

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE TRANSPORTADORES ABC ENTRE
CLONES DE *Theobroma grandiflorum* E *Theobroma cacao***

LUAN AFFONSO MONTANDON POMPEU

JABOTICABAL – SP

2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE TRANSPORTADORES ABC
ENTRE CLONES DE *Theobroma grandiflorum* E *Theobroma cacao*

LUAN AFFONSO MONTANDON POMPEU

Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Trabalho apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, para graduação em ENGENHARIA
AGRONÔMICA.

JABOTICABAL – SP

1º semestre/2024

P788a	Pompeu, Luan Affonso Montandon Análise genômica comparativa de transportadores ABC entre clones de Theobroma grandiflorum e Theobroma cacao / Luan Affonso Montandon Pompeu. -- Jaboticabal, 2024 32 p. : il., tabs. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Engenharia Agrônômica) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientador: Vitor Fernandes Oliveira de Miranda Coorientador: Alessandro de Mello Varani 1. Genômica. 2. Plantas Genetica molecular. 3. Theobroma. 4. Cupuaçu. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

DEPARTAMENTO: Biologia

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO: ANÁLISE GENÔMICA COMPARATIVA DE TRANSPORTADORES ABC ENTRE
CLONES DE *Theobroma grandiflorum* E *Theobroma cacao*

ACADÊMICO: LUAN AFFONSO MONTANDON POMPEU

CURSO: Engenharia Agrônômica

ORIENTADORES: Orientador: Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda
Coorientador: Prof. Dr. Alessandro de Mello Varani

Aprovado e corrigido de acordo com as sugestões da Banca Examinadora

BANCA EXAMINADORA:

(Nomes)

(Assinaturas)

Presidente Prof. Dr. Vitor Fernandes O de Miranda

gov.br

Documento assinado digitalmente
VITOR FERNANDES OLIVEIRA DE MIRANDA
Data: 31/05/2024 10:52:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro

gov.br

Documento assinado digitalmente
DANIEL GUARIZ PINHEIRO
Data: 29/05/2024 16:27:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro Dra. Saura Rodrigues Silva

gov.br

Documento assinado digitalmente
SAURA RODRIGUES DA SILVA
Data: 31/05/2024 09:49:07-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal 27 / maio / 2024

Aprovado em reunião do Conselho do Departamento em: 03 / 06 / 2024

Dani R. Ronatto

Chefe do Departamento

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Campus de Jaboticabal, por ter me acolhido como estudante de graduação;

Ao Departamento de Biotecnologia Agropecuária e Ambiental e aos Professores Drs. Lucia Maria Carareto, Daniel Guariz Pinheiro e Alessandro de Mello Varani pela oportunidade, paciência e valiosa orientação durante minha trajetória;

Ao apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e UNESP (**CNPq, Edital PROPe Unesp Nº04/2022**) e à Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo – FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - **processo nº 2019/25176-0**, sem o qual este estudo não seria possível;

A minha família e amigos pelo apoio que me permitiu chegar até aqui.

ÍNDICE

Resumo.....	vi
Abstract.....	vii
1. Introdução.....	1
2. Materiais e métodos	6
3. Resultados e discussão.....	8
4. Conclusão.....	19
Referências.....	20

RESUMO

O gênero *Theobroma* da família Malvaceae, que inclui *Theobroma cacao* (cacaueiro) e *Theobroma grandiflorum* (cupuaçuzeiro), possui um grande potencial econômico na região amazônica. Enquanto o cacau é amplamente explorado na fabricação de chocolate, o cupuaçu está ganhando espaço, principalmente devido ao interesse em sua polpa para bebidas e alimentos. Ambas as espécies enfrentam desafios significativos devido a doenças que afetam sua produção, principalmente a vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*). A tolerância a estresse e patógenos em ambas as espécies está relacionada a diversos mecanismos, dentre estes, os transportadores ABC, que desempenham um papel importante na resposta imune e na adaptação ambiental. Neste estudo, os genes de transportadores ABC de clones de cupuaçuzeiro resistente e suscetível a vassoura-de-bruxa e variedades Criollo e Matina de cacaueiro foram identificados e passaram por classificação em subfamílias, localização nos cromossomos, inferência de eventos de duplicação e análise comparativa filogenética. Juntas estas informações podem dar suporte para a elucidação das causas genéticas das diferenças entre as espécies de *Theobroma*, entre as variedades de cacaueiro e de características agronomicamente importantes, como resistência a estresses e a doenças.

Palavras-chave: cupuaçu, cacau, genética molecular, transporte celular, genômica comparativa.

ABSTRACT

The *Theobroma* genus from the Malvaceae family, which includes *Theobroma cacao* (cocoa tree) and *Theobroma grandiflorum* (cupuassu tree), holds significant economic potential in the Amazon region. While cocoa is extensively exploited in chocolate production, cupuassu is increasingly popular, especially due to interest in its pulp for beverages and foods. Both species face significant challenges due to diseases that impact their yield, particularly witches' broom disease (*Moniliophthora perniciosa*). The tolerance to stress and pathogens in both species can be linked to ABC transporters, which play a crucial role in immune response and environmental adaptation. In this study, ABC transporter genes from resistant and susceptible cupuassu clones to witches' broom, and Criollo and Matina cocoa varieties were identified and underwent subfamily classification, chromosomal localization, duplication event inference, and comparative and phylogenetics analysis. Together, these insights may support the elucidation of the genetic causes of differences between *Theobroma* species, among cocoa varieties, and agronomically important traits, such as resistance to stress and diseases.

Keywords: cupuassu, cocoa, molecular genetics, cellular transport, comparative genomics

1. INTRODUÇÃO

Nativo da floresta amazônica, o gênero *Theobroma* da família Malvaceae é um dos que se destaca quanto ao potencial econômico na região, sobretudo *Theobroma cacao* (cacaueiro) e *Theobroma grandiflorum* (cupucaçuzeiro). O cacau já é amplamente explorado pela indústria mundial, principalmente na fabricação de chocolate.

Ganhando espaço, o cupuaçu tem uma produção essencialmente brasileira que hoje atrai interesse de mercados externos, com interesse especial pela polpa, utilizada em bebidas, sorvete, doces e iogurte. As sementes recebem atenção como matéria-prima na produção de cosméticos e de “cupulate”, alternativa ao chocolate de cacau (Carvalho et al., 2004). Trata-se de uma cultura de grande importância socioeconômica para a região Amazônica, sobretudo para produtores familiares, e de boa adaptação para sistemas agroflorestais (Alves et al., 2020). Além disso, a fruta possui compostos com propriedades antioxidantes, probióticas e de redução de triglicérides (Avila-Sosa et al., 2019).

Ambas as espécies sofrem perdas substanciais em sua produção por doenças, como as causadas por oomicetos do gênero *Phytophthora* (podridão parda do cacaueiro) e por fungos basidiomicetos hemibiotróficos do gênero *Moniliophthora*, incluindo *M. perniciosa* (vassoura-de-bruxa) e *M. roreri* (moniliose) (Jiménez; Alvarez; Mosquera, 2022; Rêgo; Mora-Ocampo; Corrêa, 2023).

