

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A DORMÊNCIA EM
SEMENTES DE AMENDOIM**

MARIA DE FÁTIMA CAETANO DA SILVA

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA

CAMPINA GRANDE, PB

FEVEREIRO, 2018

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A DORMÊNCIA EM
SEMENTES DE AMENDOIM**

MARIA DE FÁTIMA CAETANO DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/Área de Concentração: Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Roseane Cavalcanti dos Santos

CAMPINA GRANDE - PB

FEVEREIRO, 2018

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

S586r Silva, Maria de Fátima Caetano da.
Relação entre a expressão gênica e a dormência em sementes de amendoim [manuscrito] : / Maria de Fátima Caetano da Silva. - 2018.
47 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2018.

"Orientação : Profa. Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, Embrapa Algodão."

1. *Arachis hypogaea*. 2. Amendoim. 3. Regulação gênica.
4. Ensaio fisiológico.

21. ed. CDD 633.368

**RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A DORMÊNCIA EM
SEMENTES DE AMENDOIM**

MARIA DE FÁTIMA CAETANO DA SILVA

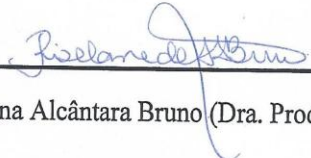
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Agrárias da Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ciências Agrárias/Área de Concentração: Melhoramento Vegetal e Biotecnologia.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2018


Banca Examinadora:



Prof.ª Josemir Moura Maia (Dr. Bioquímica Vegetal - UEPB)



Prof.ª Riselane de Lucena Alcântara Bruno (Dra. Producción Vegetal Fitotécnica - UFPB)



Prof.ª Roseane Cavalcanti dos Santos, Embrapa Algodão

Orientadora

A Deus, por guiar todos os meus caminhos e minha família

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Agrárias, à Embrapa Algodão, aos professores do curso e secretário do curso (Danilo Cavalcante), e a CAPES pela oportunidade de capacitação e bolsa concedida.

A Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos, pela orientação e todas oportunidades e experiência repassadas para minha capacitação profissional. A Dra. Liziane Maria e Carliane Rebeca, pela disponibilidade e receptividade nas várias etapas do trabalho.

Aos amigos, Aline Oliveira, Taiza Soares e Jean Pierre pela ajuda, disponibilidade e companheirismo.

A toda equipe técnica do laboratório de Biotecnologia da Embrapa Algodão, em especial, Terezinha Duarte, Fábiana Suely, Dione Márcia, Jacilane Fernandes, Juarez Berto, e Joabson Borges, pelo suporte técnico nas análises laboratoriais.

Aos amigos de curso Samara Lima, Aline Dayanna, Geovana Priscila e Eugênio Júnior, pela convivência, trocas de conhecimentos e apoio. A amiga, Flávia Ferreira, por todos os momentos de convivência, amizade, apoio e carinho, e demais colegas.

Aos colegas de convivência no trabalho, do Laboratório de Biotecnologia, durante a condução desse trabalho: Bruno, Allef, Bárbara, Daniela, Geise, Luana, Marília, Misael, Nina, Silmara, Valeska, Vandré, Wellison e Anderson.

A Francisco Júnior, meu agradecimento especial pelo companheirismo e suporte emocional, e a minha família.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Objetivo Geral	15
1.2 Objetivos Específicos	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Classificação das sementes e armazenamento.....	16
2.2 Aspectos bioquímicos e moleculares da dormência nas sementes	20
2.3 A dormência nas sementes do amendoim.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1 Fenotípagem dos genótipos de amendoim.....	26
3.2 Análises de expressões relativas via RT-qPCR.....	28
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Fenotípagem dos genótipos de amendoim <i>fastigiata</i> e <i>hypogaea</i>	30
4.2 Expressão relativa dos genes <i>NCED</i> , <i>ARP</i> e <i>DMRI</i>	33
5. CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Genótipos de amendoim tipos botânicos *hypogaea* e *fastigiata* 27
- Tabela 2.** Sequência de oligonucleotídeos específicos e constitutivos utilizados no ensaio 29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática da elongação da transcrição de genes envolvidos na dormência de sementes, focalizando no *DOG1* 22
- Figura 2.** Dias de germinação, taxa de germinação, altura da plântula e teor de óleo das sementes de genótipos eretos e rasteiros de amendoim. T0, T1 e T2 significam os períodos em que as sementes foram avaliadas, aos 30, 150 e 240 dias após o início do armazenamento a temperatura ambiente. 31
- Figura 3.** Expressão relativa dos genes *NCED*, *ARP* e *DMR1* nos tecidos embrião (E) e cotilédone (Cot) dos genótipos de amendoim rasteiro e ereto. A barra de erro indica o desvio padrão. 35

RESUMO

SILVA, MARIA DE FÁTIMA CAETANO DA. M. Sc.; Universidade Estadual da Paraíba/Embrapa Algodão; Fevereiro de 2018; RELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO GÊNICA E A DORMÊNCIA EM SEMENTES DE AMENDOIM; Roseane Cavalcanti dos Santos (Orientadora).

O amendoim (*Arachis hypogaea*) é uma importante oleaginosa para o setor alimentício devido ao elevado valor nutricional e de óleo. A lavoura é conduzida com genótipos eretos e rasteiros que atendem aos mercados de alimento e óleo. Os genótipos rasteiros são de elevada produtividade, porém as sementes possuem elevado nível de dormência, cujo processo é desencadeado devido a alguns processos metabólicos que impedem a síntese de proteínas e transporte de reservas para o embrião. A regulação envolve vários genes que atuam ativando ou reprimindo a ação de hormônios endógenos, como os genes da família *ARP* (*auxin repressor protein*) e *DMRI* (*Dormancy-associated gene 1*) que estão diretamente envolvidos com a atividade da auxina em algumas espécies. Eles regulam a síntese da auxina, que é um fito-hormônio responsável pelo desenvolvimento e crescimento das plantas. Já o gene *NCED* (*9-cis-epoxy-carotenoide dioxigenase*) é responsável por regular a síntese do ácido abscísico (ABA), que também está relacionado ao crescimento vegetal e a dormência de sementes. Com intuito de investigar o envolvimento da expressão de genes associados à dormência em sementes de amendoim a partir de genótipos fenotipados realizou-se o presente trabalho. Os ensaios foram conduzidos adotando-se ensaios fisiológicos e moleculares, baseando-se em genótipos previamente fenotipados para o caráter de dormência. Nos ensaios fisiológicos foram adotados os seguintes descritores: porcentagem de germinação, comprimento da plântula e o tempo em dias que as sementes levaram para germinar, avaliados em três repetições para cada genótipo. Os ensaios moleculares constaram de expressão semiquantitativa RT-PCR e quantitativa RT-qPCR. Verificou-se elevada expressão de *NCED* e *ARP* em embriões dos genótipos rasteiros, IAC

Caiapó e LGoPE-06, confirmando a relação dos genes com a dormência de sementes. A expressão de *DMRI* foi mais elevada no cotilédone dos genótipos eretos, L7 Bege e BR 1. *NCED* se configura em um confiável marcador molecular para auxiliar na identificação de dormência em genótipos rasteiros de amendoim.

Palavras-chave: *Arachis hypogaea*, regulação gênica e ensaios fisiológicos.

ABSTRACT

Peanut (*Arachis hypogaea*) is an important oleaginous for the food sector due to the high nutritional value of grains and oil. The crop is grown with upright and runner cultivars that attend the food and oil markets. The runner genotypes are high yield, but the seeds often have high level of dormancy, whose process is triggered due to some metabolic steps that prevent the synthesis of proteins and transport of reserves to the embryo. The regulation involves several genes that act by activating or repressing the action of endogenous hormones, such as *ARP* (auxin repressor protein) and *DMRI* (Dormancy-associated gene 1) family genes that are directly involved with auxin activity in some species. Both regulate the auxin synthesis, whose hormone is responsible for plant development and growth. The *NCED* (9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase) is responsible for regulating of ABA synthesis, which is also related to plant growth. This work was aimed to investigate the involvement of the expression of genes associated with dormancy in peanut seeds. The assays were carried out by using genotypes previously phenotyped for dormancy traits, adopting physiological and molecular tests. In the physiological assays, the following descriptors were used: percentage of germination, length of seedlings and time in days that the seeds took to germinate, evaluated in three replicates for each genotype. The molecular assays consisted of semiquantitative (RT-PCR) and quantitative (RT-qPCR) procedures. We found high expression of *NCED* and *ARP* in embryos of IAC Caiapó and LGoPE-06, both runner genotypes, confirming the relationship of genes with seed dormancy. The expression of *DMRI* was higher in the cotyledon from upright genotypes, L7 Bege and BR

1. *NCED* is a reliable molecular marker to assist in the identification of dormancy in peanut genotypes.

Key words: *Arachis hypogaea*, gene regulation, physiological traits

1. INTRODUÇÃO

As sementes são estruturas reprodutivas, responsáveis pelo armazenamento de todas as informações e características genéticas das plantas de propagação sexuada. A dispersão, desenvolvimento e reprodução das sementes são elementos fundamentais para manter a perpetuação das espécies vegetais. No aspecto reprodutivo, as sementes enfrentam vários dispositivos fisiológicos, morfológicos ou bioquímicos que podem facilitar ou dificultar sua emergência. Apesar dos vários trabalhos atualmente existentes na literatura reportando sobre esses temas, a recalcitrância e a dormência são um dos mais estudados porque, dependendo da espécie vegetal, pode limitar a uniformização da lavoura, implicando em depreciação do produto no mercado (NAMBARA e NONOGAKI, 2012).

A dormência é um processo natural a várias espécies, podendo ser de curto ou longo prazo. Nesse último caso, pode comprometer a viabilidade das sementes em termos de emergência e desenvolvimento inicial da plântula devido à redução do crescimento embrionário, mesmo sob condições favoráveis para a germinação (FINCH-SAVAGE, W. E. e LEUBNER-METZGER, 2006). A dormência pode ser de natureza primária ou secundária e classificada em dois grupos: tegumentar (exógena) ou embrionária (endógena). A dormência tegumentar restringe a embebição e/ou expansão do embrião e as trocas gasosas, desenvolvida na maturação da semente ainda na planta mãe induzido pela ação do ABA, enquanto que a endógena, bloqueia a germinação, podendo ser causada por inibidores químicos, pela imaturidade do embrião ou

dormência fisiológica não profunda do próprio embrião (FINCH-SAVAGE, W. E. e LEUBNER-METZGER, 2006; SHELAR et al., 2014).

A dormência em sementes é um processo regulado por uma série de hormônios, tais como Auxinas e ABA, cuja biossíntese é regulada por genes de regulação negativa e positiva, dentre eles *ARP* (*auxin repressor protein*), *DMRI* (*Dormancy-associated gene 1*) e *NCED* (*9-cis-epoxy-carotenóide dioxigenase*), entre outros. Os genes *ARPI* e *DMRI* são responsáveis por regular negativamente a biossíntese de auxina que possui elevada expressão em tecidos dormentes. Já o gene *NCED* tem papel chave na biossíntese do ABA, hormônio também responsável pela dormência (BRADY e McCOURT, 2003). Lee et al. (2013) reportam que em *Brassica rapa* os genes *ARP* e *DMRI* estão envolvidos na manutenção da dormência e interrupção do crescimento.

As plantas pertencentes à família Fabaceae possuem várias espécies com histórico de dormência devido aos aspectos biológicos das sementes, como por exemplo, *Phaseolus*, *Pisum*, *Glycine*, *Arachis*, entre outras (VENIER et al., 2012, BEWLEY et al., 2013).

O amendoim (*Arachis hypogaea* L.) é uma oleaginosa amplamente conhecida pelas suas propriedades nutricionais. A espécie *Arachis hypogaea* é dividida em duas subespécies, *hypogaea* e *fastigiata*, cada uma com duas variedades. Os genótipos da subespécie *fastigiata* são geralmente de porte ereto, ciclo curto e as sementes germinam com facilidade, num prazo que vai entre 4 a 6 dias (ISSA et al., 2010); os da subespécie *hypogaea* são rasteiros, ciclo longo e as sementes frequentemente apresentam dormência fisiológica não profunda (ISSA et al., 2010; SANTOS et al., 2013; SHELAN et al., 2014). O nível de maturidade, posição da semente na vagem e período e as condições de armazenamento podem influenciar na dormência das sementes, embora barreiras metabólicas endógenas provavelmente de natureza enzimática também estão envolvidas, e impedem a síntese de proteínas e/ou a degradação e transporte de reservas para o embrião (KETRING e MELOUK, 1982).

Em ambientes com distribuição hídrica regular, a dormência é uma característica interessante, pois a colheita pode ser retardada sem prejuízo na produção e a taxa de germinação das sementes nas vagens é baixa por evitar a viviparidade (UPADHYAYA e NINGAM, 1999; ISSA et al., 2010; SHELAR et al., 2014). Em ambientes semiáridos, contudo, onde as precipitações são irregulares e mal distribuídas, a dormência é um empecilho para o manejo

porque leva a irregularidades no desenvolvimento da plântula, devido à dessecação dos tecidos, especialmente do embrião, acarretando em prejuízos econômicos para os produtores (ISSA et al., 2010; SANTOS et al., 2013). A dormência em sementes de amendoim é uma problemática enfrentada pelos melhoristas dos programas de melhoramento da cultura para desenvolvimento de genótipos mais adaptados para o semiárido.

Visando investigar os aspectos moleculares da dormência de amendoim, estudou-se nesse trabalho o envolvimento da expressão de genes *NCED*, *ARP* e *DMR1* em embriões e cotilédones das sementes, baseando-se em genótipos das subespécies *hypogaea* e *fastigiata*, previamente fenotipados.

1.1 Objetivo Geral

Investigar o envolvimento da expressão de genes associados à dormência em sementes de amendoim a partir de genótipos previamente fenotipados.

