

ELIZABETH AMÉLIA ALVES DUARTE

**Identificação de genes diferencialmente expressos em
amendoim, submetido a estresse hídrico**

Recife - PE
2008

ELIZABETH AMÉLIA ALVES DUARTE

**Identificação de genes diferencialmente expressos em
amendoim, submetido a estresse hídrico**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

Comitê de orientação:

Orientador: Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho (DEPA-UFRPE)

Co-orientadora: Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos (Embrapa Algodão)

Co-orientadora: prof^a Dr^a Rejane J. Mansur C. Nogueira (DB-UFRPE)

Co-orientadora: prof^a Dr^a Luciane Vilela Resende (DEPA-UFRPE)

Recife – PE
2008

FICHA CATALOGRÁFICA

D812i Duarte, Elizabeth Amélia Alves
Identificação de genes diferencialmente expressos em
amendoim, submetido a estresse hídrico / Elizabeth Amélia
Alves Duarte. -- 2008.
54 f. il.

Orientador: Péricles de Albuquerque Melo Filho
Dissertação (Mestrado em Agronomia – Melhoramento
Genético) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Agronomia.
Inclui anexo e bibliografia.

CDD 631. 53

1. *Arachis*
 2. Expressão diferencial
 3. Estresse hídrico
- I. Mélo Filho, Péricles de Albuquerque
 - II. Título

ELIZABETH AMÉLIA ALVES DUARTE

Identificação de genes diferencialmente expressos em amendoim, submetido a estresse hídrico

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia – “Melhoramento Genético de Plantas”, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Agronomia, área de concentração: Melhoramento Genético de Plantas.

Dissertação defendida e aprovada pela Banca Examinadora em 27/02/2008.

Orientador: _____
Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho
Departamento de Agronomia/UFRPE

Examinadores: _____
Dr^a. Ana Verônica Silva do Nascimento
DCR/CNPq/FACEPE

Dr^a. Liziane Maria de Lima
Embrapa Algodão

Dr. Clodoaldo José da Anunciação Filho
Departamento de Agronomia/UFRPE

Recife - PE
2008

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu agradecimento é eterno e demonstrado pela minha conduta;

À Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),

Aos professores e pesquisadores, Luciane Vilela, Gerson Quirino, Francisco Oliveira, Sami Michereff, Gilvan Pio, José Vitor, Raquel Coimbra, Márcia Vanusa Manuel Adrião, Wagner Alexandre, Ana Verônica Silva, Reginaldo de Carvalho e tantos outros que colaboraram com meu trabalho e minha formação científica;

Ao Prof. Dr. Péricles de Albuquerque Melo Filho, pela orientação e constante troca de conhecimentos científicos;

À Dr^a Roseane Cavalcanti dos Santos, meu agradecimento externado a cada momento e ao longo de nossa parceria profissional e pessoal;

À Prof^a Dr^a Rejane Mansur e sua equipe do Laboratório de Fisiologia Vegetal da UFRPE, pela colaboração nos trabalhos fisiológicos e bioquímicos;

À Dr^a Alessandra Resende Ramos, amiga e parceira profissional;

Aos colegas do Laboratório GENOMA, em especial a prof^a Dr^a Maria de Mascena Diniz, Silvokleio Costa, Cláudio Melo, Ebenezer Bernardes, Karla Nishiyana, Janaina Teixeira, Isabel Gomes e Manuela Granja;

A Fabiana Aparecida, amiga, parceira e companheira nessa jornada;

Aos colegas Leyton, Rafael Monteiro, Ivanildo Ramalho, Júlio Mesquita e Sr. Ivaldo Monteiro, pela ajuda e empenho nas atividades em casa de vegetação;

A Tarciana Melo, Clodoaldo Torres, Lourdes Fernandes, Waléria Guerreiro e tantos outros presentes naqueles momentos de saudade, estresse e lazer;

A Thiago Alves Oliveira, pela paciência, carinho e companheirismo;

As minhas amigas Adna Dantas, Cláudia Procópio, Priscila Pimenta e Mychelle Ramalho, meus eternos agradecimentos;

A toda minha família, em especial aos meus pais Dorgival e Sônia, meu irmão Lamark Alves e meus avós;

A todos que mesmo não citados, serão lembrados pela contribuição na realização deste trabalho.

Muito Obrigada !

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	04
LISTA DE FIGURAS	06
LISTA DE TABELAS	07
RESUMO	08
ABSTRACT	10
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
CAPÍTULO II – Prospecting of transcripts expressed differentially in peanut submitted to water stress by cDNA-ISSR primers	29
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Material and Methods.....	33
Results.....	35
Discussion.....	36
References.....	39
CONCLUSÕES GERAIS	47
ANEXOS	49
Instruções para publicação na revista: Genetics and Molecular Biology.....	50

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

FIGURA 1. Padrão das sementes dos genótipos de amendoim dos grupos Valência (A), Spanish (B) e Virginia (C)..... 14

FIGURA 2. Esquema da percepção do estresse hídrico pelas plantas..... 15

CAPÍTULO II

FIGURE 1. Differentially displayed transcripts in stressed (E) and control (C) peanut plants with nine ISSR primers described in Table 1 45

FIGURE 2. Partial alignment of transcript t808 sequences with variety of *Arabidopsis* NM116972.4 that codifies for arabinogalactan protein 46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. ISSR primers used in differential display and number of transcript identified in peanut plants submitted to water stress	43
Table 2. Result of BLAST sequence alignment from four clones obtained from active transcripts in stressed plants.....	44

RESUMO

O amendoim é um produto de grande importância mundial para a indústria de alimentos, sendo bastante representativo no Brasil que é um dos maiores produtores e consumidores dessa oleaginosa. Grande parte da produção está concentrada nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Nesta última região, o clima é um fator limitante ao seu cultivo, embora alguns tipos botânicos apresentem tolerância às condições de estiagem prolongada. O presente trabalho teve como objetivo identificar genes diferencialmente expressos em amendoim, submetido a estresse hídrico, que possam auxiliar nos programas de melhoramento genético da cultura na região Nordeste. Para este estudo a cultivar Senegal 55437, de reconhecida tolerância à seca, foi submetida a cinco dias de estresse hídrico em condições de casa de vegetação. O RNA total foi coletado a partir de tecidos foliares, quando as plantas atingiram 50% de fechamento estomático. Para a identificação de genes diferencialmente expressos, procedeu-se ensaios de RT-PCR utilizando-se *primers* ISSR. Os c-DNAs obtidos foram reamplificados, purificados, ligados em vetor pGEMT-Easy e clonados em *Escherichia coli*, célula INFa (Invitrogen). Foram obtidos vinte e nove fragmentos de cDNA dos quais dezessete na condição de sub-regulados, dois super-regulados e dez ativados, estes últimos encontrados apenas nas amostras estressadas, os quais foram seqüenciados. As seqüências obtidas foram comparadas em bancos de dados, evidenciando os bancos de *Arabidobis thaliana* e *Arachis*. Dentre as seqüências, quatro apresentaram homologia com genes conhecidos e envolvidos em rotas metabólicas de resposta a fatores abióticos e bióticos. Uma dessas seqüências com cerca de 700 pb apresentou homologia com a proteína Arabinogalactana 10 de *A. thaliana*. Essa proteína estrutural presente nas folhas, caules e raízes dos vegetais esta associada a processos regulatórios iniciados durante a perda de água pela célula, cujos genes envolvidos promovem aumento da proteção do citoplasma, organelas, membranas celulares, alterações do potencial celular osmótico e maior regulação da expressão de outros genes. O resultado aqui obtido sugere uma possível relação desse gene no envolvimento das rotas de resposta ao estresse hídrico.

Palavras-chaves: *Arachis*, expressão diferencial e estresse hídrico.

ABSTRACT

Peanut is a worldwide important product for food industries. In Brazil this crop is quite representative due its high consume. Most part of production is concentrated in the Southeast, Center-West and Northeast regions. In this last one, the wheather is a limiting factor for the crop; however, some botanical types present tolerance to prolonged dry conditions. The aim of this work was to identify genes differentially expressed in a peanut cultivar submitted to water stress which could aid on selective processes in the improvement programs carried out with this crop in the Northeast region. The cv. Senegal 55437 was chosen for this study due its recognizable tolerance to drought. It was submitted to five days of water stress under greenhouse conditions. The total RNA was collected from foliar tissues when plants reached 50% stomatic closure. RT-PCR assays were performed using ten ISSR primers and the c-DNAs obtained were re-amplified, purified and cloned into *Escherichia coli*, INF α cell (Invitrogen). A total of twenty-nine cDNA fragments were obtained, being seventeen at the down regulated condition, two at over regulated and ten activated. These later, only found in stressed samples, were sequenced. Sequences obtained were compared into databanks, focusing on *Arabidobis thaliana* and *Arachis* banks, and four showed homology with genes which are involved in metabolic routes to abiotic and biotic factors. One of these sequences, with about 700pb, showed homology with Arabinogalactan protein 10 of *A. thaliana*. This structural protein present in the leaves, stems and roots is associated to regulatory processes initiated during the water loss by the cell, which genes increase protection to the cytoplasm, organelles, cell membranes, cellular osmotic potential alteration and improve better regulation in the expression of other genes. The result here obtained suggests a possible relation of this gene with the response routes to water stress.