Dentre as doenças que atingem principalmente os frutos, destacam-se a podridão parda do cacaueiro, doença mais comum do gênero *Theobroma* no mundo (Rêgo; Mora-Ocampo; Corrêa, 2023), e a moniliose, uma ameaça

conhecida na América Latina que teve uma introdução recente no Brasil (Siviero, 2022). A vassoura-de-bruxa, nomeada conforme o sintoma de crescimento anormal dos ramos que esta provoca, é a mais prevalente e especialmente destrutiva na história brasileira. A doença causa perdas de até 90% na produção de frutos de cacau e contribuiu para o declínio do Brasil como segundo maior produtor de cacau no mundo (Moretti-Almeida *et al.*, 2019). Ainda que tenham sido desenvolvidos genótipos de cacaueiro e cupuaçuzeiro com graus de resistência à vassoura-de-bruxa, a doença mantém protagonismo no manejo e programas de melhoramento (Alves; Chaves, 2020; Santos *et al.*, 2023).

Além de resistência a patógenos, é crescente a importância de que programas de melhoramento se adaptem às mudanças climáticas, buscando a sustentabilidade a longo prazo da produção, visto que a maior ocorrência de fenômenos climáticos extremos pode afetar severamente a produtividade dessas culturas. Para o cacaueiro, períodos prolongados de baixa pluviosidade afetam significativamente a massa seca de raízes, crescimento e produção, assim como alagamentos afetam a fotossíntese (Lahive; Hadley; Daymond, 2018).

Neste cenário, o principal desafio dos respectivos programas de melhoramento é aliar resistência a doenças e estresses com produtividade. Enquanto o cacau tem ampla distribuição geográfica e disponibilidade de dados moleculares para suporte ao seu programa de melhoramento genético, o cupuaçu tem domesticação relativamente recente e carece de mais estudos (Falcão *et al.*, 2022).

O cacaueiro teve seu genoma sequenciado para duas variedades (Argout *et al.*, 2017; Motamayor *et al.*, 2013) e possui disponibilidade de dados proteômicos e transcriptômicos (Santos *et al.*, 2020; Junior *et al.*, 2012). Muitos esforços foram feitos para a caracterização da interação planta-patógeno de *Moniliophthora perniciosa* em cacau, embora estudos considerando a aplicação deste conhecimento seja ainda limitada (Santos *et al.*, 2023).

Os avanços em dados ômicos já existentes para o cacau podem acelerar a caracterização molecular do cupuaçu por meio da genômica comparativa e indicar oportunidades para aplicações biotecnológicas e genes candidatos para o seu melhoramento, embora sejam necessários dados específicos (Falcão *et al.*, 2022; Kuhn *et al.*, 2010).

Alguns estudos foram feitos para identificação de genes de interesse em *T. grandiflorum* com foco em tolerância a estresses abióticos e bióticos, assim como qualidade do fruto, que pode considerar propriedades diferentes se comparado ao cacau (Santos *et al.*, 2016, 2022). Silva *et al.* (2020) identificou quitinases e osmotinas como proteínas antifúngicas envolvidas no processo de resistência, enquanto Falcão *et al.* (2022) apresenta a dinâmica da expressão gênica nos estágios iniciais da doença como base para identificação de genes. Ambos ressaltam a importância da sinalização por fitormônios na relação planta-patógeno e o potencial de transferência de estudos genômicos de *T. cacao* para *T. grandiflorum*.

A superfamília de transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) é caracterizada por proteínas em sua maioria contendo dois domínios de ligação de nucleotídeo (NBDs), altamente conservados, e dois domínios transmembrana

(TMDs), estes com alta variabilidade, permitindo o transporte de muitos substratos diferentes, até mesmo por um único transportador (Do *et al.*, 2021). Em geral, promovem transporte ativo de compostos contra um gradiente pela hidrólise de ATP, adaptando-se aos processos metabólicos relativamente lentos das plantas terrestres, que possuem muito mais transportadores ABC que outros grupos (Hwang *et al.*, 2016). Essas proteínas são classificadas nas subfamílias ABCA – ABCG e ABCI, que tendem a agregar funções similares (Verrier *et al.*, 2008).

As proteínas ABC desempenham funções diversas, incluindo secreção de materiais da cutícula foliar, transporte de moléculas de defesa, transporte bioquímico intermediário entre organelas, transporte de fitormônios, detoxificação e controle da germinação de sementes (Hwang *et al.*, 2016).

Os transportadores ABC desempenham um papel significativo na resistência das plantas a patógenos, desencadeando uma série de mecanismos de defesa. Essas proteínas têm a capacidade de exportar metabólitos secundários com ação tóxica à patógenos. Por exemplo, a medicarpina, um isoflavonóide antimicrobiano, é produzida por espécies do gênero *Medicago* e transportada por um transportador da subfamília ABCG em resposta a ataques de patógenos (Banasiak *et al.*, 2013).

Os transportadores também podem atuar na resistência a patógenos de forma indireta. Algumas proteínas ABCG contribuem para a detoxificação de radicais livres nas células vegetais, fator que foi relacionado com o processo de defesa de genótipos resistentes de cacau a *Moniliophthora perniciosa* (Do *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2020).

Os transportadores ABC também foram associados à resposta a estresses, principalmente a calor, seca e estresse salino, em diversas plantas cultivadas (Dahuja *et al.*, 2021).

Tabela 1: Funções e domínios estruturais de cada subfamília de transportadores ABC

Subfamília	Domínios	Funções conhecidas
ABCA	(TMD-NBD)2; TMD-NBD	Transporte de lipídeos
ABCB	(TMD-NBD)2; TMD-NBD	Detoxificação; transporte de auxina e precursores, transporte de precursores de cluster Fe-S; regulação de abertura estomatal; acúmulo de moléculas de defesa
ABCC	(TMD-NBD)2	Detoxificação; acúmulo de moléculas de defesa; transporte de ácido fítico
ABCD	(TMD-NBD)2; TMD-NBD	Importação de ácidos graxos no peroxissomo
ABCE	NBD-NBD	Regulação da tradução
ABCF	NBD-NBD	Regulação da tradução; autoincompatibilidade
ABCG	NBD-TMD; (NBD-TMD)2	Secreção de materiais de revestimento (cutina, cera, lignina, suberina e revestimento do pólen); transporte de citocinina, ABA, AJ; regulação do microbioma das raízes; detoxificação; secreção de moléculas de defesa; sequestro de poliaminas
ABCI	Variável	Transporte de citocinina; transporte de lipídeos; transporte em cloroplastos;

Fonte: Elaborado de acordo com Verrier *et al.* (2008) e Do *et al.* (2021)

Considerando a proximidade evolutiva entre os *Theobroma cacao* e *T. grandiflorum*, a genômica comparativa faz-se uma ferramenta valiosa para lançar luz às causas genéticas das características divergentes entre os genomas estudados. Assim, neste trabalho objetivou-se caracterizar a superfamília dos transportadores ABC em cacau e cupuaçu, que possui ampla gama de funções relacionadas à resistência a estresses importantes para a produção destes, de

forma que seu estudo funcional possa levar a avanços no entendimento da adaptação ambiental e no potencial de melhoramento genético de ambas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados para análises quatro genomas anotados, incluindo dois de *Theobroma cacao* (cacaueiro) e dois de *T. grandiflorum* (cupuaçuzeiro). Os genomas de cacaueiro são referentes à genótipos da variedade Matina e Criolo (Argout *et al.*, 2017; Motamayor *et al.*, 2013), enquanto os genomas de cupuaçuzeiro são sequenciados dos clones C174 e C1074, respectivamente resistente e suscetível à vassoura-de-bruxa (*Moniliophthora perniciosa*) e obtidos pelo projeto regular FAPESP #19/25176-0 - Genoma e transcriptoma do *Theobroma grandiflorum* (cupuaçu): uma abordagem comparativa, evolutiva e funcional.

