

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**Prospecção de genes responsivos a estresse hídrico em uma espécie
neotropical: cajueiro (*Anacardium occidentale*)**

Érika Frydrych Capelari

Porto Alegre
29 de Agosto de 2022

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

Prospecção de genes responsivos a estresse hídrico em uma espécie neotropical: cajueiro
(Anacardium occidentale)

Érika Frydrych Capelari

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Genética e Biologia Molecular da UFRGS como
requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em**
Genética e Biologia Molecular

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Margis
Coorientador: Dr. Nureyev Ferreira Rodrigues

Porto Alegre
29 de agosto de 2022

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genômica e Populações de Plantas, Centro de Biotecnologia e Departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, com apoio financeiro da FAPERGS, CNPq e INCT. A doutoranda obteve bolsa de estudos do CNPq (48 meses).

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida eterna. Por Seu infinito amor, cuidado e misericórdia. Por abrir as portas, da maneira certa e na hora certa, e me guiar em todas as situações.

Ao Gian, meu amor. Teu amor, incentivo, apoio, ajuda e motivação diária foi o que me deu forças para poder concluir essa etapa. Obrigada por ser meu porto seguro e por estar junto comigo não só nos momentos de alegrias e conquistas, mas também nos dias de tristeza, ansiedade e preocupação. Todos os dias sou grata a Deus pela benção de poder viver a vida ao teu lado.

À minha família. Aos meus pais, Everson e Tânia. Obrigada pelas palavras de coragem e ânimo a cada conversa, pelos conselhos e orações pela minha vida. Com certeza vocês fazem parte desse momento único. Aos meus irmãos Felipe, Laura e Yuri, pela torcida, parceria e pelas conversas. Yuri, obrigada por ser um irmão presente e amigo. Eu amo vocês!

Ao Rogerio, pela oportunidade de fazer parte do LGPP. Foram quase nove anos de convivência e muito aprendizado, não só de ciência, mas de vida. Obrigada por nem sempre aceitar tudo que eu falava e pedia e pelos questionamentos, pois cada 'não' fez com que eu amadurecesse. Ter sido tua aluna orientada por todos esses anos foi um privilégio e uma honra e sou muito feliz e agradecida por isso.

Ao Nureyev, meu coorientador. Nure, obrigada! Pela orientação, pelos puxões de orelha, pelas trocas de ideias, ajudas e explicações na área da bioinformática, por falar e repetir, e repetir, e repetir sempre que precisava. Pela amizade e momentos de descontração.

Aos colegas e amigos do laboratório, aos que permanecem e aos que fizeram parte, de alguma forma: Isabel, Natalia, Guilherme Cordenonsi, Frank e Pabulo. A companhia e parceria de vocês fizeram as coisas ficarem mais leves.

Aos membros da banca por terem aceito o convite e por dedicarem um tempo para ler e avaliar este trabalho, contribuindo para sua finalização.

Ao Elmo e ao Gabriel, por sempre estarem disponíveis para auxiliar quando foi preciso.

Por ser brasileira e ter tido a oportunidade de fazer graduação e pós-graduação em uma instituição de qualidade, como a UFRGS.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS	9
LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1 ESTRESSE ABIÓTICO	17
1.2 ESTRESSE HÍDRICO NO MUNDO E NO BRASIL	19
1.3 RESPOSTAS DAS PLANTAS AO ESTRESSE HÍDRICO	20
1.4 CAJUEIRO – <i>ANACARDIUM OCCIDENTALE</i>	25
1.4.1 Cajucultura no Brasil e no mundo.....	26
1.4.2 Morfologia do cajueiro.....	29
1.5 PARÂMETROS FISIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DE ESTRESSE.....	31
1.6 METODOLOGIAS DE ANÁLISE DE EXPRESSÃO	33
2. JUSTIFICATIVA	37
3. OBJETIVOS.....	39
3.1 GERAL.....	39
3.2 ESPECÍFICOS.....	39

4. CAPÍTULO 1 - TRANSCRIPTIONAL PROFILING AND PHYSIOLOGICAL RESPONSES REVEAL NEW INSIGHTS INTO DROUGHT TOLERANCE IN A SEMIARID ADAPTED SPECIES, <i>ANACARDIUM OCCIDENTALE</i>	40
5. CAPÍTULO 2 – ANÁLISE FUNCIONAL DE GENES DE CAJU RESPONSIVOS AO ESTRESSE HÍDRICO EM SISTEMA HETERÓLOGO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> 53	
5.1 INTRODUÇÃO	53
5.2 JUSTIFICATIVA.....	57
5.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
5.3.1 MATERIAIS VEGETAIS E CONDIÇÕES DE CRESCIMENTO.....	58
5.3.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA.....	58
5.3.3 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES CODIFICADORAS DOS GENES SELECIONADOS PARA SUPEREXPRESSION	59
5.3.4 LIGAÇÃO DOS AMPLICONS NO VETOR DE ENTRADA PCR®8/GW/TOPO.....	60
5.3.5 CONFIRMAÇÃO DAS COLÔNIAS TRANSFORMADAS	61
5.3.6 RECOMBINAÇÃO COM VETOR DESTINO.....	62
5.3.7 TRANSFORMAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	63
5.3.8 EXPRESSÃO EM SISTEMA HETERÓLOGO DE <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	64
5.4 RESULTADOS.....	65
5.4.1 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES GENÔMICAS DOS GENES SELECIONADOS PARA SUPEREXPRESSION	65
5.4.2 LIGAÇÃO DOS AMPLICONS EM VETOR DE ENTRADA PCR®8/GW/TOPO.....	66
5.4.3 RECOMBINAÇÃO COM VETOR DE DESTINO.....	66
5.4.4 TRANSFORMAÇÃO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	67
5.4.5 EXPRESSÃO HETERÓLOGA EM <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	68
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	69

7. PERSPECTIVAS E POSSIBILIDADES	79
8. REFERÊNCIAS	80

ABREVIATURAS

A – assimilação de CO₂ fotossintético

ABA - ácido abscísico, do inglês *abscisic acid*

APX – ascorbato peroxidase

CAT – catalase

cDNA – DNA complementar

FAO – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, do inglês *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

F_v/f_m – rendimento quântico máximo do fotossistema I

g – gramas

gDNA – DNA genômico

gs – condutância estomática

ha – hectare

m - metros

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

NGS – sequenciamento de nova geração, do inglês *Next Generation Sequencing*

PCR – Reação em Cadeira da Polimerase, do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*

PSII – Fotossistema II, do inglês *Photosystem II*

qPCR – Reação em Cadeira da Polimerase quantitativa, do inglês *quantitative Polymerase Chain Reaction*

RNA – sequenciamento de RNA, do inglês *RNA-sequencing*

ROS – espécies reativas a oxigênio, do inglês *Reactive Oxygen Species*

RWC – conteúdo relativo de água, do inglês *Relative Water Content*

SOD – superóxido dismutase

T – tonelada

Ψ_w – potencial hídrico

Ψ_s – potencial osmótico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplo de via de transdução de sinal em resposta à sinalização de estresse.....	18
Figura 2. Mapa do Brasil com destaque na região do semiárido.....	20
Figura 3. Conceito geral das sequências de fase e respostas induzidas em plantas pela exposição ao estresse.....	21
Figura 4. Mecanismos de resposta ao déficit hídrico em diferentes níveis.....	22
Figura 5. Maiores produtores mundiais de castanha de caju em 2021.....	27
Figura 6. Participação (%) dos estados na área colhida com cajueiro, no Nordeste, em 2021.....	28
Figura 7. Principais destinos das exportações de castanha de caju e amêndoa.....	29
Figura 8. Classificação dos cajueiros quanto à morfologia.....	30
Figura 9. Reações luminosas e de carboxilação da fotossíntese em cloroplastos de plantas terrestres.....	32
Figura 10. Representação esquemática da organização de um plasmídeo Ti.....	56
Figura 11. Mapa do vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO.....	61
Figura 12. Mapa do vetor de destino pEarleyGate 103.....	63
Figura 13. Amplificação dos genes DUF2 e POR-A de <i>Anacardium occidentale</i> confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%.....	65
Figura 14. Ligação dos genes DUF2 e POR-A no vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO.....	66
Figura 15. Recombinação entre vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO e vetor de destino pEarleyGate103.....	67
Figura 16. Transformação de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> eletrocompetente com vetor de destino pEarleyGate103.....	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> projetados para amplificar os genes escolhidos para superexpressão e tamanho de amplicon.....	59
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

RESUMO

O estresse hídrico afeta as plantas em vários níveis de organização, do molecular ao morfológico e tem relevância na produtividade das culturas. Como resultado do aumento da seca em todo o mundo, a produtividade das culturas tem sido drasticamente afetada, levando a perdas significativas. Nas últimas décadas, as secas aumentaram em intensidade e frequência em muitas áreas ao redor do mundo. Para lidar com o estresse hídrico, as plantas desenvolveram diferentes estratégias para resistir ou tolerar baixos potenciais hídricos, que podem incluir ajustes moleculares, fisiológicos e morfológicos. No entanto, os mecanismos usados variam amplamente entre as espécies, genótipos, estágio de desenvolvimento da planta e em resposta ao progresso da seca através do tempo. Nos últimos anos, diversos estudos têm buscado elucidar como as plantas respondem molecularmente à seca. Embora esses estudos tenham se concentrado em plantas modelo, eles podem não refletir mecanismos de tolerância e resistência à seca em organismos diversos e de perfil arbóreo. Além disso, em plantas adaptadas ao semiárido, os mecanismos envolvidos em conferir tolerância à seca são pouco conhecidos. Por esta razão, uma melhor compreensão das consequências do déficit hídrico e estratégias adaptativas em espécies nativas e adaptadas à seca torna-se de grande importância para melhorar a produtividade agrícola no semiárido. O cajueiro (*Anacardium occidentale*) é uma espécie naturalmente adaptada a ambientes com baixa disponibilidade hídrica. Neste trabalho foi utilizada uma estratégia integrativa combinando análise fisiológica com RNA-seq de alto rendimento para entender as estratégias fisiológicas e moleculares adaptativas de *Anacardium occidentale*, variedade BRS226, em resposta ao estresse por déficit hídrico. As análises fisiológicas indicam que o cajueiro apresenta um comportamento isoídrico típico, com fechamento estomático precoce e gradual, decréscimos tardios na folha e na quantidade relativa de água e quase nenhum dano oxidativo celular. Também foi caracterizado o perfil transcricional de genes em resposta ao estresse hídrico moderado e severo e após a re-irrigação. Foram identificados 1733 genes diferencialmente expressos em amostras submetidas a estresse hídrico por 26 dias, dos quais 705 foram induzidos e 1028 foram reprimidos. Após a re-irrigação, 1330 (76,7%) genes retornaram à sua expressão basal. Entre os grupos de genes mais representativos estão genes relacionados à fotossíntese e cloroplasto, fatores de transcrição, transportadores, proteínas de choque térmico e genes envolvidos na eliminação de ROS. Outros genes relacionados às respostas ao estresse hídrico são aqueles envolvidos no

metabolismo dos osmólitos e na sinalização de ABA como PP2C e SnRKs. Para confirmar os resultados do RNA-seq, foram escolhidos 13 genes para terem sua expressão diferencial validada por PCR quantitativo (qPCR). Para realização de estudos de genômica funcional em *Arabidopsis thaliana*, foram selecionados os genes DUF2 (domínio de função desconhecida) e POR-A (protoclorofilídeo oxidorreductase A), ambos genes validados por qPCR. Este foi o primeiro estudo a mostrar respostas moleculares de folhas de cajueiros submetidos ao estresse por déficit hídrico.

Palavras-chaves: estresse hídrico, expressão diferencial, cajueiro, RNA-seq, qPCR, genômica funcional, POR-A.

ABSTRACT

Water stress affects plants at various levels of organization, from molecular to morphological, and has relevance to crop productivity. As a result of increasing drought across the world, crop productivity has been drastically affected, leading to significant productivity losses. In recent decades, droughts have increased in intensity and frequency in many areas around the world. To deal with water stress, plants have developed different strategies to resist or tolerate low critical water potentials, which may include molecular, physiological and morphological adjustments. However, the mechanisms used vary widely between species, genotypes, stages of plant development, and in response to the progress of drought over time. In recent years, several studies have proposed to elucidate how plants molecularly respond to drought in a variety of species. Although these studies have focused especially on model plants, they may not reflect mechanisms of drought tolerance and resistance in non-model organisms. Furthermore, in plants adapted to the semiarid region, the mechanisms involved in providing drought tolerance are poorly understood. For this reason, a better understanding of the consequences of water deficit and adaptive strategies in native species adapted to drought becomes of great importance to improve agricultural productivity in the semiarid region. The cashew tree (*Anacardium occidentale*) is a species naturally adapted to environments with low water availability. In this work, we used an integrative strategy combining physiological analysis with high-throughput RNA-seq to understand the physiological and molecular adaptive strategies of *Anacardium occidentale*, variety BRS226, in response to water stress. Physiological analyzes indicate that cashew shows a typical isohydric behavior, with early and gradual stomatal closure, late decreases in the leaf and the relative amount of water, and almost no cellular oxidative damage. The transcriptional profile of genes in response to moderate and severe water stress and after re-irrigation was also characterized. We identified 1733 differentially expressed genes in samples submitted to water stress for 26 days, of which 705 were induced and 1028 were repressed. After re-irrigation, 1330 (76.7%) genes returned to their basal expression. Among the most representative gene groups are genes related to photosynthesis and chloroplast, transcription factors, transporters, heat shock proteins, and genes involved in ROS elimination. Other genes related to responses to water stress are those involved in osmolyte metabolism and ABA signaling such as PP2C and SnRKs. To confirm the RNA-seq results, 13 genes were chosen to have their differential expression validated by quantitative PCR

(qPCR). To carry out functional genomics studies in *Arabidopsis thaliana*, the genes DUF2 (domain of unknown function) and POR-A (protochlorophyllide oxidoreductase A) were selected, both validated by qPCR. This was the first study to show molecular responses of cashew tree leaves subjected to water stress.

Keywords: water stress, differential expression, cashew, RNA-seq, qPCR, functional genomics, POR-A.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse abiótico

O que é estresse? Em termos físicos, estresse é definido como uma força mecânica por unidade de área aplicada a um objeto. Em resposta à essa força aplicada, o objeto sofre uma mudança na dimensão, que também é conhecida como tensão. Como as plantas são sésseis, medir essa tensão, ou estresse, se torna difícil, ainda mais quando uma condição biológica que pode ser estresse para uma planta, pode ser ótima para outra. Dessa forma, definir estresse em termos biológicos torna-se um pouco complicado. Diversos autores têm diferentes definições acerca do conceito de estresse biológico, em especial devido a evolução do conhecimento desse fenômeno. Levitt (1980) define estresse como qualquer fator que desfavoreça a vida de uma planta (LEVITT, 1980). Já Larcher (2000) classifica como um desvio significativo das condições ótimas para a vida, que induz respostas e mudanças em um organismo (LARCHER, 2000). Ainda, de acordo com Cramer (2011), estresse refere-se a qualquer condição ou substância desfavorável que afeta o metabolismo, a reprodução, o desenvolvimento da raiz ou o crescimento de uma planta (CRAMER *et al.*, 2011). Apesar de algumas diferenças pontuais nas definições, de ampla forma, concluem que estresse é um estado em que a planta está crescendo em condições não ideais, em diferentes formas e durações, que podem causar consequências permanentes e levar à morte se os limites de tolerância e capacidade adaptativa da planta não forem capazes de lidar com a situação (LARCHER, 2000; LICHTENTHALER, 2006).

Os estresses podem ser divididos em duas grandes classes: bióticos, causados por patógenos, pragas, fungos ou bactérias e abióticos, causados por falta de água, salinidade, altas temperaturas, entre outros (SUZUKI *et al.*, 2014). Diariamente as plantas são expostas às mais diversas situações que lhe são impostas. A primeira percepção do estresse abiótico é captada pelos receptores de membrana das células vegetais. A seguir, esse sinal é transduzido, resultando na geração de mensageiros secundários, como cálcio, espécies reativas de oxigênios (do inglês *Reactive Oxygen Species* – ROS) e formas de inositol fosfatos, que irão modular o nível de cálcio intracelular. A detecção dos níveis de Ca^{2+} citosólico é feita por proteínas conhecidas como sensores de Ca^{2+} . Estes sensores irão interagir com seus respectivos parceiros e iniciar uma cascata de fosforilação, que por sua vez, tem como alvo os principais genes de respostas a estresse ou fatores de transcrição que controlam estes genes (Figura 1). Em última instância, os produtos destes genes responsivos levam à adaptação da planta e ajudam a planta a sobreviver e superar condições desfavoráveis.

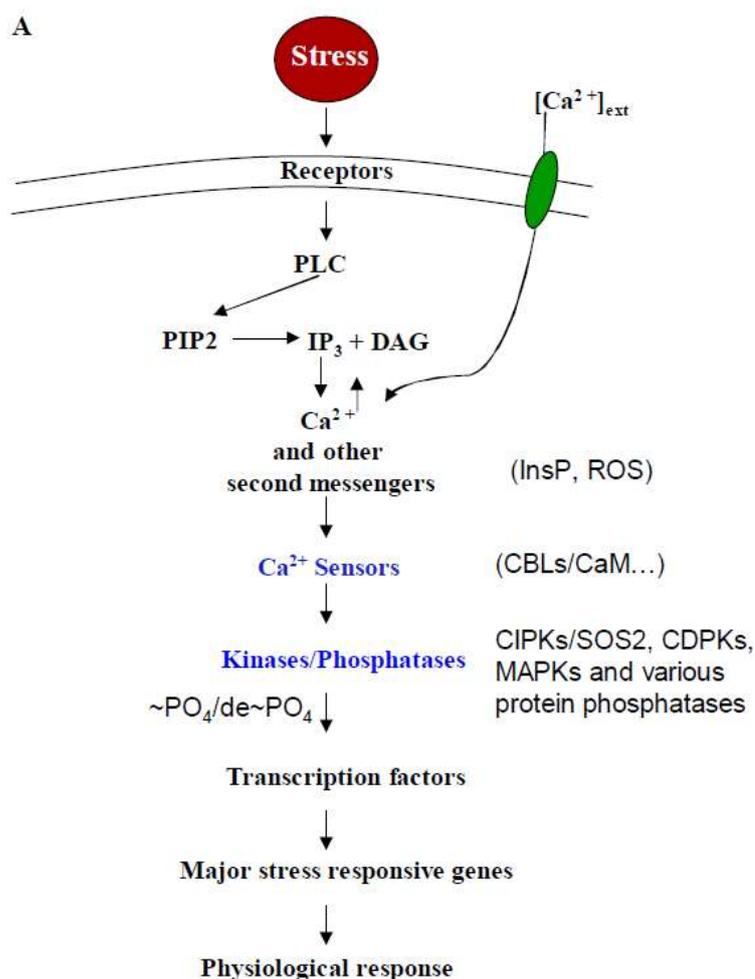


Figura 1. Exemplo de via de transdução de sinal em resposta à sinalização de estresse. O sinal de estresse é percebido primeiro pelo receptor de membrana, que ativa a fosfolipase C (PLC) e hidrolisa o 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP2) para gerar o inositol 1,2,4 trifosfato (IP3), bem como diacilglicerol (DAG). Após o estresse, os níveis de cálcio citoplasmático são regulados por meio de movimentos de íons Ca^{2+} do apoplasto, do retículo endoplasmático e do vacúolo. Essa mudança no nível de Ca^{2+} citoplasmático é detectada por sensores de cálcio que interagem com seus componentes de sinalização a jusante, que podem ser quinases e/ou fosfatases. Essas proteínas afetam a expressão dos principais genes responsivos ao estresse, levando a respostas fisiológicas. (Adaptado de (MAHAJAN; TUTEJA, 2005))

Estresses, isolados ou combinados afetam a distribuição geográfica das plantas na natureza e se tornam uma das maiores limitações à expansão de culturas e produtividade (HE; HE; DING, 2018; ZHU, J. K., 2016), uma vez que inibem o crescimento da planta devido aos efeitos negativos

sobre os principais processos bioquímicos e fisiológicos essenciais para o funcionamento celular (KANT *et al.*, 2008; KOTAK *et al.*, 2007; KREPS *et al.*, 2002; MITTLER, 2006; RIZHSKY *et al.*, 2004; TATAR; GEVREK, 2008).

1.2 Estresse hídrico no mundo e no Brasil

Estresse hídrico ou estresse osmótico é o estresse que os vegetais sofrem em condições ambientais em que a quantidade de água transpirada pela planta é superior à quantidade que ela absorve. O déficit hídrico é característico de períodos de seca, mas também pode ser consequência de um aumento da salinidade do ambiente de cultivo (levando a uma queda no potencial osmótico do ambiente) e é um dos principais fatores ambientais responsáveis por causar estresse na plantas e prejuízos na agricultura, afetando a produção global de culturas (FEDOROFF *et al.*, 2010).

Eventos climáticos extremos, como estiagem prolongada, têm se tornado cada vez mais frequente em todo o mundo. Nos últimos 40 anos, a porcentagem de áreas afetadas pelas secas mais que dobrou, estimando-se que 12 milhões de hectares de terra são perdidos devidos à seca e desertificação a cada ano. Além disso, 80% das perdas causadas pela seca afetam o setor agrícola nos países em desenvolvimento (FAOSTAT, 2018). No total, o EM-DAT (Banco de dados de eventos de emergência, do inglês *Emergency Events Database*) registrou 1,4 bilhão de pessoas afetadas por secas no período de 2000-2019 em todo o mundo, tornando as secas o segundo tipo de desastre mais impactante por essa medida (EM-DAT, 2019).

No Brasil, a seca é um fenômeno natural que tem registro histórico desde o ano de 1552 (VILLA, 2001). A região mais afetada por secas é a denominada semiárido brasileiro, sendo composta por oito estados da região Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) e parte do estado de Minas Gerais (Figura 2), e é nela onde estresses abióticos além da seca, como salinidade, alta radiação solar e elevadas temperaturas predominam (CAVALCANTI *et al.*, 2004; MITTLER, 2006). O semiárido é uma região que ocupa cerca de 1,3 milhão de km² (12% do território nacional) e abrange 1262 municípios brasileiros, onde vivem aproximadamente 28 milhões de brasileiros/as (12% da população do país), considerando a delimitação atual divulgada em 2017 (Resolução 115, de 23 de novembro de 2017, da SUDENE). Nessa região há significativa produção de alimentos, especialmente feijão, milho e mandioca, e uma pecuária tradicional, incluindo galináceos, bovinos, ovinos e caprinos. Além disso, grande parte da concentração de estabelecimentos é baseada em agricultura familiar, que são pequenas propriedades que utilizam o sistema sequeiro, ou seja, sem irrigação. Dessa forma, torna-se uma

região especialmente vulnerável à estiagem, apresentando perda de safras e rebanhos, e consequentemente afetando outros setores produtivos e a economia regional e nacional.



Figura 2. Mapa do Brasil com destaque na região do semiárido. Fonte: IBGE, 2017.

1.3 Respostas das plantas ao estresse hídrico

Durante o processo evolutivo, as plantas desenvolveram estratégias morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares para superar esses obstáculos. Dessa forma, em situações de estresse, um sistema interconectado é iniciado com a percepção dos sinais ambientais e dispara uma cascata de sinalizações para ativação de genes de respostas, regulados por fatores de transcrição específicos. Diferentes mecanismos são ativados, de forma a buscar a adaptação e estabelecer um novo patamar de homeostase celular (ZHU, J. K., 2016).

A resposta das plantas ao estresse ocorre em quatro fases diferentes, como observado na Figura 3. Com a introdução do estresse, algumas funções normais, como desempenho

fotossintético, sofrem um declínio (alarm phase). Conforme o estresse se mantém, a planta passa para a segunda fase de resposta, que é o estágio de resistência (stage of resistance). Na fase 2, a planta passa a se adaptar às condições estressantes e podem ocorrer processos de reparação. A fase 3 (stage of exhaustion) é a fase de exaustão, onde há uma alta na intensidade do estresse. Nessa fase, a planta pode ser levada a um estado de estresse crônico e até mesmo a morte. Se o estresse for retirado, a planta entra na fase 4 (regeneration phase), com recuperação parcial ou total de suas funções fisiológicas.

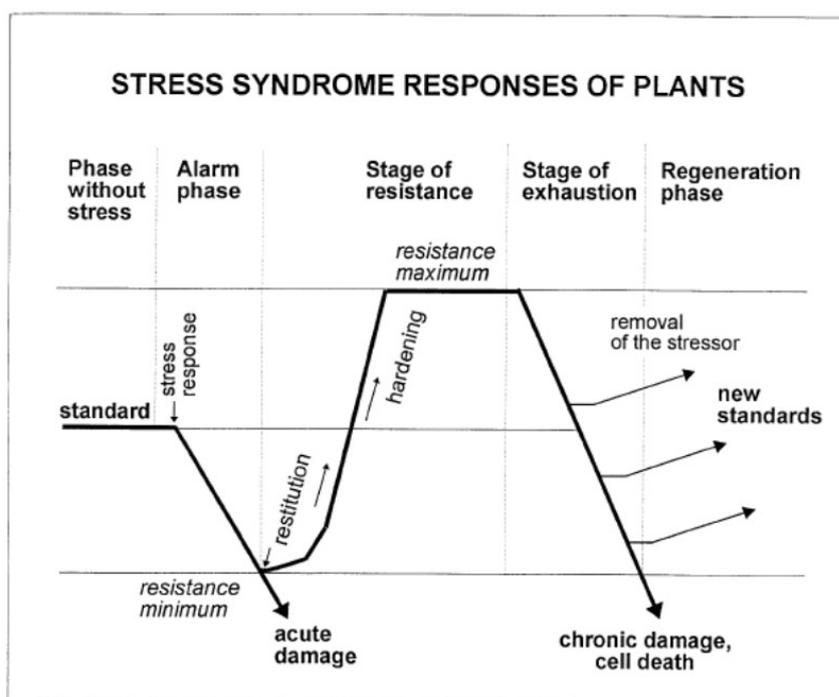


Figura 3. Conceito geral das sequências de fase e respostas induzidas em plantas pela exposição ao estresse. As plantas que crescem sob estresse começam em uma condição fisiológica padrão para responder e lidar com o estresse. Várias respostas e mecanismos de defesa serão ativados. Após a remoção do (s) estressor (es), novos padrões de fisiologia podem, no entanto, ser alcançados na planta dependendo do tempo de remoção do estresse, bem como da duração e intensidade do estresse. (LICHTENTHALER, 2006)

O tipo de resposta ao déficit hídrico depende de diversos fatores, como: espécie, estágio de desenvolvimento, estado metabólico, capacidade adaptativa da planta e duração e intensidade do estresse (REDDY; CHAITANYA; VIVEKANANDAN, 2004; SIMOVA-STOILOVA *et al.*,

2008). Como trata-se de uma via complexa, diversos genes são afetados para que haja reprogramação dos padrões de expressão. Essa modulação da expressão está associada a diferentes fatores: aspectos morfológicos (ex. redução da área foliar, murcha, aparecimento de tricomas e sistema radicular eficiente), fisiológicos (transpiração reduzida, eficiente uso de água, limitação da fotossíntese em nível de cloroplasto, fechamento dos estômatos e ajuste osmótico) e bioquímicos e moleculares (síntese de acúmulo de solutos como prolina, trealose e poliaminas, aumento da atividade da enzima nitrato redutase, aumento no armazenamento de carboidratos, síntese de HSPs, LEA e enzimas envolvidas na produção e remoção de ROS) (BENKO-ISEPPON; NEPOMUCENO; ABDELNOOR, 2012) (Figura 4). De forma geral, o estresse hídrico induz uma série de respostas fisiológicas e bioquímicas, tanto a nível celular quanto molecular.

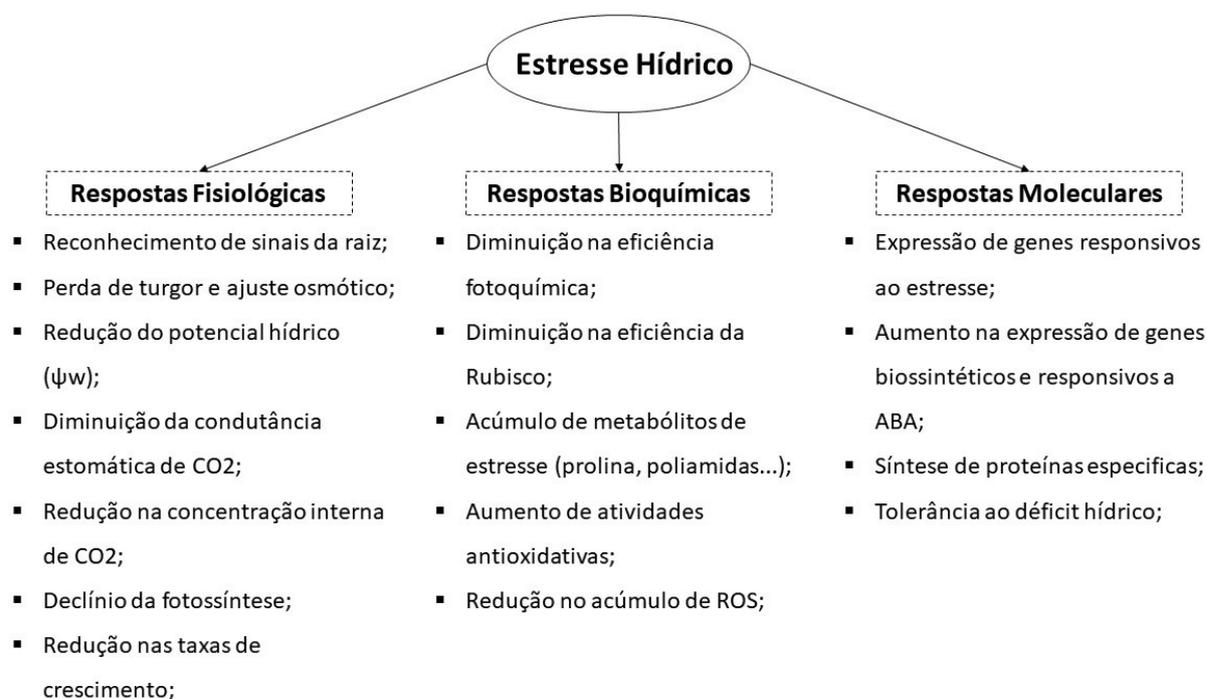


Figura 4. Mecanismos de resposta ao déficit hídrico em diferentes níveis. Adaptado de (SHAO *et al.*, 2009)

A nível celular, o estresse hídrico afeta a planta através da redução do crescimento vegetativo e pela redução da taxa fotossintética (WAGNER; DREYER, 1997). Sob condições de falta de água, a redução na atividade de quinases dependentes de ciclina acaba resultando na divisão celular mais lenta e na inibição do crescimento (SCHUPPLER *et al.*, 1998). Processos como síntese

da parede celular e de proteínas são afetados desencadeando uma redução da expansão foliar, uma vez que quanto menor a área foliar exposta, mais reduzida será a transpiração (NOGUEIRA RJMC, ALBUQUERQUE MB, 2005; SADRAS; MILROY, 1996). Dessa forma, poderá ocorrer a perda de rigidez, mudanças na fluidez e composição de membrana, alterações nas concentrações de solutos e interações entre proteína-proteína e proteína-lipídio (VALLIYODAN; NGUYEN, 2006). Ainda, o estresse hídrico pode estimular abscisão foliar e crescimento de raízes, o que é considerado uma segunda linha de defesa contra dessecação (TAIZ; ZEIGER, 2004). Embora a expansão celular seja um dos primeiros processos a ser afetado, a fotossíntese é um dos processos fisiológicos mais sensíveis à falta de água (CHAVES, M. M.; FLEXAS; PINHEIRO, 2009).