1.2 Objetivos Específicos

Estimar a expressão dos genes *ARP* (*Auxin repressor protein*), *DMR1* (*Dormancy-associated gene 1*) e *NCED* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*) em genótipos de amendoim das subespécies *hypogaea* e *fastigiata*, por meio de ferramentas moleculares;

Avaliar os descritores fisiológicos das sementes de amendoim das subespécies *hypogaea* e *fastigiata*, visando estabelecer inter-relações com os achados moleculares.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação das sementes e armazenamento

A semente é uma estrutura reprodutiva, composta de endosperma e embrião, que tem a função de perpetuação das espécies sexuadas. Todo organismo vivo incluindo as sementes são compostas pelas principais substâncias lipídios, proteínas e carboidratos. A formação das sementes passa pelas seguintes etapas: a fertilização (fecundação), a embriogênese zigótica fase em que o embrião é formado; maturação fase em que a dormência é estabelecida devido ao acúmulo de ABA e a dessecação fase em que ocorre a redução do conteúdo de água presente no interior da semente (NAMBARA e NONOGAKI, 2012).

As sementes podem ser classificadas como ortodoxas ou recalcitrantes. Nas ortodoxas, as condições de umidade e temperatura internas favorecem a germinação. Tais sementes são tolerantes ao processo de dessecação, suportando maiores períodos de armazenamento, sem comprometer a capacidade germinativa. A porcentagem de dessecação pode chegar de 80% a 90% (FONSECA e FREIRE, 2003; BARBEDO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). Em nível celular, proteínas e carboidratos específicos interagem com a membrana plasmática e com a parede interna causando seu desdobramento e reforçando a estrutura, evitando perda de sais, redução na quantidade de organelas e de vacúolos (BARBEDO et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015). Em *Arabidopsis thaliana*, Fait et al. (2006) reportam que existe um *switch* no metabolismo durante a fase de dessecação, sugerindo uma redução na taxa respiratória como

estratégia de preparação para suportar armazenamento por longo tempo. Em sementes recalcitrantes, contudo, a estratégia é diferente. De acordo com Caccere et al. (2013) algumas delas tem também um *shift* no metabolismo, porém relacionado com a elevação da eficiência na taxa respiratória e geração de energia até que tais sementes se tornem autossuficientes.

As sementes classificadas como recalcitrantes são caracterizadas pela sensibilidade ao processo de dessecação, uma vez que necessita de água no seu interior para garantir as atividades metabólicas, especialmente manutenção da respiração. No aspecto celular, as paredes internas são mais frágeis, devido possuírem menor quantidade de polissacarídeos, em relação a sementes ortodoxas (FONSECA e FREIRE, 2003; NASCIMENTO et al., 2007; BARBEDO et al., 2013). A dormência nesse tipo de sementes é uma característica importante para o armazenamento, porque auxilia na manutenção da capacidade germinativa. Segundo Goldbach (1979) a ausência de dormência em sementes muito recalcitrantes implica na necessidade de desenvolver métodos alternativos para prevenir a germinação durante o armazenamento, como por exemplo, o uso de substâncias inibidoras como ABA e PEG.

A dormência é considerada uma evolução das plantas para garantir a manutenção das espécies, sendo caracterizada pela demora no processo de germinação das sementes, mesmo ela estando em condições adequadas para germinar (BAJPAI et al., 2017). A dormência e a germinação dependem do equilíbrio entre o ácido abscísico (ABA) e as giberilinas (GAs). Em nível molecular, esse equilíbrio hormonal é antagônico porque ocorre biossíntese e catabolismo entre o ABA e GAs, que determinam a dormência e a capacidade da germinação, ou seja, alta concentração de ABA implica em baixa concentração dos níveis de GAs resultando em sementes mais dormentes, e vice-versa (BRADY e McCOURT, 2003).

Segundo Vernier et al. (2012) há vários tipos de dormência, sendo a física uma das mais reportadas por ser caracterizada pela impermeabilidade do tegumento a solutos. Tal impermeabilidade da semente é devido a presença de substâncias como suberina, lignina, cutina e taninos. Essas substâncias limitam a absorção de água pela semente, além de restringir o acesso interno de oxigênio, comprometendo o desenvolvimento do embrião. Esse tipo de dormência é encontrado em 15 famílias das Angiospermas, mas é bastante comum nas espécies pertencentes à família Fabaceae (Leguminosae). As sementes de leguminosas com dormência física possuem estrutura anatômica denominada hilo que permite o controle interno de entrada de água, de modo a controlar a germinação (BEWLEY et al., 2013).

De acordo com a literatura, o estado quiescente do embrião é alterado quando a nível molecular os genes da germinação de sementes são ativados, sendo o processo provavelmente organizado pelo silenciamento de genes de dormência. A força mecânica que a semente exerce para germinar tem envolvimento gênico, porém depende também da condição de cultivo. De acordo com Nonogaki (2014) o tegumento é um tecido não vivo, de modo que a redução na resistência mecânica depende de alterações fisiológicas no endosperma vivo. As alterações nas propriedades do endosperma afetam bastante o tempo de emergência da radícula em sementes não dormentes também. No aspecto abiótico, a temperatura e a umidade relativa do ar são fatores responsáveis por reduzir a porcentagem de germinação.

O armazenamento de sementes é uma etapa do pós-colheita que influencia diretamente na manutenção e viabilidade das sementes. Condições inadequadas de armazenamento afetam o poder germinativo e as propriedades sensoriais das sementes, além de favorecer ocorrências de pragas e doenças de grãos armazenados (BARBEDO et al., 2013). Em oleaginosas, o armazenamento inadequado contribui para deterioração devido aumentar a acidez (ALMEIDA et al., 2010).

De acordo com Almeida et al. (2010) a porcentagem de germinação de algodão, girassol, soja e amendoim reduziu em função do tempo de armazenamento. Esse efeito começou a ser verificado a partir de 45 dias para a soja e o girassol, enquanto que o amendoim só começou a reduzir partir de 135 dias de armazenamento, em condições ambientais. Ao final do ensaio (180 dias), as reduções nas taxas de germinação foram de 13%, 20% e 37% do potencial germinativo, para soja, amendoim e girassol, respectivamente. Só a mamona manteve viável a capacidade germinativa, em torno de 80%, até o final do ensaio.

O amendoim é muito vulnerável ao armazenamento porque, se as condições e a forma de armazenamento não forem adequadas, a viabilidade das sementes pode ser reduzida em torno de 50%, dentro de 4 a 5 meses de armazenamento (BAJPAI et al., 2017). Como a formação das vagens de amendoim é de natureza hipógea, é um aspecto relevante que contribui expressivamente para manutenção das propriedades fisiológicas e fitossanitárias das sementes.

Ao estudar o efeito do armazenamento por 15 meses em quatro ambientes: ambiente sem controle de temperatura e umidade relativa, sala refrigerada (18 a 20 °C, 55 a 60% de umidade relativa); câmara fria 1 (10 a 12 °C, 55 a 60% de umidade relativa) e câmara fria 2 (5 a 7 °C, 60 a

65% de umidade relativa) e embalagem de pano e plástico (garrafa pet) em sementes de pinhão manso houve redução do potencial germinativo ao longo do período de armazenamento, independentes das condições de embalagem (ZONTA et al., 2014). Esse fato é comum em oleaginosas cujas sementes são compostas por uma quantidade maior de ácidos graxos, elas são mais predispostas à deterioração por oxidação desses ácidos devido a menor estabilidade química (ZONTA et al., 2014).

A oxidação nas sementes oleaginosas é um processo desencadeado pelos níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados que contém um carbono com ligações duplas. Quando ocorre à quebra dessas ligações, há produção de ácidos, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos, cujos compostos comprometem a capacidade germinativa das sementes (BARKLEY et al., 2010). As oleaginosas que possuem alta relação O/L (ácido oleico/ácido linoleico) são mais resistentes ao processo de rancificação e, portanto, possuem maior vida de prateleira ou estabilidade oxidativa (SANTOS et al., 2012). A rancidez tende a aumentar ao longo do período de armazenamento (ALENCAR et al., 2010; MUTEGI et al., 2013; BAJPAI et al., 2017).

Alencar et al. (2010) verificaram alto estado de oxidação, nos grãos de soja armazenados em recipientes de plástico, em câmara com temperatura controlada (40°C), durante 6 meses, ao final do período de armazenamento os grãos estavam 87% colonizados por *Aspergillus glaucus*, conferindo aos grãos sabor azedo. As mudanças sensoriais foram devidas a oxidação dos lipídios, hidrólise e pirólise dos ácidos graxos. Adbellah e Isha, (2012) verificaram em girassol que o armazenamento prolongado (12 meses), em garrafas de diferentes materiais (vidro, polietileno e galvanizado) e cores (marrom, preto e incolor) a 35°C, interferiu na fluidez do óleo das sementes, que apresentou aumento na viscosidade e alta acidez. Essa viscosidade está relacionada com a formação de glicerol gerada pela hidrólise dos ácidos graxos. O recipiente galvanizado de cor preta influenciou negativamente na germinação das sementes, enquanto que o de vidro, de cor âmbar proporcionou melhor conservação.

Em amendoim Mutegi et al. (2013) estudando as condições de armazenamento na qualidade das sementes, verificaram que a rancidez aumentou 1,7X após 5 meses de armazenamento, com picos de 2,7X, independentemente do tipo de embalagem (juta, polietileno e polipropileno). Essa variação se deveu aos diferentes genótipos adotados para o estudo. Fica claro que o período de armazenamento e o teor de óleo na semente são muito influenciados pelos fatores ambientais. Nos genótipos rasteiros, por conterem maior teor de óleo, geralmente acima

de 48%, a tendência de rancidez é maior. Dessa forma, um dos modos de se evitar perdas na qualidade do óleo é adequar às condições de armazenamento em função do tipo botânico que será posteriormente comercializado.

2.2 Aspectos bioquímicos e moleculares da dormência nas sementes

O processo bioquímico da dormência tem forte ligação com fatores hormonais e o ABA tem papel chave na regulação porque inibe a germinação devido ao controle negativo das giberelinas, que são responsáveis pela germinação das sementes (BRADY e McCOURT, 2003; MIRANSARI e SMITH, 2014; BAJPAI et al., 2017). No aspecto hormonal, a semente pode apresentar dormência fisiológica, provocada pela ação do ABA e das giberelinas (GA), ou secundária, em cujo processo a germinação é inibida até que as condições abióticas sejam favoráveis, especialmente luz, temperatura e tempo de armazenamento. As condições de salinidade, acidez e estresse hídrico também influenciam na dormência secundária (MIRANSARI e SMITH, 2014).

De acordo com Miransari e Smith (2014) a salinidade é um fator crítico porque contribui afeta o nível de nitrogênio na semente, influenciando no crescimento embrionário. As giberilinas e o íon nitrato são importantes para o processo germinativo das sementes, uma vez que o primeiro é capaz de inibir a ação do ABA, e o segundo é uma fonte de nitrogênio capaz de potencializar a germinação ao reduzir os níveis de biossíntese de ABA.

A dormência das sementes pode ser classificada em:

a) Fisiológica: é o tipo mais encontrado nas sementes das Angiospermas, tais como *Arabidopsis thaliana*, *Helianthus annuus*, *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana* spp., *Avena fatua*, entre outras. As sementes podem ter dormência fisiológica profunda, intermediária e não profunda. A profunda ocorre quando o embrião produz plântulas anormais; o GA não promove a germinação e as sementes necessitam de 3 a 4 meses de estratificação para germinar. Na intermediária, o embrião produz plântulas normais e anormais; o GA promove germinação em algumas espécies, cujas sementes requerem entre 2 a 3 meses de estratificação para quebrar a dormência. Não profunda, o embrião desenvolve plântulas normais porque o GA

favorece a germinação, as sementes são ser armazenada, a estratificação pode quebrar a dormência (ARC et al., 2013; BASKIN e BASKIN, 2014);

b) Morfológica: o embrião é rudimentar. Os tecidos não estão fisicamente dormentes e não requerem a quebra da dormência para germinar, mas precisam de mais tempo para crescer até o tamanho completo e depois germinar. Um exemplo de planta com esse tipo de dormência é o aipo (*Apium graveolens* L.) (ARC et al., 2013; BASKIN e BASKIN, 2014);

c) Morfofisiológica: trata-se da combinação da dormência fisiológica e morfológica, quando o embrião é subdesenvolvido e possui dormência fisiológica. Para que a germinação ocorra, torna-se necessário um pré-tratamento de quebra de dormência, por um período de tempo mais longo. Nessa categoria de dormência, citam-se sementes das espécies *Trollius* L. e *Fraxinus excelsior* L. (ARC et al., 2013; BASKIN e BASKIN, 2014);

d) Física: como reportado anteriormente, é provocada pela impermeabilidade da semente, que dificulta a entrada de água na semente. A dormência pode ser quebrada por meio de condições naturais e artificiais, exceto por escarificação mecânica. Esse tipo de dormência é comum em várias espécies da família Fabaceae (ARC et al., 2013; BASKIN e BASKIN, 2014).

e) Há casos da junção da dormência física com a dormência fisiológica é caracterizada pela impermeabilidade a água e pela dormência fisiológica do embrião. Os embriões dos gêneros como *Cercis* pertencente à família Fabaceae e *Ceanothus* a família Rhamnaceae possuem dormência física não profunda, portanto, a quebra do estado de dormência requer a estratificação, para que as sementes possam absorver água antes de iniciar o processo de germinação (ARC et al., 2013; BASKIN e BASKIN, 2014).

Os avanços na área molecular, em temas envolvendo recalcitrância e dormência em sementes, têm sido bem reportados. O mecanismo molecular da função do ABA e GAs forneceram evidências sobre o relevante papel desses hormônios na dormência e desenvolvimento embrionário. Vários genes, coordenando regulações positivas e negativas têm sido reportados, como *ABA 1 (ABA deficient 1)*, BENTSINK et al., 2006), *DOG 1 (DELAY OF GERMINATION 1)*, BENTSINK et al., 2006), *ERF 9 (ETHYLENE RESPONSE FACTOR)*, WANG et al., 2013), *NCED4 (NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 4, 9)*, WANG et al., 2013), entre outros.

Na Figura 1, se encontra uma representação esquemática da elongação da transcrição de genes envolvidos na dormência de sementes, focalizando no *DOG1* e explanado em Nonogaki, (2014). O fator de elongação da transcrição *S-II* (*TFIIS*) auxilia a *RNA polimerase II* (*Pol II*) e promove o alongamento da transcrição. O Complexo do Fator Associado II de Pol II (*PAF1C*) funcionam neste processo através da sua interação com outros genes que funcionam como ubiquitinas e metiladores. Esses eventos de remodelação da cromatina e seus efeitos positivos sobre o alongamento da transcrição são considerados críticos para a indução de genes de dormência de sementes.