Para as análises subsequentes, foram utilizados os arquivos de anotação gerados para os quatro genomas e obtidos a partir do website: <https://plantgenomics.ncc.unesp.br/>. A partir de arquivos FASTA contendo sequências de aminoácidos de cada genoma obtidos, foram buscadas proteínas ABC com uso de palavras-chave usuais para essas nas bases de dados de proteínas. Os genes resultantes foram alinhados utilizando o programa de alinhamento de múltiplas sequências MAFFT (Nakamura *et al.*, 2018), com o método L-INS-i.

Com o alinhamento foram construídas árvores filogenéticas por máxima verossimilhança para cada genoma com o programa IQ-TREE (Nguyen *et al.*, 2015) e uso de reamostragem por *bootstrap* com 1000 replicatas para aferir a

confiabilidade das relações evolutivas representadas. O melhor modelo filogenético foi inferido pelo método ModelFinder (Kalyaanamoorthy *et al.*, 2017), com base no critério de informação bayesiana, sendo este LG+F+R5 (Le; Gascuel, 2008). Já que as árvores filogenéticas obtidas não eram enraizadas, estas passaram por um processo de enraizamento pelo método MAD (Tria; Landan; Dagan, 2017). Para a classificação dos genes em subfamílias, foram reconstruídas também árvores filogenéticas com genes ABC de *Arabidopsis thaliana* já classificados.

Os eventos de duplicação dos genes referentes às proteínas ABC de cada genoma foram inferidos em *segmental*, *tandem*, *proximal* e dispersos. Genes classificados em *segmental* são separados em blocos colineares, genes duplicados próximos em um cromossomo são considerados em *tandem* se são separados no mesmo cromossomo por até 10 genes, sendo considerados *proximal* caso contrário e genes dispersos são distantes e sem conservação de sintenia. A posição dos genes de proteínas ABC nos cromossomos foi usada na construção de um mapa físico com o software MG2C (Chao *et al.*, 2021). O resultado em arquivo SVG foi editado para demonstrar os modos de duplicação inferidos para cada gene.

Para as análises comparativas e identificação de clusters ortólogos, foi utilizado a plataforma Orthovenn 3 (Sun *et al.*, 2023). Os homólogos dos genes estudados em *Arabidopsis thaliana* foram encontrados por meio do algoritmo blastp com parâmetros padrão (Camacho *et al.*, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para os genomas de *Theobroma grandiflorum*, clones C174 e C1074, e *T. cacao*, variedade Criollo e Matina, foram identificados respectivamente 146, 148, 145 e 147 genes de transportadores ABC em cada genoma (tabela 1). Não houve grande variação do número total de proteínas entre os proteomas analisados, no entanto o número diverge do de outras plantas. A média dos genomas se aproximou ao de *Oryza sativa* (146), mas foi menor comparado à *Vitis vinifera* (193) e *Gossypium arboreum* (169), este último da família Malvaceae (Banasiak; Jasiński, 2022).

Utilizando seu agrupamento filogenético (figura 1-4) os transportadores ABC foram classificados em 8 subfamílias, de ABCA-ABCG e ABCI (Verrier *et al.*, 2008). Condizente com a caracterização da superfamília em outras plantas, ABCG é a subfamília mais enriquecida, seguida por ABCB, ABCC e ABCI (Banasiak; Jasiński, 2022).

Tabela 2: Número de proteínas ABC em cada subfamília para os genomas estudados.

Genoma	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG	ABCI	Total
C174	3	25	21	3	1	6	67	20	146
C1074	3	24	21	2	2	7	70	19	148
Criollo	3	28	20	2	1	4	66	21	145
Matina	3	26	20	2	1	5	69	21	147

Fonte: elaborado pelo autor

Destacam-se os genes da subfamília ABCG como possível fonte de genes com efeito na resistência à estresses. Além de outros substratos, os transportadores ABCG têm sido implicados no transporte de fitormônios, como auxinas e citocininas, que regulam o crescimento e desenvolvimento em plantas, e ácido abscísico, que é indicado como envolvido em diversos tipos de estresses (Dahuja *et al.*, 2021). Notadamente, transportadores desta subfamília são

responsáveis pelo fluxo de ácido abscísico dos tecidos vasculares para as células-guarda, regulando abertura e fechamento dos estômatos como resposta ao estresse hídrico (Borghi *et al.*, 2015).

Genes que codificam transportadores ABCG também são superexpressados em condições de estresse salino e térmico. Infere-se que estes manipulam a composição lipídica da membrana celular em condições de estresse térmico e mantêm o balanço osmótico nas raízes (Dahuja *et al.*, 2021).

São importantes também para resistência a metais pesados: um transportador ABCG foi relacionado a detoxificação de cádmio em cacau, cujo a acumulação na planta é um problema para a produção deste (Almeida *et al.*, 2023).

Os transportadores ABCG, podem estar associados a defesa contra patógenos comuns ao gênero *Theobroma*, inclusive de forma direta. Um estudo investigou o papel dos transportadores ABCG Nb-ABCG1 e Nb-ABCG2 em *Nicotiana benthamiana* na defesa contra *Phytophthora infestans*, do gênero de oomicetos que afeta seriamente plantações de cacau e cupuaçu, descobrindo ação de defesa pré e pós-invasão pelo patógeno pelo transporte de metabólitos secundários na resposta imune da planta (Shibata *et al.*, 2016).

O transportador AtABCG36 de *Arabidopsis thaliana*, que anteriormente foi implicado na resistência a diversos patógenos fúngicos, teve a fitoalexina camalexina indicada como o substrato deste transportador, funcionando redundantemente com o transportador AtABCG40, também associado a resposta a patógenos (He *et al.*, 2019).

Apesar do desconhecimento de seus substratos, várias outras espécies apresentam aumento na expressão de genes de transportadores ABCG em resposta a estresses bióticos ou ao ácido salicílico, associado à resistência sistêmica adquirida durante o ataque de patógenos (Geisler, 2014).

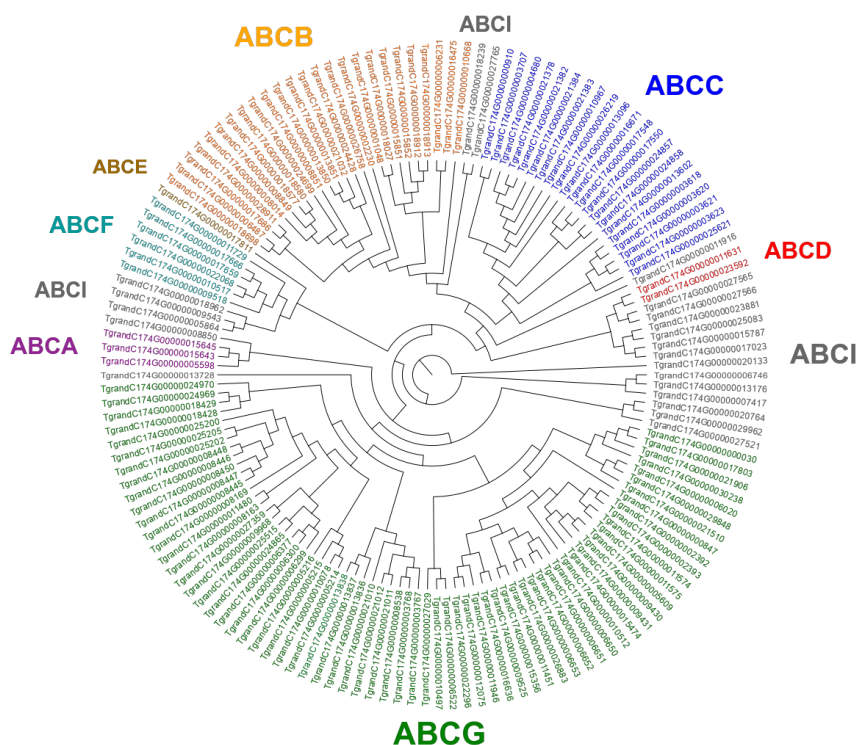


Figura 1: Árvore filogenética dos genes de transportadores ABC de *Theobroma grandiflorum*, clone C174, classificadas nas 8 subfamílias. Fonte: elaborado pelo autor.