Key-words: *Arachis*, differential expressed and drought stress.

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

Considerações gerais sobre a cultura do amendoim

O amendoim é a quarta oleaginosa mais importante no mundo com cerca de 22 milhões de hectares plantados. Tem como principais produtores a China seguida da Índia e dos Estados Unidos, onde cerca de 8 milhões de toneladas anuais de grãos são destinados ao consumo *in natura* ou a indústria de confeitaria (FAO, 2007). Ainda nestes países, 18 milhões de grãos são esmagados para fabricação de óleo comestível. A China, os Estados Unidos e a Argentina destacam-se como maiores exportadores, devido à qualidade dos grãos. A União Européia, Indonésia e Japão aparecem como maiores importadores (FNP, 2006).

Os grãos do amendoim são reconhecidos pelo alto teor de proteínas (20 a 25%) e óleo (45 a 52%), podendo ser consumidos *in natura*, como óleo comestível, na indústria de confeitaria ou ainda como ração animal (CARLEY e FLETCHER, 1995; GODOY et al., 2005). Os grãos contêm ainda, carboidratos, fibras, vitaminas E e B, ácido fólico, cálcio, fósforo, magnésio, zinco, ferro, riboflavina, tiamina e potássio. O óleo contém ácidos graxos insaturados tais como ácidos oléicos e linoléicos (GODOY et al., 2005)

Segundo estudo realizado por Freitas e Amaral (2002), o Brasil foi destaque na produção de amendoim na década de 70, quando a produção interna era destinada ao esmagamento para obtenção do óleo comestível, que juntamente com o farelo foi explorado para a produção externa. Mas a década seguinte foi marcada com o declínio da produção por consequência da diminuição da área plantada, então substituída por culturas como a soja e a cana-de-açúcar somada ao elevado custo de produção, a suscetibilidade às variações climáticas, contaminação por aflatoxina e ao baixo rendimento por área (ROCHA e BARBOSA, 1990; ALMEIDA, 1996). Na década de 90 houve uma mudança no mercado do amendoim com aumento do consumo *in natura* e declínio nas aquisições dos grãos para esmagamento e consequente redução da produção e exportação de subprodutos, direcionando a produção interna à indústria de confeitaria que requer melhor qualidade do produto (FREITAS e AMARAL 2002).

Atualmente a produção brasileira de amendoim é da ordem de 234,3 mil toneladas, sendo grande parte dessa produção gerada no estado de São Paulo,

responsável por 80% da produção nacional (CONAB, 2007). A região Nordeste é a segunda maior consumidora dessa oleaginosa, todavia a produção gerada ainda é baixa, cerca de 15 mil toneladas (IBGE, 2007), insuficiente para a demanda regional. A produção agrícola nacional destina-se ao mercado de consumo *in natura* e confeitaria. E para atender estes segmentos, a qualidade do produto, especialmente no aspecto fitossanitário, é imprescindível e isso tem sido atendido por meio de programas de esclarecimento e cooperativas no Sudoeste do país.

O gênero *Arachis*, pertence à família *Fabacea*, subfamília *Papilionoideae* e agrega nove seções (*Erectoides*, *Trirectoides*, *Extranervosae*, *Triseminatae*, *Heteranthae*, *Caulorrhizae*, *Procumbentes*, *Rhizomatosae* e *Arachis*), subdivididas com base nas relações filogenéticas, similaridades morfológicas, compatibilidade de cruzamentos interespecíficos, viabilidade de pólen e no número e morfologia cromossômica (KRAPOVICKAS e GREGORY, 1994).

O provável centro de origem primário do gênero *Arachis* é a Serra do Amambáí, situada entre o Mato Grosso do Sul e o Paraguai (GREGORY, et al., 1980). O gênero agrega oitenta e uma espécies, das quais sessenta e nove foram descritas por Krapovickas e Gregory (1994) e as demais por Valls e Simpson (2005), todas com ocorrência natural na América do Sul, estendendo-se ao leste dos Andes, sul da Amazônia, norte da Planície Platina e Noroeste da Argentina. De acordo com Krapovickas e Gregory (1994) e Peñaloza et al., (2001), trinta e uma destas espécies estão incluídas na seção *Arachis* e quarenta e sete ocorrem exclusivamente no Brasil.

A maioria das espécies do gênero é diplóide com $2n=2x=20$ cromossomos, já o amendoim cultivado, *A. hypogaea* é um alotetraplóide com $2n=4x=40$ cromossomos (FERNÁNDEZ e KRAPOVICKAS, 1994). *A. hypogaea*, pertence à seção *Arachis* e é subdividida em duas subespécies, com ocorrências distintas desde as Américas do Sul e Central, Ásia e África. Estas agregam seis variedades botânicas, caracterizadas pelo ciclo, hábito de crescimento e ramificações (reprodutivas e vegetativas). *A. hypogaea* subespécie *hypogaea*, inclui as variedades *hypogaea* (grupo Virginia) e *hirsuta*, ambas caracterizadas por ciclo longo, hábito de crescimento rasteiro, semi-rasteiro e arbustivo e sementes de tamanhos que variam do médio ao extragrande (KRAPOVICKAS,

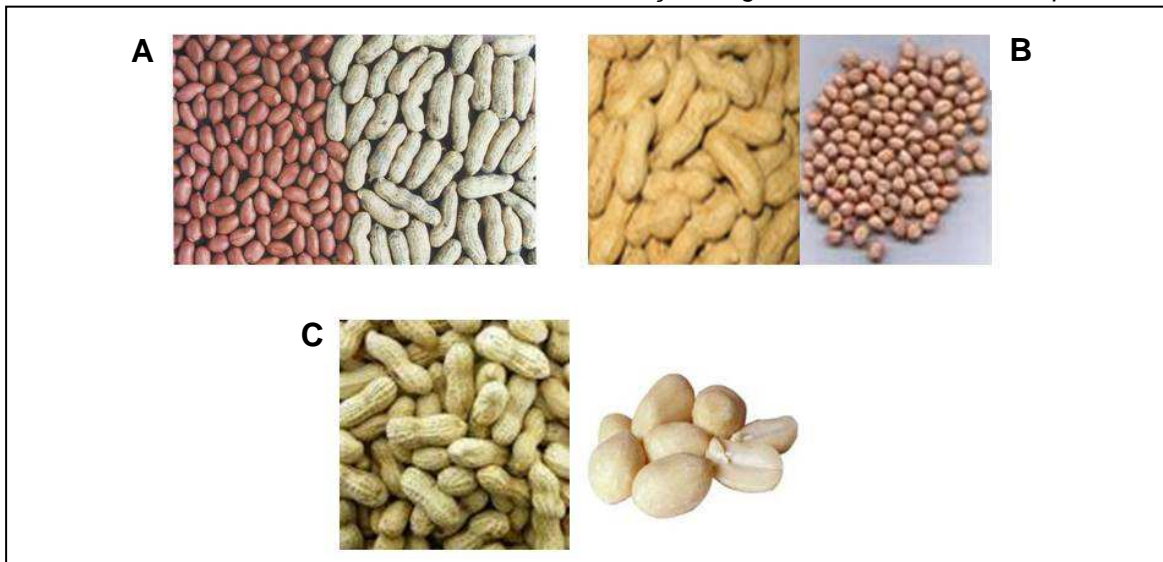
1998); *A. hypogaea* L. subespécie *fastigiata*, inclui as variedades botânicas *fastigiata* (grupo Valência), *vulgaris* (tipo agrícola Spanish), *peruviana* e *aequatoriana*, todas com ciclo curto, hábito de crescimento ereto ou semi-ereto, sementes pequenas ou médias e com centros de diversidades que incluem o Brasil, a Argentina, o Peru e o Paraguai (KRAPOVICKAS, 1995).

As cultivares em distribuição no Brasil pertence às subespécies *hypogaea* e *fastigiata*, sendo esta última a de maior preferência no mercado nacional de consumo *in natura* por ter sementes de coloração vermelha, ciclo curto e porte ereto (SANTOS et al., 2005).

No aspecto reprodutivo, o amendoim apresenta-se como uma planta monóica que apresenta flores hermafroditas, agrupadas em inflorescências com até cinco flores, formadas nas axilas das folhas compostas, cujo florescimento ocorre sobre o solo (GODOY et al., 1989). A frutificação, particular ao gênero, ocorre após fertilização da flor que busca o solo (geotropismo positivo) para formar o ginóforo, popularmente conhecido como “peg” ou esporão. Este cessa o alongamento iniciando a formação do geocarpo (vagem) onde se desenvolvem as sementes (ZAMSKI e ZIV, 1976).

As sementes podem variar em número, coloração e tamanho entre os grupos Valência, Spanish e Virginia. O primeiro apresenta de três a seis sementes por vagem, de tamanho médio e coloração vermelha (Figura 1A). O grupo Spanish tem duas sementes por vagem, de tamanho pequeno e coloração bege (Figura 1B), enquanto que, o grupo Virginia tem duas sementes por vagem, de tamanho grande ou extragrande e freqüentemente bege (Figura 1C). Quanto ao florescimento, plantas do tipo ereto florescem entre os 28-30 dias após o plantio (dap) enquanto que as plantas do tipo rasteiro crescem entre 36-38 (dap) (SANTOS et al., 1997).

