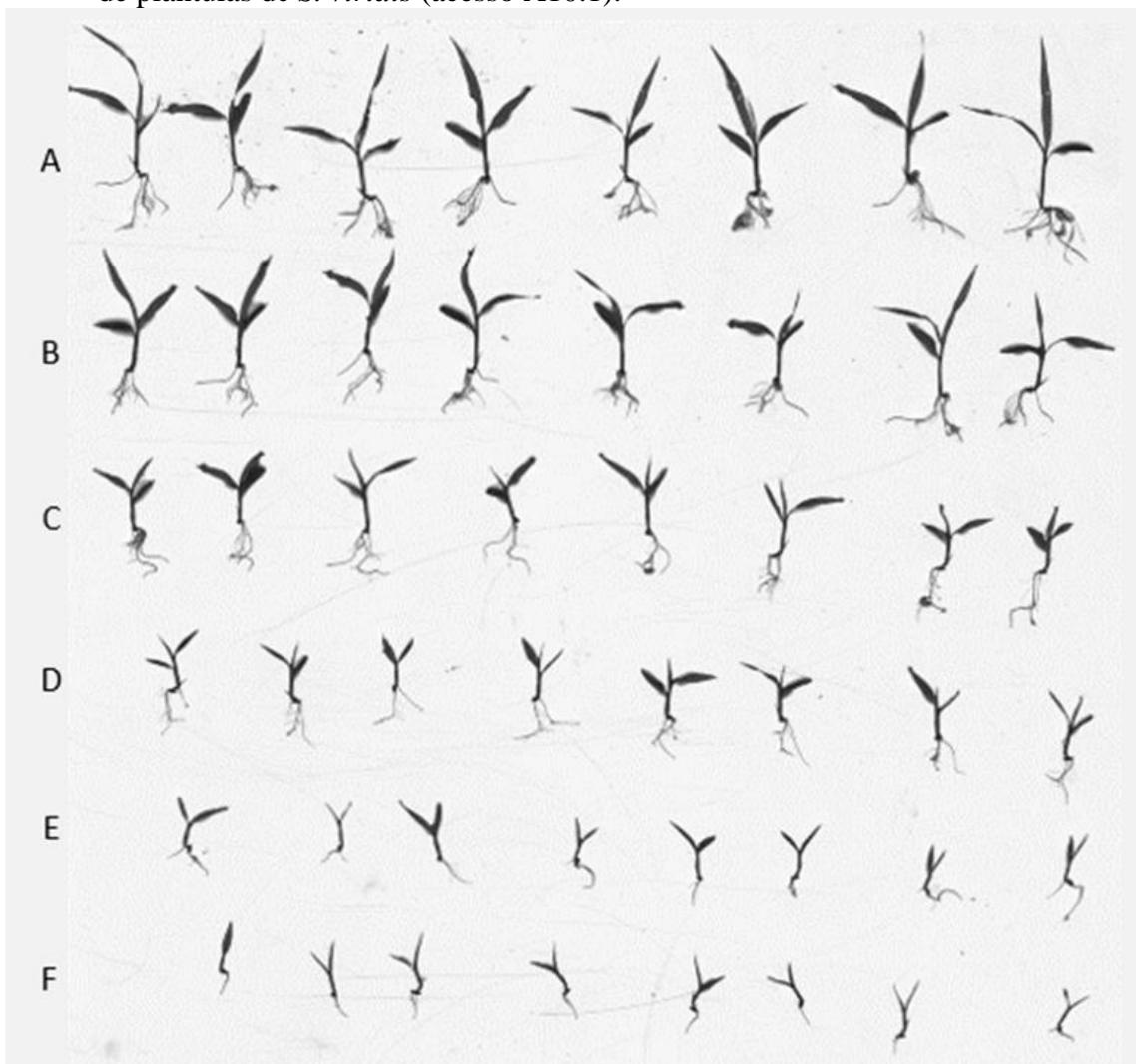
Figura 3 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato sobre o aspecto visual e imagem da fluorescência da clorofila da parte aérea de plântulas de *S. viridis*.



(1) Imagem digital RGB de plântulas de *S. viridis* (acesso A10.1); (2) imagem derivada da técnica fluorescência da clorofila por imagem (método do pulso de saturação). Os valores dos dados relativos a cada planta na imagem podem ser mapeados com o auxílio da falsa barra de cores localizada abaixo. Concentração de NaCl: 0 mM (A), 30 mM (B), 60 mM (C), 90 mM (D), 120 mM (E) e 150mM (F).
Fonte: Do autor (2017).

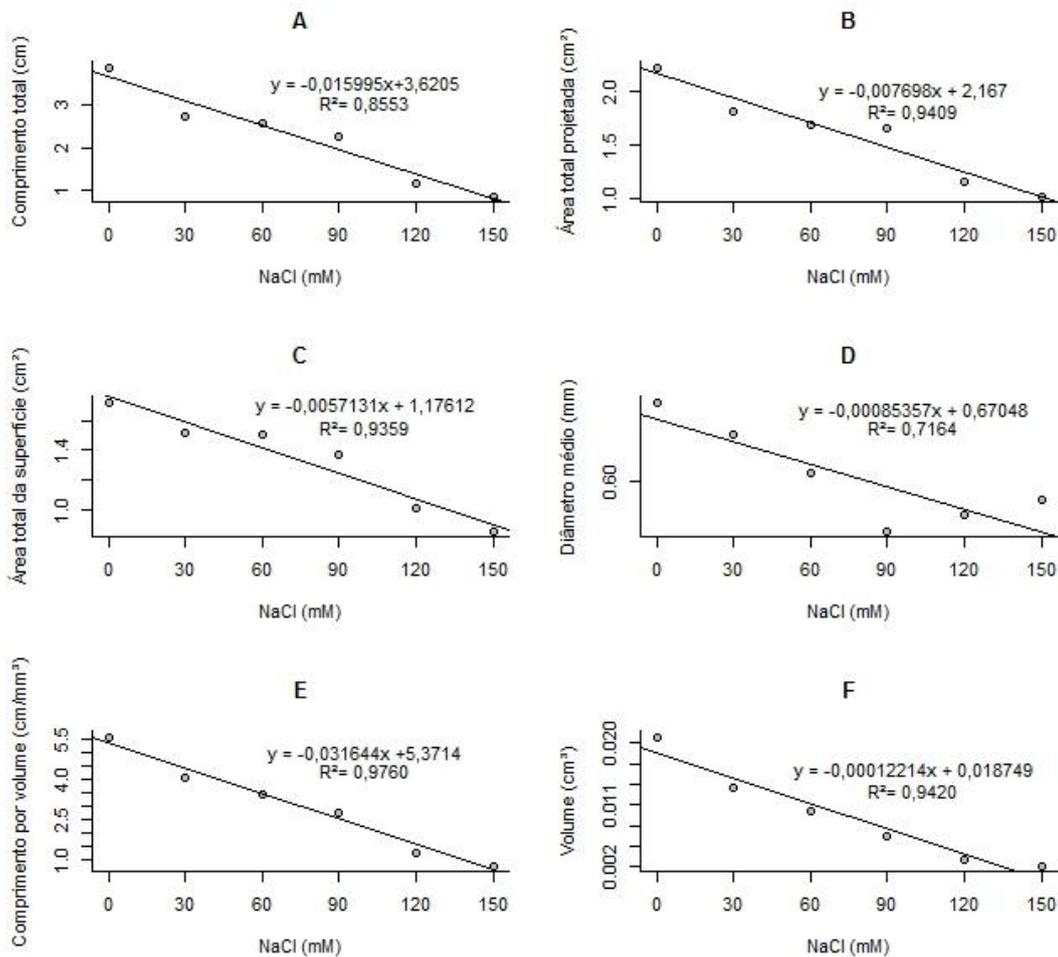
À semelhança dos efeitos observados sobre a área foliar, as variáveis relacionadas à morfologia radicular também foram drasticamente afetadas pelo aumento da concentração salina no substrato. Em consonância com o efeito visual (FIGURA 4), houve uma forte correlação linear negativa entre a concentração salina e o valor determinado para cada variável (FIGURA 5). As variáveis mais negativamente afetadas foram o volume, comprimento por volume e comprimento, com uma queda de 88,73; 86,01 e 77,78% respectivamente. Por outro lado, a variável menos afetada foi o diâmetro, que apresentou uma queda de apenas 15,94%.

Figura 4 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato sobre a imagem escaneada de plântulas de *S. viridis* (acesso A10.1).



Concentração de NaCl: 0 mM (A), 30 mM (B), 60 mM (C), 90 mM (D), 120 mM (E) e 150mM (F).
Fonte: Do autor (2017).

Figura 5 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato sobre as variáveis de morfologia radicular em *S. viridis* (acesso A10.1).



A: comprimento total (cm); B: área total projetada (cm²); C: área total da superfície (cm²); D: Diâmetro médio (mm); E: comprimento por volume (cm/mm³); e F: volume (cm³).

Fonte: Do autor (2017).

Os valores de condutividade elétrica medidos nas soluções salinas originais, com diferentes concentrações de NaCl, mantiveram a proporcionalidade esperada (TABELA 2). Após a aplicação destas soluções sobre o substrato, de acordo com o tratamento, a condutividade elétrica medida inicialmente manteve certa proporcionalidade com a concentração inicial de NaCl da solução original (FIGURA 6), com algumas particularidades. Observou-se, por exemplo, que a CE do substrato foi maior do que a CE da solução original, em todos os tratamentos. Mesmo no substrato que não recebeu adição de NaCl, em que a CE da solução original foi praticamente zero, a condutividade elétrica medida atingiu valores superiores a 5 dS m⁻¹. A explicação, muito provavelmente, pode estar relacionada principalmente ao efeito iônico dos sais presentes nos adubos químicos, previamente misturados ao substrato para a nutrição das plantas.

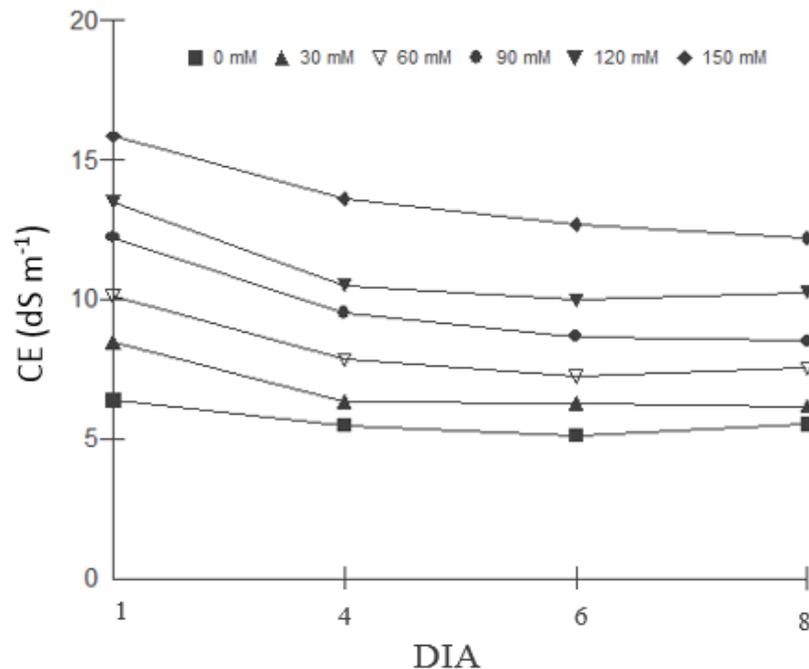
De maneira geral, o substrato apresentou a maior condutividade elétrica no primeiro dia, após a adição de NaCl, independentemente da concentração salina utilizada. Ao longo do tempo, houve queda na CE dos substratos em todas as concentrações salinas, porém de forma mais pronunciada em concentrações salinas mais altas. A estabilidade na CE foi atingida mais rapidamente nas concentrações salinas mais baixas (0 e 30 mM), por volta de 4 dias, seguidas pelas demais concentrações (60, 90, 120 e 150 mM), por volta de 6-8 dias. Isto sugere que há a necessidade de um período de incubação, após a aplicação do sal, para que as trocas iônicas entre o substrato e a solução entrem em equilíbrio, o qual depende da quantidade de sal aplicada.

Tabela 2 – Efeito do aumento da concentração de NaCl sobre a condutividade elétrica das soluções de rega.

| Concentração de NaCl (mM) | CE (mS ⁻¹) |
|---------------------------|------------------------|
| 0 | 0,01 |
| 30 | 3,1 |
| 60 | 6,44 |
| 90 | 9,61 |
| 120 | 12,5 |
| 150 | 15,43 |

Fonte: Do autor (2017).

Figura 6 – Efeito do aumento da concentração de NaCl sobre as mudanças nos valores de condutividade elétrica do substrato durante o período de incubação (dia 1, 4, 6 e 8).



Fonte: Do autor (2017).

De forma semelhante ao ensaio preliminar anterior, os valores de CE do substrato, considerando as doses de NaCl a que as plantas de *S. Viridis* foram efetivamente submetidas, mantiveram-se diretamente proporcionais à concentração salina aplicada (TABELA 3). Ou seja, quanto maior a quantidade de sal aplicada ao substrato, maior a condutividade elétrica e menor o potencial hídrico. Após o cultivo das plantas, apesar de se manter a proporcionalidade da CE e o do potencial hídrico entre os tratamentos, em função da concentração salina, os valores de CE tornaram-se mais baixos e, conseqüentemente, os valores de potencial hídrico tornaram-se mais altos (TABELA 4). Tais resultados sugerem que uma determinada quantidade de sal pode ter sido removida da solução do substrato, seja por adsorção às paredes celulares das raízes ou por absorção ou, ainda, por ambos os processos.

Tabela 3 – Efeito do aumento da concentração salina sobre os valores de condutividade elétrica (CE) e potencial hídrico (Ψ_w) no substrato sem cultivo de plantas de *Setaria viridis*.

| NaCl (g/dm ³) | CE (dS m ⁻¹) | Ψ_w |
|---------------------------|--------------------------|--------------|
| 0 | 6,99 ± 0,22 | -0,11 ± 0,08 |
| 2 | 12,32 ± 0,69 | -0,28 ± 0,07 |
| 4 | 18,41 ± 1,24 | -0,63 ± 0,08 |
| 6 | 28,23 ± 1,91 | -0,87 ± 0,06 |
| 8 | 33,89 ± 2,54 | -1,06 ± 0,06 |
| 10 | 37,61 ± 2,63 | -1,26 ± 0,14 |

Fonte: Do autor (2017).

Tabela 4 – Efeito do aumento da concentração de NaCl sobre os valores de condutividade elétrica (CE) e do potencial hídrico (Ψ_w) determinados no substrato com cultivo de plantas de *Setaria viridis*.

| NaCl (g/dm ³) | CE (dSm ⁻¹) | Ψ_w |
|---------------------------|-------------------------|--------------|
| 0 | 4,78 ± 0,46 | -0,02 ± 0,08 |
| 2 | 9,89 ± 1,54 | -0,34 ± 0,07 |
| 4 | 14,71 ± 1,85 | -0,49 ± 0,07 |
| 6 | 20,39 ± 4,28 | -0,63 ± 0,12 |
| 8 | 24,21 ± 2,71 | -0,61 ± 0,11 |
| 10 | 32,84 ± 4,21 | -0,80 ± 0,18 |

Fonte: Do autor (2017).

As observações visuais ao final do experimento e os dados de pesagem da parte aérea e raiz no 8º dia de estresse indicam que as diferentes concentrações de NaCl aplicadas ao substrato de cultivo manifestaram o seu efeito principalmente sobre o tamanho e a sobrevivência das plantas de *S. viridis* (FIGURA 7, TABELA 5). Houve redução no tamanho

das plantas a medida em que se aumentou a quantidade de NaCl até 6 g/dm³. Nos tratamentos com maiores quantidades de NaCl, ou seja, 5 (8g/dm³) e 6 (10g/dm³), todas as plantas morreram.

Figura 7 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre o aspecto visual de plântulas de *Setaria viridis* (acesso A10.1).



Imagem digital RGB de plântulas após 12 dias submetidas aos seguintes tratamentos: 0,2,4,6,8 g/dm³ de NaCl. Quantidade de NaCl: (1) 0 g/dm³, (2) 2 g/dm³, (3) 4 g/dm³, (4) 6 g/dm³, (5) 8 g/dm³ e (6) 10g/dm³.