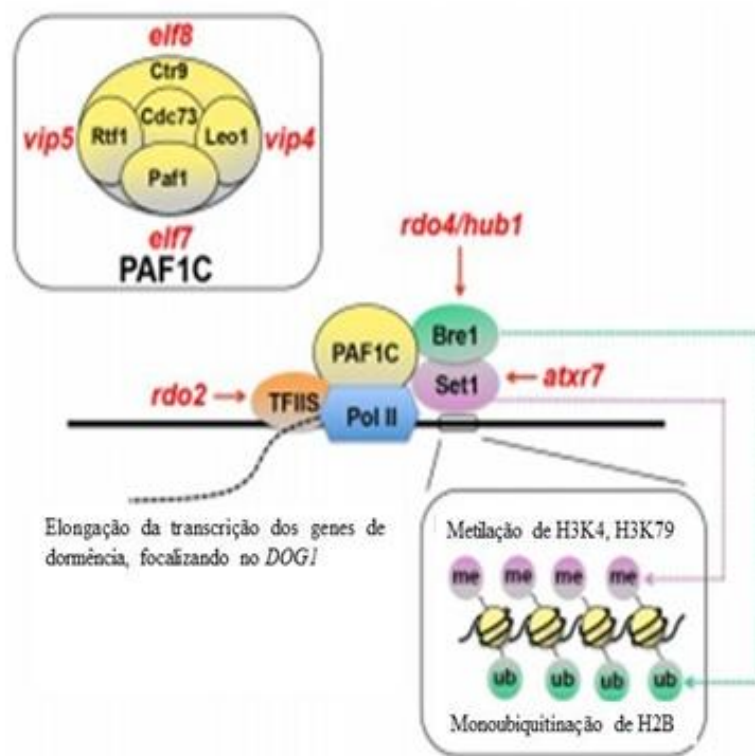


Figura 1. Representação esquemática da elongação da transcrição de genes envolvidos na dormência de sementes, focalizando no *DOG1* (NONOGAKI, 2014). Símbolos de itálico vermelho indicam mutantes de *Arabidopsis* correspondentes aos componentes da proteína de levedura.

Entre os vários genes de dormência já descritos, o *NCED* tem sido um dos mais reportados devido seu envolvimento nos mecanismos de dormência das sementes (SEO et al., 2009). *NCED* pertence a uma pequena família multigênica, com apenas um subgrupo envolvido nas respostas ao estresse e atuação na regulação de síntese de ABA. O gene já foi identificado

em várias culturas, como tomate (*Solanum lycopersicum*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), abacate (*Persea americana*), *Arabidopsis*, uva (*Vitis sp*), laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck), amendoim (*A. hypogaea*), entre outras (WAN e LING LI, 2006).

Outros genes também reportados são *ARP* (*Auxin Repressed Protein*) e *DMR1*, que fazem parte de uma superfamília de genes repressores de auxina, sendo altamente expressas em gemas dormentes e em tecidos sem crescimento de várias espécies de plantas (LEE et al., 2013). A expressão dos genes *ARPI* e *DRM 1* foi verificada em repolho chinês (*Brassica rapa* L. ssp. *Pekinensis*) e em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, em várias condições de desenvolvimento e estresse, ambos genes foram expressos em todos os tecidos testados (raízes, folhas maduras, hipocótilos, pétalas e sépalas, cotilédones), porém os níveis foram mais elevados nos tecidos maduros e gradual nos cotilédones. A expressão desses genes foi induzida por estresses abióticos, como resfriamento, choque térmico e salinidade. A superexpressão de *BrARPI* ou *BrDRM1* em *Arabidopsis* levou a uma redução no crescimento vegetativo e na produtividade da semente, sem afetar a morfologia (LEE et al., 2013).

Qi et al. (2013), avaliaram a expressão gênica de vários genes envolvidos na dormência de *Paris polyphylla var. yunnanensis*, entre eles *ARP*, *DMR* e *NCED*, focalizando no embrião e endosperma, a partir de sementes estratificadas a diferentes temperatura (4 °C e 20 °C). De acordo com os resultados apresentados pelos autores, a expressão de *NCED* foi potencializada nas radículas do embrião, estratificadas a temperatura de 20 °C, numa taxa próxima de 50% a mais do que no endosperma. Com os genes *ARP e DMR*, a expressão dos genes foi a mesma, nos embriões e endosperma, oriundos de sementes estratificadas a temperatura de 4°C. No entanto, a 20°C, o perfil de expressão ambos genes foi idêntico, revelando cerca de 70% a mais no endosperma do que no embrião. Ou seja, o comportamento foi inverso ao encontrado ao *NCED*. Os autores concluem que esses genes podem ser fortes candidatos para estudos relacionados com dormência de sementes, especialmente para esclarecer a base molecular da dormência em *P. polyphlla*.

Em *Arabidopsis*, Schmid et al. (2005) verificaram, a partir de dados de microarranjos, que os níveis de transcrição de *AtDRM1* foram significativamente reduzidos com a embebição das sementes, enquanto que em plantas transgênicas que sobreexpressam *BrDRM1* ou *BrARPI*, a germinação demorou um tempo para ocorrer, fornecendo evidências de que os membros da família *DRM1/ARP* podem estar envolvidos na manutenção da dormência de sementes.

Vriezen et al. (2008) conduziram um estudo de transcriptoma no ovário de plantas de tomate e sugeriram que os ovários não polinizados estão em um estado temporariamente inativo, amparados pela expressão de genes do ciclo celular induzidos após a frutificação. Como esses tecidos podem incluir sementes, que revelam níveis elevados de *DRMI*, os autores sugerem uma análise adicional nessas espécies para esclarecer se o aumento de expressão é resultado da maturação dos frutos ou da maturação das sementes.

2.3 A dormência nas sementes do amendoim

O amendoim é uma oleaginosa de larga importância econômica, cultivado em mais de 80 países distribuídos em diferentes continentes, como africano, asiático e o americano (FAO, 2018). Os grãos são ricos em óleo, entre 45 a 52%, além de proteínas e vitaminas, constituindo um alimento de elevado valor nutricional (FREIRE et al., 2013). O Brasil produz anualmente cerca de 460 mil toneladas de grãos, em 129 mil ha, a maioria obtida no estado de São Paulo (CONAB, 2017). O Registro Nacional de Cultivares (MAPA-RNC http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.ph) tem cadastrados 32 cultivares indicadas para cultivo no Brasil, a maioria desenvolvida pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) e a Embrapa, e outras introduzidas dos EUA e Argentina. Essas cultivares atendem os mercados de consumo in natura, indústria de alimentos e oleoquímica, essas últimas com teor de óleo acima de 48%, denominadas de “alto oleicas”.

No aspecto botânico, o amendoim é subdividido nas subespécies *fastigiata* e *hypogaea*. Os genótipos da subesp. *fastigiata* pertencem às variedades *vulgaris* ou *fastigiata*, comercialmente conhecidas como do tipo Spanish e Valência, respectivamente. As cultivares do tipo Valência são largamente comercializadas no Brasil; possuem porte ereto, ciclo curto e grãos de cor vermelha; as do tipo Spanish são mais comercializadas na África, possuem porte ereto, grãos pequenos, de cor bege (SANTOS et al., 2013). A subsp. *hypogaea* contém os genótipos dos tipos Virgínia ou *Runner*, ambos de porte rasteiro, grãos grandes e ciclo longo. Cultivares desse tipo botânico são amplamente cultivadas nos Estados Unidos e no Sudeste do Brasil, para atender os mercados de alimento e óleo. Uma característica importante que diferencia os genótipos de amendoim é a dormência nas sementes, frequentemente presente nos genótipos do tipo *hypogaea* (*Runner* ou Virgínia).

Para ambientes com largo ciclo de chuvas, a dormência é característica benéfica porque as sementes podem permanecer no solo, sem risco de iniciar os processos de germinação, ou de serem infestadas por microrganismos (UPADHYAYA e NINGAM, 1999; SHELAR et al., 2014). Em ambientes com restrição hídrica, contudo, essa característica é desfavorável porque, iniciado o processo germinativo, a restrição hídrica coloca em risco o embrião pré-emergido (SANTOS et al, 2013).

Opio e Photchanachai (2016) investigaram a influência da temperatura na dormência de sementes de amendoim e verificaram que o efeito do estresse térmico afetou negativamente a germinação e vigor das plântulas, à medida que a temperatura aumentava. A temperatura que foi responsável por induzir a dormência das sementes de amendoim em 31% foi 40°C em relação às sementes do controle para mesma temperatura, enquanto que a 50°C ocorreu à morte do embrião.

No presente estudo, a fim de compreender a dormência em sementes de amendoim da subespécie *hypogaea* e identificar genes que possam ser utilizados como marcadores moleculares de dormência para auxiliar os programas de melhoramento do amendoim para identificação de genótipos dormentes antes mesmo de serem testados no campo, foram utilizados três genes (*ARP*, *DMRI* e *NCED*) citados na literatura como genes envolvidos em diferentes rotas hormonais envolvidas na dormência de sementes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fenotipagem dos genótipos de amendoim

Oito genótipos de amendoim foram previamente fenotipados quanto aos tipos botânicos (Valencia e Virginia ou *Runner*) e selecionados para o presente estudo (Tabela 1). Todos foram cultivados em Barbalha, CE (07 °18'40 "S, 39 ° 18'15" W, 414 m) e, após as etapas de pós-colheita, vagens de cada genótipo foram coletadas ao acaso e armazenadas em sacos de papel kraft, em temperatura ambiente (RT: 23-25°C, 56-66% de umidade relativa do ar) durante 8 meses (240 dias). A umidade das sementes no início do armazenamento esteve entre 8-10%.

Ao longo do período de armazenamento foram procedidas análises fisiológicas nas sementes dos genótipos, baseando-se nos seguintes descritores: início da germinação, porcentagem de germinação e altura da plântula, iniciadas aos 30 (T0), 150 (T1) e 240 (T2) dias após o armazenamento. Adicionalmente o teor de óleo também foi avaliado nos mesmos períodos.

Tabela 1. Genótipos de amendoim usados nos testes fisiológicos e moleculares.

Genótipos	Subsp.	TB	HC	Genealogia/Origem	TS	DS	Ciclo	100S
BR 1	F	V	E	Cv. (V)/PB, BR	M	Não	89	45
BRS Havana	F	V	E	Cv. (V)/PB, BR	M	Não	90	46
L7 bege	F	V	E	Top line (V x S)/PB, BR	G	Não	90	49
IAC Caiapó	H	Vi	R	Cv. (Vi X S)/SP, BR	G	Sim	135	52
Cavalo	H	Vi	R	Land race/RO, BR	EG	Sim	145	68
LViPE-06	H	Vi	R	Land race/PE, BR	EG	Sim	152	72
LGoPE-06	H	Vi	R	Land race/PE, BR	EG	Sim	153	70
Florunner	H	Vi	R	Cv. (Vi)/USA	G	Sim	138	51

Subsp. F- fastigiata, H- hypogaea; TB- tipo botânico, V- Valência, Vi- Virginia; HC- hábito de crescimento, E- ereto, R- rasteiro; Cv.- Cultivar comercial; TS- tamanho da semente, M- médio, G- grande, EG- extra grande; DS- dormência nas sementes; 100S- peso de 100S.

As sementes foram removidas das vagens manualmente e previamente tratadas com Vitavax-Thiram 200SC (5,6-dihidro-2-metil-1,4-oxa-inil-3-carboxanilida), seguindo recomendação do fabricante. Para análise de germinação, utilizou-se papel do tipo Germitest[®], umedecido com água destilada na quantidade de 2,5 vezes o peso do papel seco. As sementes foram distribuídas em uma das faces do papel e cobertas com outro papel também umedecido, os quais foram enrolados e incubados em BOD a 25° C (ABDUL BAKI e ANDERSON, 1973). Cada papel conteve 50 sementes por repetição. O ensaio foi inteiramente casualizado com três repetições/genótipo. Observações diárias foram realizadas com o objetivo de acompanhar o tempo de germinação das sementes. Após 7 dias, foram registrados o número de sementes germinadas e o comprimento das plântulas. A porcentagem de germinação (TG%) foi estimada por: (NSG/NST) *100, onde NSG = Número de sementes germinadas e NST = Número de sementes testadas.

O teor de óleo foi estimado por Ressonância Magnética Nuclear (H1 OXFORD MQA 7005), seguindo recomendação descrita em AOCS (2004). O teste foi repetido três vezes com duas repetições de vinte sementes cada. As amostras foram coletadas ao acaso para cada repetição. Os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o software GENES (CRUZ, 2013). Os efeitos significativos dos tratamentos foram determinados pelo teste F ($p \leq 0,05$). As medias foram classificadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

3.2 Análises de expressões relativas via RT-qPCR

Os tecidos de embrião e cotilédones foram utilizados para extração de RNA total (Invisorb Spin Plant Mini Kit, Invec, Alemanha) e síntese de cDNA (kit PromPreP-IITM Reverse Transcription System, Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A transcrição reversa foi realizada em 44 μ L, utilizando-se 11 μ l de amostra de cDNA (1 μ g de RNA total), 0,5 μ g oligo dT15 (10 mM), 1X IMPROM-II Tampão de Reação, 6 mL de $MgCl_2$ (25 mM), 0,5 μ l de dNTP (10 mM), 1 U/ μ L de RNase; 1,25 U/ μ L da enzima RT ImProm-IITM. As amostras foram incubadas em termociclador, inicialmente a 25°C/5 min, depois a 42°C/1 h e em seguida por 70°C/15 min. A pureza e a concentração foram estimada em gel de agarose (0,8%) e por espectrofotometria.

As reações de RT-PCR semiquantitativas foram conduzidas de modo a estimar a expressão preliminar dos transcritos. As reações de RT-PCR foram realizadas a partir de um volume final de 25 μ L contendo 1 μ g de cDNA, 0,2 mM dos oligonucleotídeos específicos. Os produtos gerados pelas reações foram analisados através da eletroforese em gel de agarose com concentração de 0,8%. Para estimar o padrão das bandas foi utilizado o marcador de 100pb (Invitrogen).