Como resposta inicial ao estresse hídrico, há perda de turgescência e fechamento estomático para evitar a perda de água. Este processo altera as trocas gasosas e limita o influxo de CO₂ para o mesófilo foliar, levando a uma redução de fixação de CO₂, e a uma tendência a sofrer fotoinibição (CHAVES, M.; MAROCO; PEREIRA, 2003; CORNIC, 2000). Dessa forma, há diminuição na taxa fotossintética (LAWLOR, D. W. AND UPRETY, 1993; SILVA *et al.*, 2001), o que pode resultar em alterações estruturais e químicas (KÜLTZ, 2005). Com o fechamento estomático, a quantidade de O₂ aumenta em relação a de CO₂, o que favorece a fotorrespiração. Além disso, pode afetar as membranas do cloroplasto e levar à inativação do fotossistema II (PSII) e a biossíntese de compostos orgânicos (GIGON *et al.*, 2004). Com o progresso do estresse hídrico e a desidratação do tecido, ocorre um prejuízo metabólico gradual (KAISER, 1987), incluindo a limitação da fotofosforilação (TEZARA *et al.*, 1999; YOUNIS; BOYER; GOVINDJEE, 1979), regeneração da Ribulose 5-bifosfato (GIMENEZ; MITCHELL; LAWLOR, 1992; GUNASEKERA; BERKOWITZ, 1993) e atividade da Rubisco (CHAVES, M. M. *et al.*, 2002). Na condição de fotorrespiração, a Rubisco ativa sua função oxidase e leva à redução de O₂ e, portanto, há maior formação de ROS (DAT *et al.*, 2000) promovendo o aumento de danos oxidativos (BJÖRKMAN; POWLES, 1984).

As plantas também respondem e se adaptam ao déficit hídrico a nível bioquímico e molecular. Estas alterações podem ser observadas através de mudanças em rotas metabólicas pela variação em determinados produtos, tanto no metabolismo primário quanto no secundário (AUSTEN *et al.*, 2019; FÀBREGAS; FERNIE, 2019a; ISAH, 2019). Sob condições de estresse, os vegetais superiores acumulam osmólitos, que podem ser açúcares, prolina livre, ácidos orgânicos, íons, proteínas, entre outros solutos, com o principal objetivo de manter a turgescência celular e estabilizar proteínas e estruturas celulares nas condições desafiadoras (BARTELS;

SUNKAR, 2007; PADMAVATHI; RAO, 2013). O acúmulo de osmólitos compatíveis é uma estratégia de defesa a fim de evitar ao máximo a perda de água na planta. Um aminoácido bastante importante que possui ação osmorreguladora nas células é a prolina. Sintetizada a partir do glutamato, ela atua na planta de forma a manter a turgescência celular, estabilizando proteínas e substâncias que são essenciais ao metabolismo vegetal (JOSEMARA; QUEIROZ, 2006). Diversos trabalhos evidenciam que o acúmulo de prolina e açúcares como trealose constitui-se em um critério para estudos de tolerância a seca e outros fatores. Dessa forma, estes osmoprotetores são utilizados como indicadores bioquímico-fisiológicos de estresse hídrico (EL-BASHITI *et al.*, 2005; NEPOMUCENO, A. L. NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, 2001). De maneira geral, o acúmulo de osmólitos e proteínas específicas envolvidas na tolerância ao estresse desencadeiam a produção do fito-hormônio ácido abscísico (ABA), aumentando sua concentração nos cloroplastos (HSIAO, 1973).

Além disso, ocorre mudança no nível de expressão dos genes que codificam proteínas tipo LEA (do inglês, *Late Embryogenesis Abundant*), na síntese de chaperonas moleculares, que auxiliam na formação da estrutura nativa de polipeptídios e na prevenção de dobramento e agregação incorretos, e proteinases, que atuam na remoção de proteínas desnaturadas danificadas. Por fim, o estresse hídrico também leva à ativação de enzimas envolvidas na produção e remoção de ROS (CUSHMAN; BOHNERT, 2000; ZHU, J.-K., 2011). Esta eliminação é realizada através de diferentes enzimas, como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) (IVANOV, 1998) e catalase (CAT) (ASADA, 2006), e alguns antioxidantes de baixo peso molecular, como carotenoides (vitamina A) (WOITSCH; RÖMER, 2005), ascorbato (vitamina C), α -tocoferol (vitamina E) (HAVAUX *et al.*, 2005) e glutatona (ASADA, 2006).

Todas estas alterações, a nível bioquímico e molecular, criam uma complexa rede de interações de sinais, hormônios e proteínas que permite a sinalização de estresse e a ativação de mecanismos de adaptação e sobrevivência a condições ambientais adversas (ARBONA *et al.*, 2016; PELEG; BLUMWALD, 2011; RODZIEWICZ *et al.*, 2014; SMÉKALOVÁ *et al.*, 2014). Embora os mecanismos moleculares, bioquímicos e fisiológicos envolvidos nas respostas das plantas aos estresses sejam complexos (KANT *et al.*, 2008; KOTAK *et al.*, 2007; KREPS *et al.*, 2002; MITTLER, 2006), o entendimento destes é de suma importância para identificação, caracterização e melhor compreensão das estratégias adaptativas utilizadas pelas plantas e os mecanismos utilizados para a resistência e/ou tolerância vegetal contra esses estresses. Sendo assim, espécies

que demonstram ser aclimatadas a ambientes com estes fatores predominantes, são boas candidatas para se estudar as respostas metabólicas envolvidas na proteção celular contra essas condições.

1.4 Cajueiro – *Anacardium occidentale*

Apesar de o ambiente semiárido apresentar condições desfavoráveis para o desempenho vegetal (baixas e irregulares precipitações e elevada evapotranspiração), algumas espécies são bem adaptadas ao cultivo nessas regiões. Devido à grande plasticidade fenotípica e genotípica, algumas plantas nativas da região Neotropical apresentam uma ampla distribuição geográfica. Entre estas estão as espécies das tribos Anacardiaceae (gênero *Anacardium*), Spondiadeae (*Spondias*), Semecarpeae (*Semecarpus anacardium*), Rhoeae (*Rhus*) e Dobineae. Alguns dos produtos de Anacardiaceae, incluindo manga (*Mangifera indica* L.), pistache (*Pistacia vera* L.), pimenta rosa (*Schinus terebinthifolia* L.) e caju (*Anacardium occidentale* L.), são apreciados em todo o mundo (PELL, 2004).

A família Anacardiaceae pertence à ordem Sapindales e possui aproximadamente 81 gêneros e 800 espécies, presentes em ambientes secos e úmidos. Estas espécies possuem uma ampla distribuição geográfica, concentrando-se principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, estendendo-se até regiões temperadas (KUBITZKI, 2014). Nas Américas, é relatada a existência de 32 gêneros nativos, sendo que 77% das espécies são endêmicas do continente americano (TERRAZAS, 2017). O gênero *Anacardium* é constituído por 22 espécies, sendo 21 originárias das Américas do Sul e Central e uma da Malásia. Destas 22 espécies já relatadas, apenas a espécie *Anacardium occidentale* L., de origem brasileira, é explorada comercialmente. No Brasil, estão catalogados 14 gêneros com 55 espécies de Anacardiaceae sendo que 16 delas são restritas ao país (VAN EIJNATTEN, 2018).

Embora a Amazônia e o Cerrado do Brasil central sejam centros de dispersão do gênero *Anacardium* (MITCHEL; MORI, 1987), a maior diversidade de espécies com potencial econômico existe no Nordeste do Brasil. O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta nativa do Nordeste Brasileiro, distribuída desde as regiões dos Tabuleiros Costeiros à Caatinga (QUEIROZ *et al.*, 2012) e que possui uma considerável capacidade adaptativa a solos de baixa fertilidade, a temperaturas elevadas e ao estresse hídrico (FERREIRA-SILVA, Sérgio L. *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2011).

Espécies como o cajueiro desenvolveram mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares para lidar com condições adversas (SILVEIRA *et al.*, 2003). Devido às características

edafoclimáticas apresentadas pela região Nordeste aliada ao aspecto vigoroso das plantas, o cultivo do cajueiro tornou-se uma das mais importantes atividades agrícolas do Nordeste brasileiro, com elevada importância socioeconômica para a região, principalmente para o Semiárido, por gerar postos de trabalho e renda para os estados do Nordeste na época mais seca do ano.

Para entender os mecanismos que o cajueiro utiliza para tolerar as condições de estresse, diversos trabalhos de bioquímica e fisiologia têm sido realizados, sendo que a maior parte destes é em relação ao estresse salino. Em 2003, Silveira e colaboradores demonstraram que frente à condição de estresse salino, ocorre acúmulo de prolina nas folhas de *Anacardium occidentale* (SILVEIRA *et al.*, 2003). Para alguns vegetais, essa via é conservada, apresentando importância para a osmoproteção, reserva de carbono e nitrogênio, e estabilização de proteínas e membranas (SILVEIRA *et al.*, 2003; SZABADOS; SAVOURÉ, 2009). No caso do cajueiro, quando submetido a estresses simultâneo de déficit hídrico e alta luminosidade, diversos mecanismos de proteção são desencadeados, destacando um eficiente sistema antioxidante. Além de baixos níveis de ROS, as plantas foram capazes de melhorar suas taxas de assimilação de CO₂, contribuindo para a atenuação do acúmulo de ROS nos fotossistemas (LIMA *et al.*, 2018). Ainda, o aumento de vias antioxidativas enzimáticas e não-enzimáticas vêm sendo descrito para a espécie em resposta a condição de estresse. Ferreira-Silva e colaboradores (2012) demonstraram aumento da atividade de catalase atrelado ao aumento da concentração de NaCl. Essa resistência à salinidade parece ser comum para espécies correlatas, *A. occidentale* e *A. microcarpum* (SILVEIRA *et al.*, 2012). Diversos trabalhos descrevem a tolerância do cajueiro à salinidade, entretanto, estudos adicionais que permitam a visualização global das mudanças, podem ampliar o entendimento das vias utilizadas pela espécie, tanto frente ao estresse salino, como frente a outros tipos de estresses.

1.4.1 Cajucultura no Brasil e no mundo

De acordo com a FAOSTAT, até outubro de 2021 a área mundial colhida de castanha de caju foi de aproximadamente 6,81 milhões de hectares (ha) enquanto que a produção chegou a 4,16 milhões de toneladas (T) (FAOSTAT, 2021). Já no Brasil, até julho de 2021, a área colhida atingiu 428,8 mil ha, com uma produção de cerca de 130 mil T (ICB, 2022).

Dentre os maiores produtores mundiais estão Costa do Marfim (21,6%), Índia (18,8%) e Vietnã (7,5%). Juntos, estes três países foram responsáveis pelo aumento de 1,8 milhão de ha, de 2009 a 2019. Nesse mesmo período, o Brasil perdeu 332 mil ha, em função, principalmente, dos longos períodos de estiagem na região Nordeste, onde se concentra a produção nacional. Essa

situação acarretou a morte de grande número de árvores e perda de 42% de sua área e fez com que o Brasil perdesse sua posição de quinto (5º) para nono (9º) maior produtor mundial, com 428,86 mil ha (2021), e de segundo (2º) para quinto (5º) exportador mundial de amêndoa de castanha de caju (Figura 5).

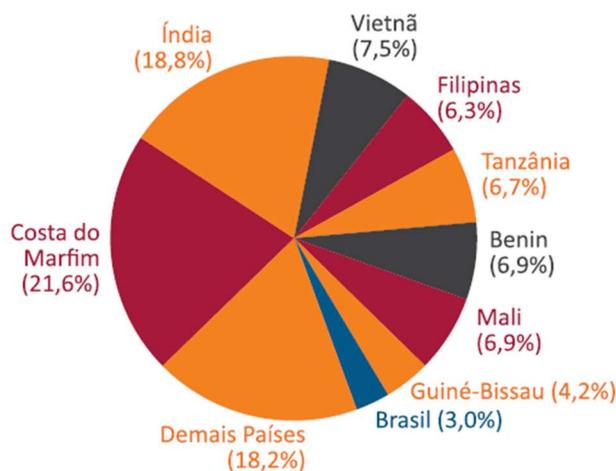
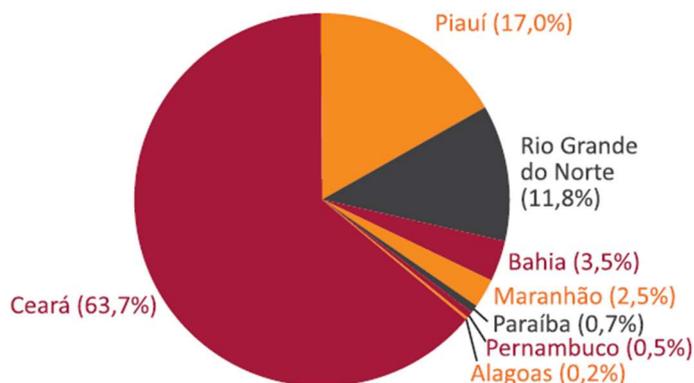


Figura 5. Maiores produtores mundiais de castanha de caju em 2021. Nota: Dados mundiais estimados; dados do Brasil – IBGE/LSPA (julho de 2021) (FAOSTAT, 2021).

A área ocupada com o cajueiro no Brasil, em 2021, foi estimada em 428,9 mil ha, localizados principalmente na região Nordeste (99,7%), sendo que mais da metade da área colhida está localizada no Ceará (63,7%), que também possui a maior área no país (Figura 6) (ICB, 2022). Juntamente com o Ceará, as áreas colhidas dos estados do Piauí e Rio Grande do Norte somam 28,8%, aproximadamente 400.000 ha, correspondendo a mais de 116.000 T da produção nacional (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2021). Em 2021, a produção nordestina foi de 122,5 mil T e as exportações de castanha de caju situaram-se em 14,9 mil T, injetando um valor de US\$96,5 milhões na economia brasileira (CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, 2021).



Fonte: IBGE/LSPA (julho de 2021).

Figura 6. Participação (%) dos estados na área colhida com cajueiro, no Nordeste, em 2021. Ceará, Piauí e Rio Grande do Norte são os maiores produtores de castanha de caju no Brasil no ano de 2020, representando 63,7%, 17% e 11,8%, respectivamente. Os outros 7,5% são representados pelos demais estados da região. (IBGE, 2021; ICB, 2022)

A recuperação da produção, a partir de 2017, ocorreu principalmente no estado de Ceará, e suas exportações também começaram a crescer. Apesar das adversidades do período de estiagem, a castanha de caju continua sendo um produto gerador de divisas na região, ou seja, além de gerar renda atrai recursos financeiros externos. Em 2019, a castanha foi responsável por 17,8% do valor das exportações do agronegócio do Ceará e por 7,6% do Rio Grande do Norte (BRAINER; VIDAL, 2020). De acordo com o Banco do Nordeste do Brasil, os principais compradores de amêndoa de castanha de caju no mercado internacional são os *brokers* (intermediários) e a indústria de alimentos que realiza a torra e a salga para venda no mercado de *snacks* e também utiliza o produto para a produção na panificação e confeitaria (CARNEIRO, W, M, 2008). Dentre os maiores importadores da castanha oriunda do Nordeste brasileiro, estão Estados Unidos e Canadá (Figura 7A). Mundialmente, os maiores importadores são Estados Unidos, Alemanha e Países Baixos (Figura 7B).

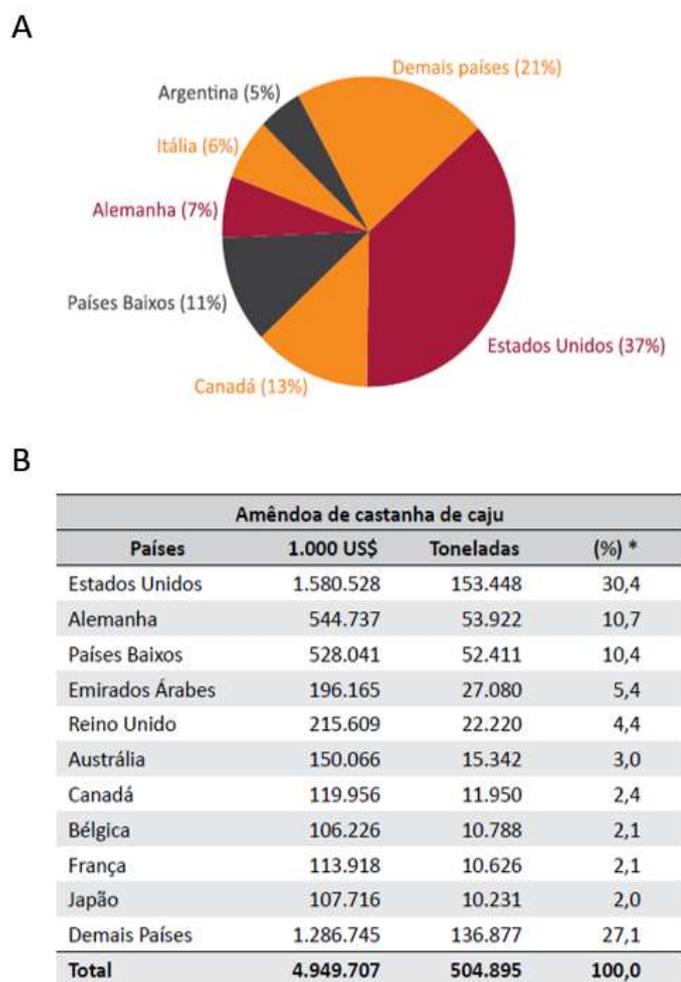


Figura 7. Principais destinos das exportações de castanha de caju e amêndoa. A) Exportações nordestinas em 2019. B) Maiores importadores mundiais em 2017. Fonte: (FAOSTAT, 2021; MAPA, 2020) (BRAINER; VIDAL, 2020)

1.4.2 Morfologia do cajueiro

O cajueiro é uma planta perene, com ramificação baixa (ramos próximos ao solo) e apresenta porte variado, podendo ser classificado como comum ou anão (Figura 8). O cajueiro-comum possui em média 13 m de altura e de 5 m a 8 m de envergadura. Além disso, inicia a produção mais tardiamente e tem maior potencial produtivo individual, com período de safra mais curto, do que o cajueiro-anão. Ainda, a castanha e o pedúnculo podem atingir tamanho médio bem superior. O cajueiro-anão possui em média 4 m de altura e varia de 6 m a 8 m na envergadura. Por ser mais baixo e proporcionar maior facilidade de colheita, possibilita maior aproveitamento do

pedúnculo para a comercialização no mercado de fruta de mesa e de suco. Além disso, os pomares deste tipo de cajueiro possuem maiores produtividades, pois permitem o plantio de um maior número de plantas por hectare.

A



B



Figura 8. Classificação dos cajueiros quanto à morfologia. A) Cajueiros do tipo comum cultivado no estado do Ceará. B) Cajueiro do tipo anão cultivado no estado de Piauí. Ambos pertencem à espécie *Anacardium occidentale* L. (Fonte: EMBRAPA)

Os mais encontrados no Nordeste são os cajueiros-comuns, que além de serem nativos, também foram os primeiros a serem explorados comercialmente. Por outro lado, o cajueiro-anão é proveniente de seleções fenotípicas de cajueiros-comuns de porte baixo, que foram realizadas a partir da década de 1960. O sistema radicular é constituído de uma raiz pivotante bem desenvolvida, com raízes laterais que atingem até duas vezes a projeção da copa. As folhas são simples, inteiras,

alternadas, normalmente com formato oval, de aspecto subcoriáceo, com pecíolo curto e apresentam nervura salientes na face abaxial. É uma planta com predominância de polinização cruzada, cujo número de cromossomos ainda é indefinido, sendo o mais aceito $2n = 42$ cromossomos.

No caso do cajueiro, acaba sendo interessante reunir na mesma planta as características de maior produtividade e maior tamanho de castanha (presente no cajueiro-comum) com as características de precocidade de porte baixo (cajueiro-anão). Dessa forma, atualmente, existem 14 clones registrados no MAPA e autorizados para comercialização, sendo 12 pertencentes à EMBRAPA. Dentre estes, destaca-se o clone BRS 226 (cajueiro-anão), que foi o utilizado neste trabalho, pelo fato de ter seu genoma sequenciado e disponível no banco de dados Phytozome. O clone BRS 226 é destinado à produção de amêndoa e foi originalmente recomendado para o semiárido do Piauí, sendo posteriormente plantado também no litoral do Ceará, especialmente para áreas de ocorrência de resinose, por ser resistente à doença. É uma planta de porte baixo, florescimento e frutificação precoce, com pedúnculo de cor alaranjada e amêndoa com peso média de 2,7 g.

1.5 Parâmetros fisiológicos para avaliação de estresse

Para avaliar a presença ou ausência e o nível de um determinado estresse, são utilizados alguns parâmetros fisiológicos. A condutância estomática (g_s) e o rendimento quântico máximo do fotossistema I (F_v/F_m) são alguns dos parâmetros afetados por estresses como deficiência hídrica, altas temperaturas, excesso de radiação, entre outros (LICHTENTHALER; BABANI, 2000). Quando a planta está sob condições estressantes, estes parâmetros têm seus valores diminuídos. Dessa forma, podem ser utilizados como indicadores sensíveis do desempenho fotossintético. O processo de assimilação de CO_2 acontece nas células do mesófilo, onde se encontram os cloroplastos, sendo a Rubisco a principal enzima envolvida. Folhas adaptadas a alta exposição solar, como as do cajueiro, são capazes de aumentar a assimilação de CO_2 por terem mais Rubisco, e conseguem dissipar o excesso de energia luminosa por terem um grande *pool* de componentes do ciclo da xantofila.

As alterações em g_s estão relacionadas com o controle da perda de água e com o controle da assimilação de CO_2 (A) para manutenção da taxa fotossintética (KLICH, 2000; RÔÇAS; BARROS; SCARANO, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2004). Sendo assim, em situações de baixa disponibilidade de água no solo as plantas reduzem a perda de água ao reduzirem a g_s . Além disso,

a diminuição de g_s pode restringir a taxa de fixação de CO_2 , e conseqüentemente diminuir sua concentração nas cavidades subestomáticas e nos espaços intercelulares (DALEY *et al.*, 1989). De maneira geral, ambientes mais quentes limitam de forma significativa a eficiência de assimilação de CO_2 , porque o aumento progressivo da temperatura desloca o equilíbrio em direção à fotorrespiração (oxigenação), afastando-o da fotossíntese (carboxilação) (Figura 9). Quando A e g_s variam proporcionalmente, em uma relação linear, pode-se dizer que a concentração interna de CO_2 e a eficiência intrínseca do uso da água (A/g_s) se mantêm constante, a fim de otimizar as trocas gasosas (SCHULZE, E.D., HALL, 1982).

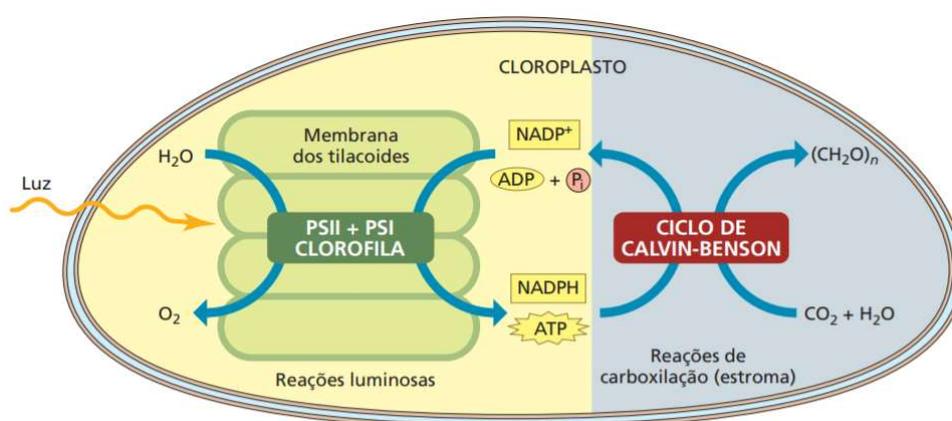


Figura 9. Reações luminosas e de carboxilação da fotossíntese em cloroplastos de plantas terrestres. Nas membranas dos tilacóides, a excitação da clorofila no sistema de transporte de elétrons (fotossistema II [PSII] + fotossistema I [PSI]) pela luz induz a formação de ATP e NADPH. No estroma, tanto o ATP como o NADPH são consumidos pelo ciclo de Calvin-Benson, em uma série de reações catalisadas por enzimas que reduzem o CO_2 atmosférico a carboidratos (trioses fosfato). Fonte: (TAIZ; ZEIGER, 2004)

Outro parâmetro fisiológico confiável para quantificar a resposta ao estresse hídrico da planta é o potencial hídrico (ψ_w) (ISLAM, 2000). O ψ_w da folha indica o seu estado energético de modo que variações neste podem afetar a assimilação de carbono na planta (HSIAO, 1973). Em plantas, os componentes mais atuantes no ψ_w são o turgor (Ψ_P pressão) e o osmótico (Ψ_s solutos). O potencial osmótico (Ψ_s) é um componente do ψ_w e refere-se a presença de sais dissolvidos na solução, os quais reduzem o potencial hídrico da solução, fazendo com que haja diminuição da disponibilidade de água para a planta (HAMLYN G. JONES, 1992). Quando a planta perde água a

uma taxa superior à sua capacidade de absorção e transporte, tanto o ψ_w quanto o Ψ_s da folha diminuem (DA COSTA, G. F.; MARENCO, 2007). Quando o Ψ_w cai abaixo de um determinado limiar, inicia-se o fechamento dos estômatos, restringindo o influxo de CO_2 nas células dos mesófilos e à redução da fotossíntese, para então tolerar tal condição (FANG; XIONG, 2015). Assim, em resposta ao déficit hídrico, a redução do potencial osmótico pode resultar em uma concentração passiva de solutos, devido a desidratação da célula ou ao acúmulo de solutos (ajuste osmótico) (PATAKAS *et al.*, 2002). A diminuição do ψ_w causada pelo déficit hídrico leva a redução no turgor celular (SAYAR *et al.*, 2008). Uma das estratégias de tolerância a esse tipo de estresse se baseia na habilidade das células vegetais em manterem a atividade fisiológica mesmo durante a redução do ψ_w , propriedade esta que é inerente das próprias células (BEWLEY, 1979; LEVITT, 1980).

O conteúdo relativo de água (RWC) é considerado uma medida do status hídrico da planta e reflete na atividade metabólica dos tecidos, sendo um dos mais significativos índices de tolerância a desidratação. Plantas que são expostas a estresse abiótico, como hídrico e salino, apresentam redução no ψ_w foliar, no RWC, na taxa de transpiração além do aumento da temperatura na folha, afetando diversos processos na planta (ISLAM, 2000; M. FAROOQ, A. WAHID, 2009).

As membranas biológicas são um dos primeiros alvos em condições de estresse (BAJJI; KINET; LUTTS, 2002; LEVITT, 1980) e a manutenção de sua integridade e estabilidade pode ser considerada um ótimo indicador fisiológico de tolerância ao déficit hídrico (BAJJI; KINET; LUTTS, 2002; BANDURSKA, 2001; KOCHEVA *et al.*, 2004). De fato, sob condições de déficit hídrico, há ocorrência de alterações na estrutura das membranas (MCKERSIE; STINSON, 1980; TETTEROO *et al.*, 1996; TISSA SENARATNA AND BRYAN D. MCKERSIE, 1983) causadas por modificações na compartimentalização celular associadas ao aumento da atividade de enzimas hidrolíticas (EL HAFID, L. PHAN THI, A. T.; ZUILY-FODIL, Y.; VIEIRA DA SILVA, 1989). Um sintoma típico da injúria por desidratação é um aumento na permeabilidade da membrana celular (FAISAL; ANIS, 2009; LEVITT, 1980; SAYAR *et al.*, 2008). Dessa forma, a desidratação aumenta a liberação de eletrólitos e solutos citoplasmáticos induzindo danos de membrana.

1.6 Metodologias de análise de expressão

Espécies como o cajueiro desenvolveram mecanismos para lidar com condições adversas, podendo representar um modelo de estudo capaz de apresentar respostas metabólicas compatíveis com a proteção celular nessas condições. Assim, estudos de genômica, transcriptômica e proteômica

podem ser somados aos estudos fisiológicos e morfológicos para identificar genes-alvo que possam estar relacionados à resistência ao estresse hídrico (JIA *et al.*, 2017; RASMUSSEN *et al.*, 2013; RYMASZEWSKI *et al.*, 2017).

Para entender como as redes moleculares associadas à adaptação e tolerância aos estresses são reguladas, faz-se necessário compreender como que a expressão de genes específicos pode ser modulada em resposta ao estresse em questão. Uma das primeiras formas de controle da expressão gênica é realizada a nível transcricional, o que gera menor gasto energético para a célula e níveis adequados de proteínas produzidas. Nos últimos anos, cada vez mais novas ferramentas de alto rendimento têm surgido para permitir e facilitar a análise de grandes conjuntos de dados, demonstrando vias de respostas a estresse abióticos (DEBNATH; PANDEY; BISEN, 2011; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2007). Dentre as ferramentas que têm permitido uma maior análise sistemática da expressão de genes em diferentes estágios de desenvolvimento e em variadas condições de estresse está o sequenciamento de nova geração (do inglês, *Next Generation Sequencing* – NGS) (NING *et al.*, 2017; SAHI *et al.*, 2006; SONG *et al.*, 2016).