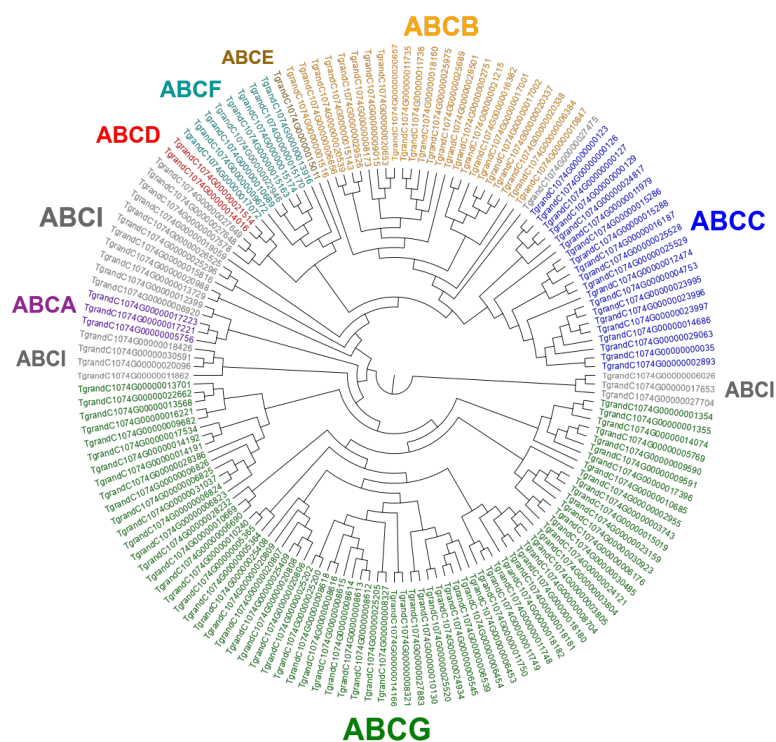


Figura 2: Árvore filogenética dos genes de transportadores ABC de *Theobroma grandiflorum*, clone C074, classificados nas 8 subfamílias. Fonte: elaborado pelo autor.

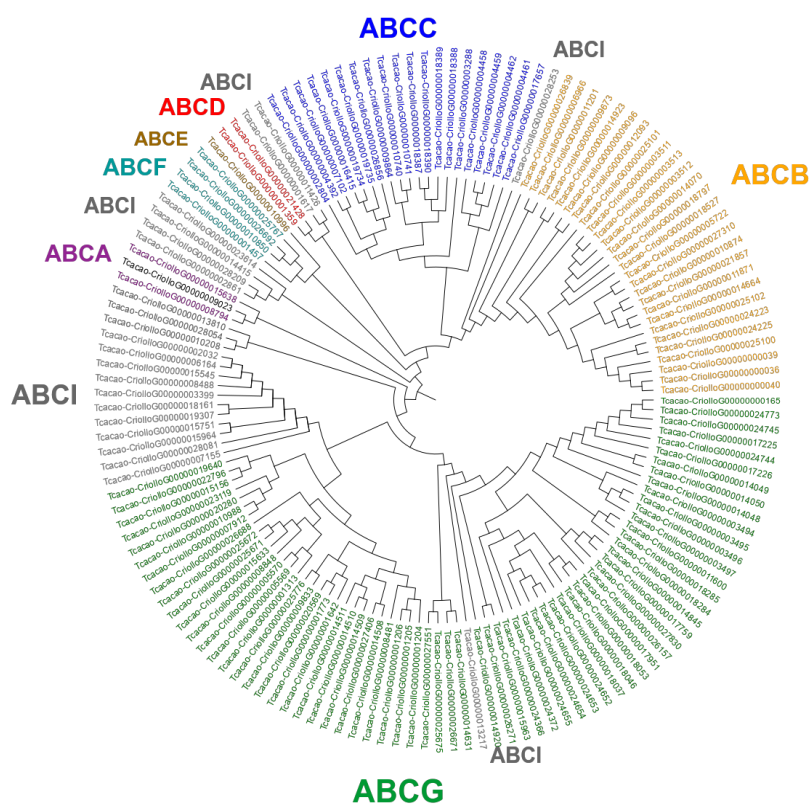


Figura 3: Árvore filogenética dos genes de transportadores ABC de *Theobroma cacao*, variedade Criollo, classificados nas 8 subfamílias. Fonte: elaborado pelo autor.

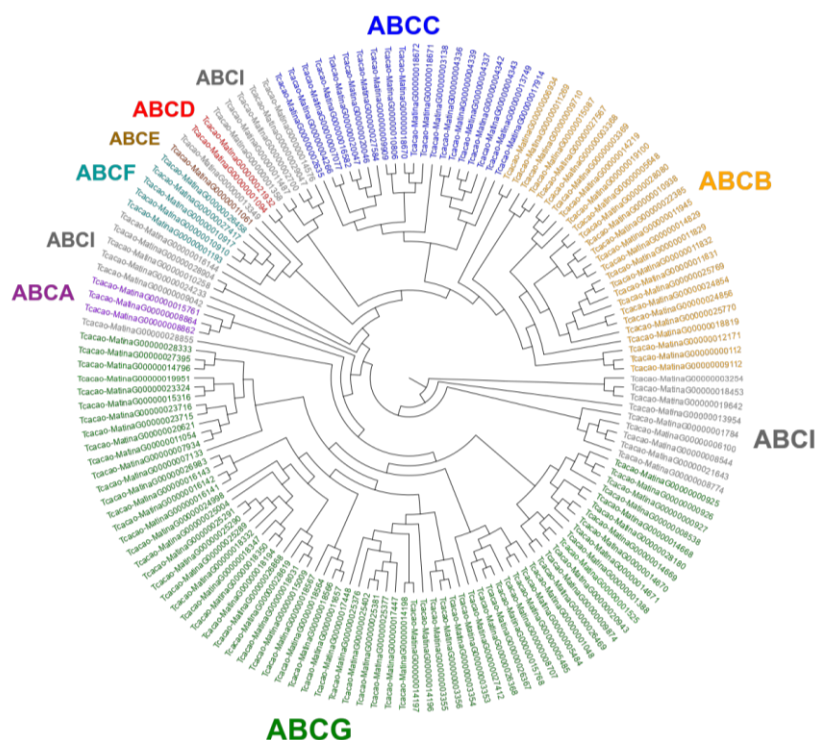


Figura 4: Árvore filogenética dos genes de transportadores ABC de *Theobroma cacao*, variedade Matina, classificados nas 8 subfamílias. Fonte: elaborado pelo autor.

A subfamília ABCB, assim como a ABCG, é enriquecida em plantas terrestres e, portanto, possui funções possivelmente importantes para resistência a estresses do ambiente em cupuaçu e cacau. Esta pode agir no transporte de metabólitos secundários relacionados à defesa como em *Coptis japonica*, pelo transporte de berberina, composto antibacteriano e antifúngico (Hwang et al., 2016). Possuem também ação demonstrada contra estresses abióticos, com os transportadores ABCB sendo superexpressados em vários casos de estresse salino e de seca em *Betula halophila* (An et al., 2019). Adicionalmente, muitos membros da subfamília ABCB estão relacionados ao transporte de auxinas e seus precursores, importantes reguladores de crescimento, e mutações com perda de função neste transportadores trazem vários efeitos negativos no crescimento de plantas (Do et al., 2021).