A expressão relativa dos transcritos *NCED*, *ARP* e *DMR1* foi estimada por qRT-PCR (Eco Real-Time PCR System - Illumina, SD, EUA) usando o kit Evagreen (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos utilizados neste estudo foram previamente desenhados a partir de regiões conservadas de vários acessos disponíveis no banco de genes (NCBI), de *NCED* (gi 340764664, *Glycine max*, gi 6715256, *Phaseolus vulgaris*, gi 22335698, *Pisum sativum*, gi 4276042, *Arachis hypogaea*, *ARP* (gi71040686, *Arabidopsis thaliana*, gi 357446688, *Medicago truncatula*) e *DMR1* (gi 2995989, *A. thaliana*, gi 2605886, *Pisum sativum*, gi 229893931, *Brassica rapa*). O programa ClustalW2 (www.ebi.ac.uk) foi usado para alinhamento de sequências. O conjunto de oligonucleotídeos utilizados nos ensaios se encontra na Tabela 2 (BATISTA et al., 2015).

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos específicos e constitutivos utilizados nos ensaios.

Gene	Oligonucleotídeos (Forward/Reverse, 5' → 3')
<i>NCED</i>	GAAGGAAGACACAGTTCGCA/ AGGAAGAAACATCGGCTCAC
<i>ARP</i>	GGTTCTGTTAGAGAAGCTG/ GCGGTGCTTGCTCCTTGTC
<i>DMRI</i>	GGATGATATTGTTGCTGGCCC/ CGCAATCGACGTGCTTCTCA
β -actina*	GATCTGGCATCACACCTTC/ AGGAAGCTCGTAGCAGCTCTT
PP2A**	GTCATCCTTTCAGGTACAAGCA/ CGTTACAAACAACAGCTCCTTC

*BATISTA et al. (2015); **ÁRTICO et al. (2014); *PP2A- Protein phosphatase 2A*.

Os oligonucleotídeos foram utilizados a 10 mM e desenhados para amplificar a 60°C. Todas as reações foram realizadas com triplicata experimental e duplicata biológica. O ciclo limiar (Ct) e a eficiência da PCR foram estimados pelo programa Miner-qPCR (ZHAO e FERNALD, 2005). As análises da expressão gênica foram realizadas utilizando o programa qBASEPlus (HELLEMANS et al., 2007). As curvas dos gráficos, Cqs e Melt foram geradas automaticamente com base no método de normalização com um gene de referência, $\Delta\Delta Cq$ (LIVAK et al., 2001). O padrão de expressão foi estimado por quantificação relativa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Fenotípagem dos genótipos de amendoim *fastigiata* e *hypogaea*

As características utilizadas para fetipagem dos genótipos de amendoim *fastigiata* (ereto) e *hypogaea* (rasteiro) foram adequadas para identificar os materiais contrastantes para dormência das sementes. Nenhuma evidência de dormência foi encontrada nos genótipos eretos, com base nos dados fornecidos na Figura 2. Os perfis dos genótipos BR 1 e BRS Havana foram semelhantes e nenhuma irregularidade expressiva foi encontrada na germinação de ambos os genótipos (Figura 2). A porcentagem de germinação foi de 96% durante o ensaio. A altura da plântula, no entanto, diminuiu em 14% aos 240 dias de armazenamento.

Na L7 bege, ocorreu uma redução irrelevante na germinação verificado no final do ensaio (T2). A taxa de germinação diminuiu em 7%, no entanto não houve diferença estatística na altura das plântulas durante o período de armazenamento (Figura 2). Essas pequenas oscilações são muitas vezes esperadas em sementes de oleaginosas, armazenadas à temperatura ambiente (ALMEIDA et al., 2010).

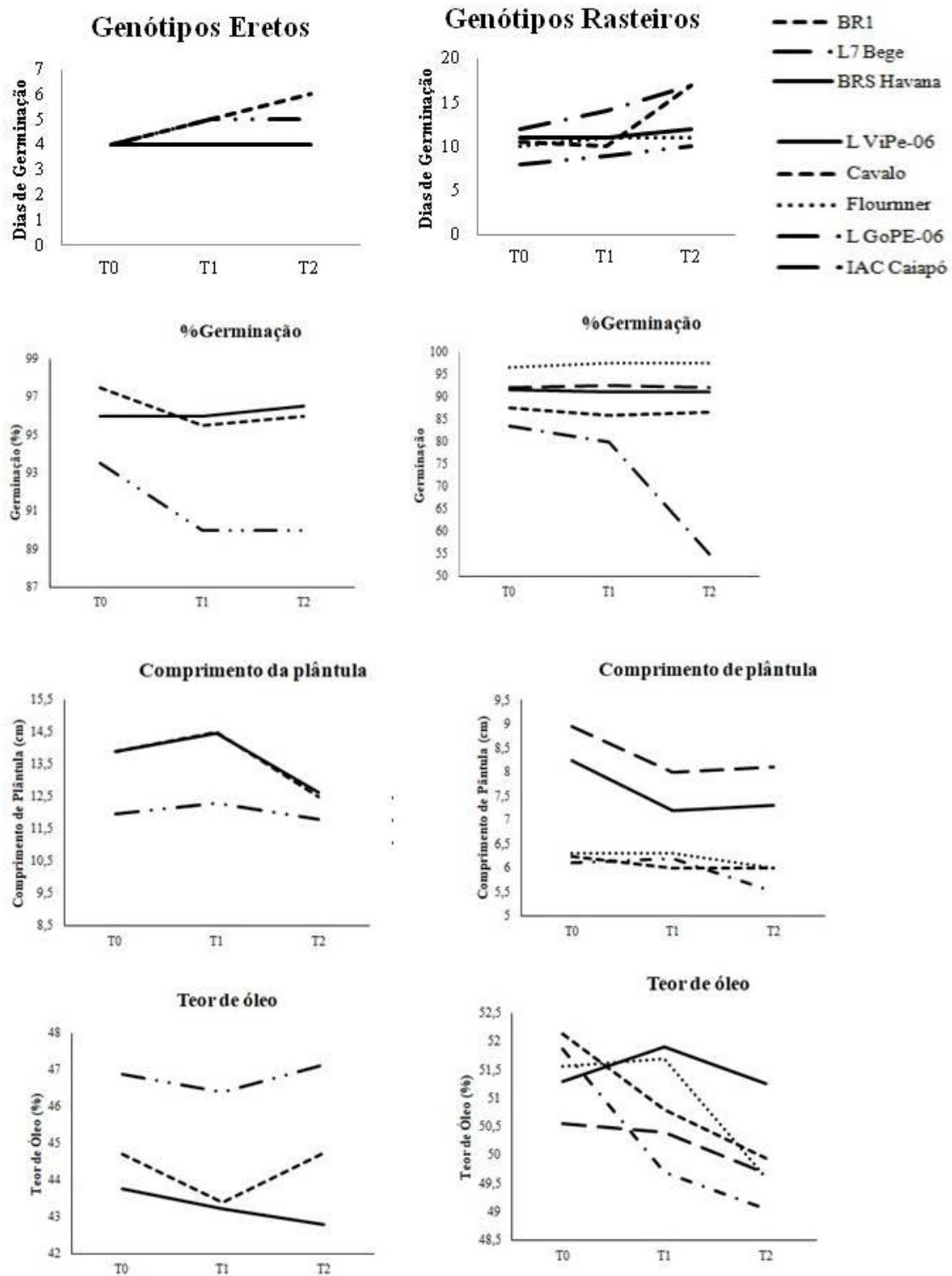


Figura 2. Dias de germinação, taxa de germinação, altura da plântula e teor de óleo das sementes de genótipos eretos e rasteiros de amendoim. T0, T1 e T2 significam os períodos em que as

sementes foram avaliadas, aos 30, 150 e 240 dias após o início do armazenamento a temperatura ambiente.

Nos genótipos rasteiros, o processo de germinação iniciou a partir de 8 a 12 dias no tratamento T0, atingindo 17 dias nos genótipos mais dormentes (IAC Caiapó e Cavalo), ao final dos ensaios. A porcentagem de germinação manteve a uniformidade entre 87% e 98%, para a maioria dos materiais, exceto para Cavalo que começou com 85% (T0) e atingiu 55%, em 210 dias de armazenamento (T2). Com relação à altura da plântula, não foram encontradas diferenças estatísticas para Florunner, LViPE-06 e Cavalo em todos os tratamentos, enquanto que nas IAC Caiapó e LGoPE-06, a altura foi reduzida em 11% e 12%, respectivamente, aos 150 dias (T1) de armazenamento (Figura 2).

A variação no teor de óleo não foi tão significativa entre os genótipos eretos e rasteiros de amendoim. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os genótipos eretos, mas nos rasteiros, as reduções situaram-se entre 4% (LViPE-06 e Florunner) e 6% (Cavalo), já IAC Caiapó e LGoPE-06 que também são rasteiros não apresentaram diferenças estatísticas durante os períodos de armazenamento avaliados (Figura 2).

De acordo com Neergaard (1977), as sementes com alto teor de óleo, possuem menor umidade do que aquelas com composição maior em proteína ou amido. Na literatura encontram-se vários relatos envolvendo germinação de sementes oleaginosas submetidas a longo período de armazenamento (NEERGAARD, 1977; BHATTACHARYA e RAHA, 2002; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al., 2010). No amendoim, não houve tendência entre dormência e armazenamento. Entretanto, a rancidez envolvida com a relação entre os óleos oleico/linoleico, é encontrada em maior quantidade em genótipos rasteiros (BHATTACHARYA e RAHA, 2002; BALEŠEVIĆ-TUBIĆ et al., 2010; SANTOS et al. 2012a). A alta rancidez interfere na germinação das sementes de amendoim (SANTOS et al., 2012a; GUNASEKARAN e PAVADAI, 2015). Alguns trabalhos reportam sobre cruzamentos entre subespécies de amendoim para minimizar o efeito da rancidez e manter a dormência das sementes (WADIA et al., 1987; FAYE et al., 2009; SANTOS et al., 2012a). De acordo com Wadia et al., (1987), cruzamentos entre Virginia x Spanish podem gerar linhagens com dormência de semente, nas quais germinam até 10 dias mais tarde que o progenitor Spanish. Faye et al., (2009) relataram a existência de dormência nos tipos *fastigiata*, embora em menor grau. Ao avaliarem a dormência em linhagens derivadas de

cruzamentos entre genótipos Spanish, os autores verificaram a intensidade de dormência variando de 12% a 100%, com duração de 15 a 35 dias.

Com base nessas informações, foram selecionados os genótipos LGoPE-06 (dormência moderada) e IAC Caiapó (dormência elevada) para representar os tratamentos dormentes nos ensaios moleculares. LGoPE-06 é um rasteiro bastante usado nos cruzamentos de amendoim coordenado pela Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) devido à alta produção de vagens e semente extra grande (SANTOS et al., 2012a). IAC Caiapó é uma cultivar gerada pelo cruzamento entre Spanish x Virginia e amplamente cultivada por fazendeiros de amendoim situados no sudeste brasileiro. Os genótipos eretos BR 1 e L7 bege foram escolhidos para representar o tratamento não dormente.

4.2 Expressão relativa dos genes *NCED*, *ARP* e *DMRI*

O ácido abscísico (ABA) reprime a germinação e presume-se que sua funcionalidade esteja relacionada à estabilização do estado dormente nas sementes (KERMODE, 2005; FINKELSTEIN et al., 2008). A deficiência de ABA durante o desenvolvimento das sementes está associada à ausência de dormência primária. Enquanto que, a maior expressão de genes responsáveis pela síntese de ABA aumenta os níveis desse hormônio e a dormência das sementes ou a germinação tardia (QIN e ZEEVAART, 2002; FINKELSTEIN et al., 2008).

Vários genes estão associados à regulação do ABA, incluindo o *NCED*, cujo papel na dormência das sementes é amplamente descrito na literatura. De acordo com Kermode (2005), a expressão do *NCED* é regulada positivamente nos embriões durante a embebição das sementes dormentes e não dormentes; no entanto, maior expressão foi verificada em embriões de sementes dormentes. Em *Arabidopsis*, tomate e tabaco, o aumento da expressão de genes responsáveis pela síntese de ABA, como é o caso do *NCED*, aumenta a dormência das sementes devido ao incremento desse tipo de hormônio (LUCHI et al., 2001; QIN e ZEEVAART, 2002).

Neste trabalho, foi verificada maior expressão de *NCED* em sementes de genótipos de amendoim dormentes. Conforme a Figura 3A, transcritos foram encontrados em tecidos de embriões de genótipos rasteiros, com maior expressão em IAC Caiapó que é dormente (50x). Estes resultados atestam que o *NCED* tem potencial para ser adotado como marcador de dormência em embriões de sementes de amendoim, confirmando os resultados encontrados na literatura.

A rede biossintética de genes envolvidos no processo de dormência é grande e complexa. *NCEDs* e *CYP707As* (ABA 8'-hydroxylases) são as principais enzimas reguladoras da biossíntese e degradação do ABA, respectivamente. Ambos são codificados por famílias multigênicas e sua regulação específica no tecido determina o conteúdo de ABA (QIN e ZEEVAART, 2002; ALI-RACHEDI et al., 2004; FINKELSTEIN et al., 2008). Em trabalhos realizados com sementes dormentes de *Arabidopsis*, Ali-Rachedi et al. (2004) verificaram que a dormência pode depender de um balanço intrínseco de GA (ácido giberélico), da biossíntese e catabolismo do ABA, que determinará a dominância de qualquer um destes hormônios. De acordo com os autores, o tratamento com GA em sementes dormentes causou uma redução transitória da concentração de ABA, sugerindo que em sementes dormentes existe um mecanismo de feedback antagônico que mantém uma alta relação entre ABA:GA.

Acredita-se que, em muitos casos, as interações entre ABA e outros hormônios resultam em um processo em que o crescimento de gemas dormentes é regulado pelo equilíbrio entre os inibidores de crescimento, como ABA e substâncias promotoras, como citoquininas, giberelinas e auxinas. Embora o ABA e as giberelinas sejam conhecidas por serem os primeiros fito-hormônios que regulam antagonicamente a dormência das sementes, descobertas recentes demonstram que outros fito-hormônios, auxinas, também são fundamentais para induzir e manter a dormência das sementes e, portanto, podem atuar como um protetor chave da dormência das sementes (SHU et al., 2015).