Nessa cultura, a morfologia floral contribui para uma elevada taxa de autofecundação, o que leva a uma redução de variabilidade genética intra-específica e, por conseguinte, reduz as chances do surgimento natural de genótipos melhorados. No entanto, esta situação pode ser contornada realizando cruzamentos controlados, utilizando progenitores superiores pré-definidos pelos programas de melhoramento.



Figuras 1. Padrão das sementes dos genótipos de amendoim dos grupos Valência (A), Spanish (B) e Virginia (C).

Aspectos fisiológicos do déficit hídrico na cultura do amendoim

Na agricultura, denomina-se seca o fenômeno meteorológico onde a precipitação não é suficiente para manter o potencial de evapotranspiração de um campo cultivado, ou seja, ocorre um déficit hídrico em relação ao suprimento requerido por determinada cultura (ROCKSTROM e FALKENMARK, 2000). Porém, esse termo é mais bem explicado por Passioura (1997), o qual adequou a uma circunstância onde as plantas reduzem o crescimento e a produtividade, por insuficiente suprimento hídrico interno, mesmo havendo água no solo e ao déficit de umidade do ar. Kramer e Boyer (1995) ressaltam que os efeitos do estresse hídrico são variáveis em função do tempo de exposição ao mesmo e do estágio de desenvolvimento da planta durante o qual a seca ocorre.

De acordo com Turner (1981), os efeitos do estresse hídrico acometem a planta desde seu crescimento até a frutificação. DURAES et al. (2004) classificaram três tipos de tolerância à seca e seus possíveis mecanismos: (i) escape à seca ou habilidade das espécies cultivadas de completarem seu ciclo de vida antes de desenvolverem um sério déficit hídrico (mecanismos envolvidos: precocidade e recuperação); (ii) tolerância à seca em alto grau de déficit hídrico, ou seja, habilidade das espécies cultivadas em tolerar prolongados períodos secos (mecanismos: manutenção da absorção de água e redução da perda de água) e, (iii) habilidade das espécies cultivadas em tolerar prolongados períodos

secos e resistir à dessecação (mecanismos: manutenção do turgor e tolerância à desidratação) (Figura 2).



Figura 2. Esquema da percepção do estresse hídrico pelas plantas. Nepomuceno et al. (2001).

As folhas são as principais responsáveis pela demanda evaporativa da atmosfera, que ao se elevar requer maior fluxo de água no sistema solo-planta-atmosfera. É nas folhas que ocorre a primeira mudança em resposta à seca, que é a inibição da expansão foliar e, por conseguinte, menor transpiração, principalmente no início do déficit hídrico (TAIZ e ZEIGER, 2004). A arquitetura das folhas, mudando o ângulo de interceptação da radiação solar e o aumento da senescência, são outras adequações das folhas em situação de estresse hídrico (SANTOS e CARLESSO, 1998). Portanto, em decorrência da diminuição da área foliar fotossintética ativa, o equilíbrio entre a produção de assimilados e a demanda para o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos são severamente afetados (GERIK et al., 1996), influenciando diretamente a produção agrícola, uma vez que a capacidade de transformação de energia luminosa em energia química (carboidratos), no processo de fotossíntese, é prejudicada.

De acordo com Lopes et al. (1998), o déficit hídrico reduz o índice de troca de CO_2 e a sua condução para as folhas, além de reduzir a concentração desse gás nos espaços intercelulares. Por isso é importante o estudo da condutância estomática durante o processo de déficit hídrico, visto que são os estômatos que

controlam a difusão de CO₂ e de vapor de água. Apesar de permitir uma maior conservação de água, o fechamento dos estômatos causa redução da assimilação de CO₂ e, conseqüentemente, diminuição da produtividade (PLAUT, 1994). Pallas et al. (1979) estudaram as respostas adaptativas dos estômatos frente ao estresse hídrico e observaram que o amendoim e a soja recuperam a função estomática mais rapidamente que outras espécies quando o estresse hídrico é atenuado. Adicionalmente, Clavel et al. (2004) estudaram o potencial agrônômico e fisiológico em genótipos de amendoim, sensíveis e tolerantes ao estresse hídrico, e reportaram que a cultivar Senegal 55437 teve maior coeficiente de partição e a produção foi relativamente maior entre as demais cultivares estudadas, constatando a tolerância dessa cultivar a diferentes níveis de déficit hídrico.

O amendoim apresenta alguns mecanismos biológicos para se estabelecer em condições de estresse. Távora e Melo (1991) citaram diminuição de área foliar, precocidade e capacidade de aprofundar suas raízes. A planta apresenta ainda a capacidade de recuperar a função estomática à medida que o nível hídrico é restabelecido, como mecanismos de adaptação ao estresse hídrico (TÁVORA e MELO, 1991; GUIMARÃES, 1993; NOGUEIRA et al., 2000).

Outros mecanismos de resposta fisiológica e molecular diretamente relacionado à resposta das plantas superiores ao déficit hídrico são: o ajuste osmótico, o acúmulo de prolinas e a concentração de açúcares solúveis, muitos deles funcionando como osmoprotetores (MULLER et al., 1995).

Aspectos moleculares relacionados ao estresse hídrico

Os aspectos moleculares de tolerância à seca envolvem um complexo de mecanismos fisiológicos e moleculares, cujas respostas representam uma cascata de eventos que são ativados ou desativados pela percepção do estresse (BRAY, 1993). A maioria dos processos moleculares relacionados à seca envolve modificações transcricionais da expressão gênica. De acordo com Bray (2002), os produtos gênicos são divididos em dois grupos: (i) aqueles que regulam a expressão gênica e a transdução de sinal durante a resposta ao estresse e (ii) aqueles que protegem diretamente as células contra estresses ambientais.

Vários autores têm conseguido identificar genes envolvidos com as rotas de resistência ao estresse hídrico. Nepomuceno et al. (2000) construíram uma biblioteca subtrativa de algodão e obteve um clone que apresentou homologia com uma NADP(H) oxidase, expressa somente na condição de estresse hídrico de um genótipo de algodão tolerante à seca. Jain et al. (2001), utilizando a técnica de *Differential Display*, obtiveram 43 transcritos de amendoim com resposta a esse mesmo tipo de estresse. Destes, doze foram submetidos à análise por *dot blot* e por comparação de expressão, dois foram indicados como marcadores moleculares para este caráter.

Em soja, Casagrande et al. (2001) identificaram seqüências homólogas a um ativador de transcrição, expresso na raiz da cultivar tolerante, o qual pode ser importante na identificação de um promotor de expressão desse gene específico para raiz de soja. Nas folhas da mesma cultivar, os autores encontraram uma seqüência homóloga com uma enzima *NADH desidrogenase*, que estão diretamente envolvidas na fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, tem papel chave no fornecimento de energia na célula (DEY e HARBORNE, 1997). A presença dessa enzima numa cultivar tolerante pode estar relacionada à produção de energia, cuja diferença na expressão pode ser devida à maior ou menor tolerância ao estresse hídrico.

Liu e Baird (2003), tentando identificar genes relacionados a estresse hídrico e salino em girassol, identificaram cinco seqüências de genes homólogos relacionadas a tais estresses, entre os quais: kinases, *Lyt B*, poliproteínas e outras ainda em estudo quanto às suas funções. As proteínas Kinase já foram estudadas quanto a sua ativação no mecanismo de resposta das plantas ao estresse hídrico. JONAK et al. (1996), estudando sinalização do estresse em plantas, reportaram que o gene *p44^{mmk4}* codifica para uma Kinase ativada por mitógenos, cuja via é ativada quando a planta encontra-se em estresse ao frio e a seca, contudo, não responde ao estresse por alta salinidade.

Dure (1993) e Bray (1993) procederam a estudos de genes que codificam para as proteínas LEA (proteína abundante da embriogênese tardia), em resposta de plantas a falta de água e consideraram que este grupo de genes está associado à adaptação das plantas à seca, cuja principal função está relacionada com a proteção de membranas e maturação de chaperonas. Embora a função das

proteínas LEA ainda não esteja bem esclarecida, sua estabilidade, afinidade por moléculas de água e abundância em organismos que toleram a desidratação, sugerem a importância de seu papel na tolerância à dessecação (Blackman et al., 1991). Dramé et al. (2007), constataram o acúmulo de proteínas LEA nas folhas de um genótipo de amendoim tolerante à seca, sugerindo seu envolvimento na tolerância ao estresse hídrico para esta cultura. A mesma situação foi observada em plantas transgênicas de arroz estudadas por Chandra-Babu et al. (2004).

Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki (1999) sugeriram que genes induzidos pela falta de água são ativados por duas rotas de percepção e transmissão do sinal de estresse, um ABA-dependente e outro ABA-independente, o que corrobora com estudos de Lang e Palva (1992), os quais relacionam os genes de resistência à seca com os indutores do fito-hormônio ácido abscísico (ABA). Lee et al. (2003) citam genes da família das histonas e de domínios ricos em leucina, estudados em *A. thaliana* como induzidos pelo déficit hídrico, embora, Ascenzi e Gantt, (1999) não tenham observado mudanças na resposta à seca, quando induziram genes *H1* da família das histonas no meristema apical de *A. thaliana* sob condição de estresse. Já em plantas transgênicas de tomate, Scippa et al. (2004) observaram redução da expressão dos genes dessa família quando submetidas a longos períodos de seca. De acordo com Bray (1993) a concentração de ABA é alterada em diferentes condições de seca e envolve complexas cascatas de eventos moleculares e isto explica as diferentes expressões dos genes envolvidos com este fito-hormônio e genes relacionados

Outro estudo associado à resposta à seca envolve produtos gênicos relacionados inicialmente a resposta ao choque térmico, os *HSP* (*Heat Shock Proteins*), inicialmente relacionados à prevenção das plantas contra a desnaturação de proteínas provocada pela desidratação celular causada pelo estresse hídrico (ZHU et al., 1993). Em algodão, Nepomuceno et al. (2002), utilizando a técnica de *differential display*, obtiveram seqüências homólogas com genes dessa família expressas em folhas de genótipos tolerante ao estresse hídrico. Estudo similar foi feito em soja por Harborne (1997), que obteve, entre outras seqüências, uma homóloga aos genes *HSP*, sugerindo aprofundamento de estudos sobre a participação desses genes nos mecanismos de tolerância ao estresse hídrico.

Em *Arabidopsis thaliana* foram encontradas proteínas da classe das arabinogalactanas (AGPs), que são proteoglicanas essenciais na regulação da expressão e na divisão celular (DING et al., 1997). Estas estão presentes nas folhas, raízes e caules de plantas superiores, sendo verificadas em estudos da expressão de genes submetidos a estresse abiótico (SHOWALTER, 2001). Em trigo e arroz, Faik et al. (2006), analisaram a expressão de genes dessa família em sementes e raiz e encontraram 70% de homologia dos genes estudados com genes de arabinogalactanas. Em estudos anteriores, Johnson et al. (2003), analisaram a repetição de seqüências *tags* (ESTs) das proteínas FLAs em *A. thaliana* e dividiram em grupos, onde FLA1, FLA2 e FLA8, podem estar envolvidas no desenvolvimento da planta e na resposta ao estresse abiótico.

Utilização de marcadores do tipo ISSR como ferramenta auxiliar no melhoramento de plantas

A técnica de ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), desenvolvida por Zietkiewicz et al. (1994) consiste na amplificação por PCR utilizando *primers* semi-arbitrários com oligonucleotídeos de 16-17 pb que anelam entre dois loci de regiões microsatélite (QUIAN et al., 2001). Essa técnica requer menor concentração de DNA que as técnicas de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) e possui as vantagens dos marcadores microsatélites (SSR), tais como: alto polimorfismo, reprodutibilidade, confiabilidade, baixo custo operacional e facilidade de manuseio (DJÉ et al., 2006).

A técnica de ISSR vem sendo empregada na identificação de cultivares em diversas espécies de plantas, como o arroz (JOSHI et al., 2000; QUIAN et al., 2001), feijão (AJIBADE et al., 2000), maçã (GOULÃO e OLIVEIRA, 2001), morango (ARNAU et al., 2003) e amendoim (RAINA et al., 2001).

Considerando que a tolerância à seca não é uma característica simples e que envolve um complexo de mecanismos para evitar ou tolerar períodos de déficit hídrico, investigar o comportamento fisiológico e molecular de plantas sob condição de estresse hídrico é imprescindível para o entendimento de como esses eventos acontecem. Os resultados então obtidos podem ser utilizados no

desenvolvimento de ferramentas para auxiliar nos processos de seleção dos programas de melhoramento.

O objetivo deste trabalho foi prospectar transcritos diferencialmente expressos em uma cultivar amendoim tolerante ao estresse hídrico por meio de marcadores do tipo ISSR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBADE, S.R.; WEEDEN, N.F.; CHITE, S.M. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, v.111, p.47-55, 2000.

ARNAU, G.; LALLEMAND, J.; BOURGOIN, M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification. **Euphytica**, v.129, p.69-79, 2003.

ALMEIDA, F.R. de F. Amendoim. **Agroanalysis**, v.3, p.26-27, 1996.

ASCENZI, R.; GANTT JS. Molecular genetic analysis of the drought-inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Molecular Biology**, v.41, p.159-169, 1999.

BLACKMAN, S.A.; WETTLAUFER, S.H.; OBENDORF, R.L.; LEOPOLD, A.C. Maturation proteins associated with desiccation tolerance in soybean seeds. **Plant Physiology**, Rockville, v.96, n.3, p.868-874, 1991.

BRAY, E.A. Classification of genes differentially expressed during water deficit stress in *Arabidopsis thaliana*: an analysis using microarray and differential expression data, **Annals of Botany**, v.89, p.803-811, 2002.

BRAY, E. A. Molecular responses to water deficit. **Plant Physiology**, v.4, n.103, p.1035-1040, 1993.

CARLEY, D.H.; FLETCHER, S.M. An overview of world peanut markets. In: PATTE, H.E.; STALKER, H.T. (eds.). Advances in peanut science. **American Peanut Research and Education Society**, p.554-577, 1995.

CASAGRANDE, E.C.; FARIAS, J.R.B.; NEUMAIER, N.; OYA, T.; PEDROSO, J.; MARTINS, P.K.; BRETON, M.C.; NEPOMUCENO, A.L. Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. **Revista Brasileira Fisiologia Vegetal**, v.13, n.2, p.168-184, 2001.

CHANDRA BABU, R.; ZHANG, J.; BLUM, A.; DAVID HO, T-H.; HO, WU, R.; NGUYEN, H.T. HVA1, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection, **Plant Science**, v.166, p.855-862, 2004.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Indicadores da Agropecuária**. Ano XVI, n.11 e 12, 2007.

CLAVEL, D.; SARR, B.; MARONE, E.; ORTIZ, R. Potential agronomic and physiological traits of Spanish groundnut varieties (*Arachis hypogaea* L.) as selection criteria under end of cycle drought conditions. **Agronomie**, v.24, p.101-111, 2004.

DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. **Plant Biochemistry**. Academic Press, San Diego, CA, 554p, 1997.

DING, L.; KANG ZHU, J. A role for arabinogalactan-proteins in root epidermal cell expansion. **Planta**, [v.203, n.3, p. 289-294, 1997](#).

DJÈ, Y.; TAHI, G.C.; ZORO, B.I.A.; MALICE, M.; BAUDOIN, J.P.; BERTIN, P. Optimization of ISSR markers for African edible-seeded *Cucurbitaceae* species genetic diversity analysis. **African Journal of Biotechnology**, v.5, n.2, p.83-87, 2006.

DRAMÉ, K.N.; CLAVEL, D.; REPELLIN, A.; PASSAQUET, C.; ZUILY-FODIL, YASMINE. Water deficit induces variation in expression of stress responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p.236-243, 2007.

DURAES, F.O.M., SANTOS, M.X., GUIMARÃES, C.T. Fenotipagem Associada à Tolerância a Seca em milho para uso em melhoramento, estudos genômicos e seleção assistida por marcadores. **Circular técnica, Embrapa sorgo e milho**, v.39, 2004, 17p.

DURE, L.I. Structural motifs in Lea proteins. In: CLOSE, T. J.; BRAY, E. A. (eds.) Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress. **Plant Physiology**, p.91-103, 1993.

FAIK, A.; ABOUZOUHAIR, J.; SARHAN, F. Putative fasciclin-like arabinogalactan-proteins (FLA) in wheat (*Triticum aestivum*) and rice (*Oryza sativa*): identification and bioinformatic analyses. **Molecular Genetic and Genomics**, v. 276, p.478-494, 2006.

FAO – Food and Agricultural Organization. Production of word peanut. Disponível em: www.fao.gov. Acesso em: 16 de dezembro de 2007.

FERNANDEZ, A., e. KRAPOVICKAS, A. Cromosomas y evolution en *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, v.8, p.187-220, 1994.

FNP. **Anuário da Agricultura Brasileira**. Amendoim, 2006. <http://www.fnp.com.br/prodserv/anuarios/index.php>. Acesso: 12 de dezembro de 2006.

FREITAS, S.M.; AMARAL, A.M.P. Alterações nas variações sazonais dos preços de amendoim nos mercados primários e atacadista, 1990-2001. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.32, n.5, p.45-54, 2002.

GERIK, T.J.; FAVER, K.L.; THAXTON, P.M. Late season water stress in cotton: Plant growth, water uses and yield. **Crop Science**, Madison, v.36, p.914-921, 1996.

GODOY, I.J.; MORAES, S.A.; ZANOTTO, M.D.; S, R.C. Melhoramento do amendoim. IN: **Melhoramento de espécies cultivadas**. BORÉM, A. (ed). Viçosa: UFV, p.51-93, 2005.

GODOY, I.J.; PEREIRA, J.C.V.N.A; MARTINS, A.L.M. Capacidade de produção de grãos e do óleo em linhagens e cultivares de amendoim. **Bragantia**, v.48, p.27-38, 1989.

GOULÃO, L.; OLIVEIRA, C.M. Molecular characterization of cultivars of apple (*Malus X domestica* Borkh.) using microsatellite (SSR and ISSR) markers. **Euphytica**, 122: 81-89, 2001.

GREGORY, W.C.; KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, M.P. Structure, variation, evolution and classification in *Arachis*. IN: **Advances in Legume Science**. Summerfield e Bunting (eds.). Kew, London, p.469-481, 1980.

GUIMARÃES, M.B. Eficiência reprodutiva em genótipos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) do tipo ereta e ramador em condições sequeiro. UFPB/CCA: Areia. 1993, 37p. (Monografia de graduação).

