



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ARTEMISA NAZARÉ COSTA BORGES

**ESTRESSES EM FEIJÃO-CAUPI: análise da resposta transcricional a injúria,
viroses ou desidratação radicular**

Recife
2021

ARTEMISA NAZARÉ COSTA BORGES

**ESTRESSES EM FEIJÃO-CAUPI: análise da resposta transcricional a injúria,
víroses ou desidratação radicular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas. Área de concentração em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a Ana Maria Benko Iseppon

Coorientador: Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Borges, Artemisa Nazaré Costa

Estresses em feijão-caupi: análise da resposta transcricional a injúria, viroses ou desidratação radicular / Artemisa Nazaré Costa Borges - 2021.

220 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko Iseppon

Coorientador: José Ribamar Costa Ferreira Neto

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2021.

Inclui referências e apêndices.

1. *Vigna unguiculata* 2. Seca 3. Transcriptômica

I. Iseppon, Ana Maria Benko (Orientadora) II. Ferreira Neto, José Ribamar Costa (Coorientador) III. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-375

ARTEMISA NAZARÉ COSTA BORGES

**Estresses em feijão-caupi: análise da resposta transcricional a injúria, viroses
ou desidratação radicular**

APROVADA EM 29/03/2021

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Biológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon
Departamento de Genética - Universidade
Federal de Pernambuco

Dr^a. Roberta Lane de Oliveira Silva
Universidade Federal do Vale do São
Francisco

Dr. Éderson Akio Kido
Departamento de Genética - Universidade
Federal de Pernambuco

Dr^a. Flavia Figueira Aburjaile
Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz

Dr. Márcio Gilberto Cardoso Costa
Universidade Estadual de Santa Cruz

MEMBROS SUPLENTE:

Dr^a. Valesca Pandolfi - Departamento de Genética - Universidade Federal de Pernambuco

Dr. João Pacífico Bezerra Neto – Universidade de Pernambuco

Recife

2021

Aos meus pais Antônio e Evanilde, por tanto amor. Minha eterna dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar cuidando de mim, por ser o meu refúgio, consolo e esperança nos momentos de dificuldade e me agradecer com pessoas tão especiais na minha vida;

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade de ingresso ao doutorado;

À CAPES, pela concessão da bolsa durante o doutorado;

Aos meus pais, Antonio e Evanilde, aos meus irmãos, Anderson, Natália e Nayane, aos meus cunhados, Jéssica e Josiel, e à minha tia Miralice. Obrigada por tanto amor, por estarem comigo em todos os momentos, pelas orações, por serem lar e consolo, mesmo nos momentos de distância física. Amo vocês;

Ao meu amor, amigo e companheiro de vida Jesuino. Obrigada por sempre apoiar e incentivar os meus sonhos e projetos, por lutar as minhas batalhas comigo, pela paciência e amor sem medida;

À minha orientadora Profa. Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por me permitir vivenciar os mais diversos aprendizados, pela confiança, carinho e por ser uma das maiores contribuidoras da minha formação acadêmica e profissional. Obrigada por ser um exemplo de mulher / pesquisadora forte, corajosa, humana, determinada e muito inteligente, que inspira a todas nós, mulheres e cientistas;

Ao meu co-orientador Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto, por todos os ensinamentos, preocupação, ajuda e tempo dedicado à realização desse trabalho e ao meu crescimento profissional. Além de um co-orientador, você se tornou um grande amigo. Obrigada pelo carinho, zelo e amizade;

Aos meus eternos professores Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima e Dr^a. Regina Lúcia Ferreira Gomes, por terem me introduzido no meio científico, por sempre acreditarem em mim, pela constante preocupação, apoio e incentivo durante todos esses anos, pela amizade tão verdadeira;

Ao Dr. David Anderson de Lima Moraes, por ser um dos meus maiores incentivadores e exemplo de profissional, por despertar em mim a paixão pela bioinformática. Obrigada por sua amizade;

À Dr^a. Gabriela Frosi Albuquerque Figueiroa, pela constante ajuda, ensinamentos, amizade e dedicação. Obrigada por ser uma amiga tão especial;