Fonte: Do autor (2017).

Tabela 5 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre a massa da parte aérea e do sistema radicular das plantas de *Setaria viridis* (acesso A10.1) aos oito dias após a submissão a diferentes quantidades de NaCl.

| NaCl (g/dm ³) | Parte aérea (g) | Raízes (g) |
|---------------------------|-----------------|--------------|
| 0 | 2,965 ± 0,29 | 1,01 ± 0,08 |
| 2 | 1,68 ± 0,01 | 0,56 ± 0,06 |
| 4 | 1,28 ± 0,07 | 0,44 ± 0,06 |
| 6 | 0,775 ± 0,04 | 0,185 ± 0,05 |
| 8 | 0,145 ± 0,04 | 0,065 ± 0,01 |
| 10 | 0,135 ± 0,01 | 0,05 ± 0,00 |

Fonte: Do autor (2017).

Comparando-se ao controle, cujas plantas não receberam NaCl, os dados de trocas gasosas (TABELA 6) e ICC (TABELA 7) indicam que, entre as plantas que sobreviveram ao estresse salino, apenas aquelas submetidas ao tratamento 4 (6g/dm³) sofreram redução tanto na taxa de assimilação líquida de CO₂ quanto no ICC. Porém, todas as plantas que receberam NaCl, independentemente da quantidade, sofreram redução nas taxas de condutância estomática e transpiração. É interessante observar que a concentração interna de CO₂ apresentou os valores mais altos nas plantas-controle. Por outro lado, os menores valores de *C_i* foram observados nas plantas submetidas às menores quantidades de NaCl. À medida que se aumentou a quantidade

de NaCl no substrato, houve, também, aumento em C_i , de forma que no tratamento 4 (6g/dm³), os valores de C_i não diferiram estatisticamente do controle.

Tabela 6 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre as variáveis de trocas gasosas em plantas de *Setaria viridis* (acesso A10.1) submetidas a diferentes quantidades de NaCl após 12 dias de estresse.

| NaCl (g/dm ³) | A | gs | E | C _i |
|---------------------------|---------|---------|--------|---------------------|
| 0 | 28,83a | 0,242a | 3,62a | 170,86 ^a |
| 2 | 28,89a | 0,188b | 2,95b | 118,51c |
| 4 | 26,11ab | 0,184bc | 2,86bc | 141,45b |
| 6 | 21,57b | 0,15c | 2,47c | 151,36ab |
| CV% | 12,75 | 13,13 | 11,12 | 11,45 |

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). A: Taxa de assimilação líquida de CO₂ ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); gs: taxa de condutância estomática ao vapor d'água ($\text{mol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), E: taxa de transpiração ($\text{mmol de H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$); C_i: concentração intracelular de CO₂ ($\mu\text{mol de CO}_2 \text{ mol}^{-1}$).

Fonte: Do autor (2017).

Tabela 7 – Efeito do aumento da concentração de NaCl no substrato de cultivo sobre o índice de concentração de clorofila (CCI) em folhas de plantas de *Setaria viridis* (acesso A10.1).

| NaCl (g/dm ³) | ICC |
|---------------------------|--------------------|
| 0 | 31,27 ^a |
| 2 | 31,11 ^a |
| 4 | 28,68 ^a |
| 6 | 13,01b |
| CV% | 28,95 |

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Fonte: Do autor (2017).

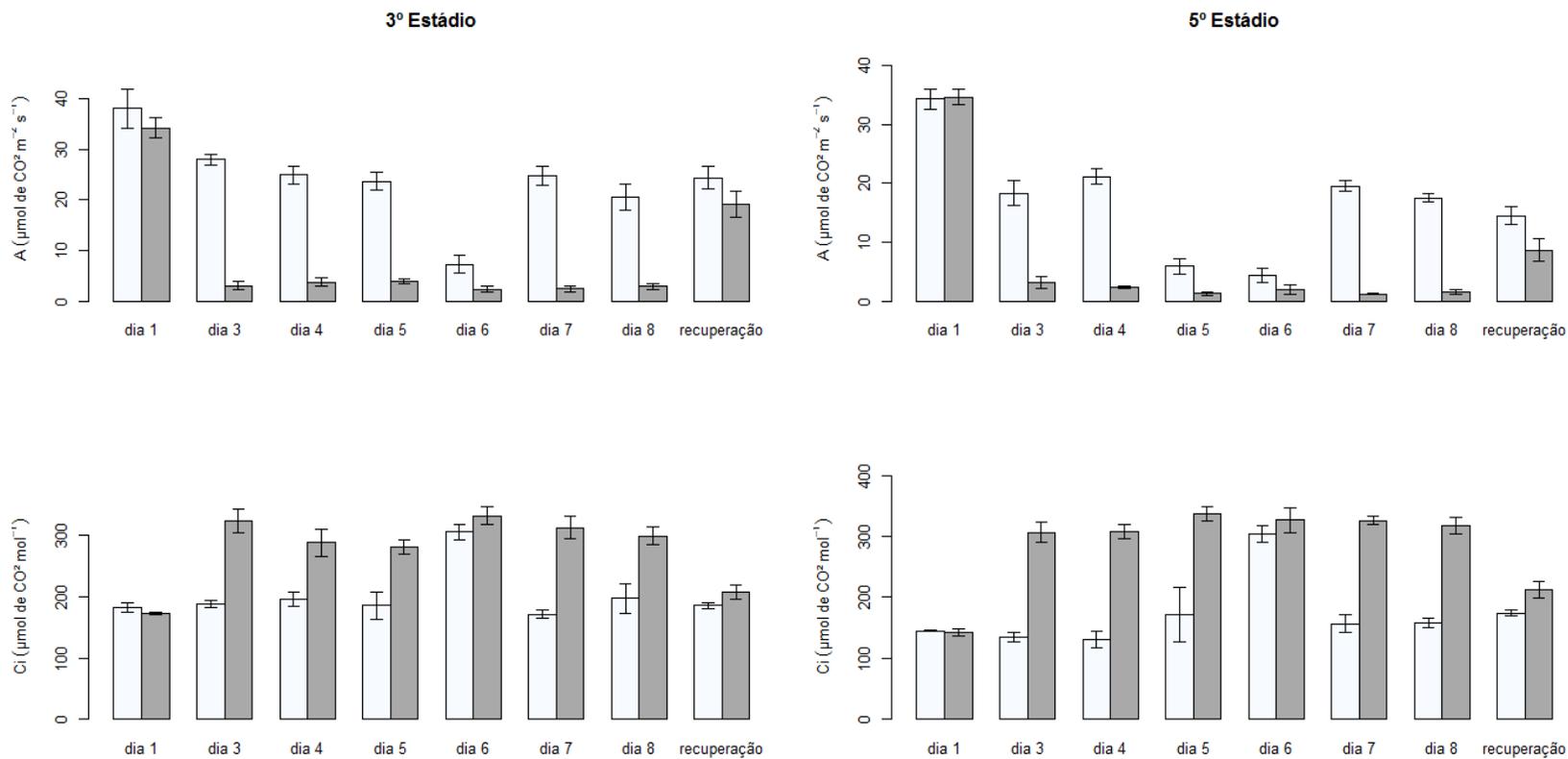
3.2 Efeito do estresse por frio sobre plantas jovens e adultas de *Setaria viridis*

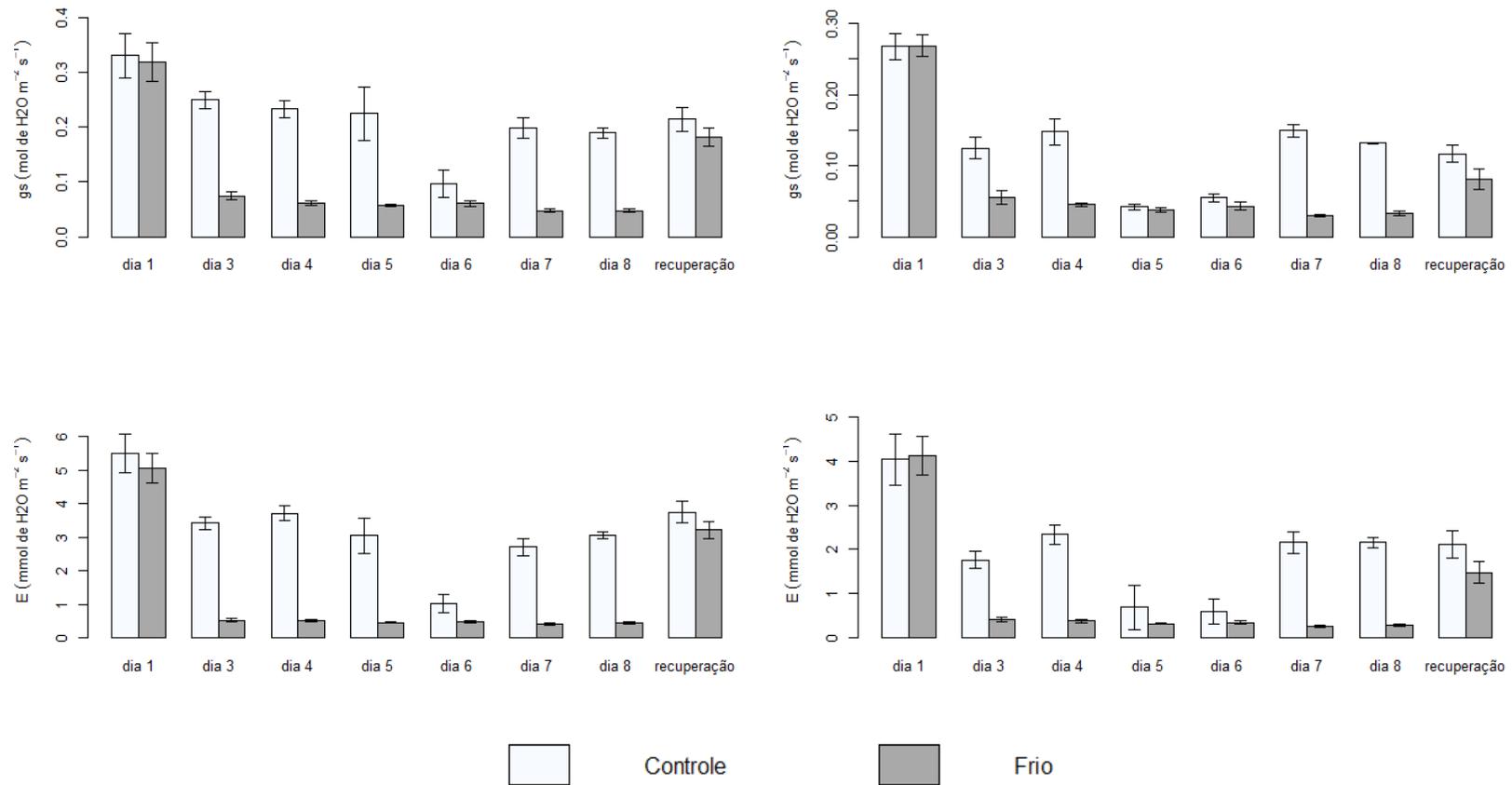
O estresse por frio afetou as plantas de *Setaria viridis* em ambos os estádios de desenvolvimento avaliados, porém com intensidade diferente. As taxas de trocas gasosas, tais como assimilação líquida de CO₂, condutância estomática e transpiração foram drasticamente reduzidas nas plantas de *S. viridis* na primeira medição efetuada após a submissão a 10 °C, em ambos os estádios de desenvolvimento (FIGURA 8). As reduções nos valores foram, proporcionalmente, semelhantes em ambos os estádios de desenvolvimento. Tais valores se mantiveram constantes ao longo de todo o período de estresse. Por outro lado, a concentração interna de CO₂ praticamente dobrou no mesmo período, em ambos os estádios de desenvolvimento.

Após o retorno às condições normais de cultivo, todas as taxas de trocas gasosas das plantas mais jovens se encontravam mais próximas ao controle do que das plantas mais velhas. Porém, ainda não haviam alcançado os valores das plantas-controle.

Após oito dias de tratamento, as plantas-controle tornaram-se visualmente maiores do que as plantas estressadas, em ambos os estádios de desenvolvimento (FIGURAS 9 e 10). Entretanto, a massa da parte aérea obtida ao final do ciclo não diferiu entre os tratamentos, independentemente do estágio no qual o estresse por foi aplicado. A produção de sementes, por sua vez, foi negativamente afetada pelo frio, mas somente quando o mesmo foi aplicado nas plantas no 5º estágio de desenvolvimento (TABELA 8).

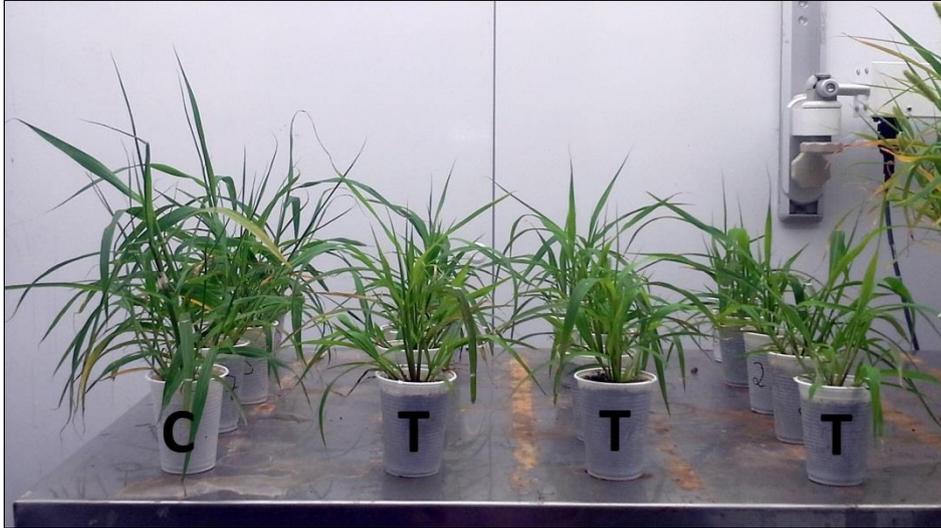
Figura 8 – Efeito do frio sobre as taxas de trocas gasosas em *Setaria viridis* (acesso A10.1) cultivadas sob condições normais de 25°C (controle) ou submetidas a estresse por frio com temperatura de 10°C durante 8 dias.





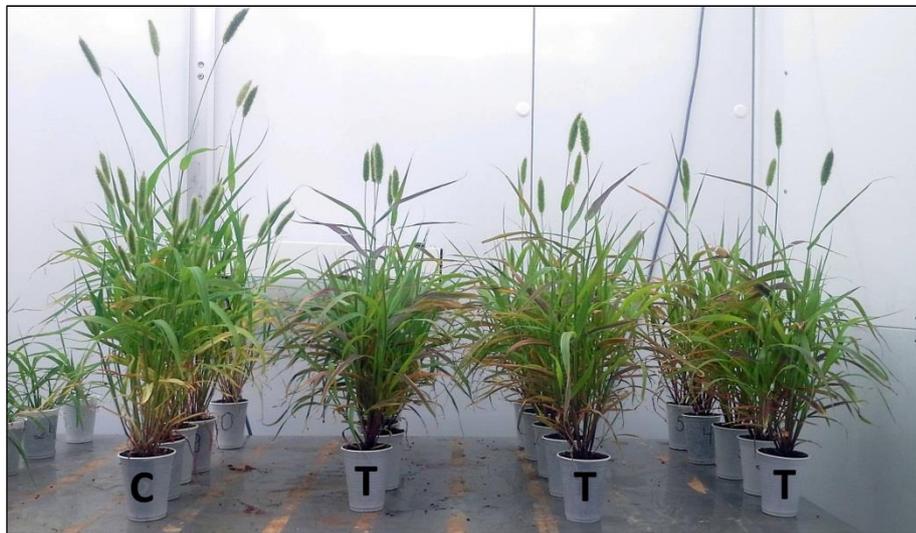
Dia 1: medição realizada imediatamente antes da submissão ao frio; dia 3 a 8: medições realizadas do 3º ao 8º dia, após o início do estresse; recuperação: medição realizada no 3º dia, após o retorno a temperatura normal de cultivo. A: Taxa de assimilação líquida de CO₂ (μmol de CO₂ m⁻² s⁻¹); gs: taxa de condutância estomática ao vapor d'água (mol de H₂O m⁻² s⁻¹); E: taxa de transpiração (mmol de H₂O m⁻² s⁻¹); Ci: concentração intracelular de CO₂ (μmol de CO₂ mol⁻¹).
 Fonte: Do autor (2017).