Destaca-se também a família ABCF, mesmo que restrita em número. Esta subfamília foi considerada envolvida em sistemas de autoincompatibilidade em frutíferas arbóreas como em *Malus domestica* (macieira) (Meng *et al.*, 2014). Nesta espécie, o silenciamento de um transportador ABCF localizado na membrana do tubo polínico impede que a S-RNase que provoca o fenômeno nestas espécies chegue no interior deste, indicando ser crucial no processo (Muñoz-Sanz *et al.*, 2020). A autoincompatibilidade presente no gênero *Theobroma* pode ser muito prejudicial à produção quando não contornada (Gondim *et al.*, 2001). Embora haja esforços para caracterizar marcadores de autoincompatibilidade no cacau, ainda há de se elucidar os mecanismos e genes responsáveis com mais acurácia (Lanaud *et al.*, 2017). Esse fator é especialmente importante para o cupuaçu, visto que este é considerado verdadeiramente autoincompatível (Alves, 2003)

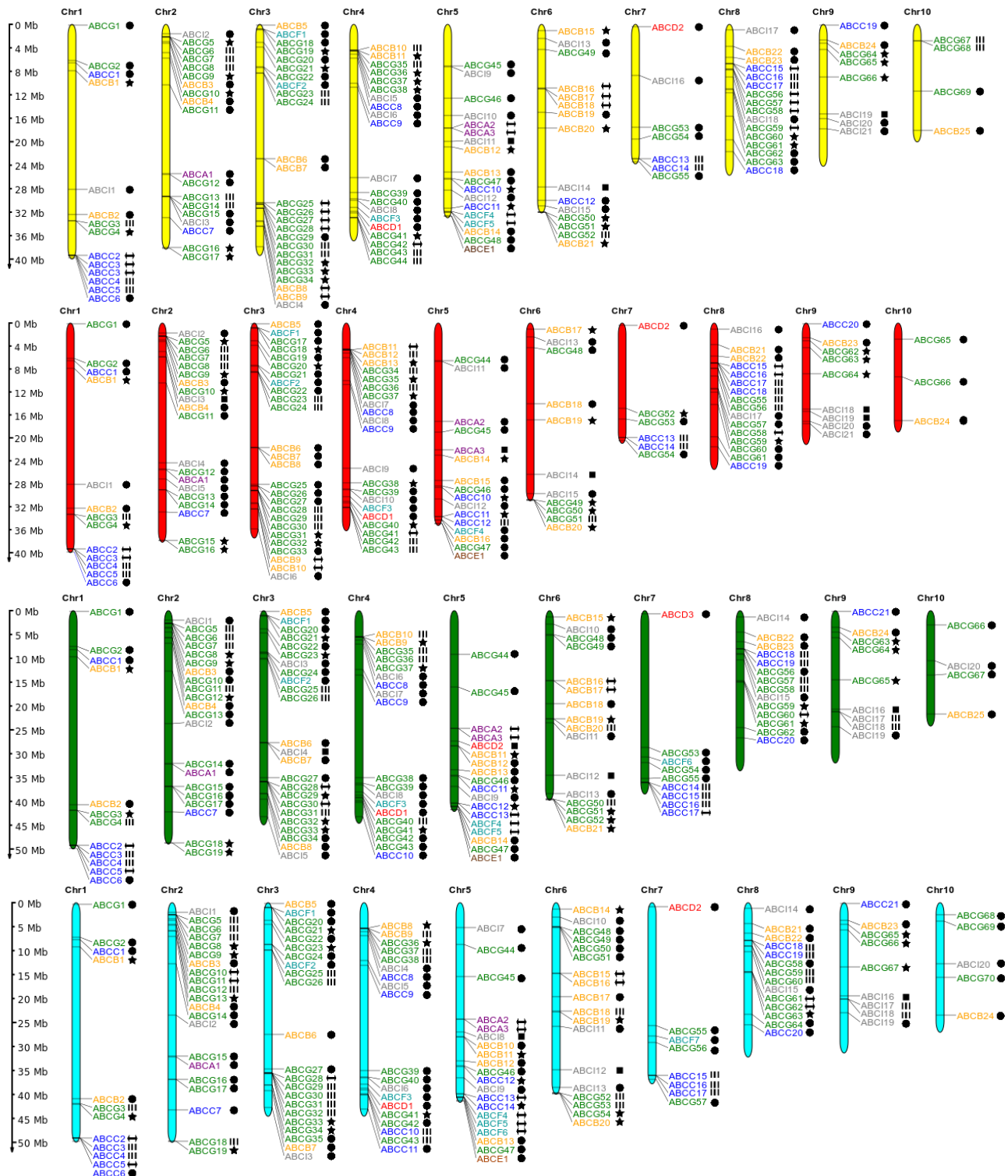


Figura 5: Disposição de genes de proteínas ABC respectivamente em *T. grandiflorum*, clones C174 (verde) e C1074 (azul), e *T. cacao*, variedades Criollo (vermelho) e Matina (amarelo). Modos de duplicação estão denotados com símbolos sendo: estrela para *segmental/WGD*, três barras para *tandem*, setas opostas para *proximal* e círculo para *dispersos*. Quadrados representam genes sem duplicação identificada ou *singleton*. Fonte: elaborado pelo autor.

Os genes ABC estudados estão distribuídos de forma desigual (figura 5), concentrando-se nos cromossomos 2, 3, 4, 5, 6 e 8. O maior número das subfamílias B, C e G nestes cromossomos é explicado por eventos de duplicação.

A subfamília ABCG contém o maior número de genes duplicados em tandem. Esses genes são próximos entre si e surgiram devido à duplicação causada por recombinação desigual entre cromossomos (Panchy; Lehti-Shiu; Shiu, 2016).

Esse modo de duplicação indica a potencial adaptação a estresses destes genes. Por um lado, foi demonstrado que as taxas de recombinação aumentam quando as plantas estão sob estresse, o que pode levar ao aumento da duplicação em tandem e na duplicação de genes encontrados em repetições em tandem (Zou *et al.*, 2009). Por outro lado, as duplicações em tandem também podem contribuir para a adaptação das plantas aos estímulos ambientais.

Expansões específicas de linhagens de duplicatas em tandem foram observadas em resposta a estímulos ambientais, sugerindo que a duplicação em tandem desempenha um papel central na resposta adaptativa das plantas (Hanada *et al.*, 2008). As duplicações em tandem também podem contribuir para o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas, que são importantes para vários processos biológicos, incluindo defesa contra patógenos e interações com o meio ambiente (Gaynor *et al.*, 2020).