HARBORNE, J. B. Biochemical plant ecology. In P. M. Dey e J. B. Harborne (eds.) **Plant Biochemistry**, p.501-516, 1997.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola**. Disponível em: www.ibge.com.br. Acesso em 22 de outubro de 2007.

JAIN, A.K.; BASHA, S.M.; HOLBROOK, C.C. Identification of drought-responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L.). **Journal of Biotechnology**, v.4, n.2, p.59-67, 2001.

JOHNSON, K.L.; JONES, B.J.; BACIC, A.; SCHULTZ, C.J. The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of Arabidopsis. A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules. **Plant Physiology**, v.133, p.1911-1925, 2003.

JONAK, C.; KIEGERL, S.; LIGTERINK, W.; BARKER, P.J.; HUSKISSON, N.; HIRT, H. Stress signaling in plant: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, p.11274-1127, 1996.

JOSHI, S.P.; GUPTA, V.S.; AGGARWAL, R.K.; RANJEKAR, P.K.; BRAR, D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. **Theoretical Applied Genetics**, v.100, p.1311-1320, 2000.

KRAMER, P.J.; BOYER, J.S. **Water relations of plants and soils**. Academic Press, New York, 1995.

KRAPOVICKAS, A. *Arachis hypogaea* var. *hirsuta* y las relaciones transoceánicas precolombianas. **Anales de La Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**, v.50, p.211-216, 1998.

KRAPOVICKAS, A. El origen y dispersión de las variedades del maní. **Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria**, v.49, p.18-26, 1995.

KRAPOVICKAS, A.; GREGORY, W.C. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). **Bonplandia**, Corrientes, v.8, p.1-186, 1994.

LÅNG, V.; PALVA, E.T. The expression of a *rab*-related gene *rab18* is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. **Plant Molecular Biology**, v.20, p.951-962, 1992.

LEE YH, OH HS, CHEON CI, HWANG IT, KIM YJ, CHUN JY. Structure and expression of the *Arabidopsis thaliana* homeobox gene *Athb-12*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.284, p.133-141, 2003.

LIU, X.; BAIRD, W.V. Differential expression of genes regulated in response to drought or salinity stress in sunflower. **Crop Science**, v.43, p.678-687, 2003.

LOPES, B.F.; SETER, T.L.; Mc DAVID, C.R. Photosynthesis and water vapor exchange of pigeon pea leaves in responses to water deficit and recovery. **Crop Science**, Madison, v.28, p.141-145, 1998.

MÜLLER, J., BOLLER, T., WIEMKEN, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. **Plant Science**. v.112, p.1-9, 1995.

NEPOMUCENO, A.L.; OOSTEHUIS, D.M.; A.L., STEWART; D.M., TURLEY, R., NEUMAIER, N., FARIAS, J.R.B. Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induce during water deficit in cotton. **Brazilian Journal Plant Physiology**, v.14, n.1, p. 11-20, 2002.

NEPOMUCENO, A.L., STEWART, J.M., OOSTEHUIS, D.M., TURLEY, R., NEUMAIER, N., FARIAS, J.R.B. Isolation of a cotton NADP(H) oxidase

homologue induced by drought stress. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.7, n.35, p.1407-1416, 2000.

NOGUEIRA, R.J.M.C.; SANTOS, R.C. Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental: DEAg/UFPB**. Campina Grande, v.4, n.1, p.41-45, 2000.

PALLAS, J.E.; STANSELL, J.R.; KOSKE, T.J. Effects of drought on florunner peanuts. **Agronomy Journal**, v.71, p.853-858, 1979.

PASSIOURA, J.B. Drought and drought tolerance. IN: BELHASSEN, E. (ed.). **Drought tolerance in higher plants. Genetical, physiological and a molecular biological analysis**. Kluwer Academia Publiqui Dordrecht, p.1-5, 1997.

PEÑALOZA, A.P.S.; VALLS, J.F.M.; GUERRA, M. Caracterização citogenética de espécies brasileiras de *Arachis*. - **Anais do III SIRGEALG** - Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe; Londrina-PR, Brasil, 2001.

PLAUT, Z. Photosynthesis in plant/crops under water and salt stress. in: pessarakli, m. (ed.). **Handbook of Plant and Crop Stress**. New York, Marcel Dekker, p.587-603, 1994.

QIAN, W.; GE, S.; HONG, D.Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers. **Theoretical Applied Genetics**, v.102, p.440-449, 2001.

RAINA, S.N.; RANI, V.; KOJIMA, T.; OGIHARA, Y.; SINGH, K.P.; DEVARUMATH, R.M. RAPD and ISSR fingerprints useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietals identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. **Genome**, v.44, p.763-772, 2001.

ROCHA, M.B.; BARBOSA, M.Z. Aspectos econômicos da cultura do amendoim. **Agricultura em São Paulo**, São Paulo, v.37, p.101-166, 1990.

ROCKSTROM, J.; FALKENMARK, M. Semiarid crop production from a hydrological perspective: gap between potential and actual yield. **Plant Science**, v.19, p.319-346, 2000.

SANTOS, R.C. dos; GODOY, J.I.; FÁVERO, A.P. Melhoramento do amendoim. IN: **O agronegócio do amendoim no Brasil**. SANTOS, R.C. (ed). Embrapa. Campina Grande, p.123-192, 2005.

SANTOS, R.C.; CARLESSO, R. Déficit hídrico e os processos morfológicos e fisiológicos das plantas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola Ambiental**, Campina Grande, v.2, n.3, p.287-294, 1998.

SANTOS, R.C. dos; GUIMARÃES, M.B.; MORAES, J. de S.; BRITO, S. de F.M. **Fenologia, reprodução e crescimento de genótipos de amendoim do Nordeste brasileiro**. Campina Grande: Embrapa Algodão. 1997, 8p.

SCIPPA, G.S.; DI MICHELE, M.; ONELLI, E.; PATRIGNANI, G.; CHIATANTE, D.; BRAY, E.A. The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v.55, p.99-109, 2004.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Molecular responses to drought stress. In: Cold, Drought, Heat and Salt Stress in Higher Plants. **Biotechnology Intelligence unit**, Landes Company, USA, 1999.

SHOWALTER, A.M. Arabinogalactan proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.58, p.1399-1417, 2001.

TÁVORA, F.J.A.F.; MELO, F.I.O. Resposta de cultivares de amendoim a ciclos de deficiência hídrica: crescimento vegetativo, reprodutivo e relações hídricas. **Ciência Agrária**, v.22, p.47-60, 1991.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED. p.75-93/143-197, 2004.

TURNER, N. C. Techniques and experimental approaches for the measurement of plant water status. **Plant and Soil**, The Hague, v.58, p.339-366, 1981.

VALLS, J.F.M.; SIMPSON, C.E. New species of *Arachis* from Brazil, Paraguay and Bolivia. **Bonplandia**, v.14, p.1-2, p.35-63, 2005.

VIERSTRA, R.D. Proteolysis in plants: mechanisms and functions. **Plant Molecular Biology**, v.32, p.275-302, 1996.

ZAMSKI, E. e ZIV, M. Pod Formation and its geotropic orientation in the peanut, *Arachis hypogaea* L., in Relation to light and mechanical stimulus. **Annals of Botany**, v.40, p.631-636, 1976.

ZIETKIEWICZ, E.; RAFALSKI, A.; LABUDA, D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. **Genomics**, v.20, p.176-183, 1994.

ZHU, J.K.; SHI, J.; BRESSAN, R.A.; HASEGAWA, P.N. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DNA. **Journal Plant Cell**, v.5, p.341-349, 1993.

Capítulo II

Prospecting of transcripts expressed differentially in peanut submitted to water stress by cDNA-ISSR primers

Manuscrito enviado à revista:
Genetics and Molecular Biology (ISSN 14154757)

**Prospecting of transcripts expressed differentially in peanut submitted to water stress
by cDNA-ISSR primers**

Elizabeth Amélia Alves Duarte¹, Péricles de Albuquerque M. Filho¹, Rejane Jurema Mansur C. Nogueira² and Roseane Cavalcanti dos Santos³

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, PE, Brazil, 81-33206314, elizabethaad@gmail.com

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Biologia, Recife, PE, Brazil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Campina Grande, PB, Brazil

Abstract

Prospecting of differentially displayed genes was performed using ISSR primers in a drought-tolerant peanut variety submitted to water stress. RNA was collected when plants reached 49.7 % stomatal closure (measured through porometry) from leaves located in the upper third of the plant at 9:00 am. Reverse transcription was performed for each sample with the appropriate kit using ISSR primers. The same procedure was performed in the PCR, where each primer was again used with the respective c-DNA sample, which was re-amplified, linked into a plasmid vector and cloned into bacteria then sequenced. A total of twenty-nine differential display products were observed in down-regulated, up-regulated and activated conditions. The new (activated) transcripts were just found in the stressed samples. Among the sequences obtained and compared in databanks (*Arabidopsis thaliana* and *Arachis* databanks), four exhibited homology with known genes involved in metabolic pathways in response to abiotic and biotic factors.

Key words: differential display, peanut, abiotic stress

Introduction

The peanut is a crop of considerable economic expressivity worldwide. It is cultivated in a number of countries under the most diverse environmental conditions. The plant exhibits considerable plasticity in its physiological mechanisms, which enables it to adapt to environments with expressive climatic variations, especially in semi-arid regions, where a large area of production is concentrated (Beghin et al., 2006).