Figura 9 – Efeito do estresse por frio (10°C) sobre o aspecto visual das plantas de *Setaria viridis* (acesso 10.1) a partir do terceiro estágio de desenvolvimento imediatamente quando retornaram as condições de 25°C.



C: Plantas controle, T: Plantas submetidas ao frio.
Fonte: Do autor (2017).

Figura 10 – Efeito estresse por frio (10°C) sobre o aspecto visual das plantas de *Setaria viridis* (acesso 10.1), partir do quinto estágio de desenvolvimento imediatamente quando retornaram as condições de 25°C.



C: Plantas controle, T: Plantas submetidas ao frio.
Fonte: Do autor (2017).

Tabela 8 – Efeito do estresse por frio sobre a produção de biomassa em plantas jovens e adultas de *Setaria viridis* (acesso 10.1).

| Estádio de desenvolvimento | 15 DAT (3° estágio) | | 29 DAT (5° estágio) | | |
|-----------------------------------|----------------------------|-------------------|----------------------------|-------------|---------|
| | Parte da Planta | Parte aérea | Semente | Parte aérea | Semente |
| Controle | | 5,16 ^a | 2,52 a | 6,25a | 4,79a |
| Tratamento | | 4,92 ^a | 2,188a | 5,66a | 3,30b |
| CV% | | 8,56 | 15,70 | 14,89 | 11,95 |

As médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$).
 Fonte: Do autor (2017).

4 DISCUSSÃO

4.1 Efeito do estresse salino sobre a germinação de sementes, desenvolvimento inicial e 2º estágio de desenvolvimento da *Setaria viridis* (acesso A10.1)

As plantas exibem diferentes respostas à salinidade do solo, incluindo adaptações que funcionam em diferentes estádios de desenvolvimento (ABARI et al., 2011; BAYUELO-JIMENEZ; CRAIG; LYNCH, 2002; MUNNS; TESTER, 2008). A taxa de germinação de sementes e crescimento de raiz em substratos salinos tornou-se variáveis bastante utilizada para se avaliar a tolerância das plantas cultivadas sob tais condições (ARAGÃO et al., 2009; CORDEIRO et al., 2014; YI; MA; LI, 2007).

Plantas glicófitas, quando submetidas a estresse salino, exibem tipicamente germinação reduzida e retardada, bem como o crescimento reduzido das plântulas (GUO et al., 2012; KHALIL; BOUFOUS; MOUSADIK, 2011). Inicialmente, a presença de sais no solo reduz o seu potencial hídrico, restringindo a absorção de água pela semente (PEREIRA et al., 2012). A penetração de solutos através do revestimento da semente induz ainda à toxicidade iônica, mudanças na composição lipídica e interfere no funcionamento da membrana plasmática, incluindo a permeabilidade e o transporte (BLISS; PLATT-ALOIA; THOMSON, 1984; CORDEIRO et al., 2014; GALPAZ; REYMOND, 2010; JOB et al., 2005). Todos esses fatores interferem, portanto, na emergência da plântula.

As sementes de *S. viridis* (Acesso 10.1) apresentam altas percentagens de germinação, mesmo na concentração salina mais alta utilizada. Experimentos realizados em espécies da família Poaceae, da qual *S. viridis* faz parte, mostraram resultados similares. Sementes de Capim-arroz, por exemplo, quando submetidas a concentrações crescentes de NaCl, apresentaram germinação superior a 80% até na concentração de 150 mM, tendo a germinação completamente inibida somente em 400 mM de NaCl (SADEGHLOO; ASGHARI; GHADERI-FAR, 2013). Em milho, ensaios utilizando aproximadamente 40, 80, 120, 160 e 200 mM, para três diferentes tipos de sais (NaCl, CaCl₂ e KCl), mostraram que a germinação das sementes não foi afetada por nenhum dos sais utilizados, independentemente da concentração (CONUS et al., 2009).

Contrastando com os resultados destes estudos, sementes de um cultivar de soja, e de sua derivada transgênica, apresentaram queda considerável na germinação com o aumento da salinidade. Entretanto, os genótipos se diferenciaram ao se avaliar o volume e o comprimento das raízes das plântulas. O transgênico obteve melhor reação frente à situação de estresse, passando a investir as reservas da semente no crescimento da raiz primária, o que, segundo os

autores do experimento, pode ser considerado uma estratégia para ampliar a região de captação de água (CARVALHO et al., 2012).

Apesar de algumas espécies apresentarem germinação reduzida quando submetidas à salinidade, Muscolo; Panuccio; Eshel, (2013) afirmam que a maioria das culturas é mais suscetível à salinidade durante o crescimento inicial pós-germinação do que em outros estágios do seu ciclo de vida. Estudos mostram que apesar de se observar uma alta taxa de germinação em substratos salinos, pode ocorrer uma redução na área foliar, altura das plântulas e número de folhas, com conseqüente redução da fitomassa da parte aérea (CAVALCANTI et al., 2005a, 2005b; CONUS et al., 2009).

Em condições salinas, a redução na taxa de crescimento da parte aérea das plantas, em geral, é proporcionalmente maior do que a redução na taxa de crescimento das raízes (GONÇALVES; TÁVORA; HERNANDEZ, 2001). Tais resultados foram observados, também, nas plântulas de *S. viridis* avaliadas neste estudo. Acredita-se que a redução no tamanho da parte aérea e no sistema radicular esteja associada a certa sensibilidade da *S. viridis* ao estresse salino. A área foliar é um parâmetro importante na avaliação de plantas submetidas à salinidade, uma vez que está intimamente relacionada ao processo fotossintético e, conseqüentemente, à produção de biomassa.

Thellungiella halophila, uma espécie considerada tolerante ao sal, teve os efeitos da salinidade sobre a germinação e o crescimento de plântulas comparada com *A. thaliana*, numa concentração crescente de 0-200 mM de NaCl. Os resultados demonstram que a salinidade inibiu a germinação de sementes em ambas as espécies. No entanto, sementes de *T. halophila* não sofreram toxicidade iônica, o que foi evidenciado pela maior taxa de germinação final após sementes não germinadas pré-tratadas com NaCl serem transferidas para água destilada. As mudas de *T. halophila* apresentaram maior tolerância ao sal do que aquelas de *A. thaliana*, tendo melhor crescimento de plantas (comprimento de raiz, massa fresca e seca) (GUO et al., 2012).

Os efeitos do estresse salino sobre as raízes de três espécies halófitas, na fase de plântula foram estudados com o sistema Rootedge, semelhante ao Winrhizo. Observou-se que as relações entre crescimento e o ambiente osmótico foram claramente refletidas no sistema radicular. Diferentes concentrações de NaCl não tiveram influência significativa sobre o diâmetro médio do sistema radicular, embora com uma ligeira tendência de diminuição com o aumento da concentração de sal (YI; MA; LI, 2007). Resultado semelhante foi encontrado em *S. viridis*. Das variáveis radiculares mensuradas, o diâmetro foi a menos afetado apresentando uma queda de apenas 15,94% para a concentração mais alta. Este resultado mostra que o

diâmetro das raízes parece não representar uma resposta para suscetibilidade ou tolerância ao estresse salino.

Os Acessos Col-0, Ws e Ler da planta modelo *A. thaliana*, comumente usadas para ensaios de laboratório, são considerados extremamente sensíveis ao sal, entretanto, existe variação entre acessos de ocorrência natural (BAXTER et al., 2010; GALVAN-AMPUDIA; TESTERINK, 2011; KATORI et al., 2010). Acessos de *A. thaliana* quando avaliados sob estresse salino a 125, 175 ou 200 mM de NaCl, por meio de uma metodologia similar a utilizada neste estudo para *S. Viridis*, apresentaram grande variação de resposta. Sob 125 mM de NaCl, a maioria dos acessos foi capaz de geminar, mas o desenvolvimento da raiz foi prejudicado. Alguns acessos mostraram sensibilidade extrema e não germinaram nesta concentração de NaCl. A resposta ao estresse salino foi quantificada como a porcentagem de redução no comprimento da raiz. O acessos mais sensíveis apresentaram redução de até 95% (GALPAZ; REYMOND, 2010).

A redução inicial no crescimento da parte aérea da planta é, provavelmente, devido aos sinais hormonais gerados pelas raízes (MUNNS, 2002). Entretanto, a raiz pode interagir com o estresse ambiental, ajustando seu sistema no que diz respeito a adaptações morfológicas e fisiológicas (YI; MA; LI, 2007), mantendo, assim, um crescimento da parte aérea da planta. As plântulas tendem a direcionar suas reservas para o desenvolvimento radicular à medida que seus tecidos passam por estresses salino ou hídrico (GALVAN-AMPUDIA; TESTERINK, 2011; SANCHEZ-CALDERON et al., 2005). No entanto, se houver um declínio do crescimento da raiz, a absorção de nutrientes é prejudicada; o que, conseqüentemente, reduz o crescimento de todos os órgãos das plantas (FEIJÃO et al., 2013; MUNNS; TESTER, 2008; SOUSA et al., 2016; TAGLIAFERRE et al., 2016).

Os resultados demonstraram que tanto as plântulas de *S. viridis* do ensaio de germinação, quanto as plantas no 2º estágio de desenvolvimento, apresentaram redução na taxa de crescimento da parte aérea e raiz. Mais especificamente no 2º estágio de desenvolvimento as plantas morreram quando submetidas aos tratamentos 8 e 10 g/dm³ de NaCl, e a parte aérea e raiz dessas plantas apresentavam cerca de somente 5% do peso das plantas controle. A morte das plantas, além de outros fatores como o estresse hídrico ocasionado pelo efeito osmótico, pode estar ligada a redução da absorção de nutrientes por competição iônica gerada pela alta salinidade (FEIJÃO et al., 2013).

Independentemente do tipo de estresse, plantas tolerantes conseguem manter taxas fotossintéticas razoáveis, mesmo em condições desfavoráveis (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2016). A redução da taxa fotossintética pelo estresse salino pode ocorrer devido a desidratação

das membranas celulares, o que reduz a permeabilidade do CO₂, fechamento de estômatos, o que gera a redução do suprimento de CO₂, a senescência das folhas, mudança na atividade das enzimas, como por exemplo, a inibição na atividade de fixação do carbono fotossintético e toxicidade por sais, que se acumuladas nos cloroplastos (ESTEVEZ; SUZUKI, 2008; SONG et al., 2005).

Em resumo, a redução da fotossíntese em função da salinidade tem sido atribuída a limitações de origem estomática e não estomática (MUNNS; TESTER, 2008; PARIHAR et al., 2015; SOUZA et al., 2011). Em *S. viridis*, a taxa de condutância estomática (*g_s*) e transpiração (*E*) apresentaram uma queda próxima de um terço do controle em 6g/dm³, indicando fechamento dos estômatos para evitar a perda de água. Além disso, observou-se que a taxa de assimilação líquida de CO₂ (*A*) só obteve queda significativa em 6g/dm³ e que a concentração intracelular de CO₂ (*C_i*) apresentou uma queda em 2 e 4/dm³ e posterior elevação em 6g/dm³, sendo que este não se diferenciou estatisticamente do controle.

Acredita-se que a manutenção na taxa fotossintética nas concentrações 2 e 4/dm³ de NaCl foi mantida graças ao conteúdo de CO₂ já fixado pela planta antes da medição, pois foi constatado diminuição em *g_s* e *E* mas não de *A*. Adicionalmente, a observação visual da biomassa das plantas aos 12 dias de estresse (FIGURA 7), permitiu concluir que as plantas, independentemente da concentração aplicada, apresentaram redução de crescimento, o que consequentemente está relacionada a redução da entrada de CO₂ via fotossíntese.

Resposta similar, utilizando o IRGA, foi encontrada para erva-sal (*Atriplex numulária*), uma planta halófito altamente tolerante ao estresse salino. Nesta a diminuição da assimilação de CO₂ coincidiu com o aumento de *C_i*, indicando uma inibição da fixação de carbono fotossintético. Entretanto, por ser uma planta tolerante a salinidade, houve uma pequena variação dos valores de *C_i* nos últimos períodos avaliados e retorno da assimilação fotossintética de CO₂, retratando assim um período de aclimação ao estresse imposto (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2016); o que não foi observado para *S. viridis*, pois medidas após o 12º dia de estresse não foram realizadas.

Em plantas de *S. viridis* no 2º estágio de desenvolvimento, o aumento da concentração salina além de gerar uma redução nas taxas de condutância estomática e transpiração, afetou também o índice de concentração de clorofila. Resultados semelhantes foram encontrados em *O. sativa* submetida a estresse de salinidade. Nestas houve uma redução dos teores de clorofila a (33%) e b (41%), com 200 mM de NaCl (AMIRJANI, 2011) e 30% a e 45% b em 100 mM NaCl (CHUTIPAIJIT; CHA-UM; SOMPORNPAILIN, 2011) e em *Vigna radiata* a 150 mM de NaCl houve uma queda de 31% para a clorofila total (SAHA; CHATTERJEE; BISWAS,

2010). Para *S. viridis* somente o tratamento 6 g/dm³, se diferenciou entre os demais tratamentos, apresentando uma queda considerável no ICC, de aproximadamente um terço do controle, o que pode estar relacionada à deterioração da membrana dos cloroplastos (MANE et al., 2010).

Alguns autores classificam as plantas cultivadas quanto à sensibilidade ao sal em quatro categorias: sensíveis, moderadamente sensíveis, moderadamente tolerantes e tolerantes. Segundo esta classificação, por ordem crescente de tolerância, as plantas não germinam, não crescem e nem produzem adequadamente quando a condutividade elétrica do extrato de saturação do solo seja superior a 1,3; 3; 6, 6,0 e 10 dS m⁻¹ (CAVALCANTE et al., 2009; CAVALCANTE; JÚNIOR; SÁ, 2007; RIBEIRO et al., 2016). Além disso, segundo Munns e Tester (2008) um solo salino que reduz significativamente o rendimento da maioria das culturas é aquele com aproximadamente 40mM de NaCl, que é relativo a uma condutividade elétrica (Ece) 4 dS m⁻¹ gerando uma pressão osmótica de cerca de 0,2 Mpa.

De acordo com o exposto, não se pode dizer que a *S. viridis* (acesso A10.1) é uma planta sensível à salinidade com base apenas na germinação, pois a espécie apresentou alta percentagem de germinação, mesmo na mais alta concentração de sal utilizada. Entretanto, houve uma queda drástica na área foliar e, também, no comprimento total das raízes nos dois estádios estudados. Estes resultados demonstram que as plantas não se desenvolveram adequadamente quando submetidas ao estresse salino, apresentando uma queda destes parâmetros já em 30mM e 2g/dm³ de NaCl, para o ensaio de germinação e 2º estádio de desenvolvimento respectivamente, o que demonstra certo grau de sensibilidade deste acesso.

Em se tratando de espécies para a produção de biocombustíveis, por exemplo, a biomassa é um fator altamente relevante. Esses resultados indicam, portanto que os genes prospectados visando à melhoria dessas características podem, nesse contexto, ser validados em *S. Viridis*.

4.2 Efeito do estresse por frio em plantas jovens e adultas de *Setaria viridis* (acesso A10.1)

As baixas temperaturas causam redução na taxa de transporte de elétrons, na atividade da rubisco, translocação de açúcares e seletividade da membrana do cloroplasto. Todos esses fatores estão diretamente ligados à diminuição da taxa fotossintética (BATISTA-SANTOS et al., 2011; MAHAJAN; TUTEJA, 2005). A taxa fotossintética da *S. viridis* foi drasticamente afetada pelo frio em ambos os estádios de desenvolvimento avaliados, o que concorda com um estudo realizado com genótipos de café. Estes possuíam diferentes níveis de tolerância ao frio, apesar disso, a fotossíntese líquida e vários parâmetros de fluorescência da clorofila foram fortemente afetados em todos os genótipos avaliados. Um aumento em *Ci*, no café, apontou

para uma ausência de limitação estomática à disponibilidade de CO₂ (BATISTA-SANTOS et al., 2011).