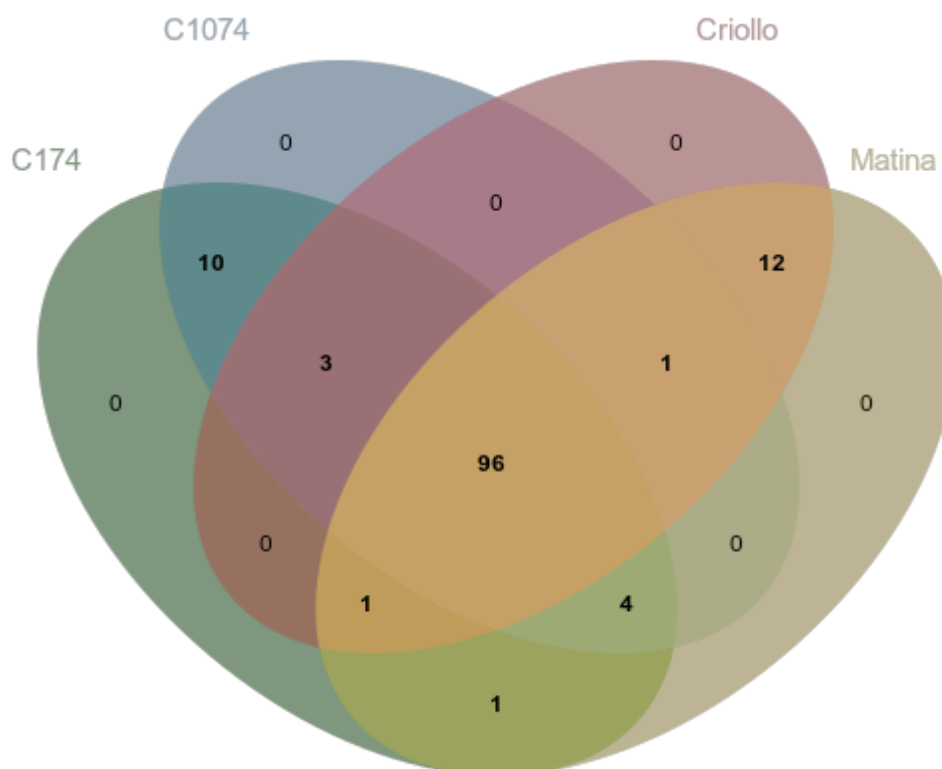


Figura 6: Diagrama de Venn demonstrando compartilhamento ou exclusividade em grupos ortólogos de transportadores ABC nos quatro genomas. Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados da análise comparativa revelaram a presença de grupos de genes homólogos entre as espécies, que foram agrupados em clusters ortólogos com base em sua similaridade.

96 destes grupos são compartilhados por todos os genomas, possivelmente denotando transportadores com funções essenciais para todo o gênero. Houve 10 grupos compartilhados apenas pelos genomas de cupuaçuzeiro e 12 restritos ao cacaueiro, sendo relacionados a características únicas de cada espécie. Há 4 clusters presentes na variedade Matina e não na variedade Criollo e 3 cluster no genoma do cacaueiro Criollo não presentes na variedade Matina, mas presentes em ambos os genomas de cupuaçuzeiro. Há

ainda 2 grupos presentes no clone de cupuaçuzeiro C174 e não presentes no clone C1074 e 1 para a relação contrária.

Tabela 3: Grupos ortólogos identificados que são ausentes em pelo menos um genoma estudado e seus respectivos homólogos em *Arabidopsis thaliana*.

Genomas	Subfamília	Homólogo	Função em <i>Arabidopsis thaliana</i>
C1074 e Cacau	ABCC		
C174 e Cacau	ABCB	AtABCB15	Transporte de auxina
C174 e Matina	ABCG	AtABCG36	Resposta a patógenos, transporte de auxina, resistência a metais pesados, hiperacumulação de ácido salicílico
Cacau	ABCI	AtABCI20	Transporte de citocininas
Cacau	ABCG	AtABCG17	
Cacau	ABCG	AtABCG41	
Cacau	ABCC	AtABCC12	
Cacau	ABCG	AtABCG31	Revestimento de pólen, resposta a patógenos, secreção de ABA no endosperma
Cacau	ABCG	AtABCG40	Resistência a metais pesados, resistência a seca, transporte de ABA, resposta a patógenos
Cacau	ABCG	AtABCG40	Resistência a metais pesados, resistência a seca, transporte de ABA, resposta a patógenos
Cacau	ABCC	AtABCC8	
Cacau	ABCC	AtABCC8	
Cacau	ABCG	AtABCG33	Síntese de celulose, lignificação
Cacau	ABCB	AtABCB22	
Cacau	ABCG	AtABCG41	
Criollo e Cupuaçu	ABCI		
Criollo e Cupuaçu	ABCC	AtABCC10	Transporte de metabólitos secundários
Criollo e Cupuaçu	ABCI	AtABCI17	

Cupuaçu	ABCG	AtABCG31	Revestimento de pólen, resposta a patógenos, secreção de ABA no endosperma
Cupuaçu	ABCG	AtABCG40	Resistência a metais pesados, resistência a seca, transporte de ABA, resposta a patógenos
Cupuaçu	ABCC	AtABCC9	
Cupuaçu	ABCB	AtABCB15	Transporte de auxina
Cupuaçu	ABCG	AtABCG29	Biossíntese lignina
Cupuaçu	ABCF	AtABCF1	
Cupuaçu	ABCG	AtABCG40	Resistência a metais pesados, resistência a seca, transporte de ABA, resposta a patógenos
Cupuaçu	ABCG	AtABCG39	Resposta a herbicidas
Cupuaçu	ABCC	AtABCC8	
Cupuaçu	ABCI	AtABCI6	
Matina e Cupuaçu	ABCG	AtABCG31	Revestimento de pólen, resposta a patógenos, secreção de ABA no endosperma
Matina e Cupuaçu	ABCF	AtABCF1	
Matina e Cupuaçu	ABCB	AtABCB25	Transporte de precursores de grupos Fe-S
Matina e Cupuaçu	ABCA	AtABCA12	

Fonte: elaborado com base em Do et al. (2021).

4. CONCLUSÕES

Por meio de uma análise bioinformática, foram identificados, caracterizados e comparados respectivamente 146 e 148 genes de transportadores ABC em *Theobroma grandiflorum*, em clones resistentes e suscetíveis a vassoura-de-bruxa, e 145 e 147 em *T. cacao*, nas variedades Criollo e Matina. Foram considerados seu número, suas relações evolutivas, sua distribuição, modos de duplicação e intersecção de grupos ortólogos entre os quatro genomas. Os dados obtidos servem de base para estudos futuros de expressão, função e evolução da família gênica e seus processos associados. A análise de uma família gênica vasta como os transportadores ABC pode trazer novos genes candidatos e ajudar na elucidação de mecanismos complexos de resistência a estresse e servir de suporte aos programas de melhoramento de espécies amazônicas de interesse econômico.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. M.; ALMEIDA, A.-A. F.; SANTOS, N. A.; MORA-OCAMPO, I. Y.; PIROVANI, C. P. Leaf proteomic profiles in cacao scion-rootstock combinations tolerant and intolerant to cadmium toxicity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 203, p. 107987, 1 out. 2023.
- ALVES, R. M. **Caracterização genética de populações de cupuaçuzeiro, Theobroma grandiflorum (Willd. ex. Spreng.) Schum., por marcadores microssatélites e descritores botânico-agronômicos**. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.
- ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. da S. BRS Careca, BRS Fartura, BRS Duquesa, BRS Curinga, and BRS Golias: New Cupuassu Tree Cultivars. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 20, 11 dez. 2020.
- ALVES, R. M.; CHAVES, S. F. da S.; BASTOS, A. J. R. Viability Of The Use Of African Mahogany With Cupuassu Tree In Agroforestry System (AFS). **Revista Árvore**, v. 44, p. e4407, 3 jul. 2020.
- AN, L.; MA, Q.; DU, J.; YU, M.; LI, F.; LUAN, J.; JIANG, J.; LI, H. Preliminary Classification of the ABC Transporter Family in Betula Halophila and Expression Patterns in Response to Exogenous Phytohormones and Abiotic Stresses. **Forests**, v. 10, n. 9, p. 722, set. 2019.
- ARGOUT, X.; MARTIN, G.; DROC, G.; FOUET, O.; LABADIE, K.; RIVALS, E.; AURY, J. M.; LANAUD, C. The Cacao Criollo Genome v2.0: An Improved Version of the Genome for Genetic and Functional Genomic Studies. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 2017.
- ARGOUT, X.; MARTIN, G.; DROC, G.; FOUET, O.; LABADIE, K.; RIVALS, E.; AURY, J. M.; LANAUD, C. The Cacao Criollo Genome v2.0: An Improved Version of the Genome for Genetic and Functional Genomic Studies. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 2017.
- AVILA-SOSA, R.; MONTERO-RODRÍGUEZ, A. F.; AGUILAR-ALONSO, P.; VERA-LÓPEZ, O.; LAZCANO-HERNÁNDEZ, M.; MORALES-MEDINA, J. C.; NAVARRO-CRUZ, A. R. Antioxidant Properties of Amazonian Fruits: A Mini Review of In Vivo and In Vitro Studies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. e8204129, 17 fev. 2019.
- BANASIAK, J.; BIAŁA, W.; STASZKÓW, A.; SWARCEWICZ, B.; KĘPCZYŃSKA, E.; FIGLEROWICZ, M.; JASIŃSKI, M. A Medicago truncatula ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 4, p. 1005–1015, 1 fev. 2013.
- BANASIAK, J.; JASIŃSKI, M. ATP-Binding Cassette Transporters in Nonmodel Plants. **New Phytologist**, v. 233, n. 4, p. 1597–1612, 2022.