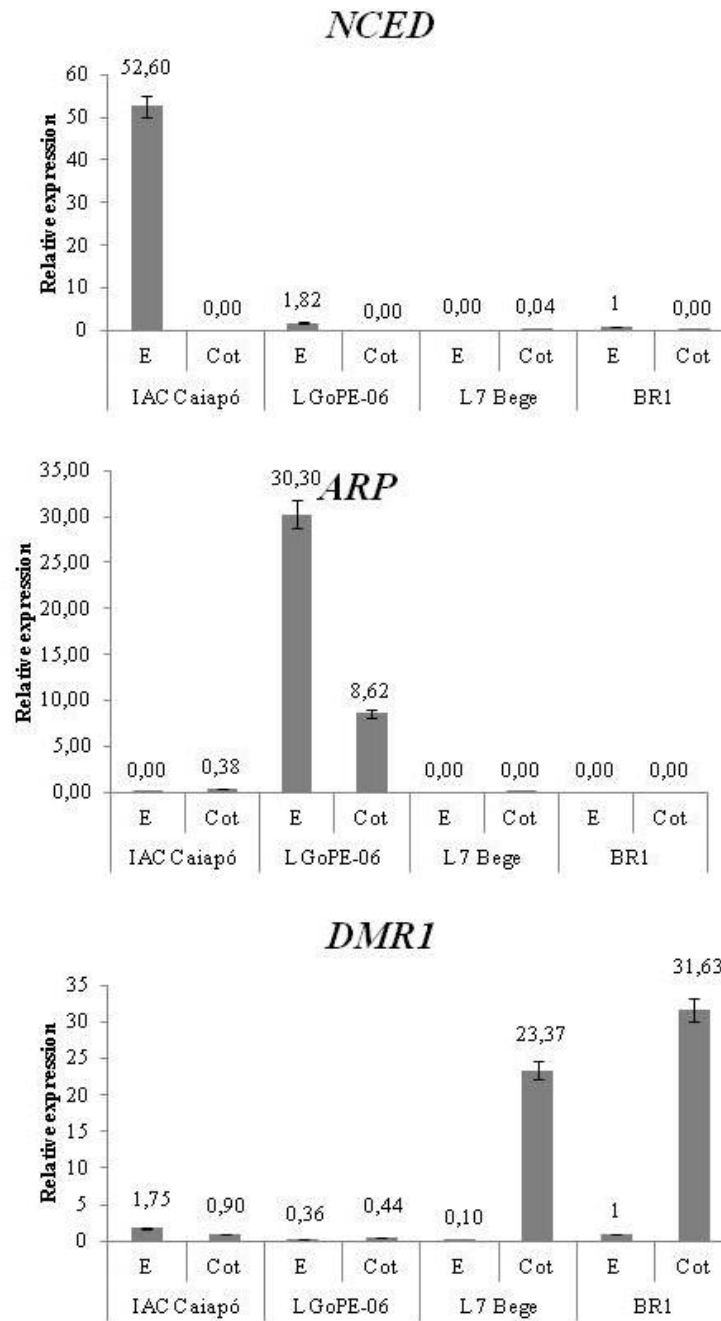


Figura 3. Expressão relativa dos genes *NCED*, *ARP* e *DMRI* nos tecidos embrião (E) e cotilédones (Cot) dos genótipos de amendoim rasteiro ereto. A barra de erro indica o desvio padrão.

As Auxinas, são fito-hormônios estimulantes do crescimento, regulam uma variedade de processos de crescimento e desenvolvimento nas plantas, induzindo a mudanças na expressão de

muitos genes que são ativados ou reprimidos por auxinas. Os genes *ARP* e *DRM* estão fortemente relacionados com a regulação das auxinas. Esses genes foram isolados de dicotiledôneas e monocotiledôneas e ambos formam uma família de genes (*ARP/DRM*) e são frequentemente usados como marcadores genéticos para os tecidos meristemáticos e semente dormentes (LEE et al., 2013; RAE et al., 2013). Em um estudo sobre a caracterização molecular da superfamília de genes reprimidos por auxina de *Brassica rapa*, Lee et al. (2013) verificaram que os níveis elevados de *BrARP1* e *BrDRM1* em plantas de *Arabidopsis* causaram germinação tardia; redução no crescimento da raiz, hipocótilo e folha; e redução do tamanho final da planta e na produção de sementes.

Neste estudo, a expressão de *ARP* em genótipos de amendoim é observada na Figura 3B. Transcritos foram encontrados apenas em genótipos rasteiro, com maior expressão no cotilédone (8x) e em embrião de LGoPE-06 (30x). As sementes de LGoPE-06 são extragrandes, ricas em ácidos graxos e mais tolerantes à seca do que IAC Caiapó (SANTOS et al., 2012a e b).

Os achados na literatura relatam acerca da regulação positiva da transcrição dos membros da família *DRM1/ARP* em resposta a fatores abióticos, como a seca e a salinidade, em várias espécies, incluindo *A. hypogaea* (SHIMIZU et al., 2006; GOVIND et al., 2009). Considerando-se que ambos os genótipos rasteiros têm dormência expressiva nas sementes, é possível que a maior expressão encontrada em LGoPE-06 esteja associada à expressão de outras características como a adaptação ambiental. Enquanto que IAC Caiapó foi desenvolvido para ambientes com chuvas regulares, a LGoPE-06 é uma linhagem superior melhorada para a região semiárida do Nordeste brasileiro (SANTOS et al., 2012b).

Quanto aos transcritos de *DMRI* mostrados na Figura 3C, o padrão de expressão obtido para IAC Caiapó foi semelhante ao observado para *ARP* (Figura 3B), em ambos os tecidos. Menor expressão foi encontrada em outros genótipos, com exceção do aumento da expressão no cotilédone de materiais eretos. Como a maioria dos resultados encontrados na literatura com *NCED*, *ARP* e *DMRI* foram relatados em sementes dormentes, pesquisas foram realizadas para explicar o perfil de expressão observado em genótipos eretos. De acordo com Rae et al. (2013) além dos processos de dormência, a regulação do *DRM1/ARP* foi avaliada em resposta a vários tratamentos: hormonais, açúcares e fatores abióticos e bióticos em diversas espécies de plantas. No amendoim, Govind et al. (2009) relataram a expressão de transcritos de *DRM1/ARP* em resposta ao estresse hídrico gradual. Como BR 1 e L7 bege são precoces e

amplamente tolerantes à seca (DUARTE et al., 2013), sugere-se que a maior expressão encontrada no cotilédone desses materiais poderia ser beneficiada pelo efeito dessa característica.

5. CONCLUSÕES

O gene *NCED* é o marcador molecular mais confiável para ser utilizado em procedimentos de seleção em trabalhos de melhoramento voltados para identificação de genótipos dormentes de amendoim.

REFERÊNCIAS

ABDELLAH, A. M. e ISHAG, K. E. N. A. Effect os storage packaging on sunflower oil oxidative stability. **American Journal of Food Technology**, v. 7, n. 11, p. 700-707, 2012.

ABDUL BAKI, A. A.; ANDERSON J. D. Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. **Crop Science**, v. 13, p. 630-633, 1973.

ALENCAR, E. R.; FARONI, L. R. D.; PETERNELLI, L. A.; SILVA, M. T. C.; COSTA, A. R. Influence of soybean storage conditions on crude oil quality. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 13, n. 3, p. 303-308, 2010.

ALI-RACHEDI, S.; BOUINOT, D.; WAGNER, M. H.; BONNET, M., SOTTA, B.; GRAPPIN, P.; JULLIEN, M.. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. **Planta**. v. 219, p. 479-488, 2004.

ALMEIDA, F. A. C.; JERÔNIMO, E. S.; ALVES, N. M. C.; GOMES, J. P.; SILVA, A. S. Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 12, n. 2, p. 189-202, 2010.

AOCS. American Oil Chemists Society. Official Methods and recommended practices of the aoac, sampling and analysis of vegetable oil source materials, Section A. AOCS recommended

practice Ak 5-01 approved 2001. Simultaneous determination of oil and moisture contents of oilseed residues using pulsed nuclear magnetic resonance spectrometry. In: American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5 ed., AOCS, Champaign, Ill.4, 2004.

ARC, E.; SECHET, J.; CORBINEAU, F.; RAJJOU, L.; MARION-POLL, A. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, n. 63, 2013.

ARTICO, S.; LAMBRET-FROTTÉ, J.; NARDELI, S.M.; OLIVEIRA-NETO, O.B.; GROSSI-DE-SA, M. F.; ALVES-FERREIRA, M. Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 32, p. 630-643, 2014.

BAJPAI, R.; SINGH, P.; SINGH, P. D.; SOBHA SINGH, P. Study on seed dormancy and longevity behaviour of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 5, n. 4, p. 399-403, 2017.

BALEŠEVIĆ-TUBIĆ, S.; TATIĆ, M.; ĐORĐEVIĆ, V.; NIKOLIĆ, Z.; ĐUKIĆ, V. Seed viability of oil crops depending on storage conditions. **Helia**, v. 52, p. 153-160, 2010.

BARBEDO, C. J.; CENTENO, D. J.; RIBEIRO, R. C. L. F. Do recalcitrant seeds really exist? **Hoehnea**, v. 40, n. 4, p. 583-593, 2013.

BARKLEY, N. A.; CHAMBERLIN, K. D. C.; LI WANG, M.; PITTMAN, R. N. Development of a real-time PCR genotyping assay to identify high oleic acid peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **Mol Breeding**, v. 25, p. 541-548, 2010.

BASKIN, J. M.; BASKIN, C. C. A classification system for seed dormancy. **Seed Science Research**, v. 14, n. 01, p. 1-16, 2014.

BATISTA, V. G. L.; PINHEIRO, M, P. N.; MELO FILHO, P. A.; SANTOS, R.C.; LIMA, L. M. Temporal and tissue expression of genes involved in buds of earliness cotton cultivar. **Genetics Molecular Research**, v. 3, p. 7386-7394, 2015.

BENTSINK, L., JOWETT, J., HANHART, C. J., KOORNNEEF, M. Cloning of *DOG1*, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, p. 17042-17047, 2006.

BEWLEY, J.D.; BRADFORD, K.J.; HILHORST, H.W.M.; NONOGAKI, H. Seeds: physiology of development, germination and dormancy. **New York: Springer**, p. 392, 2013.

BHATTACHARYA, K.; RAHA, S. Deteriorative changes of maize, groundnut, and soybean seeds by fungi in storage. **Mycopathologia**, v. 155, p. 135-141, 2010.

BRADY, S. M.; McCOURT, P. Hormone cross-talk in seed dormancy. **Journal Plant Growth of Regulation**, v. 22, p. 25-31, 2003.

CACCERE, R.; TEIXEIRA, S. P.; CENTENO, D.C.; FIGUEIREDO-RIBEIRO, R. C. L.; e BRAGA, M. R. Metabolic and structural changes during early maturation of *Inga vera* seeds are consistent with the lack of a desiccation phase. **Journal of Plant Physiology**, v. 170, p. 791-800, 2013.

CONAB (Agência Nacional de Abastecimento) Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1252&t=2>> Acesso em: 13/12/2017 às 23h52.

CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 35, p. 271-276, 2013.

DUARTE, E. A. A.; MELO FILHO, P. A. e SANTOS, R. C. Características agronômicas e índice de colheita de diferentes genótipos de amendoim submetidos a estresse hídrico. **Revista Brasileira Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 843-847, 2013.

FAIT, A.; ANGELOVICI, R.; LESS, H.; OHAD, I.; URBANCZYK-WOCHNIAK, E.; FERNI, A.R. e GALILI, G. *Arabidopsis* seed development and germination is associated with temporally distinct metabolic switches. **Plant Physiology**, v. 142, p. 839-854, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization). Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Groundnut.pdf> Acesso em: 26/02/2018 às 21:38.

FAYE, I.; NDOYE, O.; DIOP, T.A. Evaluation of fresh seed dormancy on seven peanut (*Arachis hypogaea* L.) lines derived from cross between Spanish varieties: variability on intensity and duration. **Journal of Applied Sciences Research**, v. 5, p. 853-857, 2009.

FINCH-SAVAGE, W. E. e LEUBNER-METZGER, G. Seed dormancy and the control of germination. **New Phytologist**, v. 171, p. 501-523, 2006.

FINKELSTEIN, R. R.; REEVERS, W.; ARIIZUMI, T.; STEBER, C. Molecular aspects of seed dormancy. **Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 387-415, 2008.

FONSECA, S. C. L. e FREIRE, H. B. Sementes recalcitrantes: problemas na pós-colheita. **Bragantia**, v. 62, n. 2, p. 297-303, 2003.

FREIRE, R. M. M.; NARAIN, NARENDRA; MIGUEL, A. M. R. O. & SANTOS, R. C. Aspectos nutricionais de amendoim e seus e seus derivados. In: **O agronegócio do amendoim no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa, 2ª edição, p. 391-419, 2013.

GOLDBACH, H. Imbibed storage of *Melicoccus bijugatus* and *Eugenia brasiliensis* using abscisic acid as a germination inhibitor. **Seed Science and Technology**, v. 7, p. 403-406, 1979.

GOVIND, G.; HARSHAVARDHAN, V.T.; PATRICIA, J.K.; DHANALAKSHMI, R.; SENTHIL KUMAR, M.; SREENIVASULU, N.; UDAYAKUMAR, M. Identification and functional validation of a unique set of droughts induced genes preferentially expressed in

response to gradual water stress in peanut. **Molecular Genetics and Genomics**, v.281, p.591-605, 2009.

GUNASEKARAN, A.; PAVADAI, P. Studies on induced physical and chemical mutagenesis in groundnut (*Arachis hypogaea*). **International Lettes of Natural Sciencies**, v. 8, p. 25-35, 2015.

HELLEMANS, J.; MORTIER, G.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F.; VANDESOMPELE, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. **Genome Biology**, v. 8, p. R19, 2007.

HU, B.; WAN, X.; LIU, X.; GUO, D. et al. Abscisic acid (ABA)-mediated inhibition of seed germination involves a positive feedback regulation of ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. **African Journal Biotechnology**, v. 9, p. 1578-1586, 2010.

ISSA, F.; DANIÈL, F.; JEAN-FRANÇOIS, R.; HODO-ABOLO, T.; NDOYE, S.M.; TAHIR, D. A.; OUSMANE, N. Inheritance of fresh seed dormancy in Spanish-type peanut (*Arachis hypogaea* L.): bias introduced by inadvertent selfed flowers as revealed by microsatellite markers control. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 1905-1910, 2010.

KERMODE, A. R. Role of abscisic acid in seed dormancy. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 24, p. 319-344, 2005.