Em contraste, um estudo realizado em *Mangifera indica*, a queda drástica da taxa de fotossíntese foi atribuída ao fechamento dos estômatos devido a alteração da sensibilidade de células guarda ao CO₂, e também a uma menor atividade da Rubisco (ALLEN et al., 2000). Outro estudo em café demonstrou que a diminuição gradual da temperatura (25/20°C dia e 15/10 °C noite), levou a uma fotoinibição induzida pelo frio. Considerando que os mesmos também apresentavam altos índices de concentração interna de CO₂, esse fator foi atribuído à inativação bioquímica (atividade de ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase /oxigenase e síntese de carboidratos) e biofísica (funcionamento do sistema antena, eficiência do fotossistema II e transporte linear de elétrons), ao invés de restrições estomáticas à condutância ao CO₂ (RAMALHO et al., 2003).

Segundo Yamori et al., (2010) as espécies de plantas tolerantes ao frio, como o espinafre, o trigo de inverno, o centeio e o feijão-fava, são capazes de manter elevadas taxas de assimilação de CO₂, devido à alteração do conteúdo da Rubisco. Para Marengo et al. (2014), a aclimação à baixa temperatura está relacionado ao aumento no conteúdo de enzimas da fotossíntese, como por exemplo a Rubisco; síntese de formas da Rubisco tolerantes ao frio e síntese de componentes de membrana que permitam a manutenção de fluidez em baixas temperaturas.

Considerando que em *S. viridis* a taxa de condutância estomática e a taxa de transpiração apresentaram uma queda considerável, e que, a concentração intracelular de CO₂ (C_i) apresentou um aumento significativo, acredita-se que por ter havido uma inativação enzimática responsável pela fixação de CO₂, já que mesmo com uma diminuição da condutância estomática os níveis de concentração intracelular de CO₂ permaneceram altos nos dias de estresse. Outro fator a ser observado é que a taxa fotossintética (assimilação líquida de CO₂) voltou a aumentar na recuperação, indicando assim que não houve danos irreversíveis ao sistema fotossintético. Entretanto, medidas fotoquímicas em *S. viridis* submetida ao frio podem caracterizar de forma mais clara se há ou não danos ao sistema de membranas dos cloroplastos e, conseqüentemente, ao centro de reação do PSII.

Plantas submetidas ao frio apresentam ainda crescimento mais lento, o que pode ser reflexo da redução da atividade metabólica. Em famílias mutantes de arroz submetidos a 15 °C por exemplo, houve uma diminuição de até 20% na estatura (MARTINS et al., 2007). Linhagens e híbridos de milho tolerantes ao frio foram submetidos a 10 °C dia / 7 °C noite e 10 °C dia / 4 °C noite, respectivamente, durante uma semana. Estes apresentaram, em geral, uma

estagnação do crescimento durante a exposição ao frio, embora alguns genótipos continuassem crescendo lentamente, o que foi recuperado após a elevação da temperatura. Os autores afirmaram que esse resultado sugere que a estagnação do crescimento pode ser uma estratégia de recuperação rápida após um estresse leve (RIVA-ROVEDA et al., 2016).

Estes resultados concordam com o encontrado para *S. viridis*, que quando submetidas ao frio apresentaram visual estagnação de crescimento, entretanto ao voltarem para temperatura de 25 °C não apresentaram diferença da biomassa final em relação ao controle. No entanto, como essa avaliação foi apenas visual, não se pode afirmar uma total estagnação do crescimento. Para o ensaio com milho supracitado, por exemplo, a manutenção do crescimento, mesmo lenta, em alguns genótipos, apesar da redução da capacidade fotossintética, sugeriu uma fixação de carbono altamente eficiente, mostrando assim uma tolerância ao frio, o que não se pode afirmar em *S. viridis* (RIVA-ROVEDA et al., 2016).

5 CONCLUSÃO

Os ensaios de salinidade mostraram que a *Setaria viridis* (acesso 10.1), apresentou alta germinação mesmo na concentração salina mais alta utilizada, entretanto os parâmetros de raiz e parte aérea foram fortemente afetados, tanto nas plântulas oriundas do ensaio de germinação quanto no 2º e estágio de desenvolvimento. Apenas as plantas submetidas ao tratamento 4 (6g/dm³) sofreram redução tanto na *A* quanto no ICC, porém, todas as plantas sofreram redução nas taxas de *gs* e *E*. A concentração intracelular de CO₂ (*Ci*), por sua vez, teve os valores mais baixos nas concentrações salinas mais baixas e o valor mais alto na concentração salina mais alta, em que as plantas sobreviveram, sendo que esta não se diferenciou estatisticamente do controle.

O ensaio de frio demonstrou que a *Setaria viridis* (acesso 10.1) apresenta redução em *gs*, *E* e *A* quando submetida a 10°C nos dois estágios avaliados. Contudo, a *Ci* aumenta quando as plantas são estressadas. A biomassa da parte aérea, por sua vez, não foi afetada pelo frio em ambos os estágios avaliados, exceto a biomassa da semente que foi negativamente afetada no 5º estágio de desenvolvimento.

Entendendo que existe uma escassez de estudos que avaliem a sensibilidade dos acessos de *Setaria viridis* quanto a estresse abióticos, acredita-se que este estudo pode contribuir para o uso dessa espécie como planta modelo para validação de genes de resistência a estes estresses. Os resultados aqui apresentados indicam certa sensibilidade da *S. viridis* para os dois estresses avaliados; entretanto, estes necessitam ser melhor caracterizados.

Testes adicionais, a exemplo de estresse salino que vão desde a fase de germinação, prolongando-se até os estágios de desenvolvimento mais avançados, ou seja, partindo da fase osmótica e embebição das sementes até a fase tóxica de íons nas folhas fotossintetizantes, podem caracterizar melhor o comportamento de *S. viridis* ao estresse salino. Para o estresse de frio, testes para avaliação de forma mais prologada da recuperação dessa cultura podem inferir com mais clareza se existe ou não uma recuperação efetiva nas trocas gasosas relacionados aos componentes do sistema fotossintético. Além disso, estresses mais prolongados e com diferentes níveis de temperatura podem inferir mais adequadamente os níveis de sensibilidade de *S. viridis* ao frio.

REFERÊNCIAS

- ABARI, A. K. et al. Salt effects on seed germination and seedling emergence of two *Acacia* species. **African Journal of Plant Science**, v. 5, n. 1, p. 52–56, 2011.
- ALLEN, D. J. et al. An overnight chill induces a delayed inhibition of photosynthesis at midday in mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 352, p. 1893–1902, 2000.
- AMIRJANI, M. R. Effect of Salinity Stress on Growth, Sugar Content, Pigments and Enzyme Activity of Rice. **International Journal of Botany**, v. 7, n. 1, p. 73–81, 1 jan. 2011.
- ARAGÃO, C. A. et al. Avaliação de cultivares de melão sob condições de estresse salino. **Revista Caatinga**, v. 22, n. 2, 2009.
- BATISTA-SANTOS, P. et al. The impact of cold on photosynthesis in genotypes of *Coffea* spp. photosystem sensitivity, photoprotective mechanisms and gene expression. **Journal of Plant Physiology**, v. 168, n. 8, p. 792–806, 2011.
- BAXTER, I. et al. A coastal cline in sodium accumulation in *Arabidopsis thaliana* is driven by natural variation of the sodium transporter AtHKT1;1. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 11, p. e1001193, 11 nov. 2010.
- BAYUELO-JIMENEZ, J.; CRAIG, R.; LYNCH, J. Salinity tolerance of species during germination and early seedling growth. **Crop Science**, 2002.
- BLISS, R.; PLATT-ALOIA, K.; THOMSON, W. Effects of salt on cell membranes of germinating seeds. **California Agriculture**, v. 38, n. 10, p. 24–25, 1984.
- CARVALHO, T. C. DE et al. Germination and initial development of soybean seedlings and their transgenic derivatives in salt stress condition. **Ciência Rural**, v. 428428, p. 1366–1371, 2012.
- CAVALCANTE, L. F. et al. Crescimento inicial do maracujazeiro amarelo manejado em dois substratos irrigados com água salina. **Irriga**, v. 14, n. 4, p. 504–517, 2009.
- CAVALCANTE, L.; JÚNIOR, F. R.; SÁ, J. Influência da água salina e matéria orgânica no desempenho do maracujazeiro-amarelo e na salinidade do substrato. **Irriga**, v. 12, n. 4, p. 505–518, 2007.
- CAVALCANTI, M. L. F. et al. Índices ecofisiológicos Índices ecofisiológicos da mamoneira sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 9, n. 99, p. 66–7066, 2005a.
- CAVALCANTI, M. L. F. et al. Tolerância da mamoneira BRS 149 à salinidade: germinação e características de crescimento. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, n. 99, p. 57–6157, 2005b.
- CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.; ZHU, J.-K. Cold stress regulation of gene expression in plants. **Trends in Plant Science**, v. 12, n. 10, p. 444–451, out. 2007.
- CHUTIPAIJIT, S.; CHA-UM, S.; SOMPORNPAILIN, K. High contents of proline and anthocyanin increase protective response to salinity in *Oryza sativa* L. spp. indica. **AJCS**, v. 5, n. 10, p. 1191–1198, 2011.

CONUS, L. A. et al. Germinação de sementes e vigor de plântulas de milho submetidas ao estresse salino induzido por diferentes sais. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 31, n. 4, p. 67–74, 2009.

CORDEIRO, M. A. et al. Population differentiation for germination and early seedling root growth traits under saline conditions in the annual legume *Medicago truncatula* (Fabaceae). **American journal of botany**, v. 101, n. 3, p. 488–98, mar. 2014.

CRUZ, R. P. DA et al. Alterations in fatty acid composition due to cold exposure at the vegetative stage in rice. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 22, n. 3, p. 199–207, 2010.

DIAS, N. DA S.; BLANCO, F. F. Efeitos dos sais no solo e na Planta. In: GHEYI, H. R.; DIAS, N. DA S.; LACERDA, C. F. DE. **Manejo da salinidade na Agricultura: Estudos Básicos e aplicados**. Fortaleza: INCTSal, 2010. p. 22.

ESTEVES, B. DOS S.; SUZUKI, M. S. Efeito da salinidade sobre as plantas. **Oecologia Brasiliensis, ISSN-e 1981-9366, Vol. 12, Nº. 4, 2008**, v. 12, n. 4, p. 6, 2008.

FAO. **Salt-affected soils**. Disponível em: <<http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/>>. Acesso em: 9 fev. 2017.

FEIJÃO, A. R. et al. Nitrato modula os teores de cloreto e compostos nitrogenados em plantas de milho submetidas à salinidade. **Bragantia**, v. 72, n. 1, p. 10–19, 2013.

FERRAZ, R. L. DE S. et al. Trocas gasosas e eficiência fotossintética em ecótipos de feijoeiro cultivados no semiárido. **Agropec. Trop**, v. 42, n. 2, p. 181–188, 2012.

GALPAZ, N.; REYMOND, M. Natural Variation in *Arabidopsis thaliana* Revealed a Genetic Network Controlling Germination Under Salt Stress. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. e15198, 20 dez. 2010.

GALVAN-AMPUDIA, C. S.; TESTERINK, C. Salt stress signals shape the plant root. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, n. 3, p. 296–302, jun. 2011.

GONÇALVES, R. F.; TÁVORA, F. J. A. F.; HERNANDEZ, F. F. F. Distribuição da matéria seca e composição química das raízes, caule e folhas de goiabeira submetida a estresse salino. **Pesq. agropec. bras**, v. 36, n. 1, p. 79–88, 2001.

GUO, Y. et al. *Thellungilla halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 34, n. 4, p. 1287–1294, 13 jul. 2012.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International journal of genomics**, v. 2014, p. 701596, 2014.

JANSKÁ, A. et al. Cold stress and acclimation - what is important for metabolic adjustment? **Plant Biology**, v. 12, n. 3, p. 395–405, 1 maio 2010.

JIANG, H.; BARBIER, H.; BRUTNELL, T. Methods for Performing Crosses in em *Setaria viridis* em, a New Model System for the Grasses. **Journal of Visualized Experiments**, n. 80, 1 out. 2013.

JOB, C. et al. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. **Plant physiology**, v. 138, n. 2, p. 790–802, jun. 2005.

JUNTTILA, O.; ROBBERECHT, R. Ecological aspects of cold-adapted plants with a special emphasis on environmental control of cold hardening and dehardening. In: **Cold-Adapted Organisms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 57–77.

KATORI, T. et al. Dissecting the genetic control of natural variation in salt tolerance of *Arabidopsis thaliana* accessions. **Journal of Experimental Botany**, v. 61, n. 4, p. 1125–1138, 1 fev. 2010.

KHALIL, C.; BOUFOUS, E.; MOUSADIK, A. EL. Diversity of Salt Tolerance During Germination in *Medicago cil- iaris* (L.) and *Medicago polymorpha* (L.). **Atlas Journal of Plant Biology**, v. 1, n. 1, p. 6–12, 2011.

MAHAJAN, S.; TUTEJA, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 444, n. 2, p. 139–158, 2005.

MANTRI, N. et al. Abiotic Stress Responses in Plants: Present and Future. In: **Abiotic Stress Responses in Plants metabolism, productivity and sustainability**. New York, NY: Springer New York, 2012. p. 1–19.

MARENCO, R. A. et al. Fisiologia de espécies florestais da Amazônia: fotossíntese, respiração e relações hídricas. **Revista Ceres**, v. 61, p. 786–799, dez. 2014.

MARTINS, A. F. et al. Caracterização de famílias mutantes de arroz para tolerância ao frio. **Bragantia**, v. 66, n. 2, p. 227–233, 2007.

MARTINS, P. K. et al. Selection of reliable reference genes for RT-qPCR analysis during developmental stages and abiotic stress in *Setaria viridis*. **Scientific reports**, v. 6, p. 28348, 20 jun. 2016.

MUNNS, R. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, Cell and Environment**, v. 25, n. 2, p. 239–250, fev. 2002.

MUNNS, R.; TESTER, M. Mechanisms of Salinity Tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, n. 1, p. 651–681, jun. 2008.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia plantarum**, v. 15, n. 3, p. 473–497, 1962.

MUSCOLO, A.; PANUCCIO, M. R.; ESHEL, A. Ecophysiology of *Pennisetum clandestinum*: a valuable salt tolerant grass. **Environmental and Experimental Botany**, v. 92, p. 55–63, ago. 2013.

NERY, J. T. DINÂMICA CLIMÁTICA DA REGIÃO SUL DO BRASIL. **Revista Brasileira de Climatologia**, v. 1, n. 1, 2005.

OLIVEIRA JUNIOR, L. F. G. DE et al. Ecophysiological and biochemical responses of saltbush subjected to salinity. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 46, n. 2, p. 116–122, jun. 2016.

PARIHAR, P. et al. Effect of salinity stress on plants and its tolerance strategies: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4056–4075, 16 mar. 2015.