BORGHI, L.; KANG, J.; KO, D.; LEE, Y.; MARTINOIA, E. The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. **Biochemical Society Transactions**, v. 43, n. 5, p. 924–930, 9 out. 2015.

CAMACHO, C.; COULOURIS, G.; AVAGYAN, V.; MA, N.; PAPADOPOULOS, J.; BEALER, K.; MADDEN, T. L. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 15 dez. 2009.

CARVALHO, J. E. U. de; MULLER, C. H.; ALVES, R. M.; NAZARE, R. F. R. de. **Cupuaçuzeiro**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2004. (Embrapa Amazônia Oriental. Comunicado técnico, 115).

CHAO, J.; LI, Z.; SUN, Y.; ALUKO, O. O.; WU, X.; WANG, Q.; LIU, G. MG2C: a user-friendly online tool for drawing genetic maps. **Molecular Horticulture**, v. 1, n. 1, p. 16, 9 dez. 2021.

DAHUJA, A.; KUMAR, R. R.; SAKHARE, A.; WATTS, A.; SINGH, B.; GOSWAMI, S.; SACHDEV, A.; PRAVEEN, S. Role of ATP-Binding Cassette Transporters in Maintaining Plant Homeostasis under Abiotic and Biotic Stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 171, n. 4, p. 785–801, 2021.

DAHUJA, A.; KUMAR, R. R.; SAKHARE, A.; WATTS, A.; SINGH, B.; GOSWAMI, S.; SACHDEV, A.; PRAVEEN, S. Role of ATP-Binding Cassette Transporters in Maintaining Plant Homeostasis under Abiotic and Biotic Stresses. **Physiologia Plantarum**, v. 171, n. 4, p. 785–801, 2021.

DO, T. H. T.; MARTINOIA, E.; LEE, Y.; HWANG, J.-U. 2021 update on ATP-binding cassette (ABC) transporters: how they meet the needs of plants. **Plant Physiology**, v. 187, n. 4, p. 1876–1892, 6 maio 2021.

FALCÃO, L. L.; SILVA-WERNECK, J. O.; ALBUQUERQUE, P. S. B.; ALVES, R. M.; GRYNBERG, P.; TOGAWA, R. C.; COSTA, M. M. do C.; BRIGIDO, M. M.; MARCELLINO, L. H. Comparative transcriptomics of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) offers insights into the early defense mechanism to *Moniliophthora perniciosa*, the causal agent of witches' broom disease. **Journal of Plant Interactions**, v. 17, n. 1, p. 991–1005, 31 dez. 2022.

GAYNOR, M. L.; LIM-HING, S.; MASON, C. M. Impact of genome duplication on secondary metabolite composition in non-cultivated species: a systematic meta-analysis. **Annals of Botany**, v. 126, n. 3, p. 363–376, 13 ago. 2020.
GEISLER, M. (ed.). **Plant ABC Transporters**. Cham: Springer International Publishing, 2014. v. 22

GONDIM, T. M. de S.; THOMAZINI, M. J.; CAVALCANTE, M. de J. B.; SOUZA, J. M. L. de. Aspectos da Produção de Cupuaçu. **Embrapa Documentos**, v. 67, p. 43, 2001.

HANADA, K.; ZOU, C.; LEHTI-SHIU, M. D.; SHINOZAKI, K.; SHIU, S.-H. Importance of Lineage-Specific Expansion of Plant Tandem Duplicates in the Adaptive Response to Environmental Stimuli. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 993–1003, out. 2008.

HE, Y.; XU, J.; WANG, X.; HE, X.; WANG, Y.; ZHOU, J.; ZHANG, S.; MENG, X. The Arabidopsis Pleiotropic Drug Resistance Transporters PEN3 and PDR12 Mediate Camalexin Secretion for Resistance to *Botrytis cinerea*. **The Plant Cell**, v. 31, n. 9, p. 2206–2222, set. 2019.

HWANG, J.-U.; SONG, W.-Y.; HONG, D.; KO, D.; YAMAOKA, Y.; JANG, S.; YIM, S.; LEE, E.; KHARE, D.; KIM, K.; PALMGREN, M.; YOON, H. S.; MARTINOIA, E.; LEE, Y. Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. **Molecular Plant**, v. 9, n. 3, p. 338–355, 7 mar. 2016.

JIMÉNEZ, D. L.; ALVAREZ, J. C.; MOSQUERA, S. Frosty Pod Rot: A Major Threat to Cacao Plantations on the Move. **Tropical Plant Pathology**, v. 47, n. 2, p. 187–200, 1 abr. 2022.

JUNIOR, B. T. da H.; POLONI, J. de F.; LOPES, M. A.; DIAS, C. V.; GRAMACHO, K. P.; SCHUSTER, I.; SABAU, X.; CASCARDO, J. C. D. M.; MAURO, S. M. Z. D.; GESTEIRA, A. da S.; BONATTO, D.; MICHELI, F. Transcriptomics and Systems Biology Analysis in Identification of Specific Pathways Involved in Cacao Resistance and Susceptibility to Witches' Broom Disease. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 5, p. 1507–1519, 3 abr. 2012.

KALYAANAMOORTHY, S.; MINH, B. Q.; WONG, T. K. F.; VON HAESELER, A.; JERMIIN, L. S. ModelFinder: Fast Model Selection for Accurate Phylogenetic Estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, jun. 2017.

KUHN, D. N.; FIGUEIRA, A.; LOPES, U.; MOTAMAYOR, J. C.; MEEROW, A. W.; CARIAGA, K.; FREEMAN, B.; LIVINGSTONE, D. S.; SCHNELL, R. J. Evaluating *Theobroma Grandiflorum* for Comparative Genomic Studies with *Theobroma Cacao*. **Tree Genetics & Genomes**, v. 6, n. 5, p. 783–792, 1 out. 2010.

LAHIVE, F.; HADLEY, P.; DAYMOND, A. J. The Physiological Responses of Cacao to the Environment and the Implications for Climate Change Resilience. A Review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 39, n. 1, p. 5, 19 dez. 2018.