Uma das vertentes do NGS é o sequenciamento de RNA (RNA-seq). O RNA-seq é uma ferramenta poderosa e econômica para estudar a expressão gênica (JAIN, 2012), que não se limita ao conhecimento prévio do genoma ou dos transcritos do organismo (WANG, Z.; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Além de detectar genes expressos em níveis baixos, permite descobrir genes novos e únicos e identificar genes responsivos a estresses (WILHELM *et al.*, 2008). Sendo assim, as tecnologias voltadas à detecção dos níveis de RNA mensageiro (mRNA) permitem a identificação do padrão de transcrição espaço-temporal dos genes e correlação destes com os processos biológicos, permitindo a identificação de genes-chaves em redes de interação (SHIMKETS, 2004). Devido a essas características e vantagens, a área de transcriptômica tem sido uma das grandes protagonistas em estudos de expressão gênica.

De maneira geral, a técnica baseia-se na obtenção de uma biblioteca de cDNA a partir da conversão do RNA total ou fracionado [poli(A)⁺]. Adaptadores são ligados em uma ou ambas as extremidades dos fragmentos de cDNA, permitindo o reconhecimento da direção das *reads* após o sequenciamento de alto rendimento. A seguir, as sequências resultantes são alinhadas a um genoma de referência ou montadas *de novo* (quando a espécie não possui genoma sequenciado). Dessa forma, obtém-se um mapa transcriptômico em escala genômica, que será composto pela estrutura transcricional e/ou nível de expressão de cada gene (WANG, Z.; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Esta abordagem já foi utilizada para acessar os perfis transcriptômicos de resposta à seca em plantas como arroz (YOO *et al.*, 2017), milho (LIANG; YANG, 2017), trigo (HU *et al.*, 2018), *Brassica napus* L. (WANG, Daojie *et al.*, 2015) e tabaco (ZHANG, X. *et al.*, 2019). No entanto, a maior parte do nosso conhecimento acerca das bases moleculares das respostas das plantas aos estresses abióticos vem de estudos de plantas anuais, como *Arabidopsis* e espécies de culturas, enquanto as informações sobre árvores geralmente são escassas e limitadas.

Por terem se tornado cada vez mais acessíveis, essa maior disponibilidade possibilita o acesso aos genomas de espécies de árvores, fornecendo maior conhecimento das respostas fisiológicas destas aos estresses abióticos. Os primeiros estudos de RNA-seq que investigaram a expressão gênica sob estresses abióticos em árvores foram conduzidos em gêneros economicamente importantes, como *Populus* (PENG *et al.*, 2012) e *Eucalyptus* (VILLAR *et al.*, 2011). Recentemente, foram realizados estudos de RNA-seq em gimnospermas (quatro espécies, duas famílias) e angiospermas (17 espécies, 11 famílias) usando plantas juvenis (ESTRAVIS-BARCALA *et al.*, 2020). Uma característica em comum a todos os estresses avaliados (seca, calor ou frio) no tecido foliar foi a regulação negativa da fotossíntese, indicando um rearranjo na alocação de recursos.

Ao permitir a identificação e quantificação da abundância de mRNA dentro das células, tecidos e organismos, a tecnologia de RNA-seq revolucionou o campo da transcriptômica. No entanto, uma parte essencial em qualquer experimento de perfil de expressão é a validação biológica dos resultados. Um dos métodos moleculares utilizados para quantificar a expressão de um gene é o PCR quantitativo (qPCR) em tempo real.

Juntamente com o sequenciamento massivo de transcritos com sequenciamento de nova geração, o qPCR destaca-se entre as principais metodologias empregadas na identificação e análise de genes associados à tolerância da planta a determinada situação de estresse. A análise de expressão diferencial baseia-se na regulação de genes, ou seja, em situações fisiológicas diferentes, através da comparação de uma condição estressada *versus* controle. Dessa forma, a regulação do gene pode ser aumentada (induzida), diminuída (reprimida) ou, ainda, permanecer inalterada (CASASSOLA *et al.*, 2013). Associado ao RNA-seq, mostram-se como umas das técnicas mais eficazes para descobrir novos genes (HOWALD *et al.*, 2012).

A reação da amplificação pode ser visualizada em tempo real através da captação de um sinal fluorescente (intercalante de DNA). O fluoróforo mais utilizado nas reações é o SYBR Green

I, que se intercala a qualquer DNA de fita-dupla (cDNA) que esteja presente na amostra e emite a fluorescência, que então é detectada pelo termociclador (HUGGETT; BUSTIN, 2011).

2. JUSTIFICATIVA

Entender os distúrbios metabólicos causados pelo efeito de fatores abióticos é essencial para a identificação e caracterização de mecanismos responsáveis pela tolerância vegetal contra esses estresses. Dentre os estresses abióticos, o estresse hídrico é um dos principais fatores ambientais responsáveis por afetar o crescimento e desenvolvimento das plantas, inclusive causando prejuízos na agricultura (FEDOROFF *et al.*, 2010). No Brasil, a região do semiárido brasileiro é a mais exposta e afetada por diversos estresses abióticos, como seca, salinidade, radiação elevada e altas temperaturas (CAVALCANTI *et al.*, 2004; MITTLER, 2006). Estes estresses, isolados ou combinados, podem afetar diferentes processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que são essenciais para o funcionamento celular (KANT *et al.*, 2008; KOTAK *et al.*, 2007; KREPS *et al.*, 2002; MITTLER, 2006)

Os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares envolvidos nas respostas da plantas frente aos estresses são complexos (KANT *et al.*, 2008; MITTLER, 2006). Entretanto, para desenvolver novas estratégias de manipulação genética que visem ao aumento da resistência das plantas aos estresses abióticos, e até mesmo ao aumento da produtividade agrícola, é essencial o entendimento das informações relacionadas a esses mecanismos de defesa e das consequências causadas pelo estresse (VALLIYODAN; NGUYEN, 2006).

Apesar de apresentar condições desfavoráveis para o crescimento e desenvolvimento vegetal, algumas espécies desenvolveram mecanismos genéticos, moleculares e fisiológicos, sendo relativamente bem adaptadas ao ambiente semiárido, como é o caso do cajueiro (SILVEIRA *et al.*, 2003). De fato, plantas de cajueiro apresentam bom desenvolvimento quando expostas e cultivadas em diversas áreas com restrição hídrica, salinidade em excesso e temperaturas elevadas, condições características do semiárido brasileiro (FERREIRA-SILVA, Sérgio L. *et al.*, 2008; FERREIRA-SILVA *et al.*, 2011). Essa característica, e sua importância econômica para as regiões produtoras, tem incentivado programas de melhoramento genético da espécie. Além do apelo econômico, o caju e seus derivados têm apresentado atividade antioxidante (KAMATH; RAJINI, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011), probiótica (VERGARA *et al.*, 2010), anti-inflamatória (OLAJIDE *et al.*, 2004), antimicrobiana (AKINPELU, 2001), larvicida (OLIVEIRA *et al.*, 2011), e outras, descritas em diversos estudos.

Técnicas moleculares de alto rendimento como microarrays e RNA-seq, têm sido utilizadas para identificar genes responsivos a estresses abióticos e muitos deles estão sendo funcionalmente caracterizados quanto a tolerância a estresses abióticos. Genes responsivos a estresses abióticos podem desempenhar funções essenciais na planta, tanto quanto a maior tolerância a estresses abióticos, como atuar na transdução de sinais, proteção da célula sob estresses, expressão de novos genes, produção de enzimas e proteínas/enzimas de rotas metabólicas essenciais, enzimas antioxidantes, proteínas chaperonas, fatores de transcrição, microRNAs, genes relacionados a vias de hormônios vegetais, dentro outras funções (ARBONA *et al.*, 2016; BALFAGÓN *et al.*, 2022; ZANDALINAS *et al.*, 2021).

Através das informações relacionadas ao nível de expressão, genes de interesse podem ser selecionados e, posteriormente, utilizando-se técnicas de engenharia genética, estes genes podem permitir o desenvolvimento de plantas tolerantes a estresses abióticos (CHEN, J. Q. *et al.*, 2008; HIMABINDU *et al.*, 2016; NING *et al.*, 2017; QIU; YU, 2009; WU *et al.*, 2009). Dessa forma, utilizar dados de NGS de transcriptomas de plantas nativas com características naturais de tolerância a estresse hídrico, é uma forma segura e eficaz para prospecção, identificação e validação de genes com potencial à aplicação biotecnológica.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

O presente estudo tem como objetivo avaliar a modulação da expressão gênica do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.), variedade BRS226, espécie nativa tolerante a estresses abióticos, como fonte para identificar, isolar e validar genes envolvidos na tolerância à seca.

3.2 Específicos

1. Caracterizar, por meio de parâmetros fisiológicos, a progressão dos efeitos do estresse hídrico causado pela suspensão da irrigação e a progressão da recuperação após o retorno da irrigação em mudas de cajueiro;
2. Analisar o transcriptoma das folhas em diferentes condições de disponibilidade hídrica (controle, déficit hídrico e recuperação);
3. Identificar genes candidatos relacionados à tolerância à seca no cajueiro;
4. Validar genes candidatos relacionados à tolerância à seca por meio de análise molecular;
5. Comparar e correlacionar os resultados das análises fisiológicas e do transcriptoma e definir as vias metabólicas e processos celulares afetados pela seca;
6. Selecionar genes associados à tolerância à seca do cajueiro e realizar a clonagem destes em vetor de superexpressão;
7. Transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* com os vetores superexpressando genes de tolerância a seca e avaliar a tolerância das plantas submetidas ao estresse hídrico;

4. CAPÍTULO 1 - Transcriptional profiling and physiological responses reveal new insights into drought tolerance in a semiarid adapted species, *Anacardium occidentale*

É. F. Capelari¹, L. dos Anjos², N. F. Rodrigues¹, R. M. de J. Sousa²,

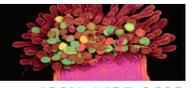
J. A. G. Silvera² & R. Margis^{1,3}

¹ Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CEP, Brazil

³ Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genomas e Populações de Plantas (LGPP), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Artigo publicado na revista *Plant Biology*



RESEARCH PAPER

Transcriptional profiling and physiological responses reveal new insights into drought tolerance in a semiarid adapted species, *Anacardium occidentale*

É. F. Capelari¹ , L. dos Anjos² , N. F. Rodrigues¹ , R. M. de J. Sousa² , J. A. G. Silvera²  & R. Margis^{1,3} 

¹ Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

² Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CEP, Brazil

³ Centro de Biotecnologia, Laboratório de Genomas e Populações de Plantas (LGPP), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

Keywords

Anacardium occidentale; transcriptome; water deficit; recovery; abiotic stress; differential expression; cashew tree.

Correspondence

R. Margis, Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 91501-970, Brazil.
E-mail: rogerio.margis@ufrgs.br

Editor

Y. Hu

Received: 4 March 2021; Accepted: 5 May 2021

doi:10.1111/plb.13312

ABSTRACT

- Water stress affects plant performance at various organisational levels, from morphological to molecular, with a drastic drop in crop yield. Integrative studies involving transcriptomics and physiological data in recognized tolerant species are appropriate strategies to identify and understand molecular and functional processes related to water deficit tolerance. The cashew tree (*Anacardium occidentale*) is a species naturally adapted to environments with low water availability associated with adverse conditions such as heat, high radiation and salinity.
- We used an integrative strategy, combining classical physiological measurements with high throughput RNA-seq to understand the main adaptive mechanisms of cashew to water deficit followed by recovery.
- Physiological analyses indicate that young cashew plants display typical isohydric behaviour. They first exhibit rapid stomatal closure, followed by CO₂ assimilation, thus preserving the relative water content, membrane integrity and photosystem II activity. Differential expression was observed in 1733 genes from plant leaves exposed to water deficit stress for 26 days. Among them, 705 were upregulated and 1028 were downregulated. After rewatering, 1330 (76.7%) genes returned to their basal expression level.
- Transcriptional, combined with physiological data, reveal that cashew plants display high phenotypic plasticity and resilience to acute water deficit, and do not activate senescence pathways. A series of genes/pathways and processes involved with drought tolerance in cashew are evidenced, particularly in carbon metabolism, photosynthesis and chloroplast homeostasis.

INTRODUCTION

Drought is defined as an imbalance between water availability in the soil and plant transpiration demand, resulting in changes in plant water status and decreased growth and productivity (Tardieu *et al.* 2019). Over the last few decades, water stress in agriculture has increased in both intensity and frequency in many areas worldwide (Marengo 2008). As a result, crop productivity has been drastically affected, leading to significant yield loss. The combination of water deficit and extreme temperatures results in decreased food production and quality, representing a serious threat to world agriculture (IPCC 2014). In Brazil, the most significant drought over the last 50 years occurred between 2012–2013. It caused a loss of US\$ 1.6 billion to the ten most important crops in the country (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística–IBGE 2016), mainly in the northeast of Brazil, where drought occurs with high frequency and intensity (Marengo *et al.* 2008). Drought causes cell dehydration and loss of turgor, which directly affects the fundamental process of cell

elongation and plant growth. It triggers stomatal closure and compromises CO₂ photosynthetic assimilation, causing changes in the redox balance inside the cells, affecting critical physiological processes, such as photosynthesis and respiration, leading to potential damage to cell components, such as proteins, phospholipids and pigments. At the whole plant level, critical decreases in plant water potential increase the risk of xylem cavitation, hydraulic failure and mortality (Hochberg *et al.* 2017). To cope with drought stress, plants evolve different strategies to resist or tolerate critical low water potentials, including morphological, physiological and molecular adjustments. However, plant adaptation mechanisms vary largely among species, genotypes, plant developmental stages and in response to the progress of drought through time (Fang & Xiong 2015).

In general, plants respond to drought at an early stage of the stress development by resisting or avoiding critical decreases in water potential to retain normal physiological processes (Nolan *et al.* 2017). Plants may increase water uptake through investments in the root system and water

storage and/or reduce water loss through leaf rolling and shedding, partial stomatal closure and adjustments to the metabolism and growth rate to match current carbon availability. As the stress becomes more severe, plants tolerate the adverse effects of drought stress by investing in mechanisms to reduce or repair the stress damage and sustain a minimum level of physiological activity. These mechanisms include the accumulation of organic and inorganic molecules to maintain cell turgor pressure and macromolecule structure, adjustments in energy dissipation and oxidative protective enzymes, and the activation of various repair mechanisms. After drought stress, plant recovery depends on plant ability to repair all the damage caused by the loss of turgor pressure and hydraulic capacity and re-establish growth and yield (Fang & Xiong 2015). To better sense environmental changes and respond accordingly to drought, plants have developed a broad spectrum of biochemical and molecular programmes that presuppose the expression of several genes related to stress signal transduction and the transcription and regulation of several proteins, enzymes and metabolites (Shanker *et al.* 2014). Plant responses to water deficit stress have been further investigated by RNA-seq approaches in various crop and model species. These studies have revealed many different responses at the molecular level and have been successfully used for a genetic dissection of stress response pathways (Hu *et al.* 2018; Morgil *et al.* 2019). However, many of these studied plants, such as *Arabidopsis*, rice and soybean, are drought-sensitive, and their response may not reflect drought tolerance and resistance mechanisms. Besides, in non-model plants, and especially tree species adapted to semiarid regions, the mechanisms involved in conferring drought tolerance are poorly understood. For this reason, a better comprehension of water deficit consequences and adaptive strategies in natural drought-adapted species becomes of great importance to improve agricultural productivity in semiarid regions.

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a perennial tropical species native to the semiarid coastal region of north-east Brazil and is naturally adapted to low water availability (Souza *et al.* 2005; Bezerra *et al.* 2007; Ferreira-Silva *et al.*, 2010; Ferreira-Silva *et al.*, 2008). It is one of the most important crop species of the tropics (De Oliveira 2008), covering an estimated area of 5.97 million hectares globally, with 5.93 million tonnes annual production (FAOSTAT 2018). Several physiological and biochemical studies have been done regarding cashew tree stress adaptation capacity (Souza *et al.* 2005; Ferreira-Silva *et al.* 2012). However, no molecular study at the gene expression level has been performed to understand better the molecular mechanisms involved in drought resistance and tolerance of the cashew tree.

In this study, we used an integrative strategy combining high throughput RNA-seq with physiological analysis to understand the adaptive strategies of *A. occidentale* in response to water deficit stress. We used two main approaches to analyse the transcriptome: (i) we first characterized transcriptomic regulation of genes in response to moderate and severe water deficit stress caused by withholding water, then (ii) identified and quantified differentially expressed genes over a time course of water deficit stress and after recovery. To our knowledge, the current study is the first to present a transcriptional profile of cashew leaves submitted to water deficit stress and recovery.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and growth condition

Full-sib seeds of cashew tree (*Anacardium occidentale* L.), var. BRS226 (EMBRAPA), were disinfected with 1.5% (w/v) sodium hypochlorite solution, immersed in distilled water overnight and then sown in a substrate consisting of vermiculite and sand (3:1) and osmocote (3.5 kg·m⁻³). Seedlings were kept well-watered near field capacity and nourished with Hoagland nutrient solution (Hoagland & Arnon 1938) under greenhouse conditions (32.0 ± 7.8 °C day/28.2 ± 1.7 °C night), 62 ± 10% RH, 11-h photoperiod with 15.3 mol·m⁻²·day⁻¹ DLI (daylight integral).

Experimental design

The experiment was conducted as illustrated in Fig. 1A. After 45 days from sowing, some of the cashew seedlings was kept well-watered while the other portion of seedlings was submitted to water withdrawal. The progress of water deficit stress in the plant was monitored using leaf gas exchange and chlorophyll *a* fluorescence, leaf water potential, relative water content and oxidative stress. The experiment was repeated three times (data not shown) to determine the optimal timing of severe reversible stress, when a batch of seedlings was re-watered and allowed to recover for 5 days. Samples for RNA extraction were harvested at three time points during the experiment: (1) after 3 days for plants under mild water deficit stress; (2) on day 21, when plants were under severe water deficit stress; and (3) on day 26, after 5 days of re-watering. Figure S1 illustrates the seedling growth profile after 26 days under control (C), water withdrawal (WD) and recovery (R) conditions. An apparent decrease in seedling size was visible in both WD and R groups, compared to control plants of the same age. No other symptoms were visible.

Physiological characterization of plant water deficit stress

Photosynthetic CO₂ assimilation (A , μmol CO₂ m⁻²·s⁻¹) and stomatal conductance (g_s , mol H₂O m⁻²·s⁻¹) were measured in fully expanded leaves using a portable gas exchange measurement system (IRGA Li-6400XT; LI-COR, Lincoln, NE, USA) and internal parameters at 1000 μmol·m⁻²·s⁻¹ PPFD and 10% blue light, 1.0 ± 0.2 kPa VPD, 400 ppm CO₂ and 28 °C. The photosystem II (PSII) maximum quantum efficiency was measured for chlorophyll *a* fluorescence with a Dual PAM-100 (Walz, Effeltrich, Germany), using the saturation pulse method (Schreiber *et al.* 1995), where F_o , F_m and F_v are initial, maximum and variable fluorescence, respectively, calculated using the formula:

$$F_v/F_m = (F_m - F_o)/F_m.$$

Leaf water potential was measured in detached leaves between 12:00 and 13:00 h with a Schölander pressure bomb. Osmolarity was measured in leaf discs using a vapour pressure osmometer (Vapro 5520; Wescor, USA). Osmolality (mmol·kg⁻¹) was converted to osmotic potential (Ψ_s) using the relationship: 1 mmol·kg⁻¹ = 2.408 × 10⁻³ MPa. Leaf relative water content (RWC) was determined according to previous work (Cavalcanti *et al.* 2004). Leaf membrane damage

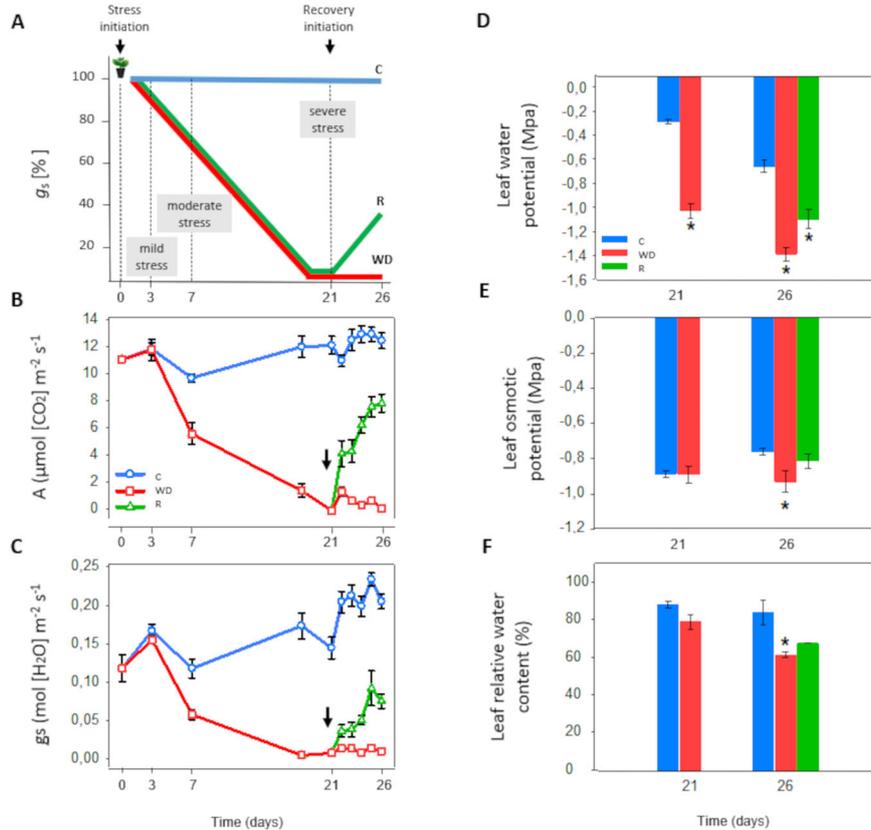


Fig. 1. Physiological measurements of cashew seedlings submitted to water withdrawal for 21 and 26 days and rewatered for 5 days from day 21. (A) Experimental design. Cashew seedlings were grown under well-watered conditions (C). Plants were then submitted to water withdrawal. After 21 days, a group of plants was rewatered and allowed to recover for 5 days (R), while the other group was kept in the water withdrawal treatment until the end of the experiment (WD). Samples for RNA were harvested from all plants 3 days after stress initiation, after 21 days of water withdrawal and on day 5 of rewatering (Recovery). The severity of the stress in plants submitted to water withdrawal was monitored as (A) percentage change in g_s , (B) change in A , (C) change in g_s , (D) reduction in leaf water potential, (E) reduction in leaf osmotic potential, (F) change in leaf RWC (%) of well-watered cashew seedlings (control, C) and cashew seedlings submitted to water withdrawal for 26 days (WD), seedlings submitted to water withdrawal for 21 days then allowed to recover for 5 days through rewatering (R). Data are mean \pm SE ($n = 5$), significant difference between treatments and C indicated by asterisks (*). $P < 0.05$ (Student *t*-test).

(MD) was estimated based on K^+ leakage of leaf discs using flame photometry, and percentage membrane damage was estimated as $MD (\%) = (L_1/L_2) \times 100$.

Extraction of RNA

Leaves from five different individuals were assembled in a single biological sample for each treatment and time point. Four extractions were performed for each time point and each water regime. Leaves were immediately frozen and ground in liquid nitrogen and total RNA isolation was performed according to previous work (Kasajima 2017).

Assembly of RNA-seq library and quality assessment

About 2 μ g total RNA from each sample was precipitated in ethanol and sent to MacroGen Inc. (Korea) for RNA-seq library preparation. In total, 24 Truseq stranded mRNA libraries were prepared. The sequencing platform used was Novaseq, with 100 bp paired-end (PE), and approximately 40 M reads (4G per sample). Quality check of RNA-seq raw reads was performed using FastQC software (Andrews *et al.* 2010). Adapter

sequences and low-quality reads were removed using Trim Galore. Only reads with a score $>Q30$ and a minimum length of 50 nucleotides were kept for further analyses. Reads mapping was performed using TopHat2 (Kim *et al.* 2013). RNA-seq data were deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus under accession number PRJNA660252.

Differential expression analysis

To investigate the transcriptomic pattern of genes in *A. occidentale* leaves in response to water deficit, we selected six groups (C3, C26, WD3, WD21, WD26 and R26) to perform a genome-wide RNA sequencing analysis and compare the effects of moderate and severe water deficit with the control and recovery treatments. To identify and quantify differentially expressed genes (DEGs) between control, water deficit and recovery treatments, high-quality reads were mapped to the reference genome available in Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) using TopHat2. Differential gene expression was performed using SARtools with DESeq2 (Varet *et al.* 2016). DEG comparisons were analysed peer-to-peer between control (C3) and water deficit (WD3, WD21 and

WD26) and between samples from day 26 (C26, WD26 and R26) with *P*-value adjustment using the BH method (Benjamini & Hochberg 1995). Homogeneity of control, water deficit and recovery samples was evaluated after principal components analysis (PCA). The threshold used to judge the significance of gene expression was $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$ and $P < 0.01$. Genes that matched these criteria were designated as up- or downregulated if water deficit RNA level was higher or lower, respectively, than that of control plants, and were considered for downstream analysis. All transcripts, including alternatives, were considered for heatmap construction. A Venn diagram with all water deficit collection days was constructed considering genes with $|\text{Log}_2\text{FC}| > 1$ and $P < 0.01$, in comparison to the control (C). Statistically significant DEGs were subjected to Gene Ontology and KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) enrichment analysis using the Blast2GO program. Classification of the groups containing the largest number of DEGs was performed based on Blast2GO and Phytozome annotations. A scatterplot was constructed using R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Validation of differential gene expression using RT-qPCR

All cDNA reactions contain 1 µg total RNA, 10 µM oligo (dT24V) primers and 200 U MMLV Reverse Transcriptase. Specific primer pairs for validation of differential gene expression were designed using the Primer3 tool (Rozen & Skaletsky 2000). All primer pairs used in RT-qPCR reactions and their sequences are presented in Table S1. Samples were analysed in technical triplicates and biological triplicates. Reverse transcription followed by quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) were performed using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) on the Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system (Foster City, CA, USA). PCR was conducted in a volume of 20 µl containing 10 µl diluted cDNA (1:100), 0.4 mM dNTPs, 10× buffer, 3 mM MgCl₂, 0.25 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) and 0.1 µM of each oligonucleotide. PCR conditions were: initial 3-min step at 95 °C followed by 40 cycles of 10 s denaturing at 95 °C, 15 s annealing at 60 °C and 15 s extension at 72 °C. Melting curves were performed after a denaturation at 95 °C for 15 s, followed by a sequential increase in temperature from 65 to 98 °C. CYP27A154 (Anaoc.0001s2042), malate dehydrogenase (Anaoc.0017s0553) and Clp protease (Anaoc.0018s0700) were used as reference genes. The relative gene expression levels were determined using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen 2001). To avoid division by zero and make the calculations feasible, all those samples with genes whose amplification was not detectable, even after 40 PCR cycles, have a *C_t* attributed as 42.

Metabolic pathways and network analysis

In order to illustrate modulation of some enzymes present in carbon fixation pathways from photosynthetic organisms, we used the KEGG output (https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?map00710) and filled the enzyme boxes with the respective effect in the transcript levels. The network analysis was made using GeNeCK, a web server for network and gene expression analysis at <https://lce.biohpc.swmed.edu/genec/k/analysis.php> (Zhang *et al.* 2019). The input data correspond to the differential expression profiles of all genes listed as

associated with photosynthesis and chloroplasts, as described in Table S8. The statistical method of choice was GeneNet, which uses a partial correlation in the GeNeCK.

RESULTS

Physiological characterization of water deficit stress evolution and intensity

The physiological state of the plants was monitored by monitoring significant changes in gas exchange, plant water status and oxidative tissue damage (Table S2 and Table S3). Three days after withholding water, plants still did not show significant changes in CO₂ assimilation or stomatal conductance. However, plants 7 days after water withdrawal showed mild stress, with a decrease of 43% in *A* and 50% *g_s* than control plants (Fig. 1B, C). On the following days, leaf gas exchange decreased rapidly, so that after 18 days of water withdrawal, *A* and *g_s* were, respectively, 10.3% and 2.6% that of control plants. After 21 days, water conductance through stomata and CO₂ fixation was near zero, and this condition remained unchanged to the end of the experiment. Stressed plants also showed a 175% decrease in leaf water potential compared with control plants (Fig. 1D). Based on these results, we characterize day 21 as plants being under severe water stress.

Interestingly, plants did not show changes in leaf osmotic potential or leaf relative water content (Fig. 1E, F). Moreover, PSII maximum quantum efficiency was not affected, and no oxidative membrane damage was detected (Figure S2A, B). Since plants showed no signal of severe oxidative stress, we considered that they would recover from the stress imposed by withholding water at that point. Therefore, after 21 days of water withdrawal, we re-watered a group of the plants submitted to water deficit stress for five more days and monitored their recovery. After 1 day of rewatering, plants recovered 36% of *A* and 18% of *g_s*, as compared to the control. Leaf gas exchange increased progressively, and after 5 days of rewatering, plants recover 62% of *A* and 37% of *g_s*. Curiously, leaf water potential continued to decrease, although the drop was smaller than that observed in plants under continued water withdrawal. In contrast, leaf RWC and osmotic potential of rewatered plants remained unchanged, while plants kept in the water withdrawal treatment for 26 days showed significant decreases of 26.7% in leaf RWC and 37% in leaf osmotic potential than control plants. Membrane oxidative damage and PSII maximum quantum efficiency remained unaltered in plants submitted to continued water withdrawal. Also, the osmotic potential of roots did not change significantly (Figure S2C), indicating that no root osmotic adjustment had taken place to ameliorate the effects of lower moisture in the soil.

Effect of water availability on gene expression in cashew leaves

The genome-wide RNA sequencing analysis allowed comparison of the effects of 3, 21 and 26 days of water withdrawal and the control and recovery treatments. Quality filtering of 149,312,602 raw reads generated 148,317,238 high quality reads, with a yield of 135,806,727 (91.55%) mapped reads. Each treatment contained quadruplicate biologic replicates with about 25 M reads, with an average alignment of 91.5%. Information regarding all 20 assembled RNA-seq libraries is

provided in Table S4. RNA-seq libraries for each sample group were sequenced to identify the cashew molecular responses during the water deficit stress treatments. Two sets of comparisons were performed: a time-course study and an analysis at 26 days of water deficit stress following recovery treatment. Results are presented separately.