- PEDROTTI, A.; CHAGAS, R.; RAMOS, V. Causas e consequências do processo de salinização dos solos. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 19, n. 2, p. 1308–1324, 2015.
- PEREIRA, M. R. R. et al. Influência do estresse hídrico e salino na germinação de *Urochloa decumbens* e *Urochloa ruziziensis*. **Bioscience Journal**, v. 28, n. 4, p. 537–545, 2012.
- R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2013. 2017.
- RIBEIRO, A. A. et al. Emergência do maracujazeiro-amarelo sob estresse salino em diferentes substratos. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v. 10, n. 1, p. 27–36, 2016.
- RIVA-ROVEDA, L. et al. Maize plants can enter a standby mode to cope with chilling stress. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 212, 4 dez. 2016.
- SADEGHLOO, A.; ASGHARI; GHADERI-FAR. Germinação de sementes e emergência de plântulas de *Abutilon theophrasti* e *Echinochloa crus-galli*. **Planta Daninha**, v. 31, n. 2, p. 259–266, 2013.
- SAHA, P.; CHATTERJEE, P.; BISWAS, A. K. NaCl pretreatment alleviates salt stress by enhancement of antioxidant defense system and osmolyte accumulation in mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek). **Indian journal of experimental biology**, v. 48, n. 6, p. 593–600, jun. 2010.
- SANCHEZ-CALDERON, L. et al. Phosphate Starvation Induces a Determinate Developmental Program in the Roots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant and Cell Physiology**, v. 46, n. 1, p. 174–184, 19 jan. 2005.
- SILVA, F. ASSISTAT-Assistência Estatística-versão 7.7 beta (pt). **Programa computacional. Universidade Federal de**, 2014.
- SILVA, E. N. DA et al. Salt stress induced damages on the photosynthesis of physic nut young plants. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 1, p. 62–68, fev. 2011.
- SONG, J. et al. Strategies for Adaptation of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* to a Saline Environment During Seed-Germination Stage. **Annals of Botany**, v. 96, n. 3, p. 399–405, 7 jul. 2005.
- SOUSA, J. R. M. DE et al. Quantum efficiency of photosystem II and production of orange under salt stress and nitrogen fertilization. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 20, n. 5, p. 434–440, maio 2016.
- SOUZA, R. P. et al. Fotossíntese e acúmulo de solutos em feijoeiro caupi submetido à salinidade. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 6, p. 586–592, 2011.
- STHAPIT, B. R.; WITCOMBE, J. R.; WILSON, J. M. Methods of selection for chilling tolerance in nepalese rice by chlorophyll fluorescence analysis. **Crop Science**, v. 35, n. 1, p. 90, 1995.
- TAGLIAFERRE, C. et al. Absorption of nutrients by cowpea irrigated with saline water under different leaching fractions. **Cristiano Tagliaferre et al. R. Bras. Eng. Agríc. Ambiental**, v. 202012, n. 12, p. 1067–1071, 2016.

THAKUR, P. et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 429–443, 2010.

YAMORI, W. et al. Phenotypic plasticity in photosynthetic temperature acclimation among crop species with different cold tolerances. **Plant physiology**, v. 152, n. 1, p. 388–99, jan. 2010.

YI, L.; MA, J.; LI, Y. Impact of salt stress on the features and activities of root system for three desert halophyte species in their seedling stage. **Science in China Series D: Earth Sciences**, v. 50, n. S1, p. 97–106, jun. 2007.

CAPÍTULO 3

Análise em larga escala de genes análogos de resistência (RGAs) codificadores de domínios NBS no gênero *Elaeis*

RESUMO

A palma de óleo é responsável pela maior parte do fornecimento de óleo vegetal consumido no mundo, sendo utilizada em vários setores, a exemplo da indústria de cosméticos, farmacêutica, siderúrgica, alimentícia e mais recentemente no setor de biocombustíveis. Um dos grandes desafios para o cultivo dessa cultura é a suscetibilidade a diversas doenças, o que gera grandes prejuízos. A introgressão de genes de resistência é uma medida importante para mitigar esse problema e viabilizar com mais segurança o desenvolvimento da cadeia produtiva da palma de óleo. A maioria dos genes de resistência identificados em plantas codificam proteínas da família NBS-LRR que desempenham importante papel no reconhecimento de uma variedade de patógenos e na resposta de defesa. Diante da problemática exposta, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar potenciais genes NBS-LRR presentes no genoma de *Elaeis* spp. Para isso, foram utilizadas sequências de NBS-LRR identificadas no genoma de *E. guineensis* por meio de um perfil HMM aminiácido e sequências RGA NBS-LRR identificadas na montagem parcial do genoma de *E. oleifera* por meio de um perfil HMM nucleotídico. As sequências encontradas para *E. oleifera* foram ainda submetidas a uma busca das Janelas Abertas de Leituras (ORF) pelo programa ORFFinder e a identificação dos motivos dentro das ORFs encontradas por meio do programa InterPro. As sequências identificadas em *E. guineensis* e *E. oleifera* foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. Para a construção desta árvore foram incluídas ainda sequências de *Arabidopsis thaliana* (dicotiledônea) e *Brachypodium distachyon* (monocotiledônea), espécies com NBS-LRR bem caracterizados, o que possibilitou a classificação das sequências NBS-LRR dentro de gênero *Elaeis*. O Perfil HMM aminoácido, permitiu encontrar 220 sequências NBS-LRR em *Elaeis guineensis*, 20 a mais do que reportado na literatura até então. O perfil HMM nucleotídeo identificou 45 scaffolds dentro do genoma de *E. oleifera* dos quais 36 ORFs apresentaram domínios estruturais dentro da família NBS-LRR com homólogos em proteínas já descritas para *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Glycine max* e *Arabidopsis thaliana*. A análise filogenética permitiu a classificação das sequências de *Elaeis* spp. em sete grupos distintos, sendo CNL (CC-NBS-LRR), XNL (X-NBS-LRR), CN (CC-NBS), N (X-NBS), C (CC-X), TX (TIR-X) e TN (TIR-NBS), além disso a identificação de seis ortólogos em *B. distachyon*. Este estudo representa a primeira análise em grande escala da diversidade desta família de genes no gênero *Elaeis*.

Palavras-chave: *Elaeis guineensis*. *Elaeis oleifera*. Estresse biótico. NBS-LRRs.

ABSTRACT

Oil palm is responsible for most of the vegetable oil supply consumed in the world, being used in several sectors, such as the cosmetics, pharmaceutical, steel, food and more recently in the biofuels industry. One of the great challenges for the cultivation of this culture is the susceptibility to various diseases, which generates great damages. The introgression of resistance genes is an important measure to mitigate this problem and to oil palm productive chain more safely. Most resistance genes identified in plants encode NBS-LRR family proteins that play an important role in the recognition of a variety of pathogens and in the defense response. In view of the exposed problem, this study aimed to identify and characterize potential NBS-LRR genes present in the genome of *Elaeis* spp. For this, NBS-LRR sequences identified in the *E. guineensis* genome were used by means of an aminoacyanic HMM profile and RBS NBS-LRR sequences identified in the partial assembly of the *E. oleifera* genome by means of a nucleotide HMM profile. The sequences found for *E. oleifera* were also subjected to a search of the Open Reading frames (ORF) by the ORFFinder program and the identification of the reasons within the ORFs found through the InterPro program. The sequences identified in *E. guineensis* and *E. oleifera* were used to construct a phylogenetic tree. For the construction of this tree, sequences of *Arabidopsis thaliana* (dicotyledonous) and *Brachypodium distachyon* (monocotyledonous) were also included, species with well-characterized NBS-LRR, which allowed the classification of NBS-LRR sequences within genus *Elaeis*. The HMM aminoacid profile, allowed to find 220 NBS-LRR sequences in *Elaeis guineensis*, 20 more than reported in the literature so far. The nucleotide HMM profile identified 45 scaffolds within the *E. oleifera* genome of which 36 ORFs showed structural domains within the NBS-LRR family with protein homologues already described for *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Glycine max* and *Arabidopsis thaliana*. The phylogenetic analysis allowed the classification of the *Elaeis* spp. sequences into seven distinct groups, being CNL (CC-NBS-LRR), XNL (X-NBS-LRR), CN (CC-NBS), N (X-NBS), C (CC-X), TX (TIR-X) and TN (TIR-NBS), in addition to the identifying six orthologs in *B. distachyon*. This study represents the first large-scale analysis of the diversity of this gene family in the genus *Elaeis*.

Keywords: *Elaeis guineensis*. *Elaeis oleifera*. Biotic stress. NBS-LRRs

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Elaeis* é constituído por duas espécies, a *Elaeis guineensis* (a Palma de óleo africana, ou dendê) e a *Elaeis oleifera* (Palma de óleo americana ou caiaué), ambas possuem 16 pares de cromossomos ($2n=2x=32$) e podem cruzar entre si produzindo descendentes férteis (CORLEY; TINKER, 2003; DRANSFIELD et al., 2005). Aproximadamente um terço de todo óleo vegetal consumido no mundo é oriundo da Palma de óleo (SINGH et al., 2013). Este óleo está presente em diversos setores e vem ganhando espaço no mercado de biocombustíveis, servindo como fonte de diversificação de matéria prima para a produção de biodiesel (BORGES; COLLICCHIO; CAMPOS, 2016; CORLEY, 2009).

A hibridação interespecífica entre as duas espécies do gênero busca associar características benéficas do caiaué, como resistência a doenças, a alta produtividade do dendê. Um exemplo disso é o híbrido BRS Manicoré, que além de outras características importantes, apresenta resistência ao Amarelecimento Fatal (AF), anomalia que apresenta desenvolvimento inicial quase imperceptível, e que, apesar de ser um problema grave nos cultivos da palma de óleo, ainda apresenta etiologia desconhecida (BRAZILIO et al., 2012; 2010; RIOS et al., 2012). Mesmo diante deste avanço, sabe-se que os cultivos da palma de óleo estão susceptíveis a muitas outras doenças, como é o caso da mancha foliar de cercospora, antracnose, necroses foliares e anel vermelho (TRINDADE, 1997). As doenças causadas pelos patógenos fúngicos *Ganoderma* spp. e *Fusarium oxysporum*, por exemplo, podem levar a grandes perdas.

A infecção das raízes e tecidos de caule inferior por *Ganoderma boninense* resulta em podridão basal da haste, seguido por murchidão da fronde e redução nos rendimentos de frutos (SINGH, 1991). Considerando que mortalidade pode chegar a 70 ou 80% (ARIFFIN; IDRIS; SINGH, 2000; DE FRANQUEVILLE; RENARD, 1990), e que o patógeno reduz a vida produtiva das palmas com o aumento da incidência da doença ao longo de sucessivos ciclos de plantio (MILLER et al., 1999; TURNER, 1981), a podridão basal da haste apresenta-se como uma doença significativa à produção sustentável de palma de óleo, principalmente em áreas importantes de produção como na Ásia.

O *Fusarium oxysporum f. sp. elaeidis*, por sua vez, causa a murcha vascular em palmeiras adultas e também em palmeiras imaturas após replantação. A murcha quando aguda se caracteriza por uma secagem das folhas que pode levar a morte em três meses. Já na murcha crônica, as plantas podem permanecer vivas, porém atrofiadas, durante vários anos. A observação microscópica das raízes afetadas revela tipicamente o escurecimento dos tecidos vasculares, com tiloses e gomas bloqueando os vasos do xilema (FLOOD, 2006). Como

observado para *Ganoderma*, a mortalidade pode ser drástica, atingindo até 70% em certas áreas de produção na África (DE FRANQUEVILLE; RENARD, 1990). Somando a isso, existem ainda patógenos não relatados que podem ser introduzidos através de intercâmbios de materiais vegetais e ampliar ainda mais esse problema (CARVALHO; SANTOS, 2013).

O uso de agroquímico para controle de doenças gera tanto custo econômico quanto ambiental. Diante disto, faz-se necessário desenvolver medidas sustentáveis para mitigar futuros prejuízos causados pela proliferação de doenças. Apesar dos avanços conseguidos pelos programas de melhoramento estabelecidos, o longo ciclo reprodutivo da palma de óleo dificulta o melhoramento clássico, necessitando assim de técnicas biotecnológicas para o emprego da resistência genética que se caracteriza como uma alternativa viável para a introgressão de alelos de resistência em genótipos de palma de óleo de elite.

Para se defender dos patógenos, as plantas apresentam primeiramente barreiras físicas e químicas. Como uma segunda linha da resposta imunológica, os receptores existentes em proteína de resistência citoplasmáticos (R) podem reconhecer os efetores de agentes patogênicos e ativar a imunidade provocada por efector (ETI), (ELLIS; DODDS; PRYOR, 2000; JONES; DANGL, 2006). A ETI leva a respostas de defesa que limitam o avanço do patógeno através da ativação de uma resposta hipersensível e morte localizada das células infectadas.

As proteínas codificadas pelos genes de resistência apresentam domínios conservados (BENT, 1996) e, a partir da homologia e função bioquímica dos seus domínios, os produtos proteicos dos genes R puderam ser agrupados em famílias (DANGL; JONES, 2001). Cerca de 75% dos genes R codificam proteínas semelhantes a receptores citoplasmáticos com o domínio de ligação a nucleotídeos (NBS) e os domínios de repetição ricos em leucina (LRR), pertencentes a uma família conhecida como NBS-LRR (AFANADOR-KAFURI et al., 2015) e que apresentam grande importância no reconhecimento do patógeno e ativação de resposta de defesa (DANGL; JONES, 2001)

Os produtos de genes NLR (NBS-LRR) são geralmente compostos por um N-terminal altamente conservado e um domínio C-terminal LRR de comprimento variável, constituído por 10 a 40 motivos LRR curtos (CANNON et al., 2002). O domínio N-terminal NBS está envolvido em vias de transdução de sinal, desencadeadas pela presença de patógeno, resultando numa resposta de defesa pela planta, enquanto o domínio C-terminal LRR está relacionado ao reconhecimento de moléculas efectoras produzidas pelo patógeno invasor (DODDS et al., 2006; JIA et al., 2000). Esta classe de genes R pode ser ainda subdividida em duas subclasses, TIR-NBS-LRR (TNL), e não-TIR-NBS-LRR (CNL) a depender do N-terminal.

A primeira subclasse contém um domínio com homologia com a *Drosophila* TOLL e o receptor de interleucina-1 humano (TIR), enquanto que para a segunda subclasse, os membros podem conter um motivo de *coiled-coil* (CC) (MAEKAWA et al., 2011; MEYERS et al., 1999) um dedo de zinco (zinc finger) ou domínio RPW8 B (AMELINE-TORREGROSA et al., 2008; BENT, 1996; MEYERS; MORGANTE; MICHELMORE, 2002; MILLIGAN et al., 1998). Todos estes domínios N-terminais parecem estar envolvidos na especificidade e regulação da sinalização (DEYOUNG; INNES, 2006). Acredita-se que as proteínas da classe TIR NBS-LRR (TNL) são essencialmente presentes em dicotiledôneas, com raros relatos em genomas de monocotiledôneas até à data. Em contraste, a classe de proteína não-TIR (CNL) está presente tanto em monocotiledôneas como em dicotiledôneas (MEYERS et al., 1999).

Os genes análogos de resistência (RGAs) podem ser definidos como potenciais genes R que contêm domínios conservados específicos e motivos característicos de famílias de gene R conhecidas. Na ausência de sequências de genoma completo, o uso de iniciadores (primers) específicos e degenerados para identificação de motivos dentro da família NBS-LRR, como por exemplo o P-loop, kinase 2 e RNBS-D (TAKKEN; ALBRECHT; TAMELING, 2006) já foram descritos em muitas culturas. Entre as monocotiledôneas, por exemplo, esse tipo de estudo já foi realizado em milho (COLLINS et al., 1998), arroz, cevada, trigo (CHEN; LINE; LEUNG, 1998) e banana (MILLER et al., 2008) dentre outras. Mais recentemente, tem-se buscado RGAs diretamente nos genomas disponíveis nos bancos de dados (SEKHWAL et al., 2015), por meio de métodos de homologia computacional. Estudos com espécies como arroz (SINGH et al., 2015), trigo (BOUKTILA et al., 2014), milho (CHENG et al., 2012), sorgo (CHENG et al., 2010; MACE et al., 2014) e cevada (MAYER et al., 2012) são exemplos do uso dessa nova abordagem.

Até à publicação da primeira sequência do genoma de referência de *E. guineensis* (SINGH et al., 2013), apenas poucas sequências genéticas NBS-LRR em *Elaeis* spp. estavam publicamente disponíveis, derivadas da clonagem por PCR (FOAN et al., 2012) ou através da anotação de genes transcritos (LOW et al., 2014). Embora tenha sido previsto um total de 200 genes NBS-LRR a partir das 34.802 sequências preditas de genes codificadores de proteínas na primeira sequência completa do genoma de *E. guineensis* (SINGH et al., 2013) não existe atualmente informação publicamente disponível sobre a abundância de genes e diversidade NBS-LRR em *E. oleifera*, apesar do reconhecimento desta espécie como fonte de resistência a doenças.