KETRING, D. L.; MELOUK, H. A. Ethylene Production and Leaflet Abscission of Three Peanut Genotypes Infected with *Cercospora arachidicola* Horin. **Plant Physiol**, v. 69, p. 789-792, 1982.

LEE, J.; HAN, C. T.; HUR, Y. Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, BrARPI and BrDRM. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 197-209, 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LUCHI, S.; KOBAYASHI, M.; TAJI, T.; NARAMOTO, M.; SEKI, M.; KATO, T.; TABATA, S.; KAKUBARI, Y.; YAMAQUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. **Plant Journal**, v .27, p. 325-333, 2001.

MIRANSARI, M.; SMITH, D.L. Plant hormones and seed germination. **Environmental and Experimental Botany**, v. 99, p. 110-121, 2014.

MUTEGI, C.K.; WAGACHA, J.M.; CHRISTIE M.E.; KIMANI J. E KARANJA L. Effect of storage conditions on quality and aflatoxin contamination of peanuts (*Arachis hypogaea* L.). **International Journal of AgriScience**, v. 3, n. 10, p. 746-758, 2013.

NAMBARA, E.; NONOGAKI, H. Seed Biology in the 21st Century: Perspectives and New Directions. **Plant Cell Physiology**, v.53, n.1, p.1-4, 2012.

NASCIMENTO, W. M. O.; NOVENBRE, A. D. L. C.; CICERO, S. M. Consequências fisiológicas da dessecação em sementes de Açaí (*Euterpe Oleracea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v.29, n. 2, p.38-43, 2007.

NEERGAARD, P. Seed pathology. **MacMillan Press**, London, 1977.

NONOGAKI, H. Seed dormancy and germination emerging mechanisms and new hypotheses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, p. 233, 2014.

OPIO, P. e PHOTCHANACHAI, S. Heat stress influences dormancy in peanut seeds (*Arachis hypogea* L.) cv. Khon Kaen 84-8. **South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment**, v. 7, n. 2, p. 127-137, 2016.

QI, J.; ZHENG, N.; BING ZHANG, B.; SUN, P.; HU, S.; XU, W.; MA, Q.; ZHAO, T.; ZHOU, L.; MINGJIAN QIN, M. AND XIANEN LI, X. Mining genes involved in the stratification of

Paris Polyphylla seeds using high-throughput embryo Transcriptome sequencing. **BMC Genomics**, v. 14, p. 358, 2013.

QIN, X.; ZEEVAART, J.A. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. **Plant Physiology**, v. 128, p. 544-551, 2001.

RAE, G.M.; DAVID, K.M.; WOOD, M. The dormancy marker *DRM1/ARP*: associated with dormancy but a broader role in planta. **Developmental Biology Journal**, ID 632524: p.12, 2013.

REGISTRO NACIONAL DE CULTIVARES – RCN disponível <http://sistemas.agricultura.gov.br/snpc/cultivarweb/cultivares_registradas.php> Acesso em: 07/02/2018 às 12:36.

RODRIGUES, A. C.; ALVARENGA, A. A.; RIBEIRO, D. E.; GUIMARÃES, R. M.; ALVES, E.; DA SILVA JUNIOR, J. M. Reindução da tolerância à dessecação em sementes de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **CERNE**, v. 21, n. 4, p. 579-586, 2015.

SANTOS, R. C.; FREIRE, R. M. M.; LIMA, L. M.; ZAGONEL, G. F. e COSTA, B. J. Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 72-77, 2012.

SANTOS, R. C.; QUEIROZ, C. M.; BATISTA, V. G. L.; SILVA, C. R. C.; PINHEIRO, M. P. N.; GALVÃO FILHO, A. L. A.; MELO FILHO, P. A.; LIMA, L. M. Variabilidade de progênies F2 de amendoim geradas por meio de seleção de genitores ISSR-divergentes. **Revista Ciência Agronômica**, v. 44, n. 3, p. 578-586, 2013.

SANTOS, R. C.; SILVA, A. F.; GONDIM, T. M. S.; OLIVEIRA-JÚNIOR, J. O. L.; ARAÚJO NETO, R. B.; SAGRILO, E.; VASCONCELOS, R. A.; MELO FILHO, P. A.; SILVA FILHO, J. L. Stability and adaptability of runner peanut genotypes based on nonlinear regression and AMMI analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.47, p.1118-1124, 2012b.

SCHMID, M.; DAVISON, T. S.; HENZ, S. R.; PAPE, U. J.; DEMAR, M.; VINGRON, M.; SCHOLKOPF, B.; WEIGEL, D.; LOHMANN, J. U. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 501-506, 2005.

SEO, M., NAMBARA, E., CHOI, G., YAMAGUCHI, S. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. **Plant Molecular Biology**, v. 69, p. 463-472, 2009.

SHELAR, V. R.; KARJULE, A. P.; JAYADEVA, B. Induction of dormancy in groundnut - a review. **Agricultural Reviews**, v. 35, n. 3, p. 216-224, 2014.

SHIMIZU, M.; SUZUKI, K.; MIYAZAWA, Y.; FUJII, N.; TAKAHASHI, H. Differential accumulation of the mRNA of the auxin-repressed gene CsGRP1 and the auxin-induced peg formation during gravimorphogenesis of cucumber seedlings. **Planta**, v. 225, p. 13-22, 2006.

SHU, K.; LIU, X.D.; XIE, Q.; HE, Z.H. Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. **Molecular Plant**, v. 5, p. 1674-2052, 2015.

UPADHYAYA, H. D.; NINGAM, S. N. Inheritance of fresh seed dormancy in peanut. **Crop Science**, v. 39, p. 98-1001, 1999.

VENIER, P.; FUNES, G.; CARRIZO-GARCIA, C. Physical dormancy and histological features of seeds of five *Acacia* species (Fabaceae) from xerophytic forests of central Argentina. **Flora**, v. 207, p. 39-46, 2012.

VRIEZEN, W. H.; FERON, R.; MARETTO, F.; KEIJMAN, J.; MARIANI, C. Changes in tomato ovary transcriptome demonstrate complex hormonal regulation of fruit set. **New Phytologist**, v. 177, n. 1, p. 60-76, 2008.

WADIA, K.D.R.; NAGESWARA; RAO, R.C.; WILLIAM, J.H. An improved method for identification of dormant sequentially branched progenies from populations derived from crosses between non-dormant (subspecies *fastigiata*) and dormant (subspecies *hypogaea*) groundnut (*Arachis hypogaea* L.). **Oléagineux**, v. 42, p. 75-82, 1987.

WAN, X. R.; LING LI, L. Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 347, p. 1030-1038, 2006.

WANG, Z., CAO, H., SUN, Y., LI, X., CHEN, F., CARLES, A.; DING, M.; ZHANG, C.; DENQ, X.; SOPPE, W. J.; LIU, Y. X. *Arabidopsis* paired amphipathic helix proteins SNL1 and SNL2 redundantly regulate primary seed dormancy via abscisic acid-ethylene antagonism mediated by histone deacetylation. **Plant Cell**, v. 25, p. 149-166, 2013.

ZHAO, S. AND FERNALD, R.D. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. **Journal Computational Biology**, v. 12, p. 1045-1062, 2005.

ZONTA, J. B.; ARAUJO, E. F.; ARAUJO, R. F.; DIAS, L. A. S.; RIBEIRO, P. H. Storage of physic nut seeds in different environments and packagings. **Bioscience Journal**, v. 30, supplement 2, p. 599-608, 2014.

Differential Expression of Dormancy-Associated Genes in *Fastigiata* and *Hypogaea* Peanut

M.F.C. Silva¹, C.R.C. Silva², L.M. Lima³ and R.C. Santos³, Jean Pierre Cordeiro Ramos⁴

¹Universidade Estadual da Paraíba, Pós-Graduação em Ciências Agrárias,
Campina Grande, PB, Brasil

²Renorbio, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

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

⁴Center of Agrarian Sciences, Federal University of Paraíba, Areia, PB, Brazil

Corresponding author: L.M. Lima

E-mail: liziane.lima@embrapa.br

Genet. Mol. Res. 16 (4): gmr16039820

Received August 30, 2017

Accepted October 25, 2017

Published October 28, 2017

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr16039820>

Copyright © 2017 The Authors. This is an open-access article distributed under

the terms of the Creative Commons Attribution ShareAlike (CC BY-SA) 4.0 License.

ABSTRACT. Seed dormancy is a temporary replacement state observed in some higher plants, which prevents germination under unfavorable conditions. In several species, dormancy process is triggered by hormonal factors, initiated by ABA and precursor enzymes. In this work, we investigated the relationship between dormancy and the expression of ARP, DMR1, and NCED genes in upright and runner peanut seeds. Eight dormancy-contrasting genotypes were previously phenotyped based on germination traits, during three storage periods. Expression of ARP, DMR1 and NCED transcripts was analyzed by qRT-PCR, from endosperm and embryo tissues. Higher expression of NCED and ARP were found in embryo tissues from runner genotypes, IAC Caiapo and LGoPE-06, confirming findings in literature as to association of these genes with seed dormancy. Higher expression of DMR1 was found only in endosperm of upright materials (L7 Bege and BR1). We suggest the NCED is a functional molecular marker to identify dormancy in

seeds, contributing to selection procedures of runner genotypes in peanut breeding.

KEY WORDS: *Arachis hypogaea* L, Embryo,

Endosperm, ARP, DMR1 And NCED Genes.

INTRODUCTION

In agricultural crops, seed dormancy is generally an undesirable characteristic, where rapid germination and growth are required. The level of dormancy in many crops directly affects the quality of yield. Short and shallow dormancy may result in the harmful phenomenon- of pre-harvest sprouting, in which the seeds gain the ability to germinate while they are still on the mother plant (Kermode, 2004). The process triggers in the final stage of maturation of the seed, at the end of the cell cycle and is controlled by several genes and environmental factors, with broad hormonal influence (Hu et al., 2010; Footitt et al., 2014).

Genetic studies have demonstrated that alterations in the ABA biosynthesis can influence seed dormancy and germination. The loss of function of some genes that participate of ABA biosynthetic pathway results in reduced dormancy, whereas higher expression enhances dormancy (Frey et al., 2004; Cadman et al., 2006). Analysis of the expression of genes potentially encoding regulatory enzymes involved in ABA metabolism have been conducted with several crops (Chono et al., 2006; Hwang et al., 2010). Findings reported in literature have demonstrated that *NCED* (*9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases*), *ARP* (*Auxin Repressor Protein*) and *DMR1* (*Dormancy-associated gene 1*) are associated with ABA mechanisms, in routes responsible for control of dormancy processes (Footitt et al., 2014). *NCED* expression in response to environmental stresses is so rapid that *NCED* activity is considered the rate-limiting step in ABA biosynthesis. Hwang et al. (2010), found higher expression of *NCED3* in *Arabidopsis*, resulting in increased accumulation of ABA and a delay in germination of transgenic seeds compared to wild-type seeds.

ARP and *DRM1* belong to family members that have been involved in response to a number of hormonal and environmental treatments in several plant species. The involvement of *DRM1/ARP* in seed dormancy maintenance has been reported. In *Arabidopsis*, Schmid et al. (2005) found that high levels of *DRM1* transcript were reduced with seed imbibition, while transgenic lines higher expressing *DRM1* or *ARP1* exhibited delayed germination. In a transcriptome study carried out with *Brassica oleracea* using osmoprimed seeds and water germinated seeds, Soeda et al. (2005) found that *DRM1/ARP* was expressed only in seeds germinated on water, suggesting that the expression levels of *DRM1/ARPs* throughout germination are not integral to the process but might be indirectly linked. According to these authors, the profile in *B. oleracea* was shared with several stress-associated genes, including *cyclophilin*, *superoxide dismutase*, *GRP2*, and *glutathione-transferase*, providing evidence that *DRM1/ARP* may play a more general role in stress response in the seed.

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a valuable oilseed crop and known for the differentiated levels of seed dormancy in some genotypes, especially in subspecies hypogaea (Virginia and Runner types) (Faye et al., 2009). In the subspecies fastigiata, represented by upright accesses (Valencia and Spanish types), genotypes are early maturing but generally without fresh seed dormancy. Breeding for fresh seed dormancy in peanut is an important strategy in environments where rains may occur after pod maturity

In several region at worldwide, peanut crop is often carried out in the rainy season, with frequent short summers during the cycle. Environmental changes often interfere with germination and quality of the seeds. The grains contain 45-50% of oil, which contains 30-35% polyunsaturated fatty acids and 17-18% of saturated fatty acids (Santos et al., 2012a; Gunasekaran and Pavadai, 2015). This amount makes peanuts susceptible to oxidative rancidity during processing and storage that is the most common cause of quality loss. Polyunsaturated fatty acids have a high potential of developing off-flavors due to oxidation, which leads to the formation of hydroperoxides. The decomposition of hydroperoxides results in a wide variety of compounds, such as aldehydes and ketones, which interfere on seed germination (Vokou et al., 2003). High linoleic seeds are more resistant to oxidation and are found in Spanish and Valencia genotypes. Although no correlation has been found between fatty acids and germination, it is suggested that rancidity may be involved in the dormancy of hypogaea genotypes, since they have high concentration of oleic acid (Santos et al., 2012a; Gunasekaran and Pavadai, 2015).

The objective of this work was to investigate the relationship between dormancy and expression of *NCED*, *ARP*, and *DMRI* in seeds of peanut genotypes previously phenotyped, in order to identify markers that could be previously adapted in selection procedures for environments with water restriction.

MATERIAL AND METHODS

Phenotyping of peanut genotypes

Eight dormancy-contrasting peanut genotypes were chosen for the trials (Table 1). Five hundred full mature pods were collected from each genotype grown in a field, at Barbalha, CE, Brazil (07°18'40"S; 39°18'15"W, 414 m) and further stored at room temperature (RT: 23-25 °C, 56-66% relative humidity of air) for a period of up to eight months (240 days). The humidity of the seed at the beginning of storage was between 8-10%. Phenotyping was based on these traits: day to germination, germination rate and seedling height, estimated from seeds of each genotype in three storage periods, at 30 (T0), 150 (T1) and 240 (T2) days. Additionally, the oil content was also evaluated. Seeds were previously treated with Vitavax-Thiram 200SC (5,6-dihydro-2-methyl-1,4-oxathi-ine-3-carboxanilide), following manufacturing's recommendation.

Table 1. Botanical traits of hypogaea and fastigiata peanut genotypes.