Differentially expressed genes over the time course of water deficit stress

The relationship among control (C3) and the four different water deficit levels (WD3, WD21 and WD26) were analysed by PCA (Fig. 2A). A heatmap was generated to illustrate the DEG expression profile of these groups and how the replicates were related in each group (Fig. 3A). DEG comparisons were analysed peer-to-peer between control (C3) and water deficit (WD3, WD21 and WD26). DEG analysis identified seven (WD3 versus C3), 2098 (WD21 versus C3) and 1874 (WD26 versus C3) upregulated genes and two (WD3 versus C3), 3835 (WD21 versus C3) and 2778 (WD26 versus C3) downregulated genes (Fig. 3B). Among these genes, five upregulated genes were common to the three stages of water deficit: Anaoc.0008s1284 (Phytopsin), Anaoc.0014s1050 (protein with no annotated domains), Anaoc.0014s1081 (protein with no annotated domains), Anaoc.0014s1084 (transcription factor SPN1) and Anaoc.0014s1085 (DUF59). No common downregulated gene was identified. All upregulated and downregulated genes

are listed in Table S5 and Table S6, respectively. The total number of transcripts differentially expressed during water deficit stress, including alternatives, are presented in Table S7.

Differentially expressed genes during severe water deficit stress and after recovery

The variations among samples from control, water deficit and recovery conditions were evaluated by PCA (Fig. 2B). As expected, libraries from different treatments were separated, whereas the replicates were similar. Another heatmap was constructed with the DEG expression profile of the three groups evaluated and this shows how the replicates are related in each group (Fig. 4A). Overall, 705 genes were upregulated and 1028 were downregulated under water deficit stress for 26 days.

The boxplots from Fig. 4B represent eight different expression profiles. The first group of 1264 genes had the recovery group expression level equivalent to that defined as the control group and was classified as ‘aba’. Only the water deficit plants had a different expression profile, with increased expression in 488 and decreased expression in 776 genes. The ‘abb’ profile corresponds to 403 genes down- (199) and up- (204) regulated under water deficit that retained the same expression level in the recovery group. A set of 32 genes had intermediate recovery expression among control and water deficit (classified as ‘abc’). Interestingly, 34 genes exhibited an opposite expression pattern to water deficit than those of the control group (IV and VII,

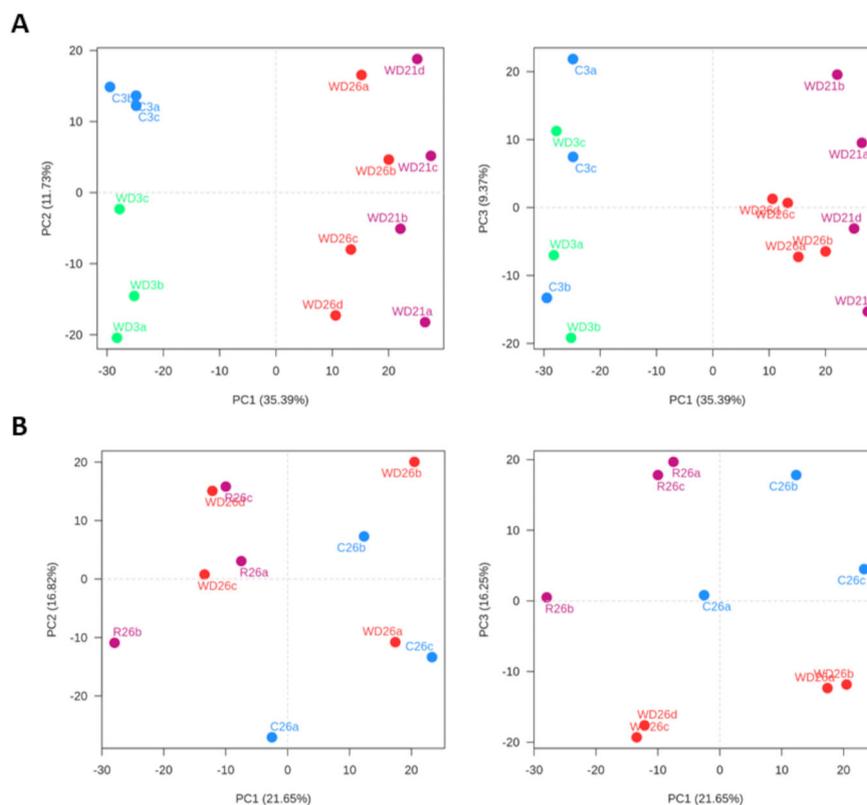


Fig. 2. Principal components analysis (PCA) of mRNA-seq libraries. (A) Biplot of the first and second PCA components of differentially expressed genes during drought stress compared with control. The 12 different RNA-seq libraries correspond to three control samples on day 3 (C3; blue), three from 3 days of water deficit (WD3; green), four from 21 days of water deficit (WD21; red) and four from 26 days of water deficit (WD26; purple). (B) Biplot of the first and third components of PCA for control (C26), water deficit-responsive genes (WD26) and water recovery (R26) mRNA-seq libraries.

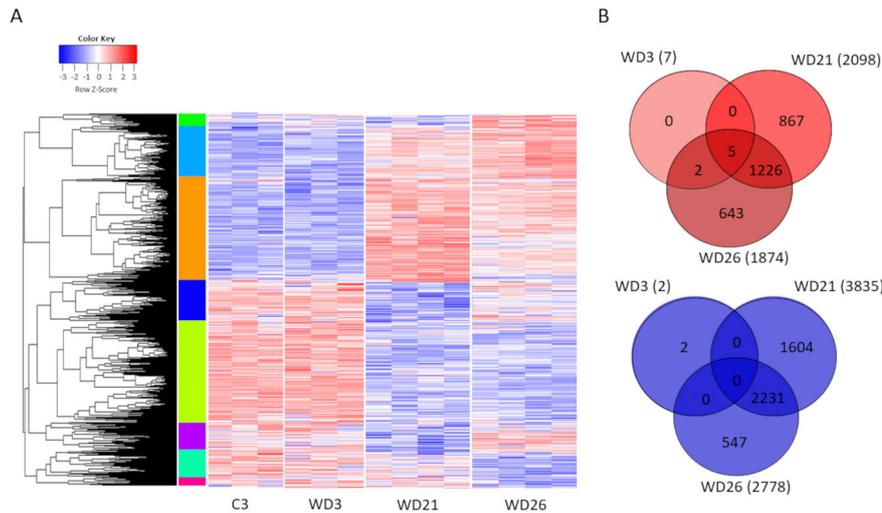


Fig. 3. Differentially expressed genes during water deficit stress. (A) Heatmap depicting expression of all differentially expressed transcripts during water deficit stress for day 3 (WD3), day 21 (WD21) and day 26 (WD26), in comparison to control day 3 (C3). Red shading indicate upregulated and blue shading correspond to downregulated transcripts. (B) Venn diagram showing total number of differentially expressed transcripts for days 3, 21 and 26 of water deficit stress, compared to control day 3. Red circles are upregulated and blue circles are downregulated genes, considering $\log_2FC \geq |1|$ and $P < 0.01$.

classified as 'abd'). The number of transcripts differentially expressed in severe water deficit stress is given in Table S7.

The most representative groups of DEGs sharing functional and genetic relationships are provided in Table 1 and Table S8. They encompassed genes related to photosynthesis and chloroplast metabolism (LHCII, carbonic anhydrase, RuBisCo, TIC), transcription factors (bHLH, zinc finger, homeobox and auxin response), transporters (aquaporins, amino acid, ions and sugars), heat shock proteins (HSP70, HSP20 and DNA) and genes involved in ROS scavenging (thioredoxin, peroxidase and superoxide dismutase). Other genes related to drought stress responses were also modulated, such as trehalose phosphate synthase, galactinol synthase, asparagine synthase and ABA signalling PP2C (protein phosphatase-2C) and SnRKs (Snf1 related protein kinases).

To illustrate the range of variation in expression among the three treatments (WD26 versus C26, R26 versus WD26 and R26 versus C26), we selected representative genes from each group, as shown in Fig. 5. The expression profile within each group was uniform, with minor exceptions, as in proteinases (B), RNA processing (C), heat shock/chaperones (D), secondary metabolite synthesis (E), receptors (F) and transcription factors (I). The abscisic acid (ABA) signalling (A), antioxidant system (G), transporters (H) and photosynthesis/chloroplast (J) groups exhibited a wide variation in intra-group expression profiles.

Validation of DEGs

To confirm the RNA-seq results, the differential expression of 13 representative genes associated with different mechanisms of the stress response was validated by quantitative PCR (RT-qPCR) (Fig. 6). Among them, ten genes were upregulated while three genes were downregulated under drought stress. Trehalose-6-phosphate synthase (TPS – *Anaoc.0013s1148*), Late Embryogenesis Abundant (LEA – *Anaoc.0011s1154*) and Nuclear transcription factor Y subunit A-1-related (NF-YA1 –

Anaoc.0018s0487) were the genes with higher expression variation under water stress. After 5 days of recovery, gene expression of rewatered plants resembled that of control plants, except for Hydroperoxide lyase (HPL1 – *Anaoc.0014s0438*) and Protochlorophyllide reductase (PORA – *Anaoc.0020s0590*).

Genes of carbon assimilation pathways and chloroplast network under drought stress

In the pathways illustrated in Fig. 7A, it becomes clear that not only pyruvate phosphate di-kinase, PPDK (E.C.2.7.9.1), an enzyme previously associated with different abiotic stresses, as well as a large number of other transcripts from genes of the Calvin cycle and carbon fixation were downregulated under water deficit. The original KEGG view of the Calvin cycle, tri-carboxylic acid cycle (TCA) and pentose pathways with genes affected by the drought stress is presented in Figure S3. It suggests that cashew plants use mechanisms associated with a reduction in carbon fixation to avoid senescence.

A network analysis of genes related explicitly to photosynthesis and chloroplast targeting, as described in Table S8, is presented in Fig. 7B. Four genes correspond to hubs in this network: granule-bound starch synthase 1, chloroplastic/amyloplastic (GBSS1), protochlorophyllide reductase (PORA) implicated in chlorophyll synthesis, STAY-GREEN protein (SGR1) and a small heat-shock protein- α . These genes have central roles in carbon metabolism, pigment turnover and protein stability in chloroplasts. The enrichment gene ontology results also identified high effects on membrane-bound and, in particular, organellar components (Figure S3).

DISCUSSION

Species use many different strategies in response to drought. Some species retain tight regulation of leaf water potential (Ψ_{leaf}) by closing stomata early in drought development. However, this increases the risk of carbohydrate depletion and

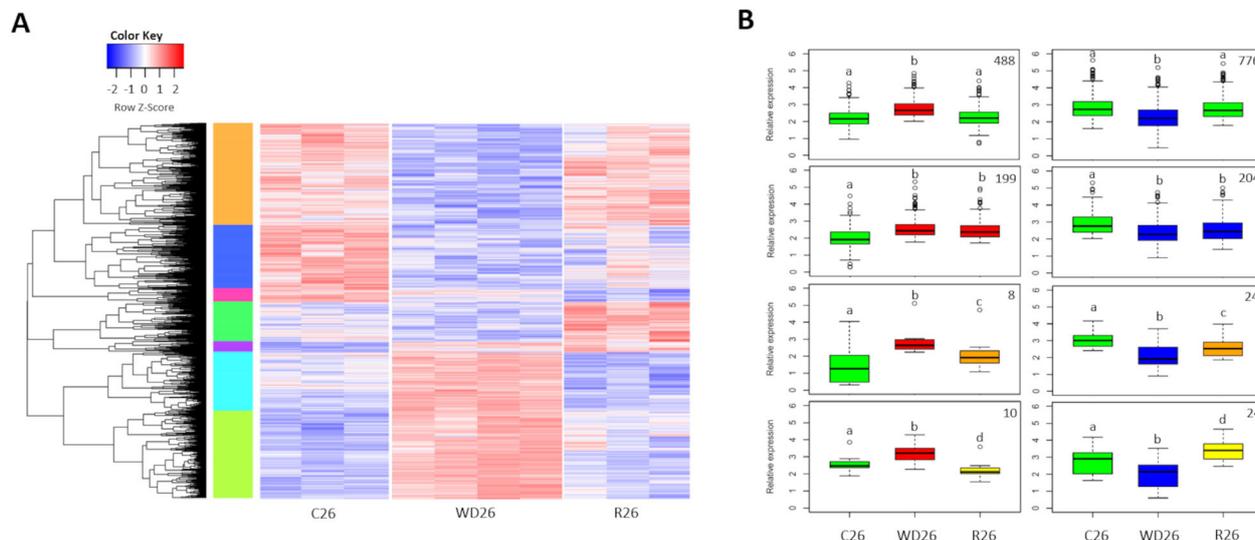


Fig. 4. Differentially expressed genes under water deficit stress and after recovery. (A) Heatmap profile of all differentially expressed transcripts from control (C26), water deficit (WD26) and recovery (R26) experiments. Red shading indicates upregulated and blue corresponds to downregulated transcripts. White is genes not differentially expressed. (B) Boxplots representing the profile of DEGs, considering $\log_2FC > 10.51$ and $P < 0.01$. Green, red and blue boxes represent expression levels are equal, up- or downregulated in relation to the control (green). Orange boxes correspond to intermediate expression among control and water deficit. Yellow boxes correspond to opposite expression pattern in response to water deficit compared to the control. Numbers at upper right correspond to number of genes present in the profile.

Table 1. Most representative groups of differentially expressed genes (DEGs) related to water deficit stress.

group	up	down	total
Photosynthesis/chloroplast	103	80	183
Transcription factors	68	108	176
Transporters	43	104	147
Protein of unknown function	57	90	147
Antioxidant system	33	17	50
Heat shock/chaperones	29	12	41
Receptors	10	31	41
Proteinases	3	26	29
RNA processing	23	2	25
Secondary metabolite synthesis	16	5	21
ABA signalling	7	14	21
Other	340	548	888

carbon starvation (isohydric strategy). In contrast, other species prefer to delay stomatal closure and deal with the consequences of significant declines in cell water potential and the risk of xylem cavitation and hydraulic failure (anisohydric strategy). Depending on the prevalent strategy that the plant displays in response to drought, species can be classified along a continuum from isohydric to anisohydric. However, increasing evidence suggests that plants may switch between isohydric and anisohydric behaviours according to the development of drought stress through time (Nolan *et al.* 2017). To better understand cashew tree adaptive responses to drought and to characterize the protective strategies used at different intensities of the water stress, we monitored the physiological plant status during the evolution of water deficit stress and during recovery.

Additionally, we evaluated gene expression through time and identified DEGs during the evolution of water deficit stress and the recovery process after re-irrigation. We demonstrated that cashew seedlings submitted to gradual soil water deficit stress show typical isohydric behaviour, with early and gradual stomatal closure, late decreases in Ψ_{leaf} and RWC, and nearly absent cell oxidative damage. These physiological responses are most probably associated with the modulation of adaptive molecular mechanisms, such as osmolyte biosynthesis, transcription factor activation, chlorophyll biosynthesis and degradation, ABA signalling and ROS detoxifying systems. Like several other isohydric tree species that survive dehydration (Delzon 2015; Hochberg *et al.* 2017), the early strategy of cashew seedlings to cope with water stress over a short time scale is to prevent or delay the negative impacts of water stress by closing the stomata. In our experiment, cashew gradually decreased g_s , such that water potential decreases were observed after 20 days of water withdrawal, when stomata were fully closed. It has been demonstrated that g_s and leaf water potential are correlated during drought as a function of leaf turgor, controlled by the accumulation of osmotically active solutes in response to soil drying. However, the point at which a plant loses leaf turgor varies among species. For example, in *Hymenaea courbaril* the leaf turgor loss point is at the earliest stage of stomatal closure, while in *Simarouba glauca* the loss of leaf turgor is reached when g_s is reduced by 99% (Brodrigg *et al.* 2003; Nolan *et al.* 2017). Interestingly, in our study, cashew did not show changes in leaf osmotic potential or in leaf RWC when leaf water potential was reduced. Cell wall flexibility is affected by the content of lignin and phenolic compounds during stress (Moore *et al.* 2008), and caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase (CCoAOMT) is an important enzyme involved in the biosynthesis of lignin. Curiously, in the RNA-seq data obtained in our study, we observed a decrease in expression of CCoAOMT

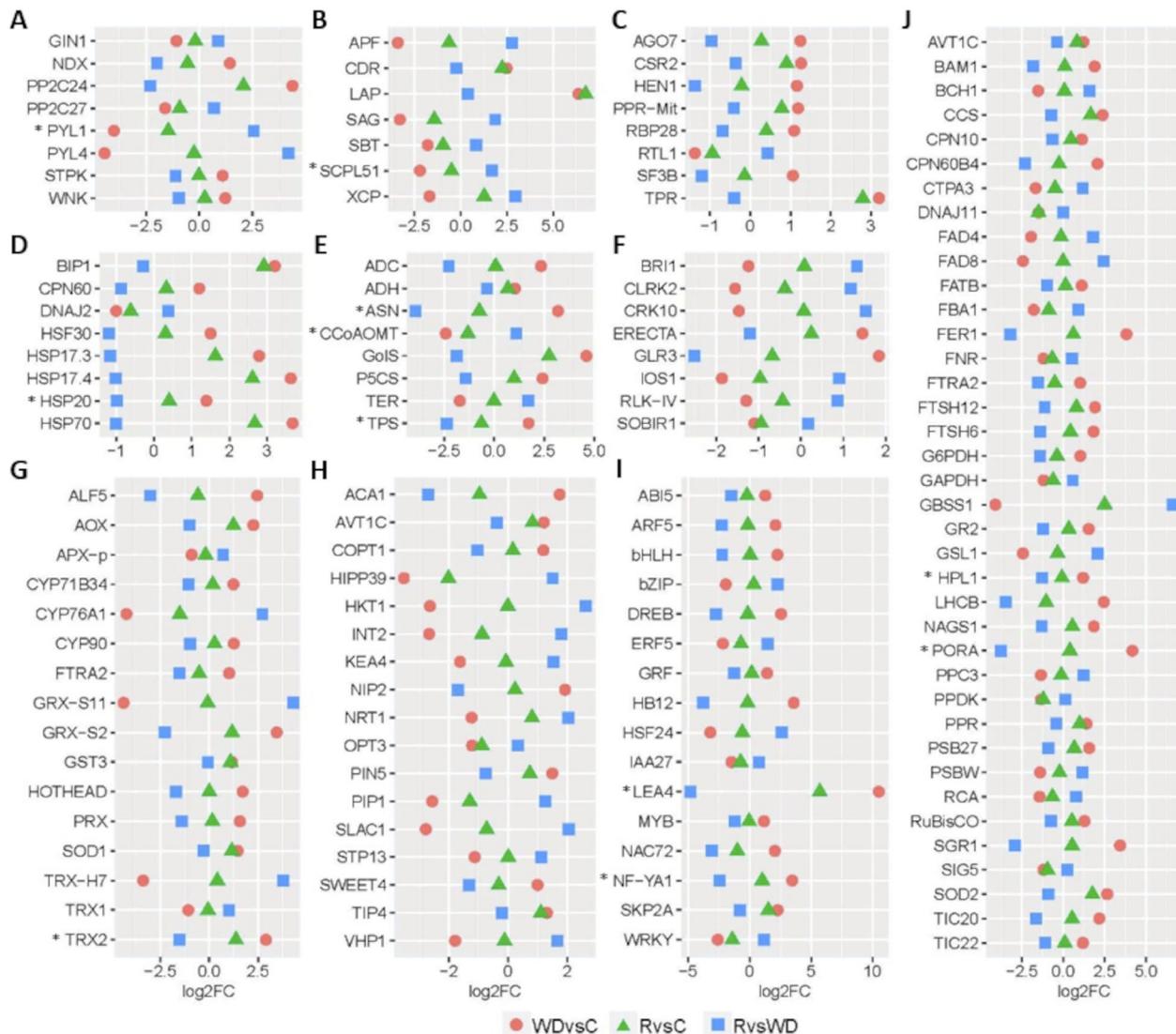


Fig. 5. Comparison of DEGs from some genes for pathways and mechanisms of drought response. These were selected to illustrate expression patterns between water deficit and control (WD *versus* C), recovery and control (R *versus* C) and recovery and water deficit (R *versus* WD). Each group is represented by a letter in the upper left corner. A: ABA signalling, B: Proteinases, C: RNA processing, D: Heat shock/chaperones, E: Secondary metabolite synthesis, F: Receptors, G: Transporters, H: Transcription factors, I: Transcription factors and J: Photosynthesis/chloroplast. The x-axis represents value of log₂FC. Asterisks indicate genes validated by RT-qPCR.

and other genes involved in lignin, anthocyanin and phenylpropanoid biosynthesis in plants that were submitted to water deficit. Other studies on trees also found a decrease in lignin upon drought (Wildhagen *et al.* 2018). Yan *et al.* (2018) demonstrated that plants engineered for a low lignin content adapted to drought tolerance more rapidly, elevating ABA level and positively regulating expression of drought-responsive genes (Yan *et al.* 2018). This indicates that the modification of secondary cell walls does not render plants less robust. Instead, some plants use a low lignin content as an adaptation to drought tolerance. However, the relationship between lignin metabolism, drought tolerance and post-drought recovery has received little attention (Li *et al.* 2013).

There was a decrease in leaf osmotic potential after 26 days of water withdrawal. Differences in osmotic adjustment vary

among species in relation to the types of solutes upregulated during osmotic adjustment (Nolan *et al.* 2017). Proline, asparagine and trehalose are the most common osmolytes accumulated in response to drought, and are also associated with increased stabilization of enzymes and proteins, maintenance of membrane integrity and protection against ROS (Kaur & Asthir 2017). The P5CS (delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) genes involved in proline biosynthesis, accumulated upon drought stress in our experiment. Accumulation of proline in leaves of cashew in response to rapid and severe salt stress has been reported previously (Silveira *et al.* 2003; da Rocha *et al.* 2012). However, these increases in proline were attributed to potential cellular metabolic disorders, such as protein degradation and leaf senescence, or to salt-induced increases in nitrogen recycling

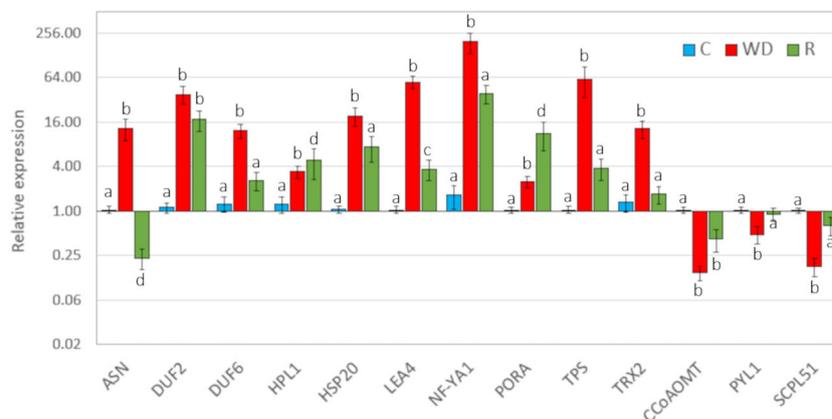


Fig. 6. RT-qPCR expression analysis of severe water deficit-modulated genes in *A. occidentale* leaves. Relative expression of 13 genes confirmed in *A. occidentale* seedlings when submitted to different water regimes. Values are fold change of mean \pm SD. Three independent biological replicates were used for each experimental condition. Statistics were performed using ANOVA ($P < 0.05$). Small letters above each expression level indicate to which expression profile the genes were classified, as presented in Fig. 4.

(Silveira *et al.* 2003; Li *et al.* 2016). Interestingly, we observed accumulation of genes associated with asparagine synthetase (ASN), an important enzyme for nitrogen storage and transport during abiotic stress.

Another osmoprotectant and indicator that plants are experiencing some stress is trehalose, which acts by lowering osmotic potential and protecting membranes, enzymes and other biological structures against irreversible damage and denaturation (Benaroudj *et al.* 2001). Trehalose is synthesized by trehalose-phosphate synthase (TPS). TPS, late-embryogenesis abundant (LEA) and chaperones also have crucial roles in osmotic adjustment of plant cells. LEA proteins are involved in protection from desiccation and synthesized in vegetative tissues in response to water deficit during drying or water shortage. Also, our results show that cashew reduces expression of three classes of aquaporin (AQP) (nodulin intrinsic protein, NIP; tonoplast intrinsic protein, TIP; plasma membrane intrinsic protein, PIP). In general, negative regulation of many PIP genes leads to a reduction in water loss, helping to prevent water backflow and avoiding loss of water to the dry soil (Afzal *et al.* 2016).

A further highlight of our study is that, even at the late stage of water stress, cashew leaf samples did not show signs of membrane damage or decreases in potential photochemical efficiency. Previous studies have revealed that cashew has an effective antioxidant defence system based on SOD (superoxide dismutase), APX (ascorbate peroxidase) and CAT (catalase) activity, and this is integrated with other protective mechanisms to regulate light harvesting, excess energy dissipation and cell membrane integrity. A combination of water deficit stress and high light stress leads to an increase in activity of SOD and a decrease in CAT activity (Lima *et al.* 2018). Also, Ferreira-Silva *et al.* (2011) showed that APX activity decreases in response to salt stress (Ferreira-Silva *et al.* 2011). Our results agree with previous studies, as SOD mRNA level was increased in response to water deficit, although there was no variation in expression level of CAT mRNA. The removal of hydrogen peroxide by peroxidases requires small reducing molecules, such as thioredoxin, to act as regeneration cofactor (Mhamdi *et al.* 2012). In our experiment, thioredoxin expression was

upregulated more than three-fold in plants submitted to water deficit.

All the above results show that cashew has developed adaptive mechanisms to protect against oxidative stress under low water potentials, resulting in resistance to water deficit stress. Indeed, despite a decrease in growth under water stress (Figure S1), it is evident that the plants achieved homeostasis in the face of water stress without entering senescence processes. One example of how to cope with this stress is by reducing transcript levels of Anaoc.0016s0356 (SAG, senescence-associated gene) and Anaoc.0005s1705 (Fig. 5, Table S8), which are the cashew orthologues of *Arabidopsis* SAG12 (At5g45890) and pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK), respectively. Both of these are known to be induced and implicated in leaf senescence mechanisms, when reallocation of nitrogen and carbon sources becomes critical (Taylor *et al.* 2010; James *et al.* 2018; Wang *et al.* 2019).

Our results show that 5 days of re-irrigation after 21 days of water withdrawal are not enough for cashew to totally recovery from stress, both at transcriptomic and physiological levels. After soil rehydration and lifting of drought stress, plants only restored 37% of g_s , with a 62% recovery in A . The hysteresis in the recovery of gas exchange may be related to two main factors. First, irreversible damage to xylem conduits, which reduces hydraulic capacity and supply of water to leaves, even after the soil is rehydrated (Skelton *et al.* 2017). Second, during water stress, the reduction in cell turgor triggers rapid biosynthesis and accumulation of ABA in leaves, which induces stomatal closure and other physiological responses (Sack *et al.* 2018). After a drought, the ABA accumulated in a leaf must be reduced through degradation or export to other tissues to allow stomatal re-opening. It has been shown that species that accumulate large amounts of ABA usually show slow recovery of gas exchange after a drought period (McAdam & Brodribb 2016). Our results indicate that cashew prevents ABA accumulation by decreasing the number of its receptors (pyrobactin resistance-1, PYR; pyrobactin resistance-like, PYL; regulatory component of abscisic acid receptor, RCAR); PYL1/4. PYL is one of the most prominent plant hormone receptor family, and many studies have demonstrated that its expression is

woody plants to abiotic stress has increased (Estravis-Barcala *et al.* 2020). Understanding gene responses to water stress is essential for identifying targets for breeding selection or for genetic engineering using editing tools. This study is the first to present the transcript profile of cashew trees exposed to water deficit stress. The genes in Table S8 provide an overview of candidate genes and their expression abundance in response to each water treatment, their expression profile and functional grouping. These results provide insights into how the cashew tree responds to periods of drought. Further functional studies are required to evaluate the potential use of the identified genes for biotechnological applications.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was carried out with support of a fellowship from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). This work was also supported by an INCT Plant Stress Biotech grant from MCT of the Brazilian Government.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

Figure S1. Seedling growth profile after 26 days. Visual representation of plants submitted to water stress for 26 days (red), plants kept under water stress for 21 days followed by recovery for 5 days (green), and control plants kept for 26 days with irrigation (blue).

Figure S2. Photosynthesis efficiency, oxidative damage of cashew seedlings submitted to water withdrawal for 21 and 26

days and root osmotic potential after recovery. (A) PSII maximum quantum efficiency (Fv/Fm), (B) Membrane damage of well-watered cashew seedlings and cashew seedlings submitted to water withdrawal for 21 and 26 days. (C) Roots osmotic potential of well-watered cashew seedlings and cashew seedlings submitted to water withdrawal for 26 days and of cashew seedlings submitted to water withdrawal for 21 days and then allowed to recover for five days of rewatering. Ctrl – control, WD – water deficit, R – recovery. Numbers on the x-axis represent the numbers of days. For (A) and (B) data are means \pm SE (n = 4). For (C) data are means \pm SE (n = 5). There is no significant difference between treatment and the control as indicated by Student's t-test ($\alpha < 0.05$).

Figure S3. KEGG view and Gene Ontology of metabolic pathways affected by drought stress. The Calvin cycle, the tricarboxylic acid (TCA) cycle and pentose pathways were selected to illustrate some of the pathways and pathways whose genes were affected by water stress.

Table S1. Primers sequences used for differential gene expression validation.

Table S2. Psychological characterization of water deficit stress evolution and intensity.

Table S3. Gas exchange measurement of cashew seedling along 26 days after water deficit stress initiation (DASI).

Table S4. Description of the libraries *Anacardium occidentale* under water deficit stress experiment.

Table S5. Up-regulated expressed genes along water deficit.

Table S6. Down-regulated expressed genes along water deficit.

Table S7. Number of transcripts differentially expressed.

Table S8. Description of genes from most representative groups responsive to water deficit stress.