Considerando o recente sequenciamento do genoma de *E. guineensis* (SINGH et al., 2013), o *draft* do genoma de *E. oleifera* (acesso Manicoré) gerado pela Embrapa Agroenergia

e a escassez de estudos que caracterizaram RGAs no genoma de *Elaeis* spp., objetiva-se nesse estudo realizar a identificação e caracterização de potenciais RGAs NBS-LRR nos genomas de *Elaeis* spp.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Para a identificação de genes RGAs NBS-LRR em *Elaeis* spp., foram utilizados dois conjuntos de dados: (i) sequências RGA NBS-LRR identificadas no genoma de *E. guineensis* e (ii) Sequências RGA NBS-LRR identificadas na montagem parcial do genoma de *E. oleifera*.

2.1 Identificação de RGAs NBS- LRR no genoma de *Elaeis guineensis*

Para identificação de genes NBS-LRR no genoma de referência de *E. guineensis* (SINGH et al., 2013), 52 sequências proteicas de genes R NBS-LRR derivadas de espécies de plantas monocotiledóneas e dicotiledóneas foram selecionadas de acordo com Jupe et al. (2012), servindo como um conjunto de treinamento para a identificação de motivos estruturais característicos de proteínas NBS-LRR. Estas sequências foram alinhadas através do programa MAFFT (KATO et al., 2002) versão 6.717b e, posteriormente, filtradas para detecção das regiões aminoacídicas mais conservadas, ou seja, presentes em mais de 50% das sequências, por meio do programa GBlocks 0.91b (CASTRESANA, 2000).

Os alinhamentos filtrados serviram como base para a criação de um perfil de Modelo de Markov Escondido (Perfil HMM) com auxílio do programa HMM build do pacote HMMER 3.0 (EDDY, 2008). Este perfil foi utilizado para detectar genes que codificam sequências com elementos estruturais NBS-LRR no conjunto proteico predito do genoma de referência de *E. guineensis*, por meio do programa HMM Search. Em seguida as sequências encontradas foram recuperadas no formato FASTA pelo HMM Search to Fasta. Todas as etapas foram realizadas em um *workflow*, usando os referidos algoritmos encapsulados e disponíveis na plataforma Southgreen Galaxy (<http://gohelle.cirad.fr/galaxy/root>).

Os passos supracitados também foram realizados em duas espécies, a *Arabidopsis thaliana* e *Brachypodium distachyon*. As sequências NBS-LRR encontradas para estas duas espécies foram filtradas e classificadas com base em IDs contidos em artigos publicados e/ ou com base na nomenclatura disponível em bases de dados. Sendo o banco de dados NIB LRRs da UCDAVIS (http://niblrrs.ucdavis.edu/data_links.php) para *Arabidopsis thaliana* e o artigo de Tan; Wu (2012) para *Brachypodium distachyon*. O conjunto de sequências proteicas preditas de *E. guineensis* foi acessado na base de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e as demais espécies foram acessadas pelo Joint Genome Institute-JGI (<http://jgi.doe.gov/>).

2.2 Identificação de RGAs NBS-LRR no genoma de *Elaeis oleifera*

Os 200 genes que codificam as proteínas NBS-LRR na versão atual do genoma de referência de *E. guineensis* (SINGH et al., 2013) foram utilizados para construir um segundo perfil HMM, como descrito na sessão 2.2. Entretanto esse perfil foi construído baseando-se em sequências nucleotídicas, e não aminoacídicas. A confiabilidade do perfil foi confirmada após a identificação das mesmas 200 proteínas anotadas no genoma de referência, em seguida, aplicado para identificar NBS-LRR nos *scaffolds* obtidos na montagem parcial do genoma não anotado de *E. oleifera*. O genoma parcial foi obtido com o sequenciamento de um indivíduo da população natural do estado do Amazonas (acesso Manicoré) por meio plataforma Illumina HiSeq 2000 (130X de cobertura) e montado pela Embrapa Agroenergia.

A partir dos *scaffolds* encontrados no genoma de *E. oleifera* foi realizada uma busca das Janelas Abertas de Leituras (ORFs) pelo programa ORFFinder NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>), ajustado em um tamanho mínimo de 300 nucleotídeos. Esse procedimento foi realizado, para confirmar se os *scaffolds* encontrados se comportavam como um potencial gene com comprimento esperado para a família NBS-LRR em vez de um pseudogene. Foram selecionadas as duas maiores ORFs que não se sobrepuseram. Com as sequências aminoacídicas para cada uma das ORFs identificadas dentro de cada *scaffold* foi realizado um Smart BLAST para a identificação de sequências homólogas nos bancos de dados. Posteriormente, foi realizado a identificação dos motivos proteicos nas sequências aminoacídicas extraídas das ORFs selecionadas com auxílio do programa InterPro Scan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>).

2.3 Análise filogenética

As sequências proteicas NBS-LRR encontradas para *E. guineensis* e *E. oleifera* por meio do perfil HMM nucleotídico e aminiacídico, respectivamente, foram utilizadas para a construção de uma árvore filogenética. A fim de caracterizar a família NBS-LRR dentro de *Elaeis spp* foram incluídas espécies com NBS-LRR bem caracterizados, sendo a *A. thaliana* como representante em dicotiledônea e *B. distachyon* como representante dentro das monocotiledôneas

As sequências de proteínas homólogas foram alinhadas utilizando o programa MAFFT. Os alinhamentos foram filtrados utilizando GBlocks (CAPELLA-GUTIERREZ; SILLA-MARTINEZ; GABALDON, 2009). Após a filtragem foi feita a conversão do formato de arquivo FASTA para Phyip, que é o arquivo de entrada do Software da árvore. Por fim foi feita

a construção da árvore pelo PhyML utilizando os modelos evolutivo de substituição aminoacídica JTT e de suporte dos ramos SH-like aLRT. A árvore genética foi reconciliada com a árvore das espécies da ordem viridiplantea (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=taxonomy>) usando o software RAP-Green e visualizada através do ItoI v3 (Interactive Tree Of Life) disponível em <http://itol.embl.de/>.

3 RESULTADOS

3.1 NBS- LRR no genoma de *Elaeis guineensis* e *Elaeis oleifera*

Por meio do perfil HMM proteico baseado no conjunto de sequências de monocotiledôneas e dicotiledôneas de acordo com por Jupe et al. (2012) foi possível encontrar 220 sequências com elementos estruturais NBS-LRR para *E. guineensis*, 20 a mais do que é descrito para as proteínas NBS-LRR previstas no genoma disponibilizado por Singh et al. (2013). O perfil empregado neste estudo permitiu ainda encontrar 520 sequências em *B. distachyon*, e 199 em *A. thaliana*. Espécies que foram incluídas na análise pelo fato de codificarem proteínas da família NBS-LRR (TNL e CNL) em dicotiledônea e monocotiledôneas, respectivamente.

A análise com o perfil HMM nucleotídeo na montagem parcial do genoma de *E. oleifera* identificou 45 *scaffolds* candidatos a conter genes NBS-LRR. A busca pelas ORFs dentro desses 45 *scaffold* resultou em 36 ORFs com domínios estruturais NBS-LRR como exemplificado na figura 1. Os resultados do Smart BLAST demonstraram que das 36 ORFs encontradas, 25 apresentaram grau de homologia com sequências de putativos genes de resistência (RGAs) descritos em *E. guineensis* com identidade variando de 45% a 99% , 3 para *Phoenix dactylifera* com identidade de 79, 87 e 87%, uma para *Glycine max* com identidade de 33% , além disso para genes de resistência descritos, sendo cinco em *E. guineensis* com identidade variando entre 85 e 99%, um em *A. thaliana* com identidade de 53% e um *P. dactylifera* com identidade de 72%. Observa-se, portanto, que das 36 sequências encontradas, 30 tiveram identidade com sequências já descritas para *E. guineensis* (TABELA 1).

Tabela 1 – Resultado da análise Smart BLAST para as 36 ORFs identificadas nos *scaffolds* do genoma de *Elaeis oleifera* por meio do perfil HMM nucleotídico criado a partir das 200 sequências com domínio estruturais NBS-LRR anotadas no genoma de *Elaeis guineensis* por Singh et al. (2013). (continua)

| Scaffold | Proteína correspondente | Número de acesso | Max Score | Query cover | E value | Ident |
|----------|--|------------------|-----------|-------------|---------|-------|
| 11149 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA1 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019710397.1 | 2064 | 99% | 0.0 | 83% |
| 11149 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA1 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019710397.1 | 1787 | 99% | 0.0 | 96% |

Tabela 1 – Resultado da análise Smart BLAST para as 36 ORFs identificadas nos *scaffolds* do genoma de *Elaeis oleifera* por meio do perfil HMM nucleotídico criado a partir das 200 sequências com domínio estruturais NBS-LRR anotadas no genoma de *Elaeis guineensis* por Singh et al. (2013). (continua)

| Scaffold | Proteína correspondente | Número de acesso | Max Score | Query cover | E value | Ident |
|----------|---|------------------|-----------|-------------|----------|-------|
| 26230 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010925190.2 | 2471 | 98% | 0.0 | 99% |
| 28361 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703760.1 | 1700 | 98% | 0.0 | 85% |
| 12556 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703761.1 | 1948 | 100% | 0.0 | 95% |
| 17555 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Phoenix dactylifera</i>] | XP_008790471.1 | 1659 | 96% | 0.0 | 79% |
| 20729 | PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative disease resistance protein RGA4 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019702111.1 | 2165 | 99% | 0.0 | 96% |
| 21766 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Phoenix dactylifera</i>] | XP_008780541.1 | 443 | 56% | 1 e- 158 | 87% |
| 21766 | PREDICTED: putative disease resistance protein At3g14460 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703765.1 | 1198 | 92% | 0.0 | 98% |
| 27428 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1like [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010942924.1 | 1439 | 100% | 0.0 | 98% |
| 29079 | PREDICTED: probable disease resistance protein At1g61300 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010936575.2 | 808 | 100% | 0.0 | 95% |
| 29079 | Disease resistance protein (CCNBSLRR class) family [<i>Arabidopsis thaliana</i>] | NP_173041.1 | 70.1 | 56% | 6 e - 14 | 53% |
| 29338 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1like [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010942385. | 1865 | 100% | 0.0 | 99% |

Tabela 1 – Resultado da análise Smart BLAST para as 36 ORFs identificadas nos *scaffolds* do genoma de *Elaeis oleifera* por meio do perfil HMM nucleotídico criado a partir das 200 sequências com domínio estruturais NBS-LRR anotadas no genoma de *Elaeis guineensis* por Singh et al. (2013). (continua)

| Scaffold | Proteína correspondente | Número de acesso | Max Score | Query cover | E value | Ident |
|----------|---|------------------|-----------|-------------|---------|-------|
| 30065 | PREDICTED: probable disease resistance RPP8like protein 2 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703763.1 | 1314 | 100% | 0.0 | 92% |
| 30781 | PREDICTED: putative disease resistance protein At3g14460 [<i>Glycine max</i>] | XP_014621169.1 | 382 | 84% | 4e -113 | 33% |
| 32905 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010911917.1 | 1507 | 100% | 0.0 | 96% |
| 32988 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703761.1 | 1617 | 100% | 0 | 80% |
| 33454 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010911917.1 | 1715 | 99% | 0 | 80% |
| 34229 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA1 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010909618.1 | 651 | 97% | 0 | 98% |
| 34914 | PREDICTED: disease resistance protein RGA2like [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019711198.1 | 2026 | 98% | 0 | 97% |
| 34961 | PREDICTED: putative disease resistance RPP13like protein 3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703764.1 | 1472 | 88% | 0 | 97% |
| 35204 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019702258.1 | 649 | 97% | 0 | 94% |
| 40570 | PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019701453.1 | 1111 | 100% | 0 | 63% |

Tabela 1 – Resultado da análise Smart BLAST para as 36 ORFs identificadas nos *scaffolds* do genoma de *Elaeis oleifera* por meio do perfil HMM nucleotídico criado a partir das 200 sequências com domínio estruturais NBS-LRR anotadas no genoma de *Elaeis guineensis* por Singh et al. (2013). (continua)

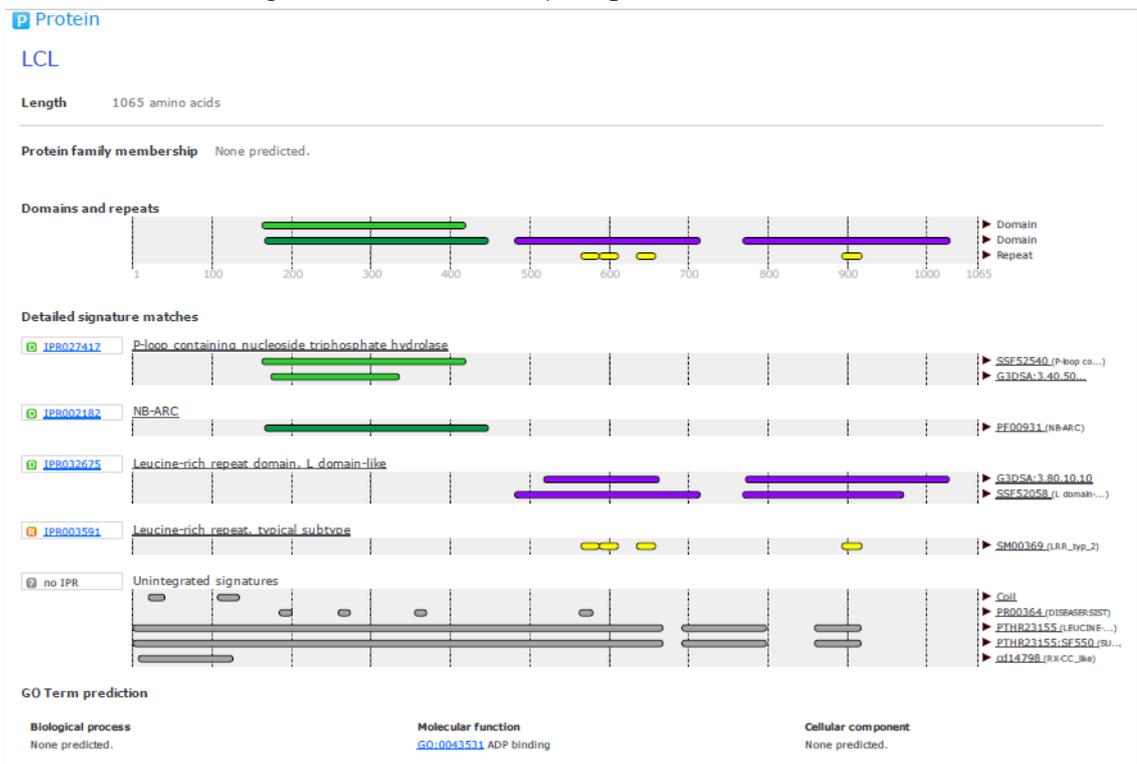
| Scaffold | Proteína correspondente | Número de acesso | Max Score | Query cover | E value | Ident |
|----------|--|------------------|-----------|-------------|---------|-------|
| 42382 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019710349.1 | 2030 | 81% | 0 | 97% |
| 44786 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 isoform X1 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010914606.1 | 772 | 98% | 0 | 45% |
| 45348 | PREDICTED: probable disease resistance RPP8like protein 2 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703763.1 | 1262 | 99% | 0 | 72% |
| 49873 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703761.1 | 1556 | 99% | 0 | 77% |
| 59748 | PREDICTED: putative disease resistance protein At3g14460 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019709593.1 | 1072 | 93% | 0 | 89% |
| 60123 | PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: putative disease resistance protein At3g14460 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019709651.1 | 855 | 100% | 0 | 79% |
| 63531 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_019703760.1 | 1170 | 100% | 0 | 91% |
| 66732 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA1 isoform X2 [<i>Phoenix dactylifera</i>] | XP_017698358.1 | 526 | 93% | 0 | 87% |
| 68411 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1like [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010905786.1 | 403 | 90% | 2e -136 | 85% |
| 69337 | PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: disease resistance protein RPM1like [<i>Phoenix dactylifera</i>] | XP_008777694.2 | 529 | 100% | 0 | 72% |

Tabela 1 – Resultado da análise Smart BLAST para as 36 ORFs identificadas nos *scaffolds* do genoma de *Elaeis oleifera* por meio do perfil HMM nucleotídico criado a partir das 200 sequências com domínio estruturais NBS-LRR anotadas no genoma de *Elaeis guineensis* por Singh et al. (2013). (conclusão)

| Scaffold | Proteína correspondente | Número de acesso | Max Score | Query cover | E value | Ident |
|----------|---|------------------|-----------|-------------|---------|-------|
| 72580 | PREDICTED: disease resistance protein RPM1like [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010942931.2 | 673 | 100% | 0 | 89% |
| 80428 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010911466.2 | 582 | 100% | 0 | 91% |
| 82318 | PREDICTED: putative disease resistance protein RGA3 [<i>Elaeis guineensis</i>] | XP_010914604.2 | 578 | 100% | 0 | 94% |

Fonte: Do autor (2017).