According to Boote et al. (1982), under conditions of water unavailability, the peanut triggers a genetic command to deepen its roots and extract water from a greater depth in order to contain desiccation during periods of low precipitation. Production, however, is reduced, as the absorption of water from a greater depth is insufficient in providing the entire evaporative demand of the crop.

Despite the ability of the peanut to tolerate semi-arid environments, water stress reduces growth, but depending on the timing, vegetative and reproductive growth may not be influenced in the same way. For example, drought early in the growing season of upright and runner genotypes has a relatively small effect on pod productions than it takes place during the phases of flowering through to the filling of the grains (Távora and Melo, 1991; Nogueira and Santos, 2000). According to Nogueira and Távora (2005), water deficit alters different physiological processes in plants, including an increase in diffusive resistance to water vapor through the closing of the stomata, thereby reducing transpiration and, consequently, the supply of CO₂ for photosynthesis. Many of these effects reflect adaptation mechanisms in the plants to the arid environment. Other mechanisms associated to drought tolerance have been reported, such as the capability of root growth or attributes linked to the plant phenology. Genotypes that have high partition coefficients (greater efficiency in the translocation of photoassimilates to the reproductive part), for example, tend to exhibit less tolerance to water stress (Nageswara et al., 1989).

In Brazil, the greatest area of peanut production is concentrated in the southeastern region. However, producers in the northeastern region have been increasingly peanut crop due to its short cycle, adaptation abilities and attractive market (Santos et al., 2005). Climatic adversity is constant in this region, especially regarding the distribution and amount of rainfalls. Thus, the selection of genotypes tolerant to the semiarid environment is a constant concern in genetic breeding developed by research companies. According to Miyasaka and Medina (1981), this abiotic component affects the efficiency of the photosynthesis process on the molecular level through the desiccation of the cytoplasm, as well as on the physiological level due to stomatal closure. As mechanisms of resistance and/or tolerance to biotic and abiotic factors are complex the molecular level, its study is essential to the understanding of physiological and biochemical responses when plants are submitted to these factors, as genes that may be associated to a combination of both.

A number of studies in the literature have identified crops that are resistant to biotic and abiotic stresses by means of molecular tools (Casa Grande et al., 2001; Gopalakrisna et al., 2001; Nepomuceno et al., 2002; Mishra et al., 2005; Rensink et al., 2005). In peanut crops, Jain et al, (2001) identified down and up-regulated transcripts from resistant and sensitive genotypes to water stress. Bertoli et al. (2003) identified genes involved in the mechanism of resistance to disease in varieties of *Arachis*. For genetic improvement, the identification of such genes can significantly contribute to the understanding of mechanisms associated to water stress and to serve as reliable molecular markers in studies involving screening processes.

A number of PCR-based methods have been adapted for the identification and characterization of genes that are differentially displayed, including Differential Display (DD), cDNA-AFLP and subtractive libraries to more sophisticated methods, such as

Microarray and SAGE. All have their own peculiarities, limitations, advantages and operational costs (Mishra et al., 2005).

The aim of the present study was prospecting differentially displayed genes through the PCR methods used in our routine procedures, by means of ISSR primers in peanut plants submitted to water stress.

Material and Methods

Material used and differentiation of treatments

The African peanut cultivar Senegal 55 437 was selected for the present study, due it is highly tolerant to semi-arid conditions, short cycle (75 to 85 days) and earliness (Boote et al., 1982, Távora and Melo, 1991; Nogueira e Santos, 2000). Seeds obtained from Embrapa Algodão (access CNPA 76 AM) were sown in pots containing previously corrected and fertilized soil, into a greenhouse the cultivation needs. Plants were irrigated daily for 25 days, at which point the treatments were differentiated into control (regular water supplementation, maintaining field capacity, 20 vases) and stressed (water suppression until achieving 50% stomatal closure, 20 vases). Transpiration and diffusive resistance were monitored daily using a LICOR dynamic equilibrium porometer (modelo LI/ 1600). By means of previous trials, at 9:00 am schedule was established for the analysis of expanded leaves located on the upper third of the main axis. On the fifth day following the suspension of irrigation, when the stressed plants had reached 49.7% stomatal closure in comparison to the control plants, leaves from the middle third were collected and duly conditioned in liquid nitrogen for the immediate extraction of total RNA.

RNA extraction and RT-ISSR reactions

Total RNA was extracted from fresh young leaves (1 g) using a Trizol reagent (Invitrogen) and RNase free. RNA purity and concentration were analyzed by denatured agarose gel (1.2%) measuring the absorbance at 260/280 nm.

The reverse transcription reaction was performed using the M-MLV kit (Invitrogen) with the addition of 2.5 μL (10 pmoles/ μL) of each primer (Table 1), 1.25 μL of dNTP 10 mM, 1 U M-MLV enzyme and 100 ng of RNA for a final volume of 20 μL as described by manufacturer's instructions. PCR amplifications were performed in 50 μL of reaction mixtures containing the following reagents: 5 μL of cDNA, 10 μM of primer, 1 Unit of Taq DNA polymerase, 0.25 mM of each dNTP, 25 mM of MgCl_2 and 1x reaction buffer supplied with the enzyme (Invitrogen). Ten ISSR primers from the UBC series (University of British Columbia) were used. The PCR program was performed in a (Mastercycler gradient, Eppendorf) programmed as follows: an initial heating at 95 °C/ 5 min, 30 cycles of denaturing at 94 °C/ 30s, annealing at 48 °C/45 s, extension at 72 °C/ 2 min and a final extension cycle at 72 °C/7 min. The ISSR amplification products were mixed with equal volumes of loading dye (98% formamide, 10 mM EDTA, and 0.05% xylene cyanol) and Sybr gold (Invitrogen) and load on agarose gel (0.8%). A 1 Kb marker (Ladder plus, Invitrogen) was included to estimate band sizes. After that the gel was analyzed under UV light and digitally photo-documented (Vilber Lourmai).

Purification of samples and cloning

Amplified fragments from the active transcripts in the stressed plants were purified from the gel using the SNAP kit (Invitrogen). One 3 μL aliquot (20 ng/ μL) was used for cloning in the pGEMT-Easy vector (Promega) and the reaction incubated at 4 °C overnight. Transformants were obtained from *Escherichia coli*, INF α cell (Invitrogen) by

thermal shock, and the plasmid DNA (miniprep) was performed using the Wizzard kit (Promega). All molecular procedures were performed according to manufacturer's recommendations.

Sequencing and Analysis

One aliquot of each miniprep (20 ng/ μ L) was sent for sequencing at the Human Genome Research Center, of the Universidade de São Paulo, Brazil. The nucleotide sequences obtained from the sequencing of the active transcripts were analyzed using the BLASTN program (Basic Local Alignment Search Tool) from the National Center for Biotechnology Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), focusing on the available *Arabidopsis thaliana* and *Arachis* databanks and aligned in ClustalX 1.87

Results

Twenty-nine fragments were obtained from the ISSR primers used in the present study. Seventeen were down regulated (C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8 and C9; Figures 1-A, 1-B and 1-C); two were up regulated or induced (E1 and E7; Figures 1-A and 1-C, respectively); and ten were activated (E1, E2, E4, E5, E7 and E8; Figures 1-A, 1-B and 1-C). Primer 827 generated the greatest number of transcripts – four down regulated, one up-regulated and one activated. However, the greatest number of activated transcripts was obtained with primer 846 (Table 1). Both primers are rich in AC repetitions. No discernible band was detected with primer 838.

Among the activated transcripts sequenced, just four genes were involved in stress mechanism pathways when compared to the *A. thaliana* and *Arachis* databanks. Table 2 displays a summary of the main results obtained from the sequenced transcripts.

The transcript obtained with primer 812 (t812) aligned with a class of TIR-NBS-LRR proteins from *A. thaliana* (NM123889), with lysine-rich motifs, and is involved in plant defense processes against disease. The same was obtained with transcript t884 (NM128455). Transcript t808 aligned with a gene that codifies for arabinogalactan proteins (AGPs) from the glycoprotein family (Figure 2) and t846 aligned with proteins from the hydrolase family (peptidyl-tRNA), both from *A. thaliana*. When compared in the *Arachis* databanks, however, only transcripts t884 and t846 aligned with genes involved in biotic stress pathways, both linked to disease resistance factors of the type PLTR (AY747418) and NBS (AY157777), respectively.

Discussion

The submission of plants to a particular stress condition triggers a specific response related to the current state of the plant, generating biochemical and physiological processes that are interrelated to the event in question. Regarding the molecular aspect, Mittler (2006) reports that, for each stress condition to which the plant is subjected, a unique response is generated and little overlapping in the display of transcripts is found when stress conditions are of an abiotic origin, caused by heat, drought, cold, salinity, high temperature or mechanical damage. There are cases, however, in which gene pathways involved in events of a biotic origin coincide with abiotic events, generating common pathways for both types of stress. This is the case, for example, of the *Ros* genes (Reactive Oxygen Species) identified in *A. thaliana*, which act in association under both stress conditions. According to Barcelo and Poschenrieder (1990), plants submitted to water stress associated to high temperatures generate high production of *Ros* due to these conditions limit the availability of CO₂ in the dark reaction, leaving oxygen as one of the main reactive products of the photosynthesis.