REFERENCES

- Afzal Z., Howton T.C., Sun Y., Mukhtar M.S. (2016) The roles of aquaporins in plant stress responses. *Journal of Developmental Biology*, **4**, 9.
- Andrews S. (2010) FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data [Online]. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
- Benaroudj N., Lee D.H., Goldberg A.L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry*, **276**, 24261–24267.
- Benjamini Y., Hochberg Y. (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, **57**, 289–300.
- Bezerra M.A., De Lacerda C.F., Gomes F.E., De Abreu C.E.B., Prisco J.T. (2007) Physiology of cashew plants grown under adverse conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **19**, 449–461.
- Brodribb T.J., Holbrook N.M., Edwards E.J., Gutiérrez M.V. (2003) Relations between stomatal closure, leaf turgor and xylem vulnerability in eight tropical dry forest trees. *Plant, Cell and Environment*, **26**, 443–450.
- Cavalcanti F.R., Oliveira J.T.A., Martins-Miranda A.S., Viégas R.A., Silveira J.A.G. (2004) Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. *New Phytologist*, **163**, 563–571.
- da Rocha I.M.A., Vitorello V.A., Silva J.S., Ferreira-Silva S.L., Viégas R.A., Silva E.N., Silveira J.A.G. (2012) Exogenous ornithine is an effective precursor and the δ -ornithine amino transferase pathway contributes to proline accumulation under high N recycling in salt-stressed cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, **169**, 41–49.
- De Oliveira V.H. (2008) Cajucultura. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **30**, 1–284. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-29452008000100001>.
- Delzon S. (2015) New insight into leaf drought tolerance. *Functional Ecology*, **29**, 1247–1249.
- Estravis-Barcala M., Mattera M.G., Soliani C., Bellora N., Oppenorth L., Heer K., Arana M.V. (2020) Molecular basis of responses to abiotic stress in trees. *Journal of Experimental Botany*, **71**, 3765–3779.
- Fang Y., Xiong L. (2015) General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **72**, 673–689.
- FAOSTAT. (2018) Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available from www.fao.org/faostat (accessed 10 January 2018).
- Ferreira-Silva S.L., Luiz E., Nascimento E., Moura J., Vasconcelos A., De A.J., Silveira G. (2011) High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. *Environmental and Experimental Botany*, **74**, 162–170.
- Ferreira-Silva S.L., Silva E.N., Carvalho F.E.L., de Lima C.S., Alves F.A.L., Silveira J.A.G. (2010) Physiological alterations modulated by rootstock and scion combination in cashew under salinity. *Scientia Horticulturae*, **127**, 39–45.
- Ferreira-Silva S.L., Silveira J.A.G., Voigt E.L., Soares L.S.P., Viégas R.A. (2008) Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, **20**, 51–59.
- Ferreira-Silva S.L., Voigt E.L., Silva E.N., Maia J.M., Aragão T.C.R., Silveira J.A.G. (2012) Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. *Biologia Plantarum*, **56**, 172–176.
- Guan L., Haider M., Khan N., Nasim M., Jiu S., Fiaz M., Zhu X., Zhang K., Fang J. (2018) Transcriptome sequence analysis elaborates a complex defensive mechanism of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in response to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences*, **19**, 4019.
- Hoagland D., Arnon D. (1938) The water-culture method for growing plants without soil. Agricultural Experiment Station, University of California, Berkeley, CA, USA, pp. 1884–1949.
- Hochberg U., Windt C.W., Ponomarenko A., Zhang Y.J., Gersony J., Rockwell F.E., Holbrook N.M. (2017) Stomatal closure, basal leaf embolism, and shedding protect the hydraulic integrity of grape stems. *Plant Physiology*, **174**, 764–775.

- Hu L., Xie Y., Fan S., Wang Z., Wang F., Zhang B., Li H., Song J., Kong L. (2018) Comparative analysis of root transcriptome profiles between drought-tolerant and susceptible wheat genotypes in response to water stress. *Plant Science*, **272**, 276–293.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística–IBGE (2016) *Pesquisa Nacional de Amostra de Domicílios: Segurança Alimentar*. IBGE, Brasília, Brazil.
- IPCC (2014) *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva, Switzerland.
- James M., Poret M., Masclaux-Daubresse C., Marmagne A., Coquet L., Jouenne T., Chan P., Trouverie J., Etienne P. (2018) SAG12, a major cysteine protease involved in nitrogen allocation during senescence for seed production in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, **59**, 2052–2063.
- Kasajima I., Kasajima I. (2017) Protocol for DNA extraction from any plant species (alkaline PVPP method). *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/protex.2017.004>
- Kaur G., Asthir B. (2017) Molecular responses to drought stress in plants. *Biologia Plantarum*, **61**, 201–209.
- Kim D., Perlea G., Trapnell C., Pimentel H., Kelley R., Salzberg S.L. (2013) TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biology*, **14**, R36.
- Li X., Chen W., Zhao Y., Xiang Y., Jiang H., Zhu S., Cheng B. (2013) Downregulation of caffeoyl-CoA O-methyltransferase (CCoAOMT) by RNA interference leads to reduced lignin production in maize straw. *Genetics and Molecular Biology*, **36**, 540–546.
- Li Y., Wang M., Zhang F., Xu Y., Chen X., Qin X., Wen X. (2016) Effect of post-silking drought on nitrogen partitioning and gene expression patterns of glutamine synthetase and asparagine synthetase in two maize (*Zea mays* L.) varieties. *Plant Physiology and Biochemistry*, **102**, 62–69.
- Lima C.S., Ferreira-Silva S.L., Carvalho F.E.L., Lima M.C., Neto A.R.M., Silva E.N., Sousa R.M.J., Silve J.A.G. (2018) Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. *Environmental and Experimental Botany*, **149**, 59–69.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, **25**, 402–408.
- Marengo J.A. (2008) Water and climate change. *Estudos Avançados*, **22**, 83–96.
- Marengo J.A., Nobre C.A., Tomasella J., Oyama M.D., Sampaio de Oliveira G., de Oliveira R., Camargo H., Alves L.M., Brown I.F. (2008) The Drought of Amazonia in 2005. American Meteorological Society. *Journal of Climate*, **21**, 495–516.
- McAdam S.A.M., Brodribb T.J. (2012) Linking turgor with ABA biosynthesis: implications for stomatal responses to vapor pressure deficit across land plants. *Plant Physiology*, **171**, 2008–2016.
- Mhamdi A., Noctor G., Baker A. (2012) Plant catalases: peroxisomal redox guardians. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **525**, 181–194.
- Moore J.P., Vitré-Gibouin M., Farrant J.M., Drriouch A. (2008) Adaptations of higher plant cell walls to water loss: drought vs desiccation. *Physiologia Plantarum*, **134**, 237–245.
- Morgil H., Tardu M., Cevahir G., Kavakli İ.H. (2019) Comparative RNA-seq analysis of the drought-sensitive lentil (*Lens culinaris*). *Functional & Integrative Genomics*, **19**, 715–727.
- Nolan R.H., Tarin T., Santini N.S., McAdam S.A.M., Ruman R., Eamus D. (2017) Differences in osmotic adjustment, foliar abscisic acid dynamics, and stomatal regulation between an isohydric and anisohydric woody angiosperm during drought. *Plant, Cell and Environment*, **40**, 3122–3134.
- Rozen S., Skaletsky H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, **132**, 365–386.
- Sack L., John G.P., Buckley T.N. (2018) ABA accumulation in dehydrating leaves is associated with decline in cell volume, not turgor pressure. *Plant Physiology*, **176**, 489–493.
- Schreiber U., Bilger W., Neubauer C. (1995) Chlorophyll Fluorescence as a Noninvasive Indicator for Rapid Assessment of In Vivo Photosynthesis In: Bilger W., Scriber U., Lange O.L. (Eds), *Ecophysiology of Photosynthesis*. Springer, Berlin, Germany, pp 49–70.
- Shanker A.K., Maheswari M., Yadav S.K., Desai S., Bhanu D., Bajaj A.N., Venkateswarlu B. (2014) Drought stress responses in crops. *Functional & Integrative Genomics*, **14**, 11–22.
- Silveira J.A.G., Viégas R.d.A., Rocha I.M.A.d., Moreira A.C.d.O.M., Moreira R.d.A., Oliveira J.T.A. (2003) Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. *Journal of Plant Physiology*, **160**, 115–123.
- Skelton R.P., Brodribb T.J., McAdam S.A.M., Mitchell P.J. (2017) Gas exchange recovery following natural drought is rapid unless limited by loss of leaf hydraulic conductance: evidence from an evergreen woodland. *New Phytologist*, **215**, 1399–1412.
- Souza R.P., Ribeiro R.V., Machado E.C., de Oliveira R.F., Silveira J.A.G. (2005) Photosynthetic responses of young cashew plants to varying environmental conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, **40**, 735–744.
- Tardieu F., Simonneau T., Muller B. (2019) The physiological basis of drought tolerance in crop plants: a scenario-dependent probabilistic approach. *Annual Review of Plant Biology*, **70**, 153–186.
- Taylor L., Nunes-Nesi A., Parsley K., Leiss A., Leach G., Coates S., Winkler A., Fernie A.R., Hibberd J.M. (2010) Cytosolic pyruvate, orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content. *The Plant Journal*, **62**, 641–652.
- Varet H., Brillet-Guéguen L., Coppée J.-Y., Dillies M.-A. (2016) SARTools: a DESeq2- and EdgeR-based R pipeline for comprehensive differential analysis of RNA-Seq data. *PLoS One*, **11**, 1–8.
- Wang X., Gao J., Gao S., Song Y., Yang Z., Kuai B. (2019) The H3K27me3 demethylase REF6 promotes leaf senescence through directly activating major senescence regulatory and functional genes in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics*, **15**, 1–24.
- Wildhagen H., Paul S., Allwright M., Smith H.K., Malinowska M., Schnabel S.K., Paulo M.J., Cattonaro F., Vendramin V., Scalabrin S., Janz D., Douthe C., Brendel O., Buré C., Cohen D., Hummel I., Le Thiec D., van Eeuwijk F., Keurentjes J.J.B., Flexas J., Morgante M., Robson P., Bogeat-Triboulot M.B., Taylor G., Polle A. (2018) Genes and gene clusters related to genotype and drought-induced variation in saccharification potential, lignin content and wood anatomical traits in *Populus nigra*. *Tree Physiology*, **38**, 320–339.
- Yan J., Aznar A., Chalvin C., Birdseye D.S., Baidoo E.E.K., Eudes A., Shih P.M., Loqué D., Zhang A., Scheller H.V. (2018) Increased drought tolerance in plants engineered for low lignin and low xylan content. *Biotechnology for Biofuels*, **11**, 195.
- Zhang M., Li Q., Yu D., Yao B., Guo W., Xie Y., Xiao G. (2019) GeNeCK: A web server for gene network construction and visualization. *BMC Bioinformatics*, **20**, 1–7.

5. CAPÍTULO 2 – Análise funcional de genes de caju responsivos ao estresse hídrico em sistema heterólogo de *Arabidopsis thaliana*

5.1 INTRODUÇÃO

A genômica é a ciência que estuda o genoma de organismos a partir do seu sequenciamento completo, visando entender sua estrutura, organização e função, e pode ser dividida em genômica estrutural, comparativa e funcional, respectivamente. A genômica estrutural estuda a organização e a estrutura dos genes, analisando sequências transcritas e estruturais utilizando metodologias como marcadores de DNA e sequenciamento. A genômica comparativa busca conhecer as relações entre genomas, homologia entre sequências e genes, determinando, assim, o grau de sintenia destes, em espécies relacionadas. À genômica funcional cabe o estudo das funções gênicas, a fim de compreender as mudanças no funcionamento do genoma em diferentes estágios de desenvolvimento e sob diferentes condições ambientais.

O melhoramento genético vegetal pode ser definido de forma bastante simplificada e generalizada como a arte e a ciência de modificar plantas ou seu desempenho em benefício da humanidade (POEHLMAN; SLEPER, 1995). Os programas de melhoramento utilizam como matéria-prima a variabilidade/diversidade genética que existe em uma espécie ou em espécies correlatas, que são capazes de se inter cruzar. Com o avanço das tecnologias de transformação genética, surgiu a possibilidade de introduzir genes de espécies que são evolutivamente distantes e não são geneticamente relacionadas, ou seja, que não possuem a capacidade de cruzamento entre si. Sendo assim, em teoria, qualquer ser vivo pode contribuir com genes para o melhoramento de uma dada espécie vegetal.

Com o melhoramento assistido é possível acompanhar variações fenotípicas das características de genes candidatos. Assim, ao identificar o gene é possível selecionar contra ou a favor do genótipo pré-existente ou obter novos genótipos por meio de mutagênese, edição, silenciamento ou superexpressão de genes de interesse. O desenvolvimento de cultivares com características desejáveis (*traits*), como maior produtividade, maior resistência a pragas ou maior valor nutricional, baseou-se principalmente em métodos de seleção de alelos favoráveis de ocorrência natural ou induzidos por mutagênese não específica.

Por muitos anos, o melhoramento clássico foi o único método disponível para introduzir características em plantas, envolvendo cruzamentos seguidos de seleção de plantas com fenótipo desejável. Apesar de sua enorme contribuição, esses métodos apresentam diversas limitações como ser um processo lento, que necessita vários anos para produzir e liberar comercialmente uma variedade (CHRISTOU P, 1992) e a seleção fenotípica sem conhecimento das bases moleculares e fisiológicas envolvidas (PURUGGANAN; FULLER, 2009). O surgimento da biologia molecular e suas diversas técnicas tem beneficiado a agricultura moderna, auxiliando na seleção assistida por marcadores moleculares, na seleção genômica e também no melhoramento genético vegetal, com destaque para a transgenia. Apesar desses avanços, ainda há muita limitação tanto por crítica do público, que acaba associando a transgenia à imagem de algo “não natural” (SCHMIDT; BELISLE; FROMMER, 2020), como limitação técnica para desenvolver produtos comerciais, como a dificuldade de escolha da posição genômica onde o DNA exógeno é integrado (QUE *et al.*, 2010).

A engenharia genética de plantas não só acelera o processo de melhoramento, mas também permite transpor as barreiras de incompatibilidade sexual através da hibridização somática ou da introdução de genes específicos em células vegetais, utilizando os métodos de transformação (MORAES-FERNANDES, 1987). A transformação genética é o processo de introdução controlada de ácidos nucléicos exógenos em um genoma receptor, por via não sexual, que não compromete a viabilidade das células (TORRES, 2000). A partir do avanço da tecnologia de DNA recombinante, é possível transferir para plantas genes isolados de outras plantas, ou mesmo de animais e microrganismos (PERANI *et al.*, 1986), permitindo a criação de novas variedades que podem ser usadas em programas de melhoramento convencional. Até o presente, diversos genes foram introduzidos estavelmente em plantas, conferindo tolerância a estresses ambientais como seca, salinidade, alta temperatura, alta radiação e resistência a estresses bióticos (GUO *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2013; MA *et al.*, 2020; MANUKA; SADDHE; KUMAR, 2018; RAMIRO *et al.*, 2016; ZHU, C. *et al.*, 2011).

A transferência de genes entre diferentes organismos vegetais pode ser através do uso de métodos diretos ou indiretos de transformação. No método direto, são utilizados processos físicos ou químicos que irão causar modificações nas paredes e membranas celulares, facilitando a entrada do DNA exógeno. Dentre estes métodos, os que possuem maior eficiência de transformação são eletroporação de protoplastos, transformação por

polietilenoglicol e aceleração de partículas (FISK; DANDEKAR, 1993). Já no método indireto, é utilizado um vetor para intermediar a transferência de genes. Alguns dos vetores mais utilizados são *Agrobacterium tumefaciens* e *Agrobacterium rhizogenes* (CHILTON, 1977, 1982).

Agrobacterium é uma bactéria fitopatogênica com importância significativa nos estudos de transformação de plantas devido a sua capacidade natural de introduzir DNA em plantas hospedeiras. *A. tumefaciens* causa a formação de tumores. Assim, seu plasmídeo é denominado Ti (Figura 10). Ao ser introduzido, uma parte do plasmídeo Ti, chamada T-DNA, é transferida para a célula vegetal e passa a ser expressa como parte do genoma da planta. Como consequência dessa expressão, o padrão normal de desenvolvimento é alterado (HOHN, 1992). A região contendo o T-DNA é definida por duas sequências não perfeitas, conservadas e repetidas de 25 pares de bases e são chamadas de bordas direita (RB) e esquerda (LB). Os genes do T-DNA são expressos somente nas células vegetais e são responsáveis pela produção excessiva de hormônios de crescimento (como auxina e citocinina) e pelo aumento da sensibilidade das células a esses compostos levando, assim, à formação de tumores. Também são genes responsáveis pela produção de opinas, que são compostos utilizados como fonte de carbono e nitrogênio pela bactéria. Na maior parte dos casos, a presença desses genes nas células/tecidos transformados não é desejada pois impede que a planta se regenere com fenótipo normal. Dessa forma, esse problema é evitado através da técnica de “desarmamento” da *Agrobacterium*, em que esses genes são inativados ou removidos. Sem esses genes indesejáveis, ou seja, apenas mantendo os genes relacionados à transferência (T-DNA) e à replicação do plasmídeo (região *vir*), as células transformadas pode ser identificadas pela inclusão de genes marcadores no T-DNA ou genes de resistência a antibióticos, como *uidA*- β -glucuronidase ou *nptII* (canamicina), respectivamente (SANTAREM, 2000).

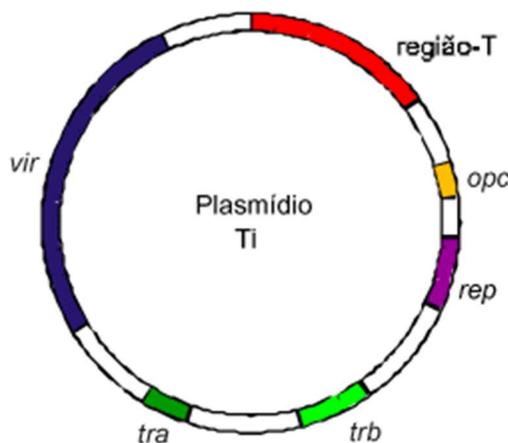


Figura 10. Representação esquemática da organização de um plasmídeo Ti. As regiões correspondem: (*vir*) região de virulência; (*tra* e *trb*) região de transferência conjugativa; (*rep*) região de replicação; (*opc*) região de catabolismo de opinas e (região-T) região transferida para a célula vegetal. O tamanho e a posição relativa de cada região variam segundo a linhagem de *Agrobacterium* sp. (ZHU, J. *et al.*, 2000)

Os métodos de transformação via forma direta demandam tempo, mão de obra qualificada e equipamentos relativamente caros. Em contraste, o método de “infiltração a vácuo via *Agrobacterium*” é relativamente novo e simples para transformar *Arabidopsis thaliana* (BECHTOLD; PELLETIER, 1998). Após algumas melhorias no protocolo, tornou-se viável o tratamento em larga escala de populações de *Arabidopsis* em uma estufa sem a necessidade de um aparelho de vácuo ou de desenraizamento e replantio das plantas. Esse novo protocolo passou a ser chamado de *floral dip* (CLOUGH; BENT, 1998; KAN, 2006). De maneira resumida, nesse método as inflorescências de *Arabidopsis* são mergulhadas em uma solução que contendo *Agrobacterium*, sacarose (ou glicose) e o surfactante Silwet L-77. O uso do surfactante faz-se necessário para reduzir a tensão superficial e, em doses com baixa fitotoxicidade, aumenta muito a entrada de bactérias em tecidos vegetais relativamente inacessíveis. Por fim, após algumas semanas é feita a coleta das sementes dessas plantas e a identificação da progênie transformada por seleção em meio contendo antibiótico ou herbicida.

5.2 JUSTIFICATIVA

O cajueiro é uma planta naturalmente adaptada a ambientes com pouca disponibilidade de água. Entretanto, diversas plantas não possuem a mesma capacidade de sobrevivência a ambientes hostis. Dessa forma, a identificação de genes e mecanismos moleculares que conferem essa tolerância ao cajueiro pode torná-lo uma planta com grande potencial, a fim de proporcionar essa vantagem a plantas de interesse econômico.

As técnicas de transformação genética de plantas têm permitido acelerar o melhoramento vegetal, gerando variedades com desempenho superior e adaptadas ao ambiente de cultivo. O método de transformação indireta, utilizando *Agrobacterium* tem sido bastante usado na obtenção de plantas transgênicas, principalmente utilizando a planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

No Capítulo 1 desta tese, foi confirmada a expressão de 13 genes diferencialmente expressos em plantas de cajueiro submetidas ao déficit hídrico. Destes 13 genes, 10 tiveram sua expressão induzida sob o estresse enquanto que três foram reprimidos. Após a seleção de genes candidatos para conferir mais tolerância ao déficit hídrico, nesse segundo capítulo da tese utilizaremos da biotecnologia vegetal para obtenção de plantas de *Arabidopsis* mais tolerantes ao déficit hídrico, utilizando genes de cajueiro para expressão heteróloga.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Materiais vegetais e condições de crescimento

A obtenção do tecido foliar de cajueiro utilizado para dar início aos experimentos de genômica funcional foi obtido como descrito previamente (CAPELARI *et al.*, 2021). Sementes de *Arabis thaliana*, ecótipo Columbia, acesso 0 (Col-0) foram semeadas e crescida em solo em substrato composto por terra, vermiculita e osmocote ($3,5\text{km}\cdot\text{m}^{-3}$). As condições de estufa foram 22°C com fotoperíodo de dia longo (16h de luz/8h de escuro), em salas de crescimento com 65% da umidade relativa do ar, durante 7 semanas

5.3.2 Extração de RNA total e síntese de cDNA

Os ácidos nucleicos das condições controle, deficit hídrico e recuperação foram extraídos utilizando o protocolo com CTAB. Para cada 150mg de amostra macerada, 900 μL de tampão de extração (2% CTAB, PVP-40 2.5%, 2M NaCl, 100 mM TrisHCl pH 8, 25mM EDTA pH 8.0, 2% β -mercaptoetanol) foi adicionado. A solução foi incubada a 65°C por 10 min e então foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). Após centrifugar a 11000 g por 10 min a 4°C , o sobrenadante foi recuperado. Os dois últimos passos foram repetidos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, onde foi adicionado LiCl (3M). A solução foi incubada no gelo por 30 min e centrifugada a 20000 g por 20 min a 4°C . O *pellet* foi ressuscitado em 500 μL de tampão SSTE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0, 1% SDS, 1M NaCl) pré-aquecido a 65°C e foi acrescentado 500 μL de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). A solução foi centrifugada a 11000 g por 10 min a 4°C e o sobrenadante precipitado com 0,7 volumes de isopropanol. Após centrifugar a 20000 g por 20 min a 4°C , a solução foi lavada com etanol 70% e ressuscitada em água milliQ.

Após a verificação da qualidade, integridade e quantidade de RNA extraído, foi realizada a síntese do gDNA. Para isso, 18 μL do RNA total extraído, juntamente com 2 μL de mix de oligonucleotídeos no sentido Reverso (100 μM), foram incubados a 70°C por 5 minutos. À essa solução foram adicionados 6 μL de tampão 5X, 2 μL de dNTP (5 μM) e 1 μL da Enzima Transcriptase Reversa M-MLV (200 U/ μL). Após incubação a 40°C por 60 minutos, o produto foi diluído 10 X e utilizado nas reações em cadeia da polimerase (PCR).

5.3.3 Amplificação das regiões codificadoras dos genes selecionados para superexpressão

Para amplificar as sequências codificadoras dos genes a serem clonados, sete pares de *primers* foram projetados utilizando o *software* Primer3plus v4.1.0 (ROZEN; SKALETSKY, 2000), baseados nas sequências depositadas no banco de dados Phytozome v.13. Os pares de *primers* utilizados para amplificar cada sequência, bem como os tamanhos dos fragmentos amplificados, estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências dos *primers* projetados para amplificar os genes escolhidos para superexpressão e tamanho de amplicon

Gene	Primer	Sequência 5' -> 3'	Amplicon gDNA
Asparagina sintase (ASN)	Anaoc.0005s1069_F Anaoc.0005s1069_R	ATgTgTggAATACTTgCTgTgC gCTAgAgATTgCAAgTCCTg	3274 pb
Domínio com Função Desconhecida 2 (DUF2)	Anaoc.0004s2112_F Anaoc.0004s2112_R	ATgCgTggAACTgCTgC CTCATCgTCCCCATCACg	369 pb
Domínio com Função Desconhecida 6 (DUF6)	Anaoc.0003s0364_F Anaoc.0003s0364_R	ATggATggTTCTTggCCg ACgAATTCgAATCACCgg	733 pb
Fator Nuclear Y subunidade A (NF-YA)	Anaoc.0018s0487_F Anaoc.0018s0487_R	ATgCACCGAAATCCAAACAgc CAGcGATTCTTCACTTTtgc	5597 pb
Hidroperóxido liase (HPL)	Anaoc.0014s0438_F Anaoc.0014s0438_R	ATgCTTTTgCAATCAAATTACTgtatg TTTTgCCTTTTCAACggct	2171 pb
Protoclorofilídeo redutase (POR-A)	Anaoc.0020s0590_F Anaoc.0020s0590_R	ATgAAgCAATCTgATTACCCATCA AgCCAAACCAACAAGTTTct	761 pb
Tioredoxina redutase (Trx)	Anaoc.0009s0083_F Anaoc.0009s0083_R	ATgAgTTATCCATTATTgATCCgAcc CCTTTCATgTAggAgCcac	3778 pb

Para a amplificação das regiões codificadoras, foram utilizadas reações de PCR partindo de um *input* inicial de 200ng de gDNA. As reações foram realizadas em um volume total de 20 µL, constituídas de 13,95 µL de água, 2 µL de tampão 10X, 1,2 µL de MgCL₂ (50mM), 0,4 µL de dNTP (5mM), 0,2 µL do primer direto (10 µM) e 0,2 µL do primer reverso (10 µM), 0,05 µL da enzima Platinum Taq DNA polimerase. A temperatura de anelamento para os *primers* foi de 60 °C. Para cada reação foi utilizado o programa de PCR: 95 °C por 5 minutos para a primeira etapa da desnaturação, 95 °C por 30 segundos para demais desnaturações do ciclo, 60 °C por 30 segundos para a etapa do anelamento dos *primers* e 72 °C. O tempo de extensão dos *primers* para os genes DUF2, DUF6 e POR-A foi de 1 minuto; para o gene HPL foi de 2 minutos; para os genes ANS e Trx foi de 3 minutos

e para o gene NF-YA foi de 5 minutos. Estas etapas passaram por 40 ciclos. Os produtos de amplificação foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados sob luz UV e imagem digital gerada por meio do sistema Gel-Doc (Bio-Rad).

5.3.4 Ligação dos amplicons no vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO

Após as sequências amplificadoras dos genes de interesse terem sido amplificadas, foi realizada a ligação do fragmento no vetor de entrada. O vetor escolhido foi o pCR®8/GW/TOPO, que possui uma timina em excesso em ambas as terminações 3'. Como a enzima utilizada para amplificar foi a Platinum Taq DNA polimerase, não foi preciso o passo de adição de uma adenina na região 3' terminal, já que a cada ciclo da PCR gera uma adenina sobressalente na região. Este vetor proporciona recombinação através do sistema Gateway, o qual será recombinado com um vetor binário através dos sítios de recombinação *attL* (vetor de entrada) *attR* (vetor de destino). Para a clonagem do fragmento de interesse no vetor de entrada, foi utilizado 1 µL do vetor, 1 µL de solução salina e 4 µL do produto de PCR. A solução foi incubada à temperatura ambiente por 5 minutos.

Bactérias *Escherichia coli* termocompetentes, da linhagem Omnimax, foram transformadas com o produto da ligação através de choque térmico. Após serem descongeladas em gelo, em cada tubo contendo bactéria *E. coli* foi adicionado o produto da ligação e após serem incubadas em gelo por 30 minutos, as bactérias foram submetidas a temperatura de 42 °C por 1,5 minuto. Imediatamente, foram transferidas para o gelo, por 5 minutos, e então 1 mL de meio líquido Luria-Bertani (LB) foi adicionado. O tubo ficou sob agitação a 180 rpm por 1 hora a 37 °C. A cultura foi centrifugada por 3 minutos a 3000 g para formar um concentrado de bactérias no fundo do tubo. Após retirar aproximadamente 600 µL do sobrenadante, as células foram ressuspensas no meio restante e plaqueadas em meio LB-ágar com os respectivos antibióticos de interesse. A fim de selecionar as bactérias efetivamente transformadas, foi utilizado o antibiótico espectinomicina (100 µg/mL). Finalmente, a placa foi mantida na estufa a 37 °C entre 16 a 20 horas.

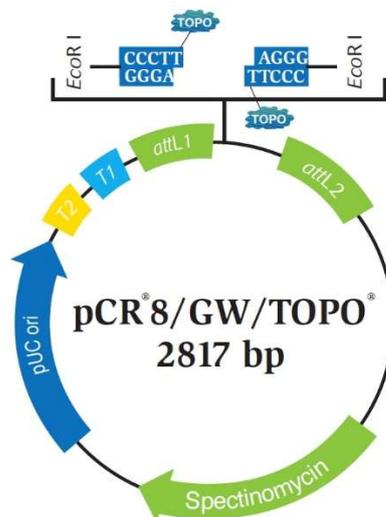


Figura 11. Mapa do vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO. Vetor utilizado na inserção dos produtos de PCR e utilizado para posterior recombinação. Possui 2817 pares de bases e apresenta gene que confere resistência à espectinomicina. Os sítios *attL1* e *attL2* são reconhecidos por recombinases. Fonte: Manual pCR®8/GW/TOPO Cloning® Kit.

5.3.5 Confirmação das colônias transformadas

Para confirmar a transformação das bactérias com o vetor de interesse, foram realizados PCR de colônias. As reações aconteceram em um volume total de 20 μL , sendo 2 μL de tampão 10X, 1,2 μL de MgCl_2 (50mM), 0,4 μL de dNTP (5mM), 0,2 μL do primer direto (10 μM) e 0,2 μL do primer reverso (10 μM), 0,05 μL da enzima Platinum Taq DNA polimerase, água destilada para quantidades suficiente para o volume final e uma colônia de interesse. Em seguida, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1%. A corrida foi realizada em tampão TAE 1x (Tampão Tris-Acetate – Tris 40 mM, Ácido acético 20 mM, EDTA 0,5 M pH 8,0), a 100 V por 40 minutos. Ao término, o gel foi visualizado sob radiação ultravioleta.