À Dr^a. Valesca Pandolfi, por sempre ter uma palavra amiga e de incentivo, pela leveza nas conversas e por sempre torcer muito por mim;

À Dr^a. Roberta Lane, pela ajuda e ensinamentos nos experimentos de bancada;

À minha segunda família Lívia Martins, Caroline Pires, Jéssica Bárbara, Ana Paula e Jéssica Resende, por todos esses anos de convivência e companheirismo, por juntas formamos laços tão sinceros de amizade e carinho;

Às minhas amigas Vanessa Souza e Flávia Czekalski, por serem o reflexo do cuidado de Deus por mim. Obrigada pelo carinho, cuidado e zelo;

Ao grupo do LGBV, especialmente aos meus amigos e companheiros da Bioinformática, João Pacífico, Mitalle Matos, Ayug Lemos, Carlos André, Marx Lima e Flávia Aburjaile, por todo o aprendizado compartilhado, disponibilidade em ajudar sempre que necessário, pelos conselhos, vivências e amizade. Ao Wilson Dias, José Diogo e Joelson Crispim, com quem, apesar de não ter trabalhado diretamente, sempre se fizeram presentes e que guardarei com muito carinho no meu coração;

Aos meus amigos de longa data, Rodrigo, Mário Henrique, Luma, Naira, Deilson, Lorena e Ilmara. Obrigada por estarem sempre presentes, mesmo com tantas barreiras geográficas, por serem consolo nos momentos difíceis. Vocês são especiais e essenciais em minha vida;

Finalmente, agradeço a todos que fizeram parte desta caminhada e que longe ou perto contribuíram para a finalização desse ciclo.

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”. (JUNG, 1983, p. 135)

RESUMO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] apresenta importância socioeconômica mundial, sendo uma das principais fontes de renda e subsistência para a maioria da população carente, especialmente em países subdesenvolvidos. No entanto, estresses bióticos e abióticos representam ameaças significativas à sua produção. Diante desse atual cenário, o *Cowpea Genomics Consortium* (CpGC) desenvolveu ensaios de transcriptômica do feijão-caupi sob condições de estresse, incluindo: (1) desidratação radicular; (2) injúria foliar | inoculação com CABMV (*Cowpea aphid-born mosaic virus*); (3) injúria foliar | inoculação com CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*). Nesse estudo, a combinação de abordagens genômicas e transcriptômicas permitiu a identificação de genes-candidatos e suas respectivas vias metabólicas envolvidas na resposta precoce conservada a vírus e tolerância ao déficit hídrico. A resposta precoce de defesa conservada em feijão-caupi para ambos os tratamentos virais (1 e 16 h após aplicação do estresse) foi investigada através de transcritos coexpressos, denominados de Assinaturas Transcricionais Conservadas (ATCs). As ATCs indicaram uma maior conservação na percepção e defesa precoce/inicial, estando relacionadas tanto a respostas imunológicas quanto à injúria. Essas ATCs estão principalmente relacionadas ao sistema imune inato da planta (PRRs e genes R), proteínas PRs, limpeza de ROS e vias de transdução de sinal, como fatores de transcrição (TFs), diversas classes de quinases (MAPKKKs e CDPKs), sensores de Ca^{2+} e fitormônios (especialmente associadas ao ácido jasmônico e etileno). No ensaio de desidratação radicular, dois níveis de informação (fisiológico e molecular) foram analisados. De acordo com os aspectos fisiológicos, os dados moleculares foram classificados em: (i) '*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*' - RD25 e (ii) '*transcriptoma de sinalização, reação e ajuste*' - RD150. Os transcritos induzidos em RD25 estão principalmente relacionados à sinalização e à manutenção das funções básicas da célula, enquanto em RD150, houve respostas mais diversas, incluindo diferentes famílias de TFs, quinases e respostas associadas ao metabolismo mais especializado. Além disso, os processos biológicos enriquecidos demonstraram respostas de defesa relacionadas a estresses adicionais, como oxidativo, salino e biótico e à injúria. Observamos que grande parte dos transcritos que participam das respostas de defesa acima mencionadas são regulados pela família de TFs bHLH. Diante disso, realizou-se a caracterização