Genotype	Subsp.	BT	GH	Genealogy/Origin	SS	DS	Cycle	100S
BR 1	F	V	U	Cv. (V)/PB, BR	M	No	89	45
BRS Havana	F	V	U	Cv. (V)/PB, BR	M	No	90	46
L7 bege	F	V	U	Top line (V X S)/PB, BR	L	No	90	49
IAC Caiapo	H	Vi	R	Cv. (Vi X S)/SP, BR	L	Yes	135	52
Cavalo	H	Vi	R	Land race/RO, BR	EL	Yes	145	68
LViPE-07	H	Vi	R	Land race/PE, BR	EL	Yes	152	72
LGoPE-06	H	Vi	R	Land race/PE, BR	EL	Yes	153	70
Florunner	H	Vi	R	Cv. (Vi)/USA	L	Yes	138	51

Subsp. F- fastigiata, H- hypogaea; BT- botanic type, V- Valencia, Vi- Virginia; GH- growth habit, U- upright, R- runner; Cv.- commercial cultivar; SS- seed size, M- mid, L- large, EG- extra-large; DS- dormancy in seed; 100S- 100 seed weight (g).

The germination analysis was carried out in BOD (Biochemical Oxygen Demand- growth chamber) chamber, using paper towel method (Abdul Baki and Anderson, 1973). Seeds were sown in rolled paper towels (Germitest) moistened with 10 mL of distilled water, and incubates at 25°C. After seven days of incubated, the number of seeds that had germinated was counted and measured the length of seedlings. The experiment was repeated three times with two replicates of fifty seeds each. The rate of germination was estimated by: %G = NSG/NST x 100 (% G = Total Germination; NSG = N of germinated seeds; NST = N of tested seeds).

The oil content was estimated by Nuclear Magnetic Resonance spectrometer (H1 OXFORD MQA 7005), following recommendation described in AOCS (2004). The test was repeated three times with two replicates of twenty seeds each. Samples were collected by chance to each repetition.

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA), using GENES software (Cruz, 2013). Significant effects of treatments were determined by F test ($p \leq 0.05$). Means were separated using Tukey's test ($p \leq 0.05$).

Expression analysis via RT-qPCR

Embryo and endosperm tissues were used for extraction of total RNA (Invisorb Spin Plant Mini Kit, Invitex, Germany) and further synthesis of cDNA (ImProm-IITM Reverse Transcription System kit, Promega), following manufacturer's recommendations. The reverse transcription was performed in 44 μ L, using 11 μ L of cDNA sample (1 μ g total RNA), 0.5 μ g Oligo dT₁₅ (10 mM), 1X ImProm-II Reaction Buffer, 6 μ L MgCl₂ (25 mM), 0.5 μ L dNTP set (10 mM), 1 U/ μ L Recombinant RNase Ribonuclease Inhibitor; 1.25 U/ μ L ImProm-IITM RT. Samples were incubated in a thermal cycler, first at 25°C/5 min, then at 42°C/1 h and 70°C/15 min.

The relative expression of *NCED*, *ARP* and *DMRI* transcripts was estimated by qRT-PCR (Eco Real-Time PCR System – Illumina, SD, USA) using Evagreen kit (Biotium Inc., Hayward, CA, USA), according to manufacturer's instructions. The primers used in this study were previously designed from conserved regions of *NCED* (gi 340764664, *Glycine max*, gi 6715256, *Phaseolus vulgaris*, gi 22335698, *Pisum sativum*, gi 4276042, *Arachis hypogaea*, *ARP* (gi71040686, *A. thaliana*, gi 357446688, *Medicago truncatula*) and *DMRI* (gi 2995989, *A. thaliana*, gi 2605886, *Pisum sativum*, gi 229893931, *Brassica rapa*) from several accessions available in NCBI

gene bank. The ClustalW2 program (www.ebi.ac.uk) was used to alignment of sequences. The set of primers used in assays are displayed in Table 2.

Table 2. Sequence of specific and constitutive primers used in assays.

Gene	Primers (Forward/Reverse, 5'→3')
<i>NCED</i>	GAAGGAAGACACAGTTCGCA/ AGGAAGAAACATCGGCTCAC
<i>ARP</i>	GGTCTGTTAGAGAAGCTG/ GCGGTGCTTGCTCCTTGTC
<i>DMRI</i>	GGATGATATTGTTGCTGGCCC/ CGCAATCGACGTGCTTCTCA
<i>β-actina*</i>	GATCTGGCATCACACCTTC/ AGGAAGCTCGTAGCAGCTCTT
<i>PP2A**</i>	GTCATCCTTTCAGGTACAAGCA/ CGTTACAAACAACAGCTCCTTC

*Batista et al. (2015); **Ártico et al. (2014); *PP2A*- Protein phosphatase 2A.

Primers were used at 10 mM and designed to amplify at 60°C. All reactions were carried out with experimental triplicate and biological duplicate. The threshold cycle (Ct) and PCR efficiency was estimated by Real-time PCR Miner program (Zhao and Fernald, 2005). The analyses of gene expression were performed using the qBASEPlus program (Hellemans et al., 2007). The graphics, Cqs and Melt curves were automatically generated based on the normalization method with a reference gene, $\Delta\Delta Cq$ (Livak et al., 2001). Relative quantification estimated the expression pattern.

RESULTS AND DISCUSSION

Phenotyping of fastigiata and hypogaea genotypes

The traits used to phenotyping fastigiata (upright) and hypogaea (runner) genotypes were adequate to identify contrasting materials to seed dormancy. No evidence of dormancy was found in upright genotypes, based on data provided in Figure 1. The profile of BR 1 and BRS Havana was quite similar (Figure 1).

Comparative Study of Blood-Derived Scaffolds

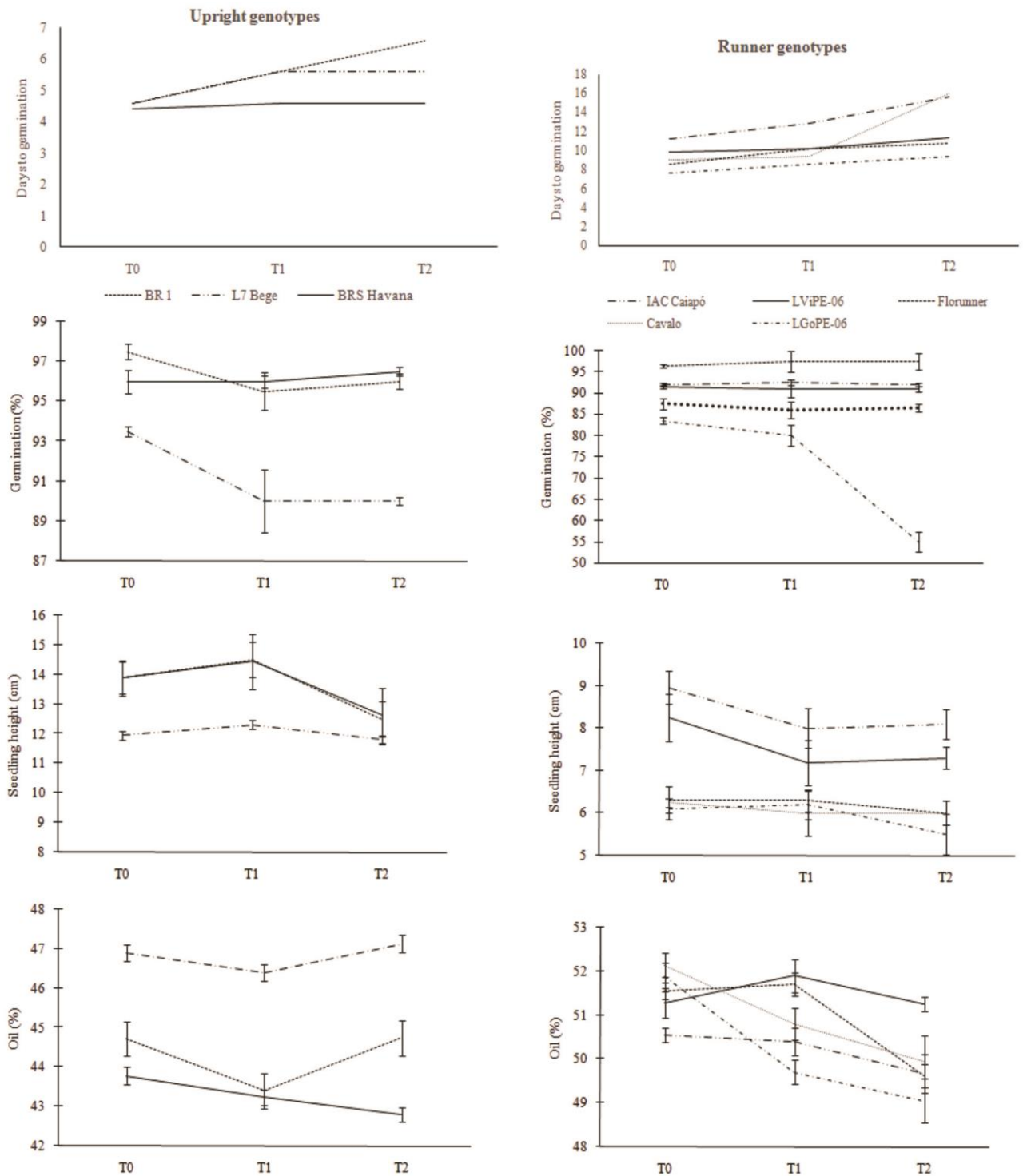


Figure 1. Days to germination, germination rate, seedling height and oil content from seeds of upright and runner genotypes of peanut. T0, T1 and T2 mean the periods that seeds were collected to assays, at 30, 150 and 240 days after the beginning of pod storage at RT.

No expressive lapse was found to germination of both cultivars. The rate of germination was 96% during the assay. The height of seedling, however, decreased in 14% at 240 days of pod storage. In L7 bege, a slight delay on germination was found at final of assay (T2). The rate of germination decreased in 7%, nevertheless, no statistical difference was seen in height of seedlings during storage period. These slight oscillations are often expected in oil seeds, stored at room temperature (Almeida et al., 2010).

In runner genotypes, the process of germination started at 8 to 12 days in T0 treatment, reaching 17 days in the more dormant genotypes (IAC Caiapo and Cavalo), at the end of assays. The rate of germination was maintained

almost uniform to all materials, between 87% to 98%, excepting to Cavallo that started at 85% (T0) and reached 55%, at 210 days of pod storage (T2). No statistical difference was found to Florunner, LViPE-06 and Cavallo to seedling height in all treatments, while in IAC Caiapo and LGoPE-06, the height was reduced to 11% and 12%, respectively, from 150 days (T1) of pod storage at RT.

The variation of oil content was not expressive in both set of genotypes. No statistical differences were found to upright genotypes, but in runner types, reductions were situated among 4% (LViPE-06 and Florunner) and 6% (Cavallo). IAC Caiapó and LGoPE-06 did not show statistical differences during the periods of storage evaluated.

Literature displays several reports involving germination of oleaginous seeds under large storage period (Neergaard, 1977; Bhattacharya and Raha, 2002; Balešević-Tubić et al., 2010). According to Neergaard (1977) seeds with high oil content possess lower moisture than those with high protein or starch. In peanut, no evident correlation has been found in dormancy and storage, but rancidity is involved with oleic/linoleic ratio, which is higher in runner genotypes (Bhattacharya and Raha, 2002; Balešević-Tubić et al., 2010; Santos et al., 2012a). High rancidity interferes on seed germination of peanut seeds (Santos et al., 2012a; Gunasekaran and Pavadai, 2015). Some peanut researchers have used intersubspecies crosses in order to minimize the effect of rancidity and maintain the dormancy of the seeds (Wadia et al., 1987; Faye et al., 2009; Santos et al., 2012a). According to Wadia et al. (1987), Virginia x Spanish crosses may lead to lines with fresh seed dormancy but matures up to 10 days latter than the Spanish parent. Faye et al. (2009) report the existence of dormancy in the fastigiata types, although to a lesser extent. In an evaluation of dormancy on lines derived from crosses between Spanish genotypes, authors found intensity of dormancy ranging from 12% to 100%, with duration varying from 15 to 35 days.

Based on these information, we choose LGoPE-06, and IAC Caiapo representing moderate and deep dormant treatments, respectively, for further molecular assays. LGoPE-06 is a decumbent runner used in Brazilian peanut breeding coordinated by Embrapa (Brazilian Agricultural Research Corporation) due its high pod yield and extra-large seed (Santos et al., 2012a). IAC Caiapo is a cultivar generated by Spanish x Virginia cross and widely cropped by peanut farmers situated at Brazilian southeast. The upright genotypes BR 1 and L7 bege, were chosen to represent no-dormant treatment.

Relative expression of *NCED*, *ARP*, and *DMR*

ABA represses germination and is presumed to function to stabilize the dormant state in seeds (Kermode, 2005; Finkelstein et al., 2008). ABA deficiencies during seed development are associated with the absence of primary dormancy of mature seed, whereas higher expression of ABA synthesis genes increases the ABA content and seed dormancy or delay germination (Qin and Zeevaart, 2002; Finkelstein et al., 2008). Several genes are associated with ABA regulation, including *NCED*, whose role in seed dormancy is widely described in the literature. According to Kermode (2005), the expression of the *NCED* is upregulated in embryos during imbibition of both dormant and non-dormant seeds; however, it is induced to a greater extent in embryos of dormant imbibed grains. In seeds of *Arabidopsis*, tomato and tobacco, the whereas higher expression of ABA synthesis genes increases the ABA content of *NCED* leads to higher ABA level, increasing seed dormancy (Luchi et al., 2001; Qin and Zeevaart, 2002).

Here, we also found higher expression of *NCED* in dormant seeds of peanut genotypes. As show in figure 2A, transcripts were basically found in embryo tissues of runner genotypes, with higher expression in deep-dormant IAC Caiapo (50x). These results attest that *NCED* can be adopted as a marker of dormancy in embryos of peanut seeds, confirming results found in the literature.

The biosynthetic network of genes involved in dormancy process is large and complex. *NCEDs* and *CYP707As* (ABA 8'-hydroxylases) are the major key regulatory enzymes for ABA biosynthesis and degradation, respectively. Both are encoded by multigene families, and their tissue- and environment-specific regulation determines the ABA contents (Qin and Zeevaart, 2002; Ali-Rachedi et al., 2004; Finkelstein et al., 2008). In works carried out with deep dormant seeds of *Arabidopsis*, Ali-Rachedi et al. (2004) have demonstrated that dormancy may depend on an intrinsic balance of GA (Gibberellic acid) and ABA biosynthesis and catabolism, which will determine the dominance of either of the hormones. According to the authors, GA treatment of dormant seeds caused a transient increase in ABA concentration, suggesting that in dormant seeds a feedback mechanism exists that maintains a high ABA:GA ratio.