In the present study, peanut plants were submitted to water stress with the aim of identifying differentially displayed transcripts related to the event. From the results obtained by sequencing, it was verified that most of the transcripts were associated to biotic stress, particularly resistance to disease. Differences in the level of genetic expression were observed in some transcripts that exhibited more intense band patterns in the control samples when compared to the stressed samples. These transcripts were reported as down regulated and, according to Nepomuceno et al. (2002), qualitative and quantitative differences in gene expression may occur depending on the level of stress tolerance. Mason et al. (1988) report that in such cases, water stress may suppress the synthesis of mRNA, thereby affecting the amount of protein synthesized. The opposite was also observed, when bands exhibited low regulation in the control samples and high regulation in the stressed ones.

The main focus of the present study, however, was centered on activated transcripts; the regulation of which is presumed to be associated to the event in question. The results verified here were relevant to the understanding of how stress-related events may be associated. The genes that codify the NBS-LRR class protein (partially identified in transcripts t812 and t884) are associated to genes of resistance to biotic stress in superior plants (Bent, 1996; Meyers et al., 1999) as well as the response to hypersensitivity involving programmed cell death (Tameling et al., 2002). This last event may be related to the effect of the stress to which the peanut plants were submitted. On the other hand, arabinogalactan proteins (AGPs), was partially identified with the transcript t808 this protein, belong to a structural class present in the leaves, stems and roots of all superior plants (Showalter, 2001) and constitute a class of proteoglycans that are essential to the regulation of expansion and cell division (Schindler et al., 1995). The functions of AGPs may be associated to the regulatory processes initiated during the loss of water from the

cell when the cellular metabolism is adjusted (Bray, 1997) and the genes induced in this event promote an increase in the protection of the cytoplasm, organelles and cell membranes as well as alterations in cell osmotic potential and a greater regulation of the expression of other genes (Bray, 1997; Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki., 1999). Thus, the homology of transcript t808 with proteins directly involved in cell adjustment processes suggests a possible relationship with genes associated in the water stress response pathway.

Figure 2 illustrates a short stretch of transcript t808 aligned with the sequence that codifies for the AGP10 protein of *A. thaliana* (NM 116972), which matched in 53% in 5'stream of the gene. For further studies aiming to obtain the complete gene sequence, which is composed of 584 bp, specific primers can be designed, seeking to use some nucleotides degenerated due to gaps in the *Arabidopsis* sequence.

The results obtained from ISSR primers in the present study were useful to the identification of differentially displayed products when plants were submitted to water stress and the understanding of the inter-relations of how biotic and abiotic events may be associated.

References

Barcelo J and Poschenrieder C (1990) Plant water relations as affected by heavy metal stress: A review. *Journal Plant Nutrition* 13:1-37.

Beghin J, Diop N and Matthey H (2006) Groundnut trade liberalization: Could the South help the South? *World development*. Elsevier 34:1016-1036.

Bent AF (1996) Plant disease resistance genes: Function meets structure. *The Plant Cell* 8:1757-1771.

Bertioli DJ, Leal-Bertioli SCM, Lion MB, Santos VL, Pappas Jr G, Cannon SB and Guimarães PM (2003) A large scale analysis of resistance gene homologues in *Arachis*. *Molecular Genetics Genomics* 270:34-35.

Boote KJ, Stansell JR, Schubert AM and Stone JF (1982) Irrigation, water use and water relation. In: Patee HE and Young CT (eds) *Peanut Science and Tecnology* 7:164-205.

Bray EA (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Science* 2:48-54.

Casagrande EC, Farias JRB, Neumaier N, OYA T, Pedroso J Martins PK, Breton MC and Nepomuceno AL (2001) Expressão gênica diferencial durante déficit hídrico em soja. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 13:168-184.

Gopalakrishna R, Kumar G, KrishnaPrasad PT, Mathew MK and Udaya Kumar M (2001) A stress-responsive gene from groundnut, *Gdi-15* is homologous to flavonol 3-O-glucosyltransferase involved in anthocyanin biosynthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 284:574-579.

Jain AK, Basha SM and Holbrook CC (2001) Identification of drought-responsive transcripts in peanut (*Arachis hypogaea* L.) *Journal of Biotechnology* 4:59-67.

Mason HS, Guerreo FD, Boyer JS and Mullet JE (1988) Proteins homologous to leaf glycoproteins are abundant in stem os dark grow soybean seedlings. *Plant Molecular Biology* 11:193-201.

Meyers BC, Dickerman AW, Michelmore RW, Sivaramakrishnan S, Sobral B and Young ND (1999) Plant disease resistance genes encode members of an ancient and diverse protein family within the nucleotide-binding superfamily. *Plant Journal* 20:317-332.

Miyasaka S and Medina JC (1981) *A soja no Brasil*. 1st edition. ITAL, Campinas, 1062pp.

Mishra RN, Ramesha A, KAUL T, Nair S, Sopory SK and Reddy MK (2005) A modified cDNA subtraction to identify differentially expressed genes from plants with universal application to other eukaryotes. *Analytical Biochemistry* 345:149-157.

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11:15-19.

Nageswara RRC, Williams JH and Singh M (1989) Genotypic sensitivity to drought and yield potential of peanut. *Agronomy Journal* 81:887-893.

Nepomuceno AL, Oosterhuis D, Stewart JM, Turley R, Neumaier N and Farias JRB (2002) Expression of heat shock protein and trehalose-6-phosphate synthase homologues induced during water deficit in cotton. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 14:11-20.

Nogueira RJMC and Távora FJAF (2005) Ecofisiologia do amendoim (*Arachis hypogaea*) IN: *O agronegócio do amendoim no Brasil*. Santos RC (ed). Embrapa. Campina Grande, pp 71-122.

Nogueira RJMC and Santos RC (2000) Alterações fisiológicas no amendoim submetido ao estresse hídrico. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 4:41-45.

Rensink W, Hart A, Liun J, Ouyang S, Zismann V and Robin Buell C (2005) Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome* 48:598-605.

Santos RC, Godoy JI and Fávero AP (2005) Melhoramento do amendoim. In: Santos RC (ed) O agronegócio do amendoim no Brasil. Embrapa, Campina Grande, pp 123-192.

Schindler T, Bergfeld R and Schopfer P (1995) Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not extension growth. *Plant Journal* 7:25-36.

Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki K (1999). Molecular responses to drought stress. In: Shinozaki K and Yamaguchi-Shinozaki Y (ed) Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants. Austin, Texas: RG Landes, pp 11-28.

Showalter AM (2001) Arabinogalactan proteins: structure, expression and function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 58:1399-1417.

Tameling WIL, Elzinga SDJ, Darmin PS, Vossen JH, Takken FLW, Harling MA and Cornelissen B (2002) The tomato R gene products I-2 and *Mi-1* are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 4:2929-2939.

Távora FJAF and Melo, FIO (1991) Resposta de cultivares de amendoim a ciclos de deficiência hídrica: crescimento vegetativo, reprodutivo e relações hídricas. *Ciência Agrária* 22:47-60.

TABLE 1. ISSR primers used in differential display and number of transcript identified in peanut plants submitted to water stress

<i>rimers</i> (UBC)	Sequence	Down regulated	Up regulated	New transcripts
1- 827	5'- ACACACACACACACACG -3'	04	01	01
2- 884	5'- H ¹ B ² HAGAGAGAGAGAGAG -3'	01	-	01
3- 813	5'- CTCTCTCTCTCTCTTT -3'	03	-	-
4- 820	5'- GTGTGTGTGTGTGTGTC -3'	01	-	01
5- 808	5'- AGAGAGAGAGAGAGAGC -3'	02	-	02
6- 874	5'- CCCTCCCTCCCTCCCT -3'	01	-	-
7- 812	5'- GAGAGAGAGAGAGAGAA -3'	01	01	02
8- 846	5'- CACACACACACACACAR ³ T -3'	02	-	03
9- 858	5'- TGTGTGTGTGTGTGTGR ³ T -3'	02	-	-
10- 838	5'- TATATATATATATATAR ³ C -3'	-	-	-
Total	10	17	02	10

Degenerated bases: H¹: A, C or T; B²: C, G or T; R³: A or G

TABLE 2. Result of BLAST sequence alignment obtained by active transcripts from cDNA-ISSR differentially displayed in peanut plants submitted to water stress.