genômica estrutural e funcional dessa família em feijão-caupi, onde 175 genes *VubHLH* foram identificados, distribuídos nos 11 cromossomos. Esses *VubHLHs* foram classificados em 26 subfamílias, sendo os mecanismos de duplicações WGD / segmental, dispersas e em tandem os principais responsáveis pela diversificação durante a evolução da espécie. A análise de transcriptômica revelou que esses genes estão, primordialmente, relacionados à resposta à desidratação radicular e da defesa precoce aos dois vírus investigados. Esse estudo forneceu um panorama das principais vias de resposta do feijão-caupi frente a diversas condições estressantes. Além disso, os resultados revelam potenciais candidatos para futuras pesquisas biotecnológicas visando o desenvolvimento de cultivares resistentes a múltiplos estresses em feijão-caupi e espécies proximamente relacionadas.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*; seca; CABMV; CPSMV; transcriptômica; *VubHLH*.

ABSTRACT

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] shows worldwide economic importance, being one of the main incomes and source of livelihood for most of the low-income population, especially in underdeveloped countries. However, biotic and abiotic stresses are significant threats for the cowpea production. Considering the current status, the *Cowpea Genomics Consortium* (CpGC) designed transcriptomics assays of cowpea under stressed conditions, including: (1) root dehydration; (2) injury leave | inoculation with CABMV (*Cowpea aphid-born mosaic virus*); (3) injury leave | inoculation with CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*). In this study, the combined genomic and transcriptomics approaches allowed us to identify candidate genes and their metabolic pathways related to the conserved early defense to virus and water deficit tolerance. The early defense response conserved in cowpea for both viral treatments (1 and 16 h after the stress application) was investigated through the coexpressed transcripts, called Conserved Transcriptional Signatures (CTSs). The CTSs indicated a higher conservation in the perception and early/initial response, being related to both immunological responses and injury. These CTSs are mainly related to the plant innate immune system (PRRs and R genes), PR proteins, ROS scavenging and signaling transduction pathways, as Transcription Factors (TFs), different classes of kinases (MAPKKs and CDPKs), Ca^{2+} sensing and phytohormones (especially associated with ethylene and jasmonic acid). In the root dehydration assay, two information levels (physiologic and molecular) were analyzed. According to the physiological aspects, the molecular data were classified into: (i) 'perception, signaling and reaction transcriptome' - RD25 and (ii) 'signaling, reaction and adjustment transcriptome' - RD150. The up-regulated transcripts in RD25 are mainly associated with signaling and maintenance of primary functions of cell while in RD150, there were a range of responses, including different TF families, kinases and responses associated with a more specialized metabolism. Furthermore, the enriched biological processes demonstrated defense responses related to additional stresses, as oxidative, salt, and biotic stresses, as well injury. Besides, we observed that most of the transcripts which participate of the defense responses above mentioned are regulated by bHLH TF family. Thus, we performed the structural and functional genomic characterization of its family in cowpea and identified 175

VubHLH genes distributed across the 11 chromosomes. These *VubHLH* were classified into 26 subfamilies, being the WGD / segmental, disperse and tandem duplication mechanisms the main responsible for the *VubHLH* diversification during *V. unguiculata* evolution. In turn, the transcriptome analysis revealed that these genes are primarily related to root dehydration response, and in the early defense response to both viruses studied. Therefore, the study provided a panorama of the main response pathways of cowpea under diverse stress conditions. Moreover, results reveal potential candidates for future biotechnological research aiming the development of cultivars resistant to multiple stresses in cowpea and in closely related species.