As colônias positivas foram incubadas *overnight* a 37 °C sob agitação de 180 rpm, em 5 mL de meio LB, contendo espectinomicina, para posterior extração do DNA plasmidial. Destes 5 mL da cultura bacteriana, 1,5 mL foi transferido para um microtubo e centrifugado por 3 minutos a 12.000 g. O sobrenadante foi descartado e o processo repetido, a fim de obter maior volume de cultura. O precipitado foi ressuscitado em 100 μL de tampão TE 1X (10 mM Tris-HCl pH:8, 1 mM EDTA) e misturado em agitador. Em seguida,

foram adicionados 100 µL do tampão de lise (NaOH 0,2 M, SDS 1%). Depois de agitar, por inversão, o tubo 10 vezes e aguardar 5 minutos, foram adicionados 300 µL da solução de neutralização (acetato de potásio 3 M, pH 4-8, 5-3). A solução foi novamente misturada por inversão, formando um precipitado branco, e então foi centrifugada por 10 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi transferido, por inversão, para outro tubo e foram adicionados 2 volumes de etanol 95 %. Após centrifugar por 15 minutos a 12.000 g, o sobrenadante foi descartado e o último passo repetido. Por fim, após seco à temperatura ambiente, o precipitado foi solubilizado em 100 µL de água.

5.3.6 Recombinação com vetor destino

O vetor de clonagem pCR®8/GW/TOPO não possui a característica de clonagem direcionada. Dessa forma, o fragmento a ser clonado pode entrar tanto no sentido 5' → 3', como no 3' → 5'. Assim, para confirmar a correta inserção do amplicon, realiza-se uma PCR utilizando um primer que hibridize no vetor e outro, no sentido contrário, que hibridize no gene. Neste trabalho foram utilizados os primers M13-forward (vetor) e gene-reverso (gene). Foi utilizado o mesmo protocolo de PCR listado no item 5.4.6, com a alteração de 1 µL da miniprep ao invés de colônia. As colônias que foram confirmadas com correta inserção dos genes foram escolhidas para a recombinação. O vetor de destino escolhido foi o da linha pEarlyGate, que possui mais de 10 vetores disponíveis para diversas finalidades em plantas, como superexpressão, *knockdown*, análise de promotor, localização subcelular, entre outros. E estes diferentes vetores possuem diferentes características entre si.

Como o vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO possui os sítios *attL1* e *attL2* e o vetor de destino pEarlyGate 103 possui os sítios *attR1* e *attR2*, foi utilizada a enzima LR clonase para a recombinação LR. De acordo com o fabricante da tecnologia, a proporção ideal é de 3:1 entre vetor de entrada e vetor destino. Assim, para cada gente foi calculada a concentração de DNA e o quanto seria necessário para cada reação. Além dos vetores de entrada e de destino, foi adicionado TE 1X e a 0,2 µL da enzima LR clonase. A solução foi incubada a 25 °C por 1 hora, e após adição de 2 µL de proteínas K, foi incubada a 37 °C por 10 minutos. Todo o volume da recombinação foi utilizado para transformação de bactéria *E. coli*, por choque térmico, conforme descrito no item 5.4.5. Para selecionar as bactérias

efetivamente transformadas com o produto da recombinação, foi utilizado o antibiótico canamicina (50 µg/mL).

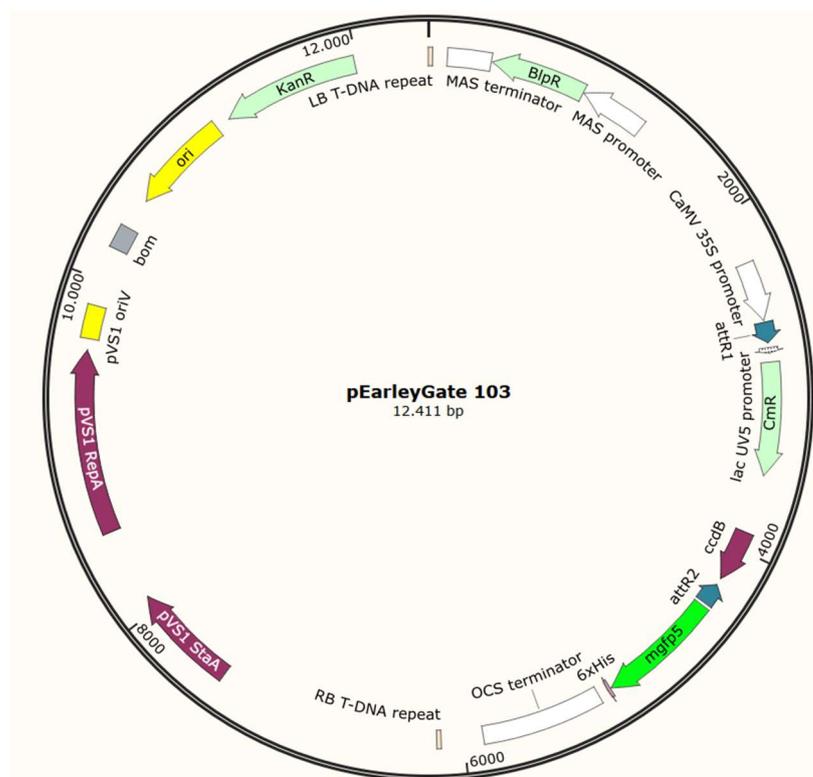


Figura 12. Mapa do vetor de destino pEarleyGate 103. Vetor utilizado na recombinação com vetor de entrada. Possui 12411 pares de bases e apresenta gene que confere resistência à canamicina. Os sítios *attR1* e *attR2* são reconhecidos por recombinases. Possui o promotor CaMV 35S, utilizado para superexpressar genes de interesse e possui GFP com uma *tag* His.

5.3.7 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

De forma similar ao item 5.4.6, a confirmação das bactérias transformadas com o vetor recombinado foi realizada por PCR de colônia, seguido de extração do DNA plasmidial. Para a amplificação utilizando o DNA plasmidial recombinado, foram utilizados os primers 35S-forward (que hibridiza no vetor de destino) e gene-reverso (que hibridiza no próprio gene). As colônias em que as recombinações foram confirmadas foram escolhidas para a transformação da bactéria *Agrobacterium tumefaciens*, da linhagem EHA105.

A transformação foi realizada via eletroporação, com aproximadamente 30 ng/µL do plasmídeo. A solução foi submetida a um pulso de 2,5 kV com capacitância de 25 µF e

resistência de 200 Ω . Após o choque, foi adicionado 1 mL de meio LB à solução e a mesma foi incubada sob agitação de 200 rpm a 28 °C por 3 horas. Por fim, a cultura bacteriana foi plaqueada em meio contendo antibióticos apropriados para seleção das bactérias transformadas e a placa ficou incubada na estufa a 28 °C por 2 dias.

5.3.8 Expressão em sistema heterólogo de *Arabidopsis thaliana*

Plantas de *Arabidopsis* de aproximadamente 45 dias foram transformadas com os vetores de interesse utilizando-se a técnica de *floral dip*, de acordo com o protocolo (CLOUGH; BENT, 1998). O volume de cultura bacteriana utilizado para cada construção foi de 200 mL. Após centrifugar a 3220 g por 10 min a 20 °C, o precipitado foi ressuspenso em 50 mL de solução de sacarose 5 %. No momento de fazer a submersão das plantas à solução transformadora, o surfactante Silwet L-77 foi adicionado a uma concentração de 0.05%. Para cada construção foram utilizados 11 vasos, com 5 plantas em cada vaso. As inflorescências foram mergulhadas na solução por cerca de 30 segundos. As plantas foram mantidas cobertas por 24 horas, a fim de manter a umidade, e seguiram sendo irrigadas até o momento em que as sementes se tornaram maduras.

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Amplificação das regiões genômicas dos genes selecionados para superexpressão

Inicialmente, o objetivo era realizar a clonagem e dar prosseguimento nos próximos passos com sete genes escolhidos, que foram validados por qPCR no capítulo 1. São eles: Anaoc.0005s1069 (asparagina sintase/ANS – 3274 pb); Anaoc.0004s2112 (DUF2 – 369 pb); Anaoc.0003s0364 (DUF6 – 733 pb), Anaoc.0018s0487 (Fator de transcrição nuclear Y subunidade A/NF-YA – 5497 pb), Anaoc.0014s0438 (Hidroperóxido liase/HPL – 2171 pb), Anaoc.0020s0590 (Protoclorofilídeo redutase/POR-A – 761 pb) e Anaoc.0009s0083 (Tioredoxina/Trx – 3778 pb).

Apenas os genes DUF2 e POR-A tiveram sua amplificação confirmada por PCR seguido de eletroforese (Figura 13). Apesar de terem aparecido duas bandas no gene POR-A, seguimos com o protocolo de clonagem e transformação. Algumas possíveis razões para os outros genes não terem sido amplificados: i) tamanho do gene, como ANS, TRX e NFY, com 3274, 3778 e 5497 pares de bases, respectivamente; ii) primers ineficientes

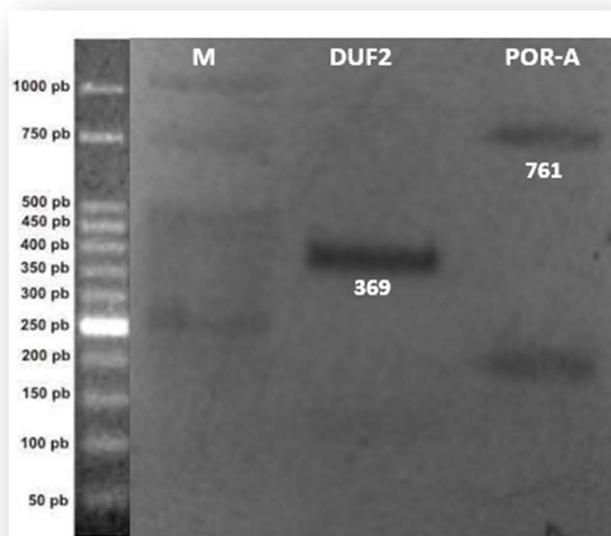


Figura 13. Amplificação dos genes DUF2 e POR-A de *Anacardium occidentale* confirmada por eletroforese em gel de agarose 1%. Os genes a serem inseridos no vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO tiveram sua amplificação confirmada por PCR. Os números acima indicam os genes DUF2 (1) e POR-A (2). O tamanho dos fragmentos esperados em

pares de bases (pb) estão indicados abaixo de cada banda. M representa o marcador de peso molecular 100 pb.

5.4.2 Ligação dos amplicons em vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO.

A validação da ligação foi feita através de PCR, utilizando o DNA plasmidial extraído e *primers* forward M13 (vetor) e o primer reverso de cada gene. Com essa combinação de oligonucleotídeos, o tamanho esperado para o gene DUF2 era de 528 pb, enquanto que para o gene POR-A era de 920 pb. Para cada construção foi confirmada apenas uma colônia positiva (Figura 14).

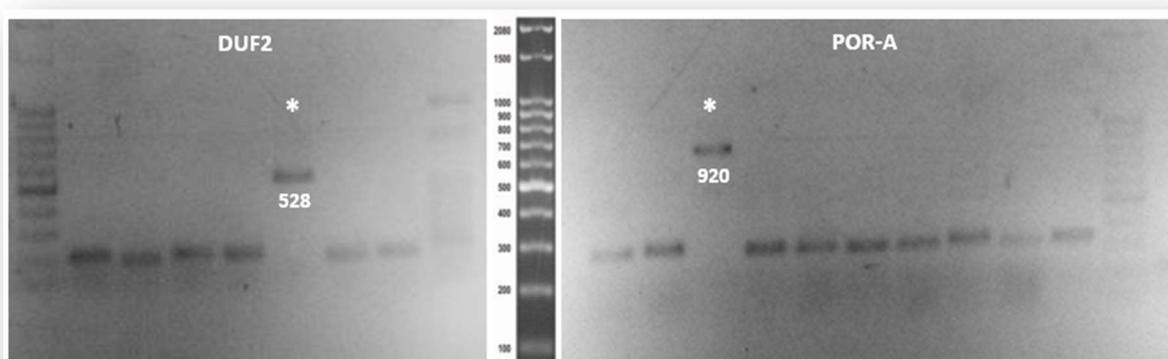


Figura 14. Ligação dos genes DUF2 e POR-A no vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO.

Do lado esquerdo está representado o gene DUF2 e do lado direito o gene POR-A. As colônias positivas estão representadas pelos asteriscos (*). O marcador de peso molecular utilizado foi o de 100 pb.

5.4.3 Recombinação com vetor de destino

Cada colônia positiva foi selecionada para recombinação com o vetor de destino pEarleyGate103. A recombinação foi realizada utilizando-se a enzima LR clonase, que reconhece as regiões *attL/attR*. A validação da ligação foi feita através de PCR, utilizando primers forward 35S (vetor) e o primer reverso de cada gene. Com essa combinação de oligonucleotídeos, o tamanho esperado para o gene DUF2 era de 816 pb, enquanto que para

o gene POR-A era de 1208 pb. Todas as colônias testadas foram positivas para a recombinação (Figura 15).

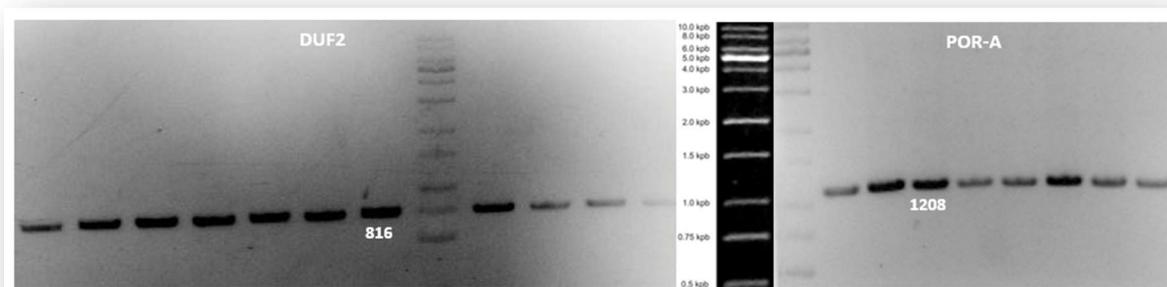


Figura 15. Recombinação entre vetor de entrada pCR®8/GW/TOPO e vetor de destino pEarleyGate103. Os plasmídeos recombinados foram testados e todas as colônias avaliadas apresentaram fragmento amplificado de acordo com o tamanho esperado utilizando os *primers* 35S-F/gene-R. O marcador de peso molecular utilizado foi o de 1 kb.

5.4.4 Transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

A partir da recombinação confirmada, um plasmídeo de cada construção foi utilizado para transformar bactéria eletrocompetente, *Agrobacterium tumefaciens*. Todas as colônias que cresceram em meio contendo antibiótico de resistência foram avaliadas e confirmadas como positivas, por PCR (Figura 16).

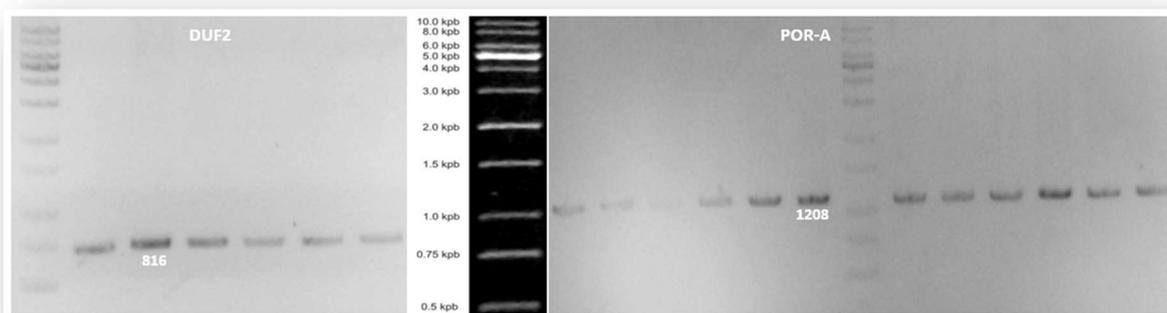


Figura 16. Transformação de *Agrobacterium tumefaciens* eletrocompetente com vetor de destino pEarleyGate103. Os plasmídeos recombinantes foram testados e todas as colônias avaliadas apresentaram fragmento amplificado de acordo com o tamanho esperado utilizando os *primers* 35S-F/gene-R. O marcador de peso molecular utilizado foi o de 1 kb.

5.4.5 Expressão heteróloga em *Arabidopsis thaliana*

As plantas de *Arabidopsis* foram transformadas com as bactérias contendo o vetor de interesse pelo método *floral dip*. Entretanto, não houve tempo hábil para avaliação das transformações nas plantas.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A seca é o principal estresse abiótico que ameaça a sobrevivência das plantas e a produtividade das culturas em todo o mundo (BARTELS; SUNKAR, 2007; BOYER, 1982; LESK; ROWHANI; RAMANKUTTY, 2016). Devido às mudanças climáticas globais, o impacto do estresse por déficit hídrico nas plantas está recebendo mais atenção e atualmente é um desafio fundamental na agricultura. Esforços consideráveis vêm sendo direcionados para investigar os mecanismos moleculares usados pelas plantas para combater a seca e traduzir esse conhecimento em ferramentas biotecnológicas adequadas com o objetivo de obter culturas mais resistentes à seca (UMEZAWA *et al.*, 2006).

A forma que as plantas respondem à seca é através de reprogramação de vias transcricionais, proteômicas e metabolômicas, para protegerem as células de danos mediados pelos estresses. Sendo assim, as áreas de genômica, transcriptômica e proteômica têm sido cada vez mais utilizadas para estudar as vias de resposta aos estresses em diversas espécies de plantas (FÀBREGAS; FERNIE, 2019b). Atualmente, diversas enzimas de desintoxicação, chaperonas, proteínas quinases e fatores de transcrição são conhecidos por desempenharem papel essenciais nessas respostas das plantas aos estresses (MARUYAMA *et al.*, 2014; NAKASHIMA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2014). Ainda, algumas respostas aos estresses abióticos estão conectadas ao hormônio ácido abscísico (ABA) (CUTLER *et al.*, 2010; YOSHIDA; MOGAMI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2014).

No Brasil, a região mais afetada pela seca é o semiárido. Nessa mesma região há significativa produção de alimentos. Desta forma, em situações de estiagem, a região apresenta perda de safras e rebanhos, e como consequência, afeta setores produtivos e a economia regional e nacional. Apesar das condições desfavoráveis para o desempenho vegetal que o semiárido apresenta, algumas espécies são bem adaptadas ao cultivo, como é o caso do cajueiro (*Anacardium occidentale*).

Devido às características edafoclimáticas apresentadas pela região Nordeste aliada ao aspecto vigoroso das plantas, o cultivo do cajueiro tornou-se uma das mais importantes atividades agrícolas do Nordeste brasileiro. Apesar de o entendimento dos mecanismos que tal espécie utiliza para tolerar a condição de estresse abiótico ser de grande interesse, trabalhos de bioquímica e fisiologia têm sido realizados, ao passo que a nível molecular existem poucas informações.

Os resultados obtidos nesta tese demonstram o primeiro relato na literatura da utilização de RNA-seq para análises das mudanças sofridas na expressão global de genes em folhas *Anacardium occidentale* L. em condições de estresse hídrico e após terem sido re-irrigadas.

De maneira geral, demonstramos que as plântulas de caju submetidas ao estresse de déficit hídrico gradual no solo apresentam comportamento isoídrico típico. Ou seja, utilizam a estratégia de fechamento estomático precoce e gradual, diminuição tardia no potencial osmótico da folha e no conteúdo relativo de água e dano oxidativo celular quase ausente. Essas respostas fisiológicas provavelmente estão associadas à modulação de mecanismos moleculares adaptativos, como biossíntese de osmólitos, ativação de fatores de transcrição, biossíntese e degradação de clorofila, sinalização de ABA e sistemas desintoxicantes de ROS. Como várias outras espécies de árvores isoídricas que sobrevivem à desidratação (DELZON, 2015; HOCHBERG *et al.*, 2017), a estratégia inicial das mudas de caju para lidar com o estresse hídrico em um curto período de tempo é prevenir ou retardar os impactos negativos do estresse hídrico fechando o estômatos.

Buscamos identificar quantos e quais genes estariam sendo expressos concomitantemente tanto nos diferentes dias quanto nas diferentes condições analisadas e surpreendentemente, foram identificados poucos genes, tanto isoladamente quanto par a par (Figura 3B do artigo). Esse baixo número na identificação dos genes pode ser devido à reduzida quantidade de informações moleculares disponíveis para o cajueiro. Limitações na identificação também foram reportados para dados transcriptômicos de semente de cajueiro (ALVES-FILHO, 2013). Apesar deste último trabalho também ter sido desenvolvido com base em análises de transcriptômica, não foram avaliadas as diferenças da expressão entre situação controle e situação de estresse. Foi feita a comparação do transcriptoma de sementes em maturação de cajueiro-comum e cajueiro-anão CCP 76. Entretanto, os dados não são aprofundados e explícitos. O nível mais profundo de informações vai até a classificação funcional ontologia gênica (*Gene Ontology*) mais representativos.

Em nosso estudo de transcriptômica de folhas de cajueiro submetido ao déficit hídrico, demos destaque a 11 grupos mais representativos de genes diferencialmente expressos que compartilham relações genéticas e funcionais. São estes, partindo do grupo com maior número de representantes: i) genes envolvidos na fotossíntese e síntese de cloroplastos (183); ii) fatores de transcrição (176); iii) transportadores (147); iv) proteínas com funções desconhecidas (147); v) sistema antioxidante (50); vi) proteínas de choque

térmico e chaperonas (41); vii) receptores (41); viii) proteinases (29); ix) processamento de RNA (25); x) síntese de metabolismo secundário (21); e xi) sinalização de ABA (21). Os demais genes que não se enquadraram nesses grupos foram agrupados em outra categoria, xii) outros (888).

Inicialmente, a partir dos dados obtidos pelo RNA-seq, selecionamos 45 genes para validarmos a expressão por qPCR. Destes, 13 tiveram sua expressão confirmada: asparagina sintetase (ASN - x), proteína com função desconhecida 2 e 6 (DUF2 e DUF6 - iv), hidroperóxido liase (HPL - i), proteína de choque térmico (HSP20 - vi), proteína LEA (LEA4 - ii), fator de transcrição nuclear Y (NF-Y - ii), protoclorofilídeo redutase A (POR-A), trealose fosfato sintase (TPS - x), tioredoxina (TRX2 - v), cafeioil coenzima A metiltransferase (CCoAOMT - x), receptor de ABA (PYL1 - xi) e serina carboxipeptidase (SCPL51 - viii). Depois de realizado o levantamento bibliográfico sobre estudos de expressão e de genômica funcional em *Arabidopsis* realizados com nossos genes candidatos, seis destes genes foram selecionados para iniciar os experimentos de genômica funcional: POR-A, DUF2, NF-YA, DUF6, TRX-2, HPL e ASN.

Existem diversas descrições de vias relacionadas a respostas ao déficit hídrico. A mais citada é o ajuste osmótico com base em aminoácidos livres, como a prolina. Outro aminoácido bastante importante nas plantas é asparagina. A alta razão nitrogênio/carbono comparado com outros aminoácidos torna a asparagina uma fonte ideal de armazenamento e transporte de nitrogênio (LEA *et al.*, 2007). Devido a essa característica, diversas funções biológicas importantes nas plantas foram descritas para asparagina, como reciclagem de nitrogênio durante estresses abióticos e bióticos e mobilização e transporte de nitrogênio de tecidos fonte para dreno (GAUFICHON *et al.*, 2010; LEA *et al.*, 2007). O gene da asparagina sintetase, um dos genes de interesse no trabalho (Anaoc.0005s1069), codifica uma enzima que é considerada uma das principais enzimas envolvidas na remobilização de nitrogênio vegetal, responsável pela conversão de glutamina em asparagina (MCALLISTER; BEATTY; GOOD, 2012). Outros estudos também demonstram esse padrão de expressão alterado e aumentado no gene da asparagina sintetase em plantas submetidas a estresses abióticos (CANALES *et al.*, 2012; HERRERA-RODRÍGUEZ; PÉREZ-VICENTE; MALDONADO, 2007; LI, Y. *et al.*, 2016). De forma contrária, a enzima responsável pela conversão de asparagina à glutamina é a asparaginase. A ligação entre asparaginase e asparagina sintetase pode ocorrer porque elas estão conectadas via acúmulo/remobilização

da asparagina: quando a asparagina é acumulada como resultado do estresse hídrico, ela pode ser catabolizada pela asparaginase para fornecer nitrogênio para a síntese de outros aminoácidos (GRANT; BEVAN, 1994). Curiosamente, o cajueiro parece não adotar essa estratégia de realocação de nitrogênio para síntese de outros aminoácidos. De acordo com os dados obtidos pelo RNA-seq, enquanto os níveis de expressão da asparagina sintetase aumentam, os níveis de expressão da asparaginase diminuem. É interessante destacar que não só asparagina deixa de ser (ou passa a ser menos) convertida em glutamina, como também a expressão do gene que converte glutamina em glutamato (GOGAT – Anaoc.0018s05449) também diminui. Logo, sugerimos que o cajueiro adota a estratégia de aumentar a concentração de asparagina, o que pode ser uma maneira ativa de aliviar os danos do amônio sob condições desfavoráveis, contribuindo para a degradação acelerada de proteínas da folha (GAUFICHON *et al.*, 2010; LI, Y. *et al.*, 2016).

O metabolismo secundário pode ter importância para a espécie em resposta ao estresse oxidativo. Em condições de estresse abiótico, observa-se aumento do fluxo de carbono para alimentação do metabolismo secundário (DE COSTA, F. *et al.*, 2013; VICKERS *et al.*, 2009). As moléculas provenientes dessa via são importantes por funcionarem como antioxidantes primários, enquanto as células vegetais preparam as vias enzimáticas e da glutatona. Dentro das vias enzimáticas, encontram-se proteínas tioredoxinas. Tioredoxinas (TRX) são proteínas envolvidas em diversos processos celulares e estão presentes em diferentes compartimentos celulares, desempenhando papéis importantes na resposta à seca, salinidade e temperaturas extremas em diversas espécies vegetais (GUPTA; PALMA; CORPAS, 2018). Essas proteínas participam como moléculas sinalizadoras e contribuem para o estado redox da célula através da regulação redox de enzimas-alvo envolvidas em reações essenciais em cada compartimento celular. Nos últimos anos estudos tem destacado a importância das tioredoxinas para o controle redox do metabolismo vegetal (BUCHANAN, 2016; GEIGENBERGER *et al.*, 2017). Além de estarem implicadas em processos essenciais como fotossíntese, fotorrespiração, respiração, metabolismo de carbono e síntese de proteínas, também atuam sobre fatores de transcrição, ativando e inibindo a transcrição de genes específicos, e na regulação pós-traducional, regulando a estrutura e a função de muitas proteínas-alvo (ARRIGO, 1999; BUCHANAN, 1991; LÁZARO *et al.*, 2013). É sabido que um dos efeitos da seca é o estresse osmótico, que culmina no estresse oxidativo. A ligação entre a regulação redox e o metabolismo de

ROS é um elemento chave para controlar e otimizar a função das organelas das células vegetais na resposta ao estresse abiótico. As plantas acionam vias antioxidativas para manutenção da homeostase e desintoxicação. Sendo assim, as ROS desempenham um papel duplo nas plantas: como reagentes nocivos envolvidos na morte celular descontrolada ou programada, mas também como sinais que estimulam a adaptação ao estresse abiótico, em particular à seca (SCHEIBE; BECK, 2011). As proteínas-chave de eliminação/modulação de ROS compreendem um conjunto de outras enzimas, como catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona peroxidase (GPX), glutathiona redutase (GR) e superóxido dismutase (SOD). O aumento da expressão de catalase e glutathiona já foi relatado para o cajueiro em resposta ao estresse térmico e salino (FERREIRA-SILVA, S. L. *et al.*, 2012). Além disso, outras vias enzimáticas e não enzimáticas já foram relatadas para a mesma planta (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2011). Curiosamente, um único gene que codifica glutathiona redutase (Anaoc.0014s0283) foi induzido e nenhum gene que codifica catalase foi diferencialmente expresso, considerando o *cut-off* definido para classificar o gene como induzido ou reprimido. O que os dados sugerem é que sob condições de seca, outras moléculas, como TRX e SOD (e.g. Anaoc. 009s0083, Anaoc.0005s1577, Anaoc.0005s1401 e Anaoc.0010s1122), são mais induzidas do que as observadas no estresse salino. Somado a isso, pode-se concluir que além das vias enzimáticas existem as não-enzimáticas, também responsáveis pela desintoxicação das células. Dentre os compostos não enzimáticos, a Glutathiona é o que apresenta maior concentração em todos os organismos, atuando na proteção de vias com funções vitais. Assim como os enzimáticos, apresentou expressão diferencial em plântulas de cajueiro submetidas ao estresse hídrico. Entretanto, em sua grande parte tiveram sua expressão reprimida. Isso pode ser um indicativo de que o cajueiro tende a acionar a via enzimática como linha principal de defesa contra moléculas oxidativas.

Outra grande família de proteínas envolvida no metabolismo de plantas, como biossíntese de hormônios e catabolismo e também na síntese de metabolitos primários e secundários é a família de citocromo P450 (KIM, G.-T.; TSUKAYA, 2002; NELSON, D. R. *et al.*, 2004). As P450 catalisam uma grande variedade de reações de oxigenação/hidroxilação que requerem oxigênio molecular. Hidroperóxido liase (HPL) é uma enzima envolvida na via de lipoxigenase (LOX) e juntamente com Aleno Oxido Sintase (AOS) e Divinil Eter Sintase (DES), formam a subfamília CYP74 citocromo P450 (MATSUI *et al.*, 1996). Essas proteínas são especializadas em metabolizar hidroperóxidos de ácidos

graxos poli-insaturados, moléculas altamente reativas, como oxilipinas, que atuam no mecanismo de defesa, adaptação a estresse, comunicação com outros organismos e diversos processos fisiológicos (WASTERNAK, 2007). HPL direciona a síntese de um grupo de voláteis C6 (também chamados de voláteis de folha verde [GLV]). Sob condições controladas de estudos em laboratório, as emissões de GLVs foram documentadas após uma série de estresses abióticos e bióticos associados ao acúmulo de ROS, como altas concentrações de ozônio (BEAUCHAMP *et al.*, 2005), alta luminosidade e temperatura (LORETO *et al.*, 2006) e seca (GOUW *et al.*, 2000). Diversos estudos de expressão diferencial também identificaram a indução da expressão de genes HPL sob estresses abióticos, como seca e alta temperatura (DE DOMENICO *et al.*, 2012; HUANG; SCHWAB, 2012; MILLAN *et al.*, 2006; MOLINA *et al.*, 2008; PREETI *et al.*, 2019). Direcionando para estudos realizados com plantas de maior porte, um estudo realizado com árvores da região da Amazônia, as concentrações ambientais de GLVs dentro e acima de um dossel de floresta tropical primária foram quantificadas por espectrometria de massa de reação de transferência de prótons (PTR-MS), durante a seca generalizada de 2010. Em 2015, o mesmo grupo realizou experimentos de estresse hídrico e térmico. Os resultados desse estudo mostram que o efeito combinado de altas temperaturas foliares e déficit hídrico resulta em uma forte diminuição na fotossíntese, transpiração e nas emissões de terpenóides voláteis, juntamente com o acúmulo de GLVs na atmosfera do dossel da floresta tropical, potencialmente fornecendo um novo sensor químico de diminuição da produtividade do ecossistema (JARDINE *et al.*, 2015). Embora não tenham outros estudos corroborando com essa hipótese, em nosso estudo de RNA-seq de cajueiro submetido ao déficit hídrico também foi observada a indução de genes de síntese de GLVs (Anaoc.0014s0438). Essa pode ser uma estratégia adotada por árvores para lidar com situações ambientais adversas, que acabam por resultar na peroxidação das membranas fotossintéticas e na diminuição na assimilação líquida de carbono.