Figura 1 – Exemplo das representações gráficas dos domínios NBS-LRR encontrados nos Scaffolds do genoma de *Elaeis oleifera* por meio do InterPro.



Legenda: domínio NBS e motivo p-loop representados em verde, domínio LRR representado em roxo e amarelo.

Fonte: Do autor (2017).

3.2 Análises filogenéticas para *Elaeis* spp.

Das 520 sequências encontradas pelo perfil HMM para *B. distachyon*, foi possível utilizar somente 183 sequências e das 199 encontradas em *A. thaliana* foi possível utilizar 188. O número de sequências para cada uma destas espécies supracitadas foi resultante da filtragem realizada a partir de artigos e bancos de dados de sequências NBS-LRR; busca que possibilitou a classificação destas sequências em subgrupos de CNL e TNL e, posteriormente, a ancoragem e o reconhecimento das sequências das sub-família NBS-LRR de *Elaeis* spp.

Um conjunto de 627 sequências aminoácidas NBS-LRR RGAs, o que inclui as sequências filtradas de *A. thaliana* e *B. distachyon*, além das 220 sequências identificadas para *E. guineensis* por meio do perfil aminoácido e 36 sequências para *E. oleifera* identificadas por meio da análise de ORFs e domínios foram alinhadas para a construção de uma árvore filogenética global.

Os domínios NBS em *A. thaliana* podem ser filogeneticamente classificados em dois grupos distintos, distinguidos pela presença e ausência de um motivo TIR nas regiões N-terminais (MEYERS et al., 2003). Em *B. distachyon*, há descrição somente para o grupo caracterizados pela ausência de um motivo TIR na região N-terminal (TAN; WU, 2012), o que é também relatado amplamente para outras espécies monocotiledôneas. Genes NBS-LRR que contém alguns motivos desconhecidos, foram neste estudo simbolizados como X. De acordo com a disposição das sequências de *Elaeis* spp. na árvore filogenética em relação *A. thaliana* e *B. distachyon* foi possível classificar as sequências de *Elaeis* em sete grupos, sendo: CNL (CC-NBS-LRR), XNL (X-NBS-LRR), CN (CC-NBS), N (NBS), CXX (CC XX), TX (TIR X) e TN (TIR-NBS) (TABELA 2). O grupo C incluiu sequências definidas por clados mais distantes classificados como CN e CNL, o que permitiu inferir que estas sequências classificadas como C apresentavam motivo CC, mas não permitiu defini-las como pertencentes a grupos de sequências de genes regulares (CC-NBS-LRR) ou não.

Esta análise demonstrou ainda divergências significativas entre as sequências regulares de CNL em monocotiledônea e dicotiledônea (FIGURA 2), ou seja, entre as sequências pertencentes a *A. thaliana* e *B. distachyon*. A topologia da árvore evidenciou também um grupo bem definido para TNL, destacado em azul claro na árvore, não sendo encontradas sequências de *Elaeis* spp. dentro deste grupo. Foram encontradas seis sequências de *E. guineensis* ortólogos a sequências CNL descritas para *B. distachyon* como por TAN; WU (2012) como demonstrado na tabela 3.

Tabela 2 – Classificação dos subgrupos NBS encontrados em *Elaeis* spp. baseado em análise filogenética.

| Subgrupos CNL | Código | <i>E. guineensis</i> | <i>E. oleifera</i> |
|----------------------|---------------|-----------------------------|---------------------------|
| CC-NBL-LRR | CNL | 120 | 24 |
| X-NBS-LRR | XNL | 5 | 1 |
| CC-NBS | CN | 46 | 7 |
| NBS | N | 1 | 0 |
| TIR-X | TX | 25 | 2 |
| TIR-NBS | TN | 3 | 1 |
| CC-X | C | 20 | 21 |
| Total | | 220 | 36 |

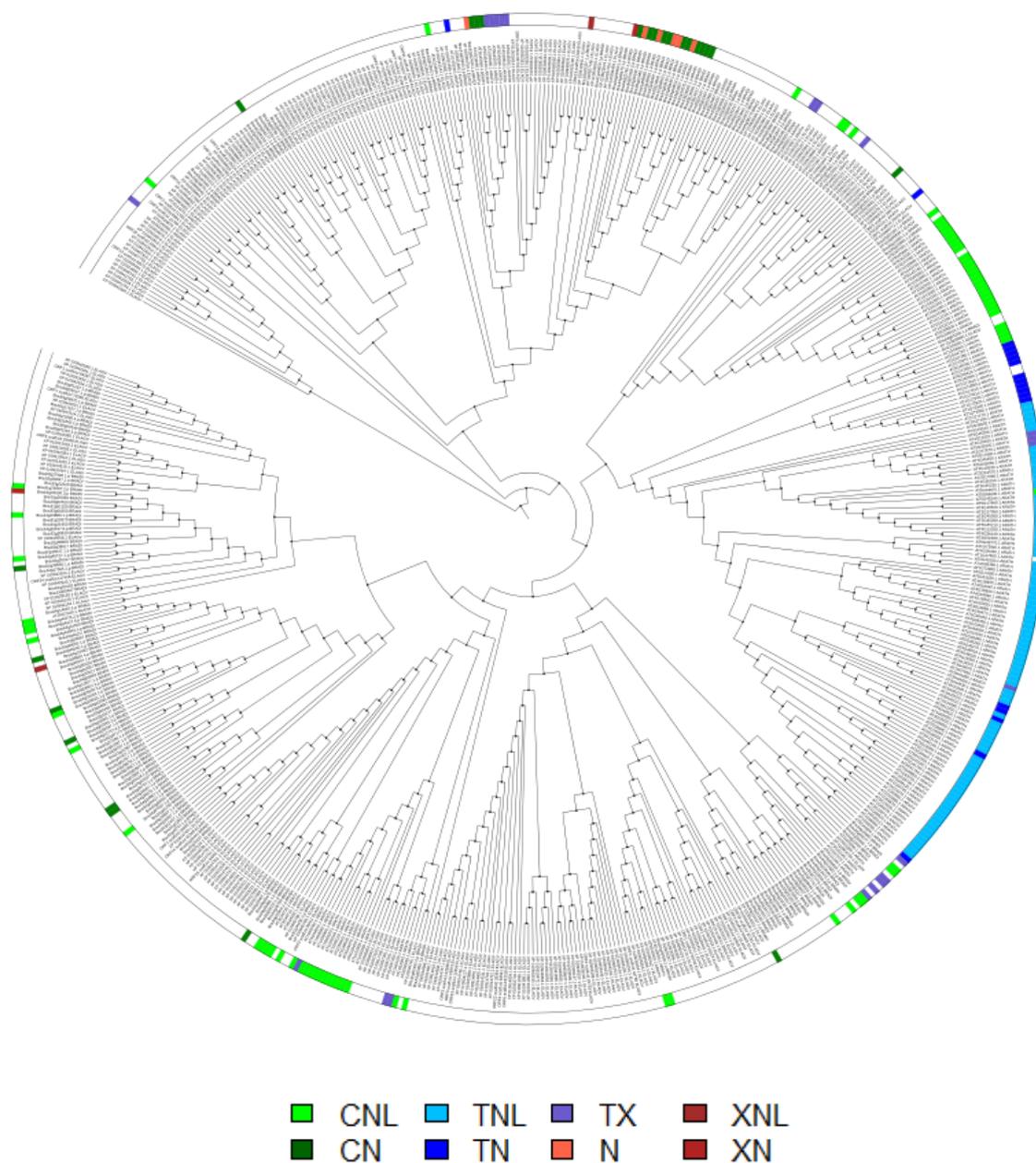
Fonte: Do autor (2017).

Tabela 3 – Ortólogos entre sequências de *Elaeis guineensis*, descritas neste estudo e sequências de *Brachypodium distachyon* e *Arabidopsis thaliana* descritas por Tan; Wu (2012).

| ID <i>Elaeis</i> spp. | Ortólogo em <i>B. distachyon</i> | Ortólogo em <i>A. thaliana</i> |
|------------------------------|---|---------------------------------------|
| XP 010923974.1 ELAGV | Bradi1g15650.1.pBRADI | AT3G14470.1 |
| XP 010905012.1 ELAGV | Bradi3g41960.1.p BRADI | AT3G14470.1 |
| XP 010905013.1 ELAGV | | |
| XP 010906772.1 ELAGV | Bradi2g52150.1.p BRADI | AT4G26090.1 |
| XP 010910950.1 ELAGV | Bradi1g67840.1.p BRADI | AT4G26090.1 |
| XP 010909985.1 ELAGV | Bradi4g03230.1.p BRADI | AT4G33300.1 |
| XP 010937447.1 ELAGV | Bradi2g37990.1.p BRADI | AT3G07040.1 |

Fonte: Do autor (2017).

Figura 2 – Análise filogenética entre as sequências NBS-LRR de *Brachypodium distachyon*, *Arabidopsis thaliana* e RGAs NBS-LRR no gênero *Elaeis* spp.



Legenda: XP...ELAGV: *Elaeis guineensis*, ARATH: *Arabidopsis thaliana*, BRADI: *Brachypodium distachyon*, ORF...ELAGV: *Elaeis oleifera*. Link para visualização da árvore: <https://1drv.ms/b/s!As084N7WIXAIqHVibDsoIEIxt03M>
 Fonte: o autor (2017).

4 DISCUSSÃO

A palma de óleo (*E. guineensis*) e o híbrido interespecífico (*E. guineensis* × *E. oleifera*) se destacam pelo elevado rendimento de óleo, podendo produzir no estado do Pará de 4 a 6 t/ha/ano, estado em que se concentra mais de 80% do plantio no Brasil (CHIA et al., 2009). A demanda por óleos vegetais deve atingir 240 milhões de toneladas até 2050 (CORLEY, 2009). Sabendo-se que a palma de óleo pode fornecer até 10 vezes mais óleo do que outras oleaginosas (ABRAPALMA, 2015), é provável que a produção eficiente desta cultura desempenhe um papel cada vez mais importante nessa oferta.

O crescimento da área plantada da palma de óleo, seja na região do Pará, ou nas demais áreas de cultivo no Brasil, se encontra sob o risco de ataques de pragas e doenças. A fusariose e o *Ganoderma*, por exemplo representam riscos consideráveis em certas áreas de produção. Para Carvalho e Santos, (2013) as doenças se destacam como ameaça primária ao cultivo dessa cultura, dessa forma, o melhoramento para resistência a doenças é essencial para prevenir e/ou sanar futuros problemas fitossanitários. Uma das principais abordagens para a prevenção de doenças é o desenvolvimento de variedades resistentes e a disponibilidade das sequências dos genomas de *Elaeis* spp. se constitui uma ferramenta extremamente útil para a prospecção de genes de resistência nessa cultura (FOAN et al., 2012).

Muitos genomas de plantas estão disponíveis nos bancos de dados, apesar deste grande recurso, apenas uma quantidade relativamente pequena de genes R foram clonados e totalmente caracterizados. Em contrapartida, muitos RGAs já foram identificados em diversas culturas (SEKHWAL et al., 2015). Para o gênero *Elaeis*, no entretanto, estudos para prospecção e diversidade de RGAs NBS-LRR são escassos. Até a data encontra-se apenas um estudo em que foram isolados três putativos homólogos de genes de resistência (RGHs) em *E. guineensis*, utilizando iniciadores (*primers*) direcionados para os motivos conservados do domínio de ligação de nucleótidos (NBS). A comparação dessas sequências de RGH isoladas com a base de dados mostrou identidade para resistência à doença como proteínas em coco (90%) e tomate (87%) (FOAN et al., 2012).

No presente estudo, para a o genoma de *E. oleifera* foram encontrados 45 scaffolds, dos quais pôde-se identificar 36 ORFs (RGA) com motivos estruturas presentes na família de genes de resistência NBS-LRR. Essas 36 ORFs apresentam sequências homólogas a putativos e genes de resistência já descritos para *Elaeis guineensis*, *Phoenix dactylifera*, *Glycine max* e *Arabidopsis thaliana*. Além disso, para *E. guineensis*, o perfil HMM utilizado permitiu a identificação de 220 sequências com motivos estruturais NBS-LRR, 20 a mais do que reportado

na literatura (SINGH et al., 2013). Estudos para a validação da função destes putativos genes de resistência a doença é extremamente importante, especialmente dada a ausência de genes de resistência conhecidos para patógenos importantes neste gênero.

Os genes NBS-LRR são a maior classe de proteínas de resistência à doença e têm um papel importante no reconhecimento de efetores dos agentes patogênicos (DANGL; JONES, 2001). O domínio NBS pode ser classificado de acordo com motivos na região N-terminal, podendo ser constituído por proteínas que transportam o receptor TOL/interleucina-1 (TIR) ou codificar um domínio N-terminal com *coiled-coil* (CC). O primeiro denominado de proteínas TNL (TIR-NBS-LRR) e o segundo proteínas CNL (CC-NBS-LRR) (LOZANO et al., 2015; MEYERS et al., 2003) Esta divisão se reflete tanto na análise filogenética como nas suas vias de sinalização (MEYERS et al., 1999).

A evolução dos genes NBS-LRR divergiu significativamente entre monocotiledôneas e dicotiledôneas (LOZANO et al., 2015). Uma análise filogenética entre espécies dicotiledôneas e monocotiledôneas mostrou que a classe Tir-NBS-LRR (TNL) é muito mais conservado entre as dicotiledôneas enquanto que CC-NBS-LRR (CNL) é mais diversa entre monocotiledôneas e dicotiledôneas. (SEKHWAL et al., 2015). O predomínio destes genes TNL ou CNL no genoma pode ser determinado pelos patógenos que infectam as espécies vegetais ao longo de sua história evolutiva (LOZANO et al., 2012; PAN; WENDEL; FLUHR, 2000).

A presença de T e TN dentre as classificações apresentadas neste estudo, não evidencia a presença de grupos TNL em *Elaeis* spp. Devido ao pequeno grupo de sequências utilizadas dentro de *B. distachyon*, por exemplo, a classificação deste estudo não permitiu distinguir algumas sequências NBS-LRR. Adicionalmente, por não apresentar domínio NBS, nem LRR, o T não pode ser considerado um TNL. Já a presença de TN pode indicar, talvez, TNL truncado dentro dos genomas de *Elaeis* spp. Tais incertezas quanto a classificação das sequências evidencia a necessidade do uso de mais representantes de outras culturas, permitindo o uso de um conjunto maior de sequência, que sejam bem definidas para os subgrupos desta família. Dessa forma, a classificação das sequências de NBS-LRR em *Elaeis* spp. pode ser mais bem esclarecida.

As proteínas que apresentam N ou NL podem ser originadas por uma perda de domínio que, na maioria dos casos, leva a criação de pseudogenes (LOZANO et al., 2012). Estes pseudogenes, por sua vez, pode ocorrer devido a rápida evolução desta família de genes, o que pode ser constatado entre diferentes cultivares da mesma espécie em ambientes com diferentes estresses bióticos, por exemplo (LOZANO et al., 2015). A análise de sequências relacionadas dentro de famílias de plantas elucidada a relação evolutiva e o processo envolvido no

desenvolvimento de resistência de doenças. Esta informação pode auxiliar na compreensão da distribuição dos genes de resistência dentro dos genomas de plantas.(SAMUELIAN et al., 2008). Além disso, esse tipo de estudo proporciona não apenas uma informação sobre a distribuição, evolução e classificação dos genes NBS- LRR, mas também a geração de recursos genéticos úteis para a criação de novos cultivares resistentes (LIU et al., 2007).