LANAUD, C.; FOUET, O.; LEGAVRE, T.; LOPES, U.; SOUNIGO, O.; EYANGO, M. C.; MERMAZ, B.; DA SILVA, M. R.; LOOR SOLORZANO, R. G.; ARGOUT, X.; GYAPAY, G.; EBAIARREY, H. E.; COLONGES, K.; SANIER, C.; RIVALLAN, R.; MASTIN, G.; CRYER, N.; BOCCARA, M.; VERDEIL, J.-L.; EFOMBAGN MOUSSENI, I. B.; PERES GRAMACHO, K.; CLÉMENT, D. Deciphering the *Theobroma cacao* self-incompatibility system: from genomics to diagnostic markers for self-compatibility. **Journal of Experimental Botany**, v. 68, n. 17, p. 4775–4790, 13 out. 2017.

LE, S. Q.; GASCUEL, O. An Improved General Amino Acid Replacement Matrix. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1307–1320, 1 jul. 2008

MENG, D.; GU, Z.; LI, W.; WANG, A.; YUAN, H.; YANG, Q.; LI, T. Apple MdABCF Assists in the Transportation of S-RNase into Pollen Tubes. **The Plant Journal**, v. 78, n. 6, p. 990–1002, 2014.

MORETTI-ALMEIDA, G.; THOMAZELLA, D. P. T.; PEREIRA, G. A. G.; MONTEIRO, G. Heterologous expression of an alternative oxidase from *Moniliophthora perniciosa* in *Saccharomyces cerevisiae*: Antioxidant function and *in vivo* platform for the study of new drugs against witches' broom disease. **Fungal Genetics and Biology**, v. 126, p. 50–55, 1 maio 2019.

MOTAMAYOR, J. C.; MOCKAITIS, K.; SCHMUTZ, J.; HAIMINEN, N.; III, D. L.; CORNEJO, O.; FINDLEY, S. D.; ZHENG, P.; UTRO, F.; ROYAERT, S.; SASKI, C.; JENKINS, J.; PODICHETI, R.; ZHAO, M.; SCHEFFLER, B. E.; STACK, J. C.; FELTUS, F. A.; MUSTIGA, G. M.; AMORES, F.; PHILLIPS, W.; MARELLI, J. P.; MAY, G. D.; SHAPIRO, H.; MA, J.; BUSTAMANTE, C. D.; SCHNELL, R. J.; MAIN, D.; GILBERT, D.; PARIDA, L.; KUHN, D. N. The genome sequence of the most widely cultivated cacao type and its use to identify candidate genes regulating pod color. **Genome Biology**, v. 14, n. 6, p. r53, 7 out. 2013.

MUÑOZ-SANZ, J. V.; ZURIAGA, E.; CRUZ-GARCÍA, F.; MCCLURE, B.; ROMERO, C. Self-(In)compatibility Systems: Target Traits for Crop-Production, Plant Breeding, and Biotechnology. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00195>>. Acesso em: 31 out. 2023.

NAKAMURA, T.; YAMADA, K. D.; TOMII, K.; KATOH, K. Parallelization of MAFFT for Large-Scale Multiple Sequence Alignments. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 34, n. 14, p. 2490–2492, 15 jul. 2018.

NGUYEN, L.-T.; SCHMIDT, H. A.; VON HAESELER, A.; MINH, B. Q. IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, jan. 2015.

PANCHY, N.; LEHTI-SHIU, M.; SHIU, S.-H. Evolution of Gene Duplication in Plants. **Plant Physiology**, v. 171, n. 4, p. 2294–2316, 1 ago. 2016.

RÊGO, A. P. B.; MORA-OCAMPO, I. Y.; CORRÊA, R. X. Interactions of Different Species of *Phytophthora* with Cacao Induce Genetic, Biochemical, and Morphological Plant Alterations. **Microorganisms**, v. 11, n. 5, p. 1172, maio 2023.

SANTOS, A. S.; MORA-OCAMPO, I. Y.; DE NOVAIS, D. P. S.; AGUIAR, E. R. G. R.; PIROVANI, C. P. State of the Art of the Molecular Biology of the Interaction between Cocoa and Witches' Broom Disease: A Systematic Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5684, jan. 2023.

SANTOS, E. C.; PIROVANI, C. P.; CORREA, S. C.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K. P. The pathogen *Moniliophthora perniciosa* promotes differential proteomic modulation of cacao genotypes with contrasting resistance to witches' broom disease. **BMC Plant Biology**, v. 20, n. 1, p. 1, 2 jan. 2020.

SANTOS, L. F. dos; SILVA, R. J. S.; AMARAL, D. O. J. do; PAULA, M. F. B. de; FALCÃO, L. L.; LEGAVRE, T.; ALVES, R. M.; MARCELLINO, L. H.; MICHELI, F. Selection of Reference Genes for Expression Study in Pulp and Seeds of *Theobroma Grandiflorum* (Willd. Ex Spreng.) Schum. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160646, 8 ago. 2016.

SANTOS, L. F. dos; SILVA, R. J. S.; FALCÃO, L. L.; ALVES, R. M.; MARCELLINO, L. H.; MICHELI, F. Cupuassu (*Theobroma Grandiflorum* [Willd. Ex Sprengel] Schumann) Fruit Development: Key Genes Involved in Primary Metabolism and Stress Response. **Agronomy**, v. 12, n. 4, p. 763, abr. 2022.

SHIBATA, Y.; OJIKI, M.; SUGIYAMA, A.; YAZAKI, K.; JONES, D. A.; KAWAKITA, K.; TAKEMOTO, D. The Full-Size ABCG Transporters Nb-ABCG1 and Nb-ABCG2 Function in Pre- and Postinvasion Defense against *Phytophthora infestans* in *Nicotiana benthamiana*. **The Plant Cell**, v. 28, n. 5, p. 1163–1181, 2016.

SILVA, R. J. S.; ALVES, R. M.; GRAMACHO, K. P.; MARCELLINO, L. H.; MICHELI, F. Involvement of structurally distinct cupuassu chitinases and osmotin in plant resistance to the fungus *Moniliophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 148, p. 142–151, 1 mar. 2020.

SIVIERO, A. Doenças Em Cacaueiro E Cupuaçuzeiro No Acre. **Agrotrópica** (Itabuna), v. 34, n. 2, p. 159–164, 31 ago. 2022.

SUN, J.; LU, F.; LUO, Y.; BIE, L.; XU, L.; WANG, Y. OrthoVenn3: an integrated platform for exploring and visualizing orthologous data across genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. W1, p. W397–W403, 5 jul. 2023.

TRIA, F. D. K.; LANDAN, G.; DAGAN, T. Phylogenetic Rooting Using Minimal Ancestor Deviation. **Nature Ecology & Evolution**, v. 1, n. 7, p. 0193, 19 jun. 2017.

VERRIER, P. J.; BIRD, D.; BURLA, B.; DASSA, E.; FORESTIER, C.; GEISLER, M.; KLEIN, M.; KOLUKISA OGLU, Ü.; LEE, Y.; MARTINOIA, E.; MURPHY, A.; REA, P. A.; SAMUELS, L.; SCHULZ, B.; SPALDING, E. P.; YAZAKI, K.; THEODOULOU, F. L. Plant ABC Proteins – a Unified Nomenclature and Updated Inventory. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 4, p. 151–159, 1 abr. 2008.

ZOU, C.; LEHTI-SHIU, M. D.; THOMASHOW, M.; SHIU, S.-H. Evolution of Stress-Regulated Gene Expression in Duplicate Genes of *Arabidopsis Thaliana*. **PLOS Genetics**, v. 5, n. 7, p. e1000581, 31 jul. 2009.