Várias classes de fatores de transcrição desempenham papéis críticos na orquestração de respostas à seca dependentes ou independentes de ABA (JIN *et al.*, 2014). A família de fatores de transcrição nuclear-Y (NF-Y) tem sido implicada em muitos processos fisiológicos e de desenvolvimento e tem se tornado alvo de abordagens translacionais para criar culturas mais resistentes e nutritivas (MYERS; HOLT, 2018; YADAV *et al.*, 2015). Os NF-Ys se ligam à sequência específica CCAAT através de complexos heterotriméricos,

compostos de subunidades únicas de cada uma das três famílias de proteínas: NF-YA, NF-YB e NF-YC. Essas subunidades sabidamente desempenham papéis importantes na resposta a seca (CHEN, M. *et al.*, 2015; HAN *et al.*, 2013; LI, W.-X. *et al.*, 2008; NELSON, D. E. *et al.*, 2007; ZHANG, T. *et al.*, 2015). Apesar de as três subunidades serem essenciais para a ligação ao DNA, é a subunidade NF-YA que faz o contato específico à região CCAAT (KIM, I. S. *et al.*, 1996; XING; FILES; GUARENTE, 1993). Em nosso experimento de RNA-seq foram identificados quatro genes que codificam NF-Y como diferencialmente expressos em estresse hídrico, sendo que os genes induzidos foram Anaoc.0018s0487 (NF-YA), Anaoc.0019s0612 (NF-YA) e Anaoc.0020s0811 (NF-YB), e o reprimido, Anaoc.0008s1011 (NF-YC). Devido ao maior aumento da expressão, escolhemos o NF-YA (Anaoc.0018s0487) para seguir com os experimentos de genômica funcional. Além disso, alguns estudos mostram que a superexpressão da subclasse NF-YA aumenta a tolerância à seca e salinidade (LEYVA-GONZÁLEZ *et al.*, 2012; LI, W.-X. *et al.*, 2008; LI, Y. J. *et al.*, 2013; SUBRAMANIAM, 2016).

Após várias tentativas de amplificação, não foi obtido sucesso com quatro genes, em que diversos fragmentos amplificaram com tamanhos diferentes do esperado. Uma das explicações mais prováveis e plausíveis para a dificuldade na amplificação é uma má anotação do genoma no banco de dados utilizado, Phytozome. Se o genoma está mal anotado, todos os passos seguintes poderão resultar em falsos positivos, pois o tamanho do fragmento obtido poderá não estar de acordo com o tamanho predito. Sendo assim, seguimos os experimentos com os genes POR-A e DUF2, que foram os genes em que o produto de amplificação coincidiu com o predito pelo genoma anotado e disponibilizado no Phytozome.

As organelas mais abundantes na célula vegetal são os cloroplastos. Além de seus papéis conhecidos na fotossíntese, também atuam em funções importantes em diversos processos metabólicos, como assimilação de nitrogênio, biossíntese de aminoácidos e produção de tetrapirrol. A clorofila é o principal motor da fotossíntese (LU *et al.*, 2020) e em angiospermas, sua síntese depende da luz (GRANICK, 1948). O protoclorofilídeo (Pchl_{id}) é um corante de porfirina, o principal pigmento fotossintético e um dos principais intermediários na via biossintética da clorofila (Chl) (MYŚLIWA-KURDZIEL; STRZAŁKA, 2005). NADPH:protoclorofilídeo oxidoreductase (POR; EC 1.3.1.33) catalisa uma etapa conhecida da biossíntese de tetrapirrol que requer luz, que é a redução de protoclorofilídeo a clorofilídeo (APEL, 1981; GRIFFITHS, 1978), sendo o último passo

antes da formação da clorofila *a*. Além disso, POR-A não está apenas transitoriamente envolvido no início da biossíntese de clorofila durante a iluminação de plântulas estioladas, mas também é essencial para o crescimento normal e desenvolvimento da planta (KIM, C.; APEL, 2012). Grande parte dos genes envolvidos na fotossíntese são regulados negativamente em resposta a tratamentos de estresse hídrico. Proteína de ligação a clorofila *a/b* CP24, subunidade V do centro de reação PSI, peptidil-prolil *cis-trans* isomerase e outros que funcionam nas vias fotossintéticas são exemplos de genes regulados negativamente em tecidos de folhas de arroz quando submetidos a estresse hídrico (WANG, Di *et al.*, 2011). Curiosamente, em nosso estudo diversos genes envolvidos na fotossíntese e síntese de clorofila foram induzidos, como genes da RuBisCO (Anaoc.0618s0005 e Anaoc0010s1099), do complexo de captação de luz do Fotossistema II (Anaoc0002s1735), genes de membrana tilacóide (Anaoc.0011s0785 e Anaoc.0001s1923), anidrase carbônica (Anaoc.0006s1319 e Anaoc.0012s0530) e POR-A (Anaoc.0014s0550, Anaoc.0001s2265 e Anaoc.0020s0590). É interessante destacar que após a planta ter sido re-irrigada, a expressão do gene POR-A não retornou aos níveis da condição controle. Pelo contrário, a expressão foi ainda mais induzida.

O terceiro grupo mais representativo de genes diferencialmente expressos foi o de proteína com função desconhecida (DUF), com 147 representantes, sendo 57 induzidos e 90 reprimidos. Dois DUFs tiveram sua expressão validada por qPCR, sendo eles denominados como DUF2 (Anaoc.0004s2112) e DUF6 (Anaoc.0003s0364). Ambos possuem estrutura gênica composta por dois éxons e possuem sequência genômica relativamente pequena, de 1348 pb e 1277 pb, respectivamente. Devido a essas características, foram escolhidos para os experimentos de transformação de *Arabidopsis* e genômica funcional. Ao fazer a busca por proteínas homologas no Phytozome, os organismos que apresentaram maior similaridade, com suas respectivas porcentagens de semelhança foram *Prunus persica* (79,8% - Prupe.5G105000.1), *Citrus sinensis* (78,7% - orange1.1g034695m) e *Vitis vinifera* (77,5% - GSVIVT01019402001) para o DUF2 e *Citrus sinensis* (66,8% - orange1.1g029053m), *Citrus clementina* (66,3% - Ciclev10032785m) e *Theobroma cacao* (63% - Thecc1EG011634t1) para o DUF6. É importante destacar que em todas essas proteínas homólogas, são proteínas de domínios com funções desconhecidas.

Destacam-se outros grupos de genes que apresentam expressão diferencial em plântulas de cajueiro submetido a seca, que estão representados na tabela 1 do artigo apresentado no Capítulo 1. Também foram observadas mudanças na expressão de genes

envolvidos no processamento de RNA. A regulação positiva da expressão de proteínas de ligação ao RNA (RBP) já foi relacionada a um aumento na tolerância aos estresses osmóticos e de temperatura (AMBROSONE et al., 2012). As proteínas RBP atuam em diversas etapas do metabolismo de RNA, como processamento, transporte, estabilidade e tradução. Genes da família de proteínas PPR, relacionadas com processamento de RNA como *splicing* e edição de RNA, tanto cloroplastidiais quanto mitocondriais, também foram diferencialmente expressos. Das 13 PPR diferencialmente expressas, apenas uma teve sua expressão reprimida (Anaoc.0008s0743). Ainda, foi observada expressão diferencial de HEN1 (Anaoc.0007s0284) e AGO7 (Anaoc.0003s0367), que são genes da biossíntese de miRNA, e do gene SF3B3 (Anaoc.0011s1114), um componente do complexo SF3B, que é um fator de *splicing* envolvido no *splicing* do pre-mRNA.

O aumento da expressão de genes da via de Ubiquitina também foi observado. Em curto prazo, essa maior expressão pode aumentar a disponibilidade de aminoácidos livres frente a estresses abióticos. Já foi demonstrado que cajueiro submetido ao estresse salino tem um intenso acúmulo de prolina em suas folhas, e esse acúmulo é acompanhado de aumento de atividade proteolítica (SILVEIRA *et al.*, 2003). De forma semelhante, nos dados de RNA-seq desse estudo foi observada uma grande quantidade de genes (mais de 30) da via de Ubiquitina sendo regulados pelo estresse hídrico, somado ao fato de diversos genes de síntese de metabolismo secundário também estarem sendo regulados pelo estresse, como Galactinol sintase (Anaoc.0006s1570), Delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS - Anaoc.0011s0777), Trealose sintase (Anaoc.0013s1148), entre outros. À longo prazo, o cajueiro pode utilizar a via da Ubiquitina para disponibilizar aminoácidos para os processos de tração e produção de metabólitos secundários (MOREIRA, 2014). Segundo alguns estudos, os vegetais ativam a degradação de proteínas via Ubiquitina para tolerar a condição de estresse abiótico (CUI *et al.*, 2012; ZHANG, H. *et al.*, 2015). Ainda, estudos demonstram que variações funcionais na Ubiquitina pode afetar a produção de siRNAs e miRNA (MAZZUCOTELLI *et al.*, 2008). Dessa forma, sugere-se que o cajueiro possa utilizar a via da Ubiquitina para i) geração de aminoácidos livres, ii) alimentação do metabolismo secundário ou iii) produção de ncRNAs (MOREIRA, 2014).

Por fim, foi possível visualizar a expressão de genes de via do metabolismo central como ciclo de Calvin, ciclo do ácido cítrico (TCA) via das pentoses. Durante estresse abiótico, alguns vegetais tendem a aumentar o fluxo de carbonos para o ciclo do ácido cítrico

(HILL *et al.*, 2012). Nesse cenário, o ciclo deve manter a produção de energia e fornecer seus intermediários para as vias de produção de aminoácidos e nucleotídeos (NELSON, D. L.; COX, 2009). Curiosamente, não só o gene da piruvato fosfato di-quinase, PPKK (E.C.2.7.9.1), como também um grande número de outros transcritos de genes do ciclo de Calvin e fixação de carbono foram reprimidos sob déficit hídrico. Isso sugere que as plantas de caju utilizam mecanismos associados à redução da fixação de carbono para evitar a senescência.

No que diz respeito aos genes selecionados para experimentos de genômica funcional, POR-A e DUF2, todas as clonagens e recombinações nos vetores foram confirmadas. A transformação em *Arabidopsis thaliana* foi realizada pelo método de *floral dip*. Entretanto, não houve tempo para realizar as análises de genômica funcional das plantas submetidas ao estresse hídrico no prazo hábil para serem incluídas nesta tese.

7. PERSPECTIVAS E POSSIBILIDADES

- Finalizar o experimento de genômica funcional. Avaliar se a superexpressão desses genes causa alguma mudança fenotípica nas plantas e se a planta se tornará mais tolerante a situações de privação de água
- Selecionar outros genes que foram sabidamente induzidos em folhas de cajueiro submetido ao estresse hídrico para realizar estudos de genômica funcional e avaliar a conferência de tolerância ao estresse hídrico.
- Utilizar dados de sequenciamento para avaliar a expressão de outras classes de RNAs, com possibilidade de geração de novas bibliotecas.

8. REFERÊNCIAS

AKINPELU, David A. Antimicrobial activity of *Anacardium occidentale* bark. **Fitoterapia**, [s. l.], v. 72, n. 3, p. 286–287, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(00\)00310-5](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(00)00310-5)

ALVES-FILHO, J. G. **Análises transcriptômica e proteômica de sementes de cajueiro (*Anacardium occidentale* L) visando aplicações biotecnológicas. 206 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.** 2013. [s. l.], 2013.

AMBROSONE, Alfredo *et al.* Beyond transcription: RNA-binding proteins as emerging regulators of plant response to environmental constraints. **Plant Science**, [s. l.], v. 182, n. 1, p. 12–18, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2011.02.004>

APEL, Klaus. The Protochlorophyllide Holochrome of Barley (*Hordeum Vulgare* L.). Phytochrome-Induced Decrease of Translatable mRNA Coding for the NADPH: Protochlorophyllide Oxidoreductase. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 120, n. 1, p. 89–93, 1981. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1981.tb05673.x>

ARBONA, Vicent *et al.* Physiological, metabolic, and molecular responses of plants to abiotic stress. *In*: STRESS SIGNALING IN PLANTS: GENOMICS AND PROTEOMICS PERSPECTIVE, VOLUME 2. [S. l.]: Springer International Publishing, 2016. p. 1–35. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-319-42183-4_1

ARRIGO, André Patrick. Gene expression and the thiol redox state. **Free Radical Biology and Medicine**, [s. l.], v. 27, n. 9–10, p. 936–944, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(99\)00175-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(99)00175-6)

ASADA, Kozi. **Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions.** [S. l.]: American Society of Plant Biologists, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.106.082040>. Acesso em: 22 abr. 2021.

AUSTEN, Nichola *et al.* The Regulation of Plant Secondary Metabolism in Response to Abiotic Stress: Interactions Between Heat Shock and Elevated CO₂. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 10, p. 1463, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01463/BIBTEX>

BAJJI, Mohammed; KINET, Jean Marie; LUTTS, Stanley. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. **Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 61–70, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1023/A:1014732714549>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BALFAGÓN, Damián *et al.* Grafting improves tolerance to combined drought and heat stresses by modifying metabolism in citrus scion. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 195, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.ENVEXPBOT.2022.104793>. Acesso em: 21 fev. 2022.

BANDURSKA, Hanna. Does proline accumulated in leaves of water deficit stressed barley plants confine cell membrane injuries? II. Proline accumulation during hardening and its involvement in reducing membrane injuries in leaves subjected to severe osmotic stress. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 483–490, 2001. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s11738-001-0059-0>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BARTELS, Dorothea; SUNKAR, Ramanjulu. **Drought and Salt Tolerance in Plants**. [S. l.], 2007. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07352680590910410>. Acesso em: 15 abr. 2020.

BEAUCHAMP, Jonathan *et al.* Ozone induced emissions of biogenic VOC from tobacco: Relationships between ozone uptake and emission of LOX products. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 1334–1343, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2005.01383.X>

BECHTOLD, N.; PELLETIER, G. In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 82, p. 259–266, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/0-89603-391-0:259/COVER/>. Acesso em: 15 jun. 2022.

BENKO-ISEPPON, Ana M; NEPOMUCENO, Alexandre L; ABDELNOOR, Ricardo V. Genosoma-The Brazilian soybean genome consortium: High throughput omics and beyond. **Genetics and Molecular Biology**, [s. l.], v. 35, n. 1 SUPPL., 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012000200001>. Acesso em: 26 abr. 2021.

BEWLEY, J D. Physiological Aspects of Desiccation Tolerance. **Annual Review of Plant Physiology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 195–238, 1979. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.30.060179.001211>. Acesso em: 22 abr. 2021.

BJÖRKMANN, Olle; POWLES, Stephen B. Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. **Planta**, [s. l.], v. 161, n. 6, p. 490–504, 1984. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00407081>

BOYER, J.S. Plant Productivity and Environment. **Science**, [s. l.], v. 218, n. October, 1982.

BRAINER, Maria Simone de Castro Pereira; VIDAL, Maria de Fatima. Cajucultura. **Caderno Setorial ETENE**, [s. l.], n. 114, p. 1–16, 2020.

BUCHANAN, Bob B. Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 288, n. 1, p. 1–9, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(91\)90157-E](https://doi.org/10.1016/0003-9861(91)90157-E)

BUCHANAN, Bob B. The Path to Thioredoxin and Redox Regulation in Chloroplasts. **Annual Review of Plant Biology**, [s. l.], v. 67, n. 1, p. 1–24, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-043015-111949>. Acesso em: 17 abr. 2020.

CANALES, Javier *et al.* Novel Insights into Regulation of Asparagine Synthetase in Conifers. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 3, n. MAY, p. 100, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00100>

CAPELARI, F. *et al.* Transcriptional profiling and physiological responses reveal new insights into drought tolerance in a semiarid adapted species, *Anacardium occidentale*. **Plant Biology**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1074–1085, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/plb.13312>

CARNEIRO, W, M, C. Cadeia Produtiva Do Caju No Nordeste Brasileiro 1. **Escritório**

Técnico de Estudos Econômicos do Nordeste-ETENE, [s. l.], v. 1, p. 1–12, 2008. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/documents/80223/800705/ano3-09.pdf/2ed82a52-df82-40df-aa81-0f77826ad921>. Acesso em: 19 abr. 2021.

CASASSOLA, Alice *et al.* Gene Expression: A Review on Methods for the Study of Defense-Related Gene Differential Expression in Plants. **American Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 4, n. 12, p. 64–73, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.4236/ajps.2013.412a3008>. Acesso em: 26 abr. 2021.

CAVALCANTI, Fabio Rossi *et al.* Superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities do not confer protection against oxidative damage in salt-stressed cowpea leaves. **New Phytologist**, [s. l.], v. 163, n. 3, p. 563–571, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01139.x>

CHAVES, M M *et al.* How plants cope with water stress in the field. Photosynthesis and growth. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 89, n. SPEC. ISS., p. 907–916, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcf105>

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 551–560, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>

CHAVES, Manuela; MAROCO, João P.; PEREIRA, João S. **Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant**. [S. l.: s. n.], 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1071/FP02076>. Acesso em: 13 abr. 2021.

CHEN, Jian Qiang *et al.* Over-expression of OsDREB genes lead to enhanced drought tolerance in rice. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 30, n. 12, p. 2191–2198, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10529-008-9811-5>. Acesso em: 16 set. 2020.

CHEN, Miao *et al.* Overexpression of a *NF-YC* transcription factor from bermudagrass confers tolerance to drought and salinity in transgenic rice. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 482–491, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbi.12270>. Acesso em: 8 abr. 2020.

CHILTON, M.D. et al. *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into Genomes of Host Plant Root Cells. **Nature**, [s. l.], v. 295, p. 432–434, 1982.

CHILTON, M.D. et al. Stable Incorporation of Plasmid DNA into Higher Plant Cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. **Cell**, [s. l.], v. 11, p. 263–271, 1977.

CHRISTOU P. Soybean and other Glycine species. **Genetic Engineering and In Vitro Culture of Crop Legumes**, [s. l.], p. 37–127, 1992.

CLOUGH, Steven J; BENT, Andrew F. **Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana**The Plant Journal. [S. l.: s. n.], 1998. Disponível em: www.stanford.edu/cgi-bin/biosci_arabidopsis.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Conab - Página inicial**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/>. Acesso em: 7 set. 2022.

CORNIC, G. **Drought stress inhibits photosynthesis by decreasing stomatal aperture - Not by affecting ATP synthesis**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(00\)01625-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(00)01625-3). Acesso em: 13 abr. 2021.

CRAMER, Grant R. *et al.* **Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective.** [S. l.]: BioMed Central, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>. Acesso em: 10 set. 2020.

CUI, Feng *et al.* Arabidopsis Ubiquitin Conjugase UBC32 Is an ERAD Component That Functions in Brassinosteroid-Mediated Salt Stress Tolerance. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 233–244, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/TPC.111.093062>. Acesso em: 24 jun. 2022.

CUSHMAN, John C.; BOHNERT, Hans J. **Genomic approaches to plant stress tolerance.** [S. l.]: Current Biology Ltd, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(99\)00052-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(99)00052-7). Acesso em: 15 abr. 2021.

CUTLER, Sean R. *et al.* Abscisic acid: emergence of a core signaling network. **Annual review of plant biology**, [s. l.], v. 61, p. 651–679, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-042809-112122>. Acesso em: 20 jun. 2022.

DA COSTA, Gracilene Fernandes; MARENCO, Ricardo A. Photosynthesis, stomatal conductance and leaf water potential in crabwood (*Carapa guianensis*). **Acta Amazonica**, [s. l.], v. 37, n. 2, p. 229–234, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0044-59672007000200008>

DALEY, Paul F *et al.* **Topography of Photosynthetic Activity of Leaves Obtained from Video Images of Chlorophyll Fluorescence** *Plant Physiol.* [S. l.: s. n.], 1989.

DAT, J. *et al.* **Dual action of the active oxygen species during plant stress responses.** [S. l.]: Cell Mol Life Sci, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s000180050041>. Acesso em: 12 abr. 2021.

DE COSTA, Fernanda *et al.* Accumulation of a bioactive triterpene saponin fraction of *Quillaja brasiliensis* leaves is associated with abiotic and biotic stresses. **Plant physiology and biochemistry: PPB**, [s. l.], v. 66, p. 56–62, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2013.02.003>. Acesso em: 21 jun. 2022.

DE DOMENICO, Stefania *et al.* Transcriptomic analysis of oxylipin biosynthesis genes and chemical profiling reveal an early induction of jasmonates in chickpea roots under drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 61, p. 115–122, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.09.009>. Acesso em: 5 jun. 2020.

DEBNATH, Mousumi; PANDEY, Mukeshwar; BISEN, P.S. An Omics Approach to Understand the Plant Abiotic Stress. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. 739–762, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/omi.2010.0146>. Acesso em: 16 set. 2020.

DELZON, Sylvain. New insight into leaf drought tolerance. **Functional Ecology**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 1247–1249, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12500>

EL-BASHITI, Tarek *et al.* Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. **Plant Science**, [s. l.], v. 169, n. 1, p. 47–54, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2005.02.024>

EL HAFID, L. PHAN THI, A. T.; ZUILY-FODIL, Y.; VIEIRA DA SILVA, J. B. Enzymatic breakdown of polar lipids in cotton leaves under water stress. I. Degradation of

monogalactosyl-diacylglycerol. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 27, p. 495–502, 1989.

EM-DAT. **An overview of the last 20 years the last 20 years**. [S. l.: s. n.], 2019.

ESTRAVIS-BARCALA, Maximiliano *et al.* Molecular bases of responses to abiotic stress in trees. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 71, n. 13, p. 3765–3779, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erz532>

FÀBREGAS, Norma; FERNIE, Alisdair R. The metabolic response to drought. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], n. February, 2019a. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>

FÀBREGAS, Norma; FERNIE, Alisdair R. The metabolic response to drought. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 70, n. 4, p. 1077–1085, 2019b. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ery437>. Acesso em: 17 fev. 2022.

FAISAL, M.; ANIS, M. Changes in photosynthetic activity, pigment composition, electrolyte leakage, lipid peroxidation, and antioxidant enzymes during ex vitro establishment of micropropagated *Rauvolfia tetraphylla* plantlets. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, [s. l.], v. 99, n. 2, p. 125–132, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9584-0>

FANG, Yujie; XIONG, Lizhong. **General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants**. [S. l.]: Birkhauser Verlag AG, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1767-0>

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [S. l.], 2018. Disponível em: www.fao.org/faostat.

FAOSTAT. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. [S. l.], 2021.

FEDOROFF, N. V. *et al.* **Radically rethinking agriculture for the 21st century**. [S. l.]: American Association for the Advancement of Science, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1186834>. Acesso em: 16 set. 2020.

FERREIRA-SILVA, Sérgio Luiz *et al.* High temperature positively modulates oxidative protection in salt-stressed cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 74, p. 162–170, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2011.05.015>

FERREIRA-SILVA, S. L. *et al.* Partial oxidative protection by enzymatic and non-enzymatic components in cashew leaves under high salinity. **Biologia Plantarum**, [s. l.], v. 56, n. 1, p. 172–176, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0037-y>

FERREIRA-SILVA, Sérgio L. *et al.* Changes in physiological indicators associated with salt tolerance in two contrasting cashew rootstocks. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. 51–59, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000100006>

FISK, Henry J.; DANDEKAR, Abhaya M. The introduction and expression of transgenes in plants. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 55, n. 1–2, p. 5–36, 1993. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(93\)90023-J](https://doi.org/10.1016/0304-4238(93)90023-J)

GAUFICHON, Laure *et al.* **Biological functions of asparagine synthetase in plants**. [S. l.:

s. n.], 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.04.010>. Acesso em: 9 abr. 2020.

GEIGENBERGER, Peter *et al.* **The Unprecedented Versatility of the Plant Thioredoxin System**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.12.008>. Acesso em: 17 abr. 2020.

GIGON, Agnès *et al.* Effect of drought stress on lipid metabolism in the leaves of *Arabidopsis thaliana* (Ecotype Columbia). **Annals of Botany**, [s. l.], v. 94, n. 3, p. 345–351, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/aob/mch150>. Acesso em: 12 abr. 2021.

GIMENEZ, Carmen; MITCHELL, Valerie J.; LAWLOR, David W. Regulation of photosynthetic rate of two sunflower hybrids under water stress. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 98, n. 2, p. 516–524, 1992. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.98.2.516>. Acesso em: 22 abr. 2021.

GOUW, JA De *et al.* Proton-transfer chemical-ionization mass spectrometry allows real-time analysis of volatile organic compounds released from cutting and drying of crops. **ACS Publications**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 2640–2648, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es991219k>. Acesso em: 22 jun. 2022.

GRANICK, S. The structural and functional relationships between heme and chlorophyll. **Harvey lectures**, United States, v. Series 44, p. 220–245, 1948.

GRANT, Murray; BEVAN, Michael W. Asparaginase gene expression is regulated in a complex spatial and temporal pattern in nitrogen-sink tissues. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 695–704, 1994. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.1994.00695.x>. Acesso em: 9 abr. 2020.

GRIFFITHS, W. T. Reconstitution of chlorophyllide formation by isolated etioplast membranes. **Biochemical Journal**, [s. l.], v. 174, n. 3, p. 681–692, 1978. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bj1740681>

GUNASEKERA, D.; BERKOWITZ, G. A. Use of transgenic plants with ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase antisense DNA to evaluate the rate limitation of photosynthesis under water stress. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 629–635, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.103.2.629>. Acesso em: 22 abr. 2021.

GUO, Liu Ming *et al.* A class I cytosolic HSP20 of rice enhances heat and salt tolerance in different organisms. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58395-8>. Acesso em: 6 jun. 2020.

GUPTA, Dharmendra K; PALMA, José M; CORPAS, Francisco J. **Antioxidants and antioxidant enzymes in higher plants**. [S. l.: s. n.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-75088-0>

HAMLIN G. JONES. **Plants and Microclimate: A Quantitative Approach to Environmental Plant Physiology**. [S. l.: s. n.], 1992. *E-book*.

HAN, Xiao *et al.* Overexpression of the poplar NF-YB7 transcription factor confers drought tolerance and improves water-use efficiency in *Arabidopsis*. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 64, n. 14, p. 4589–4601, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/ert262>. Acesso em: 8 abr. 2020.

HAVAUX, Michel *et al.* Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell**, [s. l.], v. 17, n. 12, p. 3451–3469, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037036>. Acesso em: 22 abr. 2021.

HE, Mei; HE, Cheng Qiang; DING, Nai Zheng. Abiotic stresses: General defenses of land plants and chances for engineering multistress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 871, p. 1771, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01771/BIBTEX>

HERRERA-RODRÍGUEZ, María Begoña; PÉREZ-VICENTE, Rafael; MALDONADO, José María. Expression of asparagine synthetase genes in sunflower (*Helianthus annuus*) under various environmental stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 33–38, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2006.12.002>

HILL, Camilla B. *et al.* Characterization of ion contents and metabolic responses to salt stress of different *Arabidopsis* AtHKT1;1 genotypes and their parental strains. **Molecular Plant**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 350–368, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/MP/SSS125>. Acesso em: 24 jun. 2022.

HIMABINDU, Yeduguri *et al.* Salt-tolerant genes from halophytes are potential key players of salt tolerance in glycophytes. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 124, p. 39–63, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.11.010>

HOCHBERG, Uri *et al.* Stomatal closure, basal leaf embolism, and shedding protect the hydraulic integrity of grape stems. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 174, n. 2, p. 764–775, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.16.01816>

HOHN, B. Exploration of *Agrobacterium tumefaciens*. In: RUSSO, V.E.A.; ET AL. (org.). **Development: the molecular genetic approach**. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1992. p. 633. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-77043-2>

HOWALD, Cédric *et al.* Combining RT-PCR-seq and RNA-seq to catalog all genic elements encoded in the human genome. **Genome Research**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 1698–1710, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gr.134478.111>. Acesso em: 26 abr. 2021.

HSIAO, Theodore C. Plant Responses to Water Stress. **Annual Review of Plant Physiology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 519–570, 1973. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.24.060173.002511>. Acesso em: 12 abr. 2021.

HU, Ling *et al.* Comparative analysis of root transcriptome profiles between drought-tolerant and susceptible wheat genotypes in response to water stress. **Plant Science**, [s. l.], 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.03.036>

HUANG, Fong-Chin; SCHWAB, Wilfried. Overexpression of hydroperoxide lyase, peroxygenase and epoxide hydrolase in tobacco for the biotechnological production of flavours and polymer precursors. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1099–1109, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2012.00739.x>. Acesso em: 5 jun. 2020.

HUGGETT, Jim; BUSTIN, Stephen A. **Standardisation and reporting for nucleic acid quantification**. [S. l.]: Springer, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00769-011-0769-y>. Acesso em: 26 abr. 2021.

IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613>. Acesso em: 23 maio 2022.

ICB. **O agronegócio - Caju**. Fortaleza (CE): [s. n.], 2022.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, IBGE. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. [S. l.], 2021. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/%0Aagricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematicoda-%0Aproducao-agricola.html?=&t=resultados>. Acesso em: 17 abr. 2020a.

ISAH, Tasiu. Stress and defense responses in plant secondary metabolites production. **Isah Biol Res**, [s. l.], v. 52, p. 39, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40659-019-0246-3>. Acesso em: 17 fev. 2022.

ISLAM, M.R.B. Siddique; A. Hamid; M.S. Drought stress effects on water relations of wheat. **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, [s. l.], 2000.

IVANOV, B.N. Oxygen reduction in chloroplasts and the ascorbate cycle. **Biochemistry. Biokhimiia**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 133–138, 1998. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9526104>. Acesso em: 22 abr. 2021.