It is believed that in many cases the interactions between ABA and other hormones result in a process in which dormancy and gem growth are regulated by the balance between gem growth inhibitors such as ABA and promoter substances such as cytokinins, gibberellins, and auxins. Although ABA and gibberellins are known to be the primary phytohormones that antagonistically regulate seed dormancy, recent findings demonstrate that another phytohormone, auxin, is also critical for inducing and maintaining seed dormancy, and therefore might act as a key protector of seed dormancy (Shu et al., 2015).

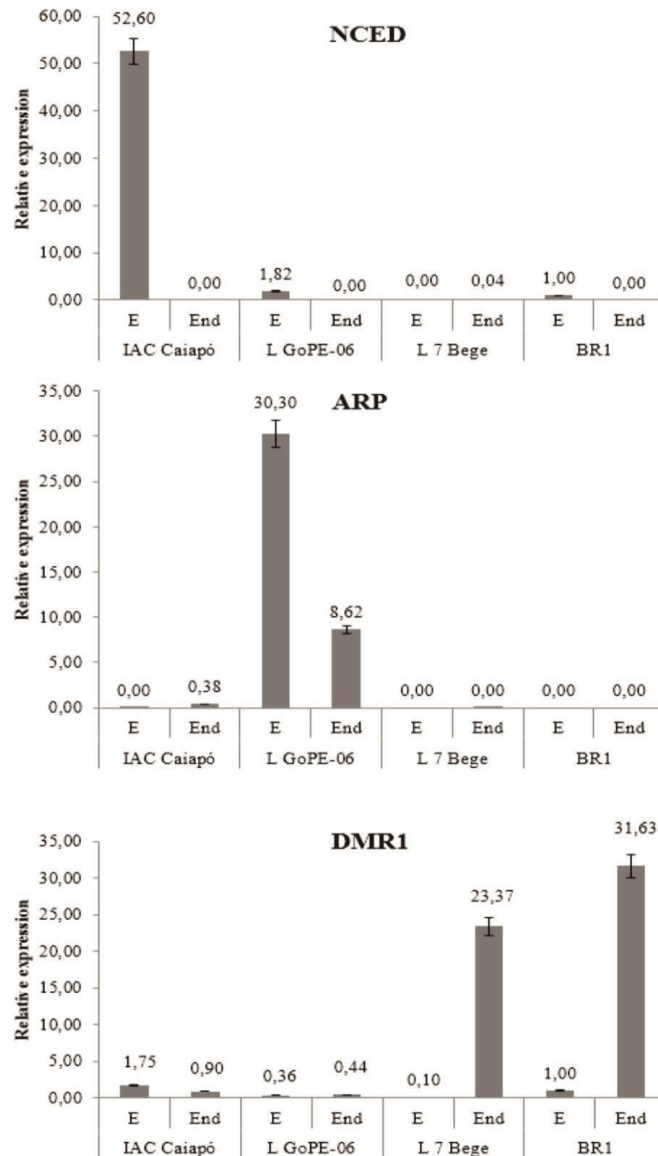


Figure 2. Relative expression of *NCED*, *ARP* and *DMR1* genes in embryo (E) and endosperm (End) tissues of runner and upright peanut genotypes. The error bars indicate standard deviation of mean.

Auxin, a common growth-stimulating phytohormone, regulates a variety of growth and developmental processes in plants, leading to changes in the expression of many auxin-activated and auxin-repressed genes. *ARP* and *DRM* genes are closely related and isolated from dicots and monocots. Both form the *ARP/DRM* gene family and are often used as a genetic marker for dormant meristematic and seed tissues (Lee et al., 2013; Rae et al., 2013). In a study of molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed superfamily genes, Lee et al. (2013) found that increases in both BrARP1 and BrDRM1 levels in *Arabidopsis* plants caused delayed germination; reduction in root, hypocotyl, and leaf growth; and reduction in final plant size and seed production.

Here, the expression of *ARP* in peanut genotypes is shown in figure 2B. Transcription was found only in runner genotypes, higher expression in endosperm (8x) and embryo of LGoPE-06 (up to 30x). Seeds of LGoPE-06 are

extra-large, rich in fatty acids and more tolerant to drought than IAC Caiapo (Santos et al., 2012a and b). Findings in the literature report transcriptional upregulation of *DRMI/ARP* family members in response to abiotic factors, such as drought and salt, in several species including *A. hypogaea* (Shimizu et al., 2006; Govind et al., 2009). Considering that both runner genotypes have expressive seed dormancy, it is possible that higher expression found in LGoPE-06 could be associated with expression of other traits, such as environmental adaptation. While IAC Caiapo was developed to environments with regular rainfall, LGoPE-06 is a top line improved to the semiarid region of Brazilian Northeast (Santos et al., 2012b).

As to *DMRI* transcripts shown in Figure 2C, the pattern of expression obtained to IAC Caiapo was similar to that seen for *ARP* (Figure 2B), in both tissues. Low expression was found in other genotypes, except for a higher expression in the endosperm of upright materials. As most of the results found in the literature with *NCED*, *ARP*, and *DMRI* have been reported in dormant seeds, we have done a vast search in order to explain the expression profile seen in upright genotypes. According to Rae et al. (2013), besides the processes of dormancy, regulation of *DRMI/ARP* has been assessed in response to a number of treatments: hormonal, sugars, and abiotic and biotic across a number of plant species. In peanut, Govind et al. (2009) reported *DRMI/ARP* transcript expression in response to gradual water stress. As BR 1 and L7 bege are earliness and widely tolerant to drought (Duarte et al., 2013), we suggest that higher expression found in endosperm of these materials could be benefited by effect of this trait.

In this work, we estimated the expression of *NCED*, *ARP* and *DMRI* in previously phenotyped dormant-seed peanut germplasm. Although the results obtained here have been quite interesting in the aspect of expression in the different tissues, we suggest that *NCED* is more suitable for further use in selection procedures, in breeding works for runner peanut improvement.

CONFLICT OF INTERESTS

The authors declare no conflict of interest in the conduction of this study.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Embrapa and CAPES for financial support and scholarship, respectively.

REFERENCES

- Artico S, Lambret-Frotté J, Nardeli SM, Oliveira-Neto OB, et al. (2014). Isolation and characterization of three new promoters from *Gossypium hirsutum* that show high activity in reproductive tissues. *Plant Mol. Biol. Rep.* 32: 630-643. <https://doi.org/10.1007/s11105-013-0674-0>
- Abdul Baki AA, Anderson JD (1973). Vigor determination in soybean seed by multiple criteria. *Crop Sci.* 13: 630-633. <https://doi.org/10.2135/cropsci1973.0011183x001300060013x>
- Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, et al. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta.* 219: 479-488. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1251-4>
- Almeida FAC, Jerônimo ES, Alves NMC, Gomes JP, et al. (2010). Estudo de técnicas para o armazenamento de cinco oleaginosas em condições ambientais e criogênicas. *Rev. Bras. Prod. Agro.* 12: 189-202. <https://doi.org/10.15871/1517-8595/rbpa.v12n2p189-202>
- AOCS (2004). American Oil Chemists Society. Official Methods and recommended practices of the aoac, sampling and analysis of vegetable oil source materials, Section A. AOCS recommended practice Ak 5-01 approved 2001. Simultaneous determination of oil and moisture contents of oilseed residues using pulsed nuclear magnetic resonance spectrometry. In: American Oil Chemists Society. Official methods and recommended practices of the AOCS. 5 ed., AOCS, Champaign, Ill. 4.
- Batista VGL, Pinheiro MPN, Melo Filho PA, Santos RC, et al. (2015). Temporal and tissue expression of genes involved in buds of earliness cotton cultivar. *Gen. Mol. Res.* 3: 7386-7394. <https://doi.org/10.4238/2015.july.3.14>
- Balešević-Tubić S, Tatić M, Đorđević V, Nikolić Z, et al. (2010). Seed viability of oil crops depending on storage conditions. *Helia.* 52: 153-160. <https://doi.org/10.2298/hel1052153b>
- Bhattacharya K, Raha S (2002). Deteriorative changes of maize, groundnut, and soybean seeds by fungi in storage. *Mycopathologia.* 155: 135-141.
- Cadman CSC, Toorop PE, Hilhorst HWM, Finch-Savage WE (2006). Gene expression profiles of *Arabidopsis* Cvi seeds during dormancy cycling indicate a common underlying dormancy control mechanism. *Plant J.* 46: 805-822. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113x.2006.02738.x>

Comparative Study of Blood-Derived Scaffolds

- Chono M, Honda I, Shinoda S, Kushiro T, et al. (2006). Field studies on the regulation of abscisic acid content and germinability during grain development of barley: molecular and chemical analysis of pre-harvest sprouting. *J. Exp. Bot.* 57: 2421-2434. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj215>
- Cruz CD (2013). GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Sci. Agron.* 35: 271-276. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.21251>
- Duarte EAA, Melo Filho PA and Santos RC (2013). Características agronômicas e índice de colheita de diferentes genótipos de amendoim submetidos a estresse hídrico. *Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.* 17: 843-847. <https://doi.org/10.1590/s1415-43662013000800007>
- Faye I, Ndoye O, Diop TA (2009). Evaluation of fresh seed dormancy on seven peanut (*Arachis hypogaea* L.) lines derived from cross between Spanish varieties: Variability on intensity and duration. *J. Appl. Sci. Res.* 5: 853-857.
- Finkelstein RR, Reever W, Ariizumi T, Steber C (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Ann. Rev. Plant Biol.* 59: 387-415.
- Footitt S, Clay HA, Dent K, Finch-Savage WE (2014). Environment sensing in spring-dispersed seeds of a winter annual *Arabidopsis* influences the regulation of dormancy to align germination potential with seasonal changes. *New Phytol.* 202: 929-939. <https://doi.org/10.1111/nph.12694>
- Frey A, Godin B, Bonnet M, Sotta B, et al. (2004). Maternal synthesis of abscisic acid controls seeds development and yield in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Planta* 218: 958-964. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1180-7>
- Govind G, Harshavardhan VT, Patricia JK, Dhanalakshmi R, et al. (2009). Identification and functional validation of a unique set of droughts induced genes preferentially expressed in response to gradual water stress in peanut. *Mol. Genet. Genomics.* 281: 591-605. <https://doi.org/10.1007/s00438-009-0441-y>
- Gunasekaran A, Pavada P (2015). Studies on induced physical and chemical mutagenesis in groundnut (*Arachis hypogaea*). *Int. Lett. Nat. Sci.* 8: 25-35. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/ilns.35.25>
- Helleman J, Mortier G, De Paepe A, Speleman F, et al. (2007). qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* 8: R19.
- Hu B, Wan X, Liu X, Guo D, et al. (2010) Abscisic acid (ABA)-mediated inhibition of seed germination involves a positive feedback regulation of ABA biosynthesis in *Arachis hypogaea* L. *Afr. J. Biotechnol.* 9: 1578-1586. <https://doi.org/10.5897/ajb10.1819>
- Hwang SG, Chen HC, Huang WY, Chu YC, et al. (2010) Ectopic expression of rice OsNCED3 in *Arabidopsis* increases ABA level and alters leaf morphology. *Plant Sci.* 178: 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.09.014>
- Kermode AR (2004) Developmental traits. Germination. In: Handbook of plant biotechnology (Klee H, Christou P, eds.). UK: John Wiley & Sons.
- Kermode AR (2005). Role of abscisic acid in seed dormancy. *J. Plant Growth Regul.* 24: 319-344. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0110-2>
- Lee J, Han CT, Hur Y (2013). Molecular characterization of the *Brassica rapa* auxin-repressed, superfamily genes, *BrARPI* and *BrDRM*. *Mol. Biol. Rep.* 40: 197-209. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2050-9>
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods.* 25: 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Luchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, et al. (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J.* 27: 325-333. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.2001.01096.x>
- Neergaard P. (1977) Seed pathology. MacMillan Press, London.
- Qin X, Zeevaert JA (2001). Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. *Plant Physiol.* 128: 544-551. <https://doi.org/10.1104/pp.010663>
- Rae GM, David KM and Wood M (2013). The dormancy marker DRM1/ARP: associated with dormancy but a broader role in planta. *Dev. Biol. J.* ID 632524: 12 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/632524>
- Santos RC, Freire RMM, Lima LM, Zagonel GF, et al. (2012). Produtividade de grãos e óleo de genótipos de amendoim para o mercado oleoquímico. *Rev. Ciên. Agron.* 43: 72-77. <https://doi.org/10.1590/s1806-66902012000100009>
- Santos RC, Silva AF, Gondim TMS, Oliveira-Júnior JOL, et al. (2012b). Stability and adaptability of runner peanut genotypes based on nonlinear regression and AMMI analysis. *Pesq. Agropec. Bras.* 47: 1118-1124. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2012000800012>
- Schmid M, Davison TS, Henz SR, Pape UJ, et al. (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* 37: 501-506.
- Shimizu M, Suzuki K, Miyazawa Y, Fujii N, et al. (2006). Differential accumulation of the mRNA of the auxin-repressed gene CsGRP1 and the auxin-induced peg formation during gravimorphogenesis of cucumber seedlings. *Planta* 225: 13-22. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0324-y>
- Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH (2015). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant* 5: 1674-2052.

<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.010>

Soeda Y, Konings MCJM, Vorst O, van Houwelingen AMML, et al. (2005). Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiology*, 137: 354-368. <https://doi.org/10.1104/pp.104.051664>

Vokou D, Douvli P, Blionis GP, Halley JM. (2003). Effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. *J. Chem. Ecol.* 29: 2281-2301.

Wadia KDR, Nageswara Rao RC and William JH (1987). An improved method for identification of dormant sequentially branched progenies from populations derived from crosses between non-dormant (subspecies *fastigiata*) and dormant (subspecies *hypogaea*) groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Oléagineux* 42: 75-82.

Zhao S and Fernald RD (2005). Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. *J. Comput. Biol.* 12: 1045-1062. <https://doi.org/10.1089/cmb.2005.12.1047>