Clone (length bp)	NCBI accession	Similar gene/ protein	E-value	Identity max. (%)
812 (400)	NM123889.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	0.069	82
808 (700)	NM116972.4	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGP10 (Arabinogalactan protein 10)	0.025	80
884 (400)	NM128455.2	<i>Arabidopsis thaliana</i> leucine-rich repeat protein kinase	0.73	84
	AY747418.1	<i>Arachis hypogaea</i> isolate PLTRP2G09 resistance protein PLTR gene	0.62	76
846 (300)	NM001085124.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> peptidyl-tRNA hydrolase family protein	0.28	84
	AY157777.1	<i>Arachis cardenasii</i> clone C8_Y_57 resistance protein gene	0.88	80

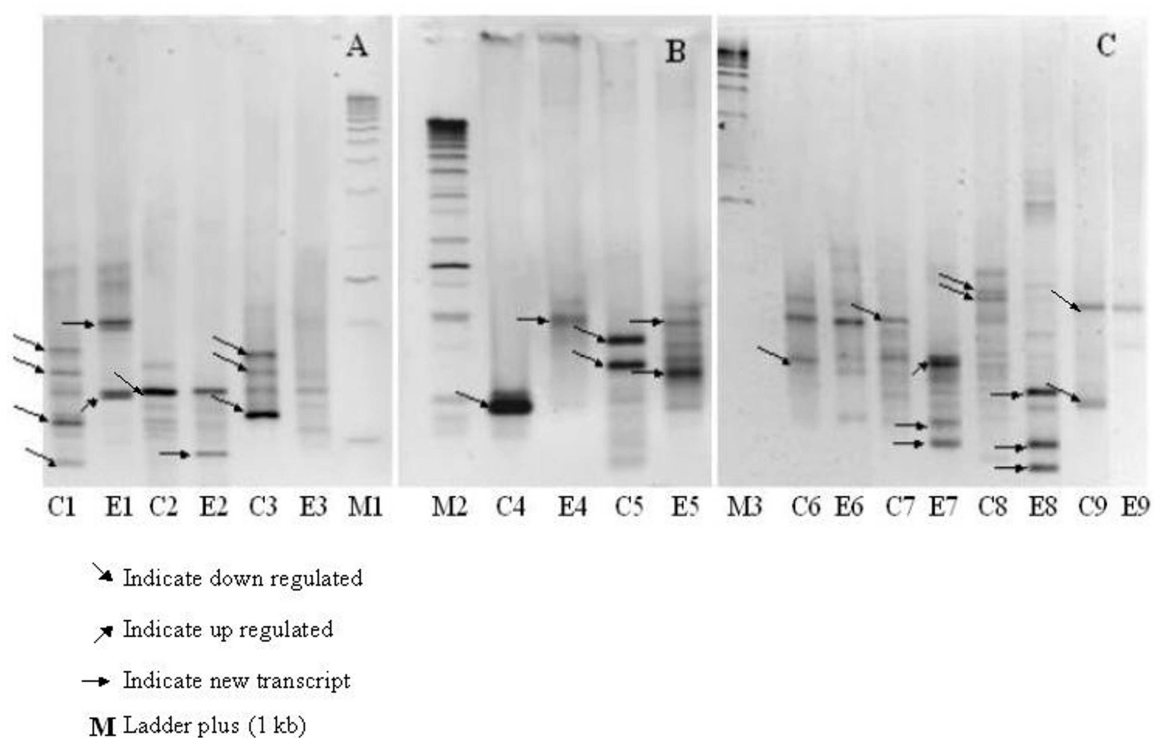


FIGURE 1. cDNA-ISSR products visualized in agarose gel (0.8%), obtained by differentially displayed transcripts in peanut plants submitted to water stress (E) and control (C). ISSR primers: 1-827, 2-884, 3-813, 4-820, 5-808, 6-874, 7-812, 8-846, 9-858, 10-838.

```
      **  *** * *  *** * * * *  ***** *  * * * *  *** * *  * * * * *  **  **  
808      CTACAATTATCCATGCCTTTAGTTTGTTCGTGTTAATTGTTTATTCATTGGTGTGATGTAGTGCTAGCTATGACCTACTGCAAATTA  
NM116972 TTATTTTAAATCTTTGGTTTTATGTTGTATTAAGAATTGAGTTAGCGTTTGGACCATAGAATTAAATCATTAAATCATATGTGTTTT
```

FIGURE 2. Partial alignment of the transcript t808 with the sequence NM116972.4 of *Arabidopsis* that codifies for arabinogalactan protein

CONCLUSÕES GERAIS

CONCLUSÕES GERAIS

1. Marcadores do tipo ISSR podem ser utilizados para identificação de transcritos diferencialmente expressos em plantas de amendoim submetidas a estresse hídrico
2. O gene envolvido com a síntese da proteína Arabinogalactana 10 pode ser utilizado como marcador molecular para trabalhos de seleção de genótipos de amendoim resistentes à seca

Anexo

Instruções para publicação na revista: Genetics and Molecular Biology

INTRUÇÕES PARA AUTORES

GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY

SCOPE AND POLICY

Genetics and Molecular Biology (formerly named Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics - ISSN 0100-8455) is published quarterly by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The Journal considers contributions that present the results of original research in genetics, evolution and related scientific disciplines. Although Genetics and Molecular Biology is an official publication of the Brazilian Society of Genetics, contributors are not required to be members of the Society.

It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been and will not be published elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries.

Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal as judged by the Editor in conjunction with the Editorial Board are reviewed by the Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript.

SUBMISSION OF PAPERS

1. Manuscripts should be submitted to:

Angela M. Vianna-Morgante, Editor-in-Chief

Genetics and Molecular Biology

Rua Capitão Adelmio Norberto da Silva, 73614025-670, Ribeirão Preto, SP/ Brasil

2. A submission package sent to the Editorial Office must contain:

a) A cover letter signed by all authors stating that they have approved the submission of the manuscript and that the findings have not been published or are not under consideration for publication elsewhere.

b) A hard copy of the manuscript, including original figures.

c) A copy of any unpublished or in-press companion articles referred to in the submission.

d) An electronic copy of the text, tables and figures. Formats for text are Word or RTF, in Windows platform. Images in TIFF or JPEG formats should be sent in separate files (For Figures see detailed instructions in 3.1.h). Mailed disks must be labeled with the first author's last name; platform and software (see detailed)ins

3. Categories of Contribution

3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout, including the References Cited section, appendices, tables and legends; printed on one side only of A4 paper with 2.5 cm margins; marked with consecutive page numbers, beginning with the cover page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) The title page: Must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province and country; different affiliations indicated with superscript numbers; a short running title of about 35 characters, including spaces; up to five key words; the corresponding author's name, postal address, phone and fax numbers and email address. The corresponding author is the person responsible for checking the page proofs, arranging for the payment of color illustrations and author's alteration charges.

b) The Abstract: Must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) The text: Must be as succinct as possible. Text citations: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names; in citations with three or more authors, name the first

author and use et al. List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (et al. should not be used). Numbers: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Avoid starting a sentence with a number. Binomial Names: Latin names of genera, species and intraspecific taxa in the text must be printed in italics; names of orders and families should appear in the Title and also when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately after the References Section, not in the text. URLs for citations of publications in electronic journals should appear in the reference section.

The text includes the following elements:

Introduction – Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods – Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results – Undue repetition in text and tables should be avoided. Comment on significance of results is appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion – The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

d) The Acknowledgments: Must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.

e) The References Section: Section: references must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. Use standard abbreviations for journal titles.

Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted to a publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. "Personal communication" refers to individuals other than the authors of the manuscript being submitted; "unpublished data" refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript being submitted.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angela* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The $X_1X_1X_2X_2:X_1X_2Y$ sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophtalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 pp.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In Gersen SL and Keagle MB (eds) The Principles of Clinical Cytogenetics. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample Electronic Article citation:

Simin K, Wu H, Lu L, Pinkel D, Albertson D, Cardiff RD and Van Dyke T (2004) pRb inactivation in mammary cells reveals common mechanisms for tumor initiation and progression in divergent epithelia. Plos Biol 2:194-205. <http://www.plosbiology.org> .

f) Internet Resources Section: This section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, software programs and other Internet resources used during data processing. When databases are cited, date of consultation must be stated.

Sample Internet Resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2005)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm

g) Tables: Each table must start on a new page. A concise title should be provided above the table. Tables must be numbered consecutively in Arabic numerals. Each column must have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript numbers.

h) Figures: Must be numbered consecutively in Arabic numerals. Legends should be typed on a separate sheet. A set of original illustrations of the highest quality must be provided in glossy paper. If you have created figures electronically submit them also as hard copies. Scanned figures should not be submitted. Images should be in TIFF or JPEG format and provided in separate files. Figures in Word format cannot be published. Journal quality reproduction will require grayscale and color at resolution yielding 300 dpi. Authors should submit bitmapped line art at resolution yielding 600-1200 dpi. These resolutions refer to the output size of the

file; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Identify each illustration by affixing on the back a label containing: the number of the figure, the name of the first author and an arrow indicating top of illustration. Illustrations supplied on disks must follow instructions in item 2 (Submission package). Color illustration can be accepted, but authors are asked to defray the cost. For costs of color figures, check with the Editorial Office.

i) Nomenclature: Should adhere to current international standards.

j) Sequences: May appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases. The accession number must be provided and released to the general public together with publication of the article. Long sequences requiring more than two pages to reproduce will not be published unless the Editorial decision is that the publication is necessary. Complete mtDNA sequence will not be published.

k) Data access: Reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

l) Ethical issues: Reports of experiments on live vertebrates must include a brief statement that the institutional review board approved the work. For experiments involving human subjects, authors must also include a statement that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must accompany the manuscript.

3.2 Short Communications: Present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited. They should include an Abstract no longer than five percent of the paper's length and no further subdivision with introduction, material and methods, results and discussion in a single section. Up to two tables and two figures may be submitted. The title page and reference section format is that of full-length article.

3.3 Letters to the Editor: Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.4 Review Articles: Are welcome.

3.5 Book Reviews: Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.6 History, Story and Memories: Accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Proofs: Page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from printer's errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

5. Reprints: Reprints are free of charge and provided as a pdf-file.