Das 34.802 proteínas preditas no genoma de *E.guineensis*, pela análise realizada neste estudo, ~0,63 % (220), apresentam RGAs NBS-LRR, número maior do que encontrada para o milho com 179 entre os 32.540 de genes anotados (CHENG et al., 2012), e inferior ao sorgo, que apresenta 332 NBS-LRR em 34.496 de genes anotados (CHENG et al., 2010; MACE et al., 2014).

NBS-LRR identificados em sequências com função conhecida em outras espécies de plantas pode indicar uma função potencial das sequências de espécies em estudo. Dos sete genes de resistência encontrados com identidade para sequências NBS-LRR em *E. oleifera* quatro pertencem a família de proteínas de resistência RPM1 descrita como responsável por desencadear a resposta de hipersensibilidade em *Arabidopsis thaliana* (MACKEY et al., 2002) e associada a à resistência contra *Puccinia triticina* (ferrugem) em trigo (FEUILLET et al., 2003), além da classe CC NBS LRR descrito por conferir resistência ao fungo *Blumeria graminis* em arroz (LIU et al., 2016).

Adicionalmente foram encontradas 6 ortólogos em *B. Distachyon* que apresentam proteína de resistência a doenças com domínio NB-ARC e LRR ortólogos a 4 proteínas NBS-LRR presentes *A. thaliana* (TAN; WU, 2012), sendo a sequência AT3G07040.1, conhecida como proteína RPM1 descrita por conferir resistência às estirpes de *Pseudomonas syringae* que carregam os genes *avrB* e *avrRpm1*, a sequência AT4G26090.1 que codifica uma proteína da membrana plasmática com repetição rica em leucina que confere resistência à infecção por *Pseudomonas syringae* ao interagir com o gene de avirulência *avrRpt2*, a sequência AT3G14470.1, sendo descrita como uma proteína envolvida na resposta de defesa, presente na região extracelular com função de ligação de proteínas, e a sequência AT4G33300.1 que codifica um receptor imune membro da família ADR. Todas as funções destas proteínas em *A. thaliana* estão descritas no The Arabidopsis Information Resource-TAIR disponível em <https://www.arabidopsis.org/>.

5 CONCLUSÃO

A caracterização em larga escala de genes análogos de resistência contendo o domínio NBS-LRR para o gênero *Elaeis* permitiu encontrar 20 RGAs NBS-LRR a mais do que reportado na literatura pra *E. guineensis* até então, sendo ainda um estudo inédito para caracterização de tais sequências para *E. oleifera*, encontrando 36 sequências com homólogos a putativos e genes de resistência disponíveis em bancos de dados.

Acredita-se que a identificação e classificação de NBS-LRR dentro do gênero *Elaeis* para a filogenia das sequências genéticas realizada neste estudo, não foi determinada com precisão no contexto de espécies de plantas monocotiledóneas e dicotiledóneas para as subfamílias NBS-LRR, necessitando assim da inclusão de um maior número de espécies com estas sequências bem definidas. Acredita-se ainda que apesar de não ter sido caracterizados genes funcionais neste estudo, a homologia observada com genes de resistência conhecidos em outras espécies de plantas, tais como *A. thaliana*, *Phoenix dactylifera*, *Glycine max* e ortólogos em *B. distachyon* pode fornecer evidências para potenciais papéis dos genes de resistência apresentando domínios estruturais NBS-LRR em *Elaeis spp* em respostas a estresses bióticos.

È plausível considerar ainda que este estudo abre gaps para futuras pesquisas, a exemplo do método de sequenciamento preferencial de alto rendimento, conhecido como sequenciamento de enriquecimento de genes de resistência (RenSeq), que se baseia no enriquecimento para famílias de genes específicas, além de pesquisas relacionadas a análise da posição cromossômica dos genes NBS-LRR, podendo fornecer informações sobre distribuição e arranjo genômico, análise de expressão gênica durante respostas de defesa a patógenos importantes, desenvolvimento de marcadores moleculares e OGMs apresentando genes NBS-LRR entre outros, o que contribuirá para o melhoramento visando a resistência a doenças nesta importante cultura.

REFERÊNCIAS

- ABRAPALMA. **A palma no Brasil e no mundo | ABRAPALMA – Associação Brasileira de Produtores de Óleo de Palma**. Disponível em: <<http://www.abrapalma.org/pt/a-palmano-brasil-e-no-mundo>>. Acesso em: 16 fev. 2017.
- AFANADOR-KAFURI, L. et al. Identifying and Analyzing the Diversity of Resistance Gene Analogs in Colombian *Rubus* Genotypes. **Plant Disease**, v. 99, n. 7, p. 994 -1001, jul. 2015.
- AMELINE-TORREGROSA, C. et al. Identification and Characterization of Nucleotide-Binding Site-Leucine-Rich Repeat Genes in the Model Plant *Medicago truncatula*. **Plant Physiology**, v. 146, n. 1, p. 5–21, 2008.
- ARIFFIN, D.; IDRIS, A.; SINGH, G. Status of Ganoderma in oil palm. In: FLOOD J; BRIDGE PD; HOLDERNESS M. **Ganoderma diseases of perennial**. p. 49–68.
- BANERJEE, D.; ZHANG, X.; BENT, A. F. The leucine-rich repeat domain can determine effective interaction between RPS2 and other host factors in *Arabidopsis* RPS2-mediated disease resistance. **Genetics**, v. 158, n. 1, p. 439–50, maio 2001.
- BENT, A. F. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. **The Plant cell**, v. 8, n. 10, p. 1757–1771, out. 1996.
- BINDSCHEDLER, L. V.; PALMBLAD, M.; CRAMER, R. Hydroponic isotope labelling of entire plants (HILEP) for quantitative plant proteomics; an oxidative stress case study. **Phytochemistry**, v. 69, n. 10, p. 1962-1972, jul. 2008.
- BORGES, A. DE J.; COLLICCHIO, E.; CAMPOS, G. A. A cultura da palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) no Brasil e no mundo: aspectos agronômicos e tecnológicos - uma revisão. **Revista Liberato**, v. 17, n. 27, p. 01–118, 2016.
- BOUKTILA, D. et al. Large-scale analysis of NBS domain-encoding resistance gene analogs in *Triticeae*. **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 3, p. 598–610, set. 2014.
- BRAZILIO, M. et al. O Dendzeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.) - Revisão. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 2, n. 1, p. 27–45, 2012.
- CANNON, S. B. et al. Diversity, Distribution, and Ancient Taxonomic Relationships Within the TIR and Non-TIR NBS-LRR Resistance Gene Subfamilies. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, n. 4, p. 548–562, abr. 2002.
- CAPELLA-GUTIERREZ, S.; SILLA-MARTINEZ, J. M.; GABALDON, T. trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 25, n. 15, p. 1972–1973, 1 ago. 2009.
- CARVALHO, E. DE A.; SANTOS, T. DE P. F. DOS. **Doenças da Palma de Óleo no Contexto da Expansão do Cultivo no Estado do Pará**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/95012/1/Doc389.pdf>>. Acesso em: 26 fev. 2017.
- CASTRESANA, J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. **Molecular biology and evolution**, v. 17, n. 4, p. 540–52, abr. 2000.
- CHEN, X. M.; LINE, R. F.; LEUNG, H. Genome scanning for resistance-gene analogs in

rice, barley, and wheat by high-resolution electrophoresis. **TAG Theoretical and Applied Genetics**, v. 97, n. 3, p. 345–355, 27 ago. 1998.

CHENG, X. et al. A genomic analysis of disease-resistance genes encoding nucleotide binding sites in *Sorghum bicolor*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 2, p. 292–297, 2010.

CHENG, Y. et al. Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize. **FEBS Journal**, v. 279, n. 13, p. 2431–2443, jul. 2012.

CHIA, G. S. et al. Repetibilidade da produção de cachos de híbridos interespecíficos entre o caiaué e o dendezeiro. **Acta Amazonica**, v. 39, n. 2, p. 249–254, 2009.

COLLINS, N. C. et al. The Isolation and Mapping of Disease Resistance Gene Analogs in Maize. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 11, n. 10, p. 968–978, out. 1998.

CORLEY, R. H. V. How much palm oil do we need? **Environmental Science & Policy**, v. 12, n. 2, p. 134–139, abr. 2009.

CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. B. The Classification and Morphology of the Oil Palm. In: CORLEY, R. H. V.; TINKER, P. **The oil Palm**. 4. ed. Blackwell Science Ltd, 2003. p. 368.

CUNHA, R. N. V. DA; LOPES, R. **BRS Manicoré: híbrido interespecífico entre o caiaué e o dendezeiro africano recomendado para áreas de incidência de amarelecimento-fatal. - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/busca-de-publicacoes/-/publicacao/867099/brs-manicore-hibrido-interespecifico-entre-o-caiaue-e-o-dendezeiro-africano-recomendado-para-areas-de-incidencia-de-amarelecimento-fatal>>. Acesso em: 16 fev. 2017.

DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 14 jun. 2001.

DE FRANQUEVILLE, H.; RENARD, J. Improvement of oil palm vascular wilt tolerance- results and development of the disease at the R. Michaux plantation. **Oleagineux (France)**, v. 45, n. 10, p. 399–405, 1990.

DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, v. 7, n. 12, p. 1243–1249, dez. 2006.

DODDS, P. N. et al. Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 23, p. 8888–93, 6 jun. 2006.

DRANSFIELD, J. et al. A new phylogenetic classification of the palm family , Arecaceae. **Kew Bulletin**, v. 60, n. September, p. 559–569, 2005.

EDDY, S. R. A Probabilistic Model of Local Sequence Alignment That Simplifies Statistical Significance Estimation. **Citation: Eddy SR PLoS Comput Biol**, v. 4, n. 5, 2008.

ELLIS, J.; DODDS, P.; PRYOR, T. The generation of plant disease resistance gene specificities. **Trends in Plant Science**, v. 5, n. 9, p. 373–379, 2000.

FEUILLET, C. et al. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from

the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 25, p. 15253–15258, 9 dez. 2003.

FLOOD, J. A Review of Fusarium Wilt of Oil Palm Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *elaeidis*. **Phytopathology**, v. 96, n. 6, 2006.

FOAN, C. et al. Amplification and sequencing of partial-length disease resistance gene homologues coding for NBS-LRR proteins in oil palm (*Elaeis guineensis*). **AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol. AsPac J. Mol. Biol. Biotechnol.**, v. 20, n. 1, p. 25–31, 2012.

JIA, Y. et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. **The EMBO Journal**, v. 19, n. 15, p. 4004–4014, 1 ago. 2000.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 16 nov. 2006.

JUPE, F. et al. Identification and localisation of the NB-LRR gene family within the potato genome. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 75, 2012.

KATAGIRI, F.; THILMONY, R.; HE, S. Y. The *Arabidopsis thaliana*-*Pseudomonas syringae* interaction. **The Arabidopsis book**, v. 1, p. e0039, 2002.

KATOH, K. et al. MAFFT: A novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 14, p. 3059–66, 15 jul. 2002.

LIU, J. et al. Recent Progress in Elucidating the Structure, Function and Evolution of Disease Resistance Genes in Plants. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 34, n. 9, p. 765–776, set. 2007.

LIU, X. et al. CC-NBS-LRR-Type R Proteins for Rice Blast Commonly Interact with Specific WRKY Transcription Factors. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 34, n. 2, p. 533–537, 19 abr. 2016.

LOW, E.-T. L. et al. Analyses of Hypomethylated Oil Palm Gene Space. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. e86728, 30 jan. 2014.

LOZANO, R. et al. Genome-Wide Identification and Mapping of NBS-Encoding Resistance Genes in *Solanum tuberosum* Group Phureja. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34775, 6 abr. 2012.

LOZANO, R. et al. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava genome. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 360, 2015.

MACE, E. et al. The plasticity of NBS resistance genes in sorghum is driven by multiple evolutionary processes. **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 253, 26 dez. 2014.

MACKEY, D. et al. RIN4 Interacts with *Pseudomonas syringae* Type III Effector Molecules and Is Required for RPM1-Mediated Resistance in *Arabidopsis*. **Cell**, v. 108, n. 6, p. 743–754, 2002.

MAEKAWA, T. et al. Coiled-Coil Domain-Dependent Homodimerization of Intracellular Barley Immune Receptors Defines a Minimal Functional Module for Triggering Cell Death. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 3, p. 187–199, 17 mar. 2011.

MAYER, K. F. X. et al. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. **Nature**, v. 491, n. 7426, p. 711–6, 17 out. 2012.

- MEYERS, B. C. et al. Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 20, n. 3, p. 317–32, nov. 1999.
- MEYERS, B. C. et al. Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. **The Plant cell**, v. 15, n. 4, p. 809–34, abr. 2003.
- MEYERS, B. C.; MORGANTE, M.; MICHELMORE, R. W. TIR-X and TIR-NBS proteins: two new families related to disease resistance TIR-NBS-LRR proteins encoded in *Arabidopsis* and other plant genomes. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 32, n. 1, p. 77–92, out. 2002.
- MILLER et al. Genetic diversity of Ganoderma in oil palm plantings. **Plant Pathology**, v. 48, n. 5, p. 595–603, out. 1999.
- MILLER, R. N. et al. Analysis of non-TIR NBS-LRR resistance gene analogs in *Musa acuminata* Colla: Isolation, RFLP marker development, and physical mapping. **BMC Plant Biology**, v. 8, n. 8, 2008.
- MILLIGAN, S. B. et al. The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. **The Plant cell**, v. 10, n. 8, p. 1307–19, ago. 1998.
- PAN, Q.; WENDEL, J.; FLUHR, R. Divergent evolution of plant NBS-LRR resistance gene homologues in dicot and cereal genomes. **Journal of molecular evolution**, v. 50, n. 3, p. 203–13, mar. 2000.
- RIOS, S. DE A. . et al. **Recursos genéticos de palma de óleo (*Elaeis guineensis* Jacq.) e caiuapé (*Elaeis oleifera* (H. B. K.) Cortes).** - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/en/amazonia-ocidental/busca-de-publicacoes/-/publicacao/949588/recursos-geneticos-de-palma-de-oleo-elaeis-guineensis-jacq-e-caiuape-elaeis-oleifera-h-b-k-cortes>>. Acesso em: 16 fev. 2017.
- SAMUELIAN, S. K. et al. Isolation and linkage mapping of NBS-LRR resistance gene analogs in red raspberry (*Rubus idaeus* L.) and classification among 270 Rosaceae NBS-LRR genes. **Tree Genetics & Genomes**, v. 4, n. 4, p. 881–896, 10 out. 2008.
- SEKHWAL, M. K. et al. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 19248–19290, 2015.
- SINGH, G. Ganoderma - the scourge of oil palm in the coastal area. **Proceedings of Ganoderma workshop, Bangi, Selangor, Malaysia, 11 September 1990.**, p. 7–35, 1991.
- SINGH, R. et al. Oil palm genome sequence reveals divergence of interfertile species in Old and New worlds. **Nature**, v. 500, n. 7462, p. 335–339, 24 jul. 2013.
- SINGH, S. et al. Genome-Wide Distribution, Organisation and Functional Characterization of Disease Resistance and Defence Response Genes across Rice Species. **PLOS ONE**, v. 10, n. 4, p. e0125964, 22 abr. 2015.
- TAKKEN, F. L.; ALBRECHT, M.; TAMELING, W. IL. Resistance proteins: molecular switches of plant defence. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 9, p. 383–390, 2006.
- TAN, S.; WU, S. Genome Wide Analysis of Nucleotide-Binding Site Disease Resistance

Genes in *Brachypodium distachyon*. **Comparative and Functional Genomics**, p. 1–12, 2012.

TRINDADE, D. Doenças do dendezeiro (*Elaeis guineensis* Jacq.). In: KIMATI, H. ET AL. (Ed.). **Manual de fitopatologia: Volume 2: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres, 1997.

TURNER, P. Oil palm diseases and disorders. **Oxford Univ. Press**, 1981.

XU, N. et al. The bacterial effector AvrB-induced RIN4 hyperphosphorylation is mediated by receptor-like cytoplasmic kinase complex in *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, p. MPMI-01-17-0017-R, 29 mar. 2017.