JAIN, Mukesh. Next-generation sequencing technologies for gene expression profiling in plants. **Briefings in Functional Genomics**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 63–70, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/bfgp/elr038>

JARDINE, Kolby J. *et al.* Green leaf volatile emissions during high temperature and drought stress in a central Amazon rainforest. **Plants**, [s. l.], v. 4, n. 3, p. 678–690, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants4030678>. Acesso em: 5 jun. 2020.

JIA, Jingbo *et al.* Comparative transcriptomic analysis reveals the roles of responsive genes in poplars exposed to high temperature and drought. **Scientific Reports**, [s. l.], n. February, p. 1–17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep43215>

JIN, Jinpu *et al.* PlantTFDB 3.0: a portal for the functional and evolutionary study of plant transcription factors. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 42, n. Database issue, p. D1182, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/NAR/GKT1016>. Acesso em: 23 jun. 2022.

JOSEMARA, Rafaela; QUEIROZ, Barbosa. **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS CAMPUS DE JABOTICABAL QUANTIFICAÇÃO DA TREALOSE E DA PROLINA LIVRE EM CANA-DE-AÇÚCAR SOB EFEITO DA DISPONIBILIDADE HÍDRICA DO SOLO**. **Aleph**. [S. l.]: Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/96878>. Acesso em: 22 abr. 2021.

KAISER, Werner M. Effects of water deficit on photosynthetic capacity. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 142–149, 1987. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1987.tb04631.x>. Acesso em: 22 abr. 2021.

KAMATH, Vasudeva; RAJINI, P.S. The efficacy of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) skin extract as a free radical scavenger. **Food Chemistry**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 428–433, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.031>

KAN, Wang. *Agrobacterium* Protocols. **Agrobacterium Protocols**, [s. l.], 2006. Disponível

em: <https://doi.org/10.1385/1597451304>

KANT, PRAGYA *et al.* Functional-genomics-based identification of genes that regulate Arabidopsis responses to multiple abiotic stresses. **Plant, Cell & Environment**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 697–714, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01779.x>. Acesso em: 6 abr. 2021.

KIM, Chanhong; APEL, Klaus. Arabidopsis light-dependent NADPH: Protochlorophyllide oxidoreductase A (PORA) is essential for normal plant growth and development: An addendum. **Plant Molecular Biology**, [s. l.], v. 80, n. 2, p. 237–240, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/S11103-012-9944-8/FIGURES/3>. Acesso em: 22 jun. 2022.

KIM, Gyung-Tae; TSUKAYA, Hirokazu. **Regulation of the biosynthesis of plant hormones by cytochrome P450s** MINIREVIEW **J Plant Res.** [S. l.: s. n.], 2002.

KIM, I S *et al.* Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 4003–4013, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/MCB.16.8.4003>. Acesso em: 14 fev. 2022.

KLICH, María Guadalupe. Leaf variations in *Elaeagnus angustifolia* related to environmental heterogeneity. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 44, n. 3, p. 171–183, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0098-8472\(00\)00056-3](https://doi.org/10.1016/S0098-8472(00)00056-3). Acesso em: 22 abr. 2021.

KOCHEVA, Konstantina *et al.* Evaluation of chlorophyll fluorescence and membrane injury in the leaves of barley cultivars under osmotic stress. *In:* , 2004. **Bioelectrochemistry**. [S. l.]: Bioelectrochemistry, 2004. p. 121–124. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2003.09.020>. Acesso em: 22 abr. 2021.

KOTAK, Sachin *et al.* **Complexity of the heat stress response in plants**. [S. l.]: Elsevier Current Trends, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.011>

KREPS, Joel A. *et al.* Transcriptome changes for Arabidopsis in response to salt, osmotic, and cold stress. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 130, n. 4, p. 2129–2141, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.008532>. Acesso em: 6 abr. 2021.

KUBITZKI, Klaus. **The families and genera of vascular plants**. [S. l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2014. v. 11 Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-39417-1>

KÜLTZ, Dietmar. **Molecular and evolutionary basis of the cellular stress response**. [S. l.]: Annu Rev Physiol, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.040403.103635>. Acesso em: 12 abr. 2021.

LARCHER, W. **Ecofisiologia Vegetal**. [S. l.: s. n.], 2000. *E-book*.

LAWLOR, D. W. AND UPRETY, D. C. Effects of water stress on photosynthesis of crops and the biochemical mechanism. *In:* PHOTOSYNTHESIS: PHOTOREACTIONS TO PLANT PRODUCTIVITY. [S. l.: s. n.], 1993. p. 419–449.

LÁZARO, Juan J. *et al.* Dissecting the integrative antioxidant and redox systems in plant mitochondria. Effect of stress and S-nitrosylation. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 4, n. NOV, p. 460, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2013.00460/BIBTEX>

LEA, P. J. *et al.* Asparagine in plants. **Annals of Applied Biology**, [s. l.], v. 150, n. 1, p. 1–26, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2006.00104.x>

LESK, Corey; ROWHANI, Pedram; RAMANKUTTY, Navin. Influence of extreme weather disasters on global crop production. **Nature** 2016 **529:7584**, [s. l.], v. 529, n. 7584, p. 84–87, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature16467>. Acesso em: 8 set. 2022.

LEVITT, J. **Responses of plants to environmental stresses. Volume 1, Chilling, freezing, and high temperature stresses (2d ed).** Academic Press, Orlando. 2nd. ed. [S. l.]: New York ; London [etc.] : Academic Press, 1980., 1980.

LEYVA-GONZÁLEZ, Marco Antonio *et al.* Functional and Transcriptome Analysis Reveals an Acclimatization Strategy for Abiotic Stress Tolerance Mediated by Arabidopsis NF-YA Family Members. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 7, n. 10, p. e48138, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0048138>. Acesso em: 23 jun. 2022.

LI, Wen-Xue *et al.* The Arabidopsis NFYA5 Transcription Factor Is Regulated Transcriptionally and Posttranscriptionally to Promote Drought Resistance. **The Plant Cell**, [s. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059444>. Acesso em: 13 abr. 2020.

LI, Yajun *et al.* Effect of post-silking drought on nitrogen partitioning and gene expression patterns of glutamine synthetase and asparagine synthetase in two maize (*Zea mays* L.) varieties. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 102, p. 62–69, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.02.002>

LI, Yan Jie *et al.* NFYA1 Is Involved in Regulation of Postgermination Growth Arrest Under Salt Stress in Arabidopsis. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 8, n. 4, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061289>

LIANG, Shan; YANG, Chengwei. RNA-seq Analysis of Cold and Drought Responsive Transcriptomes of *Zea mays* ssp. *mexicana* L. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. February, p. 1–15, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00136>

LICHTENTHALER, Hartmut K. The stress concept in plants: An introduction. *In*: , 2006. **Annals of the New York Academy of Sciences**. [S. l.]: Blackwell Publishing Inc., 2006. p. 187–198. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x>. Acesso em: 26 set. 2020.

LICHTENTHALER, Hartmut K.; BABANI, Fatbardha. Detection of photosynthetic activity and water stress by imaging the red chlorophyll fluorescence. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 38, n. 11, p. 889–895, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0981-9428\(00\)01199-2](https://doi.org/10.1016/S0981-9428(00)01199-2)

LIMA, Cristina Silva *et al.* Antioxidant protection and PSII regulation mitigate photo-oxidative stress induced by drought followed by high light in cashew plants. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 149, n. October 2017, p. 59–69, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.02.001>

LORETO, F *et al.* On the induction of volatile organic compound emissions by plants as consequence of wounding or fluctuations of light and temperature. **Wiley Online Library**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 1820–1828, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365->

3040.2006.01561.x. Acesso em: 22 jun. 2022.

LU, Xiaoliang *et al.* Comparison of total emitted solar-induced chlorophyll fluorescence (SIF) and top-of-canopy (TOC) SIF in estimating photosynthesis. **Remote Sensing of Environment**, [s. l.], v. 251, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.RSE.2020.112083>

M. FAROOQ, A. WAHID, N. Kobayashi D. Fujita S.M.A. Basra. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. **Agronomy for Sustainable Development**, [s. l.], 2009.

MA, Xiao-Jun *et al.* Overexpression of GmNFYA5 confers drought tolerance to transgenic Arabidopsis and soybean plants. **BMC Plant Biology**, [s. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02337-z>. Acesso em: 8 abr. 2020.

MAHAJAN, Shilpi; TUTEJA, Narendra. Cold, salinity and drought stresses: An overview. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [s. l.], v. 444, n. 2, p. 139–158, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2005.10.018>

MANUKA, Rakesh; SADDHE, Ankush Ashok; KUMAR, Kundan. Expression of OsWNK9 in Arabidopsis conferred tolerance to salt and drought stress. **Plant Science**, [s. l.], v. 270, p. 58–71, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.008>. Acesso em: 12 fev. 2018.

MAPA. **MAPA Indicadores**. [S. l.], 2020. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em: 21 abr. 2021.

MARUYAMA, Kyonoshin *et al.* Integrated Analysis of the Effects of Cold and Dehydration on Rice Metabolites, Phytohormones, and Gene Transcripts. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 1759–1771, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/PP.113.231720>. Acesso em: 20 jun. 2022.

MATSUI, Kenji *et al.* Bell pepper fruit fatty acid hydroperoxide lyase is a cytochrome P450 (CYP74B). **FEBS Letters**, [s. l.], v. 394, n. 1, p. 21–24, 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00924-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00924-6)

MAZZUCOTELLI, Elisabetta *et al.* Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. **Plant Science**, [s. l.], 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.02.005>. Acesso em: 24 jun. 2022.

MCALLISTER, Chandra H.; BEATTY, Perrin H.; GOOD, Allen G. Engineering nitrogen use efficient crop plants: the current status. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1011–1025, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2012.00700.X>. Acesso em: 21 jun. 2022.

MCKERSIE, Bryan D.; STINSON, Robert H. Effect of Dehydration on Leakage and Membrane Structure in Lotus corniculatus L. Seeds. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 66, n. 2, p. 316–320, 1980. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.66.2.316>. Acesso em: 22 abr. 2021.

MILLAN, Teresa *et al.* Chickpea molecular breeding: New tools and concepts. **Euphytica**, [s. l.], v. 147, p. 81–103, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10681-006-4261-4>

MITCHEL, JD; MORI, SA. The cashew and its relatives (Anacardium: Anardiaceae). **Mem. N. Y. Bot. Gard.**, [s. l.], n. 42, p. 1–76, 1987.

MITTLER, Ron. Abiotic stress, the field environment and stress combination. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 15–19, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>. Acesso em: 6 abr. 2021.

MOLINA, Carlos *et al.* SuperSAGE: The drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–28, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-553/FIGURES/10>. Acesso em: 22 jun. 2022.

MORAES-FERNANDES, M.I.B. Perspectivas da Biotecnologia para o Melhoramento de Plantas. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, [s. l.], v. 22, p. 881–896, 1987.

MOREIRA, Raulzito Fernandes. **Alteração no perfil de expressão dos genes de folhas de Cajueiro CCP76 (Anacardium occidentale L.) em resposta ao estresse salino**. 2014. [s. l.], 2014.

MYERS, Zachary A.; HOLT, Ben F. NUCLEAR FACTOR-Y: still complex after all these years? **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 45, p. 96–102, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.05.015>

MYŚLIWA-KURDZIEL, Beata; STRZAŁKA, Kazimierz. Influence of Cd(II), Cr(VI) and Fe(III) on early steps of deetiolation process in wheat: fluorescence spectral changes of protochlorophyllide and newly formed chlorophyllide. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [s. l.], v. 106, n. 2–3, p. 199–207, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.AGEE.2004.10.008>

NAKASHIMA, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko; SHINOZAKI, Kazuo. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 5, n. MAY, p. 170, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00170/BIBTEX>

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. [S. l.]: Sarvier, 2009.

NELSON, Donald E. *et al.* Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 104, n. 42, p. 16450–16455, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0707193104>

NELSON, David R *et al.* Comparative genomics of rice and arabidopsis. Analysis of 727 cytochrome P450 genes and pseudogenes from a monocot and a dicot. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 135, n. 2, p. 756–772, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.104.039826>. Acesso em: 24 abr. 2020.

NEPOMUCENO, A. L. NEUMAIER, N.; FARIAS, J. R. B.; OYA, T. Tolerância à seca em plantas: mecanismos fisiológicos e moleculares. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, [s. l.], v. 4, n. 23, p. 12–18, 2001.

NING, Wenfeng *et al.* Overexpression of Glycine soja WRKY20 enhances drought tolerance and improves plant yields under drought stress in transgenic soybean. **Molecular Breeding**, [s. l.], v. 37, n. 2, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11032-016-0614-4>

NOGUEIRA RJMC, ALBUQUERQUE MB, Silva EC. Aspectos ecofisiológicos da

tolerância à seca em plantas da caatinga. *In: ESTRESSES AMBIENTAIS: DANOS E BENEFÍCIOS EM PLANTAS*. [S. l.: s. n.], 2005. p. 22–31.

OLAJIDE, Olumayokun A. *et al.* Effects of *Anacardium occidentale* stem bark extract on in vivo inflammatory models. **Journal of Ethnopharmacology**, [s. l.], v. 95, n. 2–3, p. 139–142, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.033>

OLIVEIRA, Micheline Soares Costa *et al.* Antioxidant, larvicidal and antiacetylcholinesterase activities of cashew nut shell liquid constituents. **Acta Tropica**, [s. l.], v. 117, n. 3, p. 165–170, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2010.08.003>

PADMAVATHI, Thangella A. V.; RAO, Daggi Manohar. Differential accumulation of osmolytes in 4 cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought stress. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 151–159, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12892-012-0102-2>. Acesso em: 22 abr. 2021.

PATAKAS, A. *et al.* The role of organic solute and ion accumulation in osmotic adjustment in drought-stressed grapevines. **Plant Science**, [s. l.], v. 163, n. 2, p. 361–367, 2002. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00140-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00140-1)

PELEG, Zvi; BLUMWALD, Eduardo. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 14, p. 290–295, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.02.001>. Acesso em: 22 abr. 2021.

PELL, Susan. Molecular systematics of the cashew family (Anacardiaceae). **LSU Doctoral Dissertations**, [s. l.], 2004. Disponível em: https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/1472. Acesso em: 18 abr. 2021.

PENG, S. *et al.* Transcriptional profiling reveals sexual differences of the leaf transcriptomes in response to drought stress in *Populus yunnanensis*. **Tree Physiology**, [s. l.], v. 32, n. 12, p. 1541–1555, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/treephys/tps110>. Acesso em: 25 abr. 2021.

PERANI, L. *et al.* Gene transfer methods for crop improvement: Introduction of foreign DNA into plants. **Physiologia Plantarum**, [s. l.], v. 68, n. 3, p. 566–570, 1986. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1986.TB03397.X>. Acesso em: 8 jun. 2022.

POEHLMAN, John Milton; SLEPER, David Allen. **Breeding Field Crops**. [S. l.: s. n.], 1995. ISSN 0095-9111.v. 43 Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jaoac/43.1.206>

PREETI, Anand *et al.* Computational characterization of lipoxygenase and hydroperoxide lyase enzymes and Real Time PCR-based expression analysis of their encoding genes in peanut under heat and drought stress. **Research Journal of Biotechnology**, [s. l.], 2019. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/337591521_Computational_characterization_of_lipoxygenase_and_hydroperoxide_lyase_enzymes_and_Real_Time_PCR-based_expression_analysis_of_their_encoding_genes_in_peanut_under_heat_and_drought_stress/references. Acesso em: 5 jun. 2020.

PURUGGANAN, Michael D.; FULLER, Dorian Q. The nature of selection during plant domestication. **Nature**, [s. l.], v. 457, n. 7231, p. 843–848, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NATURE07895>. Acesso em: 8 jun. 2022.

QIU, Yuping; YU, Diqiu. Over-expression of the stress-induced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. **Environmental and Experimental Botany**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 35–47, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2008.07.002>

QUE, Qiudeng *et al.* Trait stacking in transgenic crops: Challenges and opportunities. **GM Crops**, [s. l.], p. 220–229, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/gmcr.1.4.13439>. Acesso em: 8 jun. 2022.

QUEIROZ, Manoel Abílio De *et al.* Plant breeding in the semiarid region of Brazil: examples of success. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, [s. l.], v. 12, n. spe, p. 57–66, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-70332012000500007>

RAMIRO, Daniel Alves *et al.* Expression of Arabidopsis Bax Inhibitor-1 in transgenic sugarcane confers drought tolerance. **Plant Biotechnology Journal**, [s. l.], v. 14, n. 9, p. 1826–1837, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pbi.12540>

RASMUSSEN, Simon *et al.* Transcriptome responses to combinations of stresses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 161, n. 4, p. 1783–1794, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.112.210773>. Acesso em: 9 set. 2020.

REDDY, Attipalli Ramachandra; CHAITANYA, Kolluru Viswanatha; VIVEKANANDAN, Munusamy. **Drought-induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants**. [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2004.01.013>. Acesso em: 12 abr. 2021.

RIZHSKY, Ludmila *et al.* When defense pathways collide. The response of Arabidopsis to a combination of drought and heat stress 1[w]. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 134, n. 4, p. 1683–1696, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.103.033431>. Acesso em: 6 abr. 2021.

RÔÇAS, Giselle; BARROS, Cláudia Franca; SCARANO, Fábio Rubio. Leaf anatomy plasticity of *Alchornea triplinervia* (Euphorbiaceae) under distinct light regimes in a Brazilian montane Atlantic rain forest. **Trees - Structure and Function**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 469–473, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/PL00009688>

RODZIEWICZ, Paweł *et al.* **Influence of abiotic stresses on plant proteome and metabolome changes**. [S. l.]: Springer, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1402-y>. Acesso em: 22 abr. 2021.

ROZEN, S; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 132, p. 365–386, 2000.

RYMASZEWSKI, Wojciech *et al.* Stress-Related Gene Expression Reflects Morphophysiological Responses to Water Deficit. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 174, n. July, p. 1913–1930, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.17.00318>

SADRAS, V. O.; MILROY, S. P. **Soil-water thresholds for the responses of leaf expansion and gas exchange: A review**. [S. l.]: Elsevier B.V., 1996. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(96\)00014-7](https://doi.org/10.1016/0378-4290(96)00014-7)

SAHI, Chandan *et al.* **Beyond osmolytes and transporters: Novel plant salt-stress tolerance-related genes from transcriptional profiling data**. [S. l.]: John Wiley & Sons,

Ltd, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2005.00610.x>. Acesso em: 16 set. 2020.

SANTAREM, Eliane. Métodos Eficientes para a Transformação Genética de Plantas Efficient Methods for Genetic Plants Transformation. **Revista de Ciência e Tecnologia**, [s. l.], v. 15, p. 81–90, 2000. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/237606685>. Acesso em: 13 jun. 2022.

SAYAR, R *et al.* Physiological tests as predictive appreciation for drought tolerance in durum wheat (*Triticum durum* Desf.). **Agronomy research (Tartu)**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 79–90, 2008.

SCHEIBE, Renate; BECK, Erwin. **Drought, Desiccation, and Oxidative Stress**. [S. l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-642-19106-0_11. Acesso em: 21 jun. 2022.

SCHMIDT, Sarah M; BELISLE, Melinda; FROMMER, Wolf B. The evolving landscape around genome editing in agriculture: Many countries have exempted or move to exempt forms of genome editing from GMO regulation of crop plants. **EMBO Reports**, [s. l.], v. 21, n. 6, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15252/EMBR.202050680>. Acesso em: 8 jun. 2022.

SCHULZE, E.D., HALL, A.E. Stomatal responses, water loss and CO₂ carbon dioxide assimilation rates of plants in contrasting environments. *In*: LANGE, O.L., NOBEL, P.S.; OSMOND, C.B., ZIEGLER, H. (org.). **Encyclopedia of plant physiology: physiological plant ecology**. [S. l.: s. n.], 1982. p. 181–230.

SCHUPPLER, Ute *et al.* Effect of water stress on cell division and cell-division-cycle 2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 117, n. 2, p. 667–678, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.667>. Acesso em: 23 abr. 2021.

SHAO, Hong Bo *et al.* **Understanding water deficit stress-induced changes in the basic metabolism of higher plants-biotechnologically and sustainably improving agriculture and the ecoenvironment in arid regions of the globe**. [S. l.]: Taylor & Francis, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/07388550902869792>. Acesso em: 25 maio 2021.

SHIMKETS, Richard A. **Gene expression quantitation technology summary**. [S. l.: s. n.], 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1385/1-59259-751-3:7>

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 221–227, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>

SILVA, Silvana; *et al.* Respostas fisiológicas de gramíneas promissoras para revegetação ciliar de reservatórios hidroelétricos, submetidas à deficiência hídrica. **Ciênc. agrotec.**, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 124–133, 2001. Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/485558>. Acesso em: 12 abr. 2021.

SILVEIRA, Joaquim A.G. *et al.* Proline accumulation and glutamine synthetase activity are increased by salt-induced proteolysis in cashew leaves. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 160, n. 2, p. 115–123, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00890>

SILVEIRA, Joaquim A.G. *et al.* Salt resistance in two cashew species is associated with

accumulation of organic and inorganic solutes. **Acta Physiologiae Plantarum**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 1629–1637, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11738-012-0957-3>

SIMOVA-STOILLOVA, L. *et al.* Antioxidative protection in wheat varieties under severe recoverable drought at seedling stage. **Plant, Soil and Environment**, [s. l.], v. 54, n. 12, p. 529–536, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.17221/427-pse>. Acesso em: 12 abr. 2021.

SMÉKALOVÁ, Veronika *et al.* **Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants**. [S. l.]: Biotechnol Adv, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.07.009>. Acesso em: 22 abr. 2021.

SONG, Li *et al.* Genome-wide transcriptome analysis of soybean primary root under varying water-deficit conditions. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 57, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2378-y>. Acesso em: 16 set. 2020.

SUBRAMANIAM, Sunitha. Identification and analysis of Gene Regulatory Networks involved in the drought stress response in *Arabidopsis thaliana*. **PhD Thesis**, [s. l.], 2016. Disponível em: [https://pdfs.semanticscholar.org/5f79/f3ee0d6e3ec14a20ed0e9972c4fdd5c75636.pdf?_ga=2.218781593.1833315608.1568388113-309743503.1563288833%0Ahttp://repository.essex.ac.uk/17941/2/Sunitha Subramaniam PhD thesis.pdf](https://pdfs.semanticscholar.org/5f79/f3ee0d6e3ec14a20ed0e9972c4fdd5c75636.pdf?_ga=2.218781593.1833315608.1568388113-309743503.1563288833%0Ahttp://repository.essex.ac.uk/17941/2/Sunitha%20Subramaniam%20PhD%20thesis.pdf). Acesso em: 5 maio 2020.

SUZUKI, Nobuhiro *et al.* Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, [s. l.], 2014.

SZABADOS, László; SAVOURÉ, Arnould. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 89–97, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2009.11.009>. Acesso em: 9 nov. 2021.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. [S. l.: s. n.], 2004. ISSN 03074412. *E-book*.

TATAR, Özgür; GEVREK, Mithat Nuri. Influence of water stress on proline accumulation, lipid peroxidation and water content of wheat. **Asian Journal of Plant Sciences**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 409–412, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.3923/ajps.2008.409.412>

TERRAZAS, Teresa. Anatomía de la madera de Anacardiaceae con énfasis en los géneros americanos. **Botanical Sciences**, [s. l.], v. 64, n. 64, p. 103, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17129/botsci.1587>. Acesso em: 18 abr. 2021.

TETTEROO, Frans A.A. *et al.* Characterization of membrane properties in desiccation-tolerant and -intolerant carrot somatic embryos. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 111, n. 2, p. 403–412, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1104/pp.111.2.403>. Acesso em: 22 abr. 2021.

TEZARA, W. *et al.* Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP. **Nature**, [s. l.], v. 401, n. 6756, p. 914–917, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/44842>. Acesso em: 22 abr. 2021.

TISSA SENARATNA AND BRYAN D. MCKERSIE. Dehydration Injury in Germinating Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Seeds. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 72, p. 620–624, 1983. Disponível em:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1066291/pdf/plntphys00564-0038.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2021.

TORRES, et al. **Glóssário de Biotecnologia Vegetal**. Brasília: Embrapa-CNPq, 2000.

UMEZAWA, Taishi *et al.* CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, [s. l.], v. 46, n. 2, p. 171–182, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2006.02683.x>. Acesso em: 23 abr. 2020.

VALLIYODAN, Babu; NGUYEN, Henry T. **Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants**. [S. l.]: Curr Opin Plant Biol, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.019>. Acesso em: 12 abr. 2021.

VAN EIJNATTEN, C. L.M. *Anacardium occidentale*. **CRC Handbook of Flowering**, [s. l.], v. 5, p. 15–17, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9781351072571>

VERGARA, Clarice Maria de Araújo Chagas *et al.* Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L) juice. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 141–145, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2009.06.009>

VICKERS, Claudia E. *et al.* A unified mechanism of action for volatile isoprenoids in plant abiotic stress. **Nature chemical biology**, [s. l.], v. 5, n. 5, p. 283–291, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/NCHEMBO.158>. Acesso em: 21 jun. 2022.

VILLA, Marco Antonio. Vida e morte no sertão: história das secas no Nordeste nos séculos XIX e XX. **Revista Brasileira de História**, [s. l.], 2001. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/rbh/v22n43/10922.pdf>. Acesso em: 16 set. 2020.

VILLAR, Emilie *et al.* RNA-Seq reveals genotype-specific molecular responses to water deficit in eucalyptus. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 538, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-538>. Acesso em: 25 abr. 2021.

WAGNER, PA; DREYER, E. Interactive effects of waterlogging and irradiance on the photosynthetic performance of seedlings from three oak species displaying different sensitivities (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. rubra*). **Annales des Sciences Forestières**, [s. l.], v. 54, n. 5, p. 409–429, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/forest:19970501>. Acesso em: 26 set. 2020.

WANG, Daojie *et al.* Comparative Transcriptome Analyses of Drought-Resistant and -Susceptible *Brassica napus* L. and Development of EST-SSR Markers by RNA-Seq. **Journal of Plant Biology**, [s. l.], v. 454, p. 259–269, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12374-015-0113-x>

WANG, Di *et al.* Genome-wide temporal-spatial gene expression profiling of drought responsiveness in rice. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 12, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-149>. Acesso em: 7 jun. 2020.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. **RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics**. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrg2484>. Acesso em: 26 abr. 2021.

WASTERNAK, C. Jasmonates: an update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. **Annals of botany**, [s. l.], v. 100, n. 4, p.

681–697, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/AOB/MCM079>. Acesso em: 22 jun. 2022.

WILHELM, Brian T. *et al.* Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. **Nature**, [s. l.], v. 453, n. 7199, p. 1239–1243, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nature07002>. Acesso em: 25 abr. 2021.

WOITSCH, Sonja; RÖMER, Susanne. Impact and interaction of lipophilic antioxidants in mutants and transgenic plants. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 162, n. 11, p. 1197–1209, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2005.04.007>. Acesso em: 22 abr. 2021.

WU, Xiaolan *et al.* Enhanced heat and drought tolerance in transgenic rice seedlings overexpressing OsWRKY11 under the control of HSP101 promoter. **Plant Cell Reports**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 21–30, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00299-008-0614-x>. Acesso em: 16 set. 2020.

XING, Y.; FILES, J. D.; GUARENTE, L. Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box binding domain. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. 4647, 1993. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/J.1460-2075.1993.TB06153.X>. Acesso em: 23 jun. 2022.

YADAV, Dinesh *et al.* Constitutive overexpression of the TaNF-YB4 gene in transgenic wheat significantly improves grain yield. **Journal of Experimental Botany**, [s. l.], v. 66, n. 21, p. 6635–6650, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/JXB/ERV370>. Acesso em: 6 mar. 2022.

YOO, Yo-han *et al.* OsPhyB-Mediating Novel Regulatory Pathway for Drought Tolerance in Rice Root Identified by a Global RNA-Seq Transcriptome Analysis of Rice Genes in Response to Water Deficiencies. **Frontiers in Plant Science**, [s. l.], v. 8, n. April, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00580>

YOSHIDA, Takuya; MOGAMI, Junro; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. ABA-dependent and ABA-independent signaling in response to osmotic stress in plants. **Current opinion in plant biology**, [s. l.], v. 21, p. 133–139, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2014.07.009>. Acesso em: 20 jun. 2022.

YOUNIS, Hassan M.; BOYER, John S.; GOVINDJEE. Conformation and activity of chloroplast coupling factor exposed to low chemical potential of water in cells. **BBA - Bioenergetics**, [s. l.], v. 548, n. 2, p. 328–340, 1979. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(79\)90139-7](https://doi.org/10.1016/0005-2728(79)90139-7). Acesso em: 22 abr. 2021.

ZANDALINAS, Sara I. *et al.* The impact of multifactorial stress combination on plant growth and survival. **New Phytologist**, [s. l.], v. 230, n. 3, p. 1034–1048, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/NPH.17232>. Acesso em: 21 fev. 2022.

ZHANG, Huawei *et al.* The RING Finger Ubiquitin E3 Ligase SDIR1 Targets SDIR1-INTERACTING PROTEIN1 for Degradation to Modulate the Salt Stress Response and ABA Signaling in Arabidopsis. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 27, n. 1, p. 214, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1105/TPC.114.134163>. Acesso em: 24 jun. 2022.

ZHANG, Tong *et al.* Overexpression of a NF-YB3 transcription factor from *Picea wilsonii* confers tolerance to salinity and drought stress in transformed *Arabidopsis thaliana*. **Plant**

Physiology and Biochemistry, [s. l.], v. 94, p. 153–164, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.05.001>

ZHANG, Xiaoquan *et al.* Overexpression of NtabDOG1L promotes plant growth and enhances drought tolerance in *Nicotiana tabacum*. **Plant Science**, [s. l.], v. 287, n. May, p. 110186, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110186>

ZHU, Chuanfeng *et al.* Overexpression of a cotton cyclophilin gene (GhCyp1) in transgenic tobacco plants confers dual tolerance to salt stress and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* infection. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 49, n. 11, p. 1264–1271, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2011.09.001>

ZHU, Jun *et al.* The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. **Journal of Bacteriology**, [s. l.], v. 182, n. 14, p. 3885, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JB.182.14.3885-3895.2000>. Acesso em: 15 jun. 2022.

ZHU, Jian-Kang. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. **Annual review of microbiology**, [s. l.], p. 1–25, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.53.091401.143329.Salt>

ZHU, Jian Kang. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, [s. l.], v. 167, n. 2, p. 313–324, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.08.029>. Acesso em: 17 fev. 2022.