Keywords: *Vigna unguiculata*; drought; CABMV; CPSMV; transcriptomics; *VubHLH*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Morfologia de uma planta de feijão-caupi sob inoculação com Vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV).....	33
Figura 2 –	Morfologia de uma planta de feijão-caupi sob inoculação com Vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV).....	34
Figura 3 –	Principais categorias de genes envolvidos na resposta vegetal a estresses abióticos, com ênfase para seca. Após a percepção do estresse são acionados grupos de genes envolvidos na regulação e transdução de sinais (A), acionando cascatas de sinalização que induzem genes que codificam proteínas diretamente envolvidas nos mecanismos de tolerância ao referido estresse (B).....	35
Figura 4 –	Modelo Zigue-zague para a evolução da imunidade inata e baseado no silenciamento da defesa de plantas contra agentes patogênicos virais e não-virais.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos selecionados (compilados da literatura) de vírus reconhecidos por produtos do gene NBS-LRR em plantas.....	44
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

12-OPDA	<i>12-Oxophytodienoic Acid</i>
A	<i>Photosynthetic Rate</i> ; Taxa Fotossintética
aa	Aminoácidos
ABA	<i>Abscisic Acid</i> ; Ácido Abscísico.
ABA2	<i>ABA Deficient 2</i>
ACO	<i>1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Oxidase</i>
ACS	<i>1-Aminocyclopropane-1-Carboxylate Synthase</i>
AGO	<i>Argonaute Proteins</i> , <i>Proteínas Argonauta</i>
AME	<i>Analysis of Motif Enrichment</i>
AOC	<i>Allene Oxide Cyclase</i>
AOS	<i>Allene Oxide Synthase</i>
AP2/EREBP	<i>APETALA2/Ethylene-Responsive Element Binding Protein</i>
API	<i>Application Programming Interface</i>
APX	<i>Ascorbate Peroxidase</i> ; Ascorbato Peroxidase
AQP	<i>Aquaporin</i> ; Aquaporina
ATCs	Assinaturas Transcricionais Conservadas
Avr	<i>Avirulence</i> ; Avirulência
BAK1	<i>BRI1-Associated Receptor Kinase 1</i> ; <i>Receptor Kinase 1 Associado ao BRI1</i>
BCMV	<i>Bean Common Mosaic Virus</i> ; Vírus do Mosaico do Feijão Comum.
bHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i>
BIR1	<i>BAK1-Interacting Receptor-Like Kinase 1</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Busca por Alinhamento Local
bp	<i>Base Pair</i> , Pares de Bases
BPMV	<i>Bean Pod Mottle Virus</i>
BR	<i>Brassinosteroids</i> ; Brassinosteróides

BSK3	<i>Brassinosteroid-Signaling Kinase 3</i>
BTCI	<i>Blackeyed-pea Trypsin Chymotrypsin Inhibitor</i> ; Inibidor de Tripsina e Quimiotripsina em Feijão-caupi.
CABMV	<i>Cowpea Aphid-Born Mosaic Virus</i> ; Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos
CC	<i>Coiled-Coil</i>
CDPKs	<i>Ca²⁺ Dependent Protein Kinases</i>
ChiVMV	<i>Chilli Veinal Mottle Virus</i>
C_i	<i>Intercellular CO₂ Concentration</i> ; concentração intercelular de CO ₂
CMLs	<i>Calmodulin-like Proteins</i>
CMV	<i>Cucumber Mosaic Virus</i> , Vírus do Mosaico do Pepino
CpGC	<i>Cowpea Genomics Consortium</i> ; Consórcio do Genoma do Feijão-Caupi
CPSMV	<i>Cowpea Severe Mosaic Virus</i> , Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi
CREs	<i>cis-Regulatory Elements</i> ; Elementos cis-Regulatórios
DAMPs	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i> , Padrões Moleculares Associados a Danos
DCLs	<i>Dicer-Like Ribonucleases</i>
DE	<i>Differentially Expressed</i> ; Diferencialmente Expresso
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido Desoxirribonucleico.
DR	<i>Down-Regulated</i> ; Reprimido
DREB	<i>Dehydration-Responsive Element-Binding</i>
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> ; RNA de Fita Dupla
E	<i>Transpiration Rate</i> ; Taxa de Transpiração
EeIFs	<i>Translation Initiation Factors in Eukaryotes</i> ; Fatores de Iniciação da Tradução em Eucariontes
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ER	<i>Extreme Resistance</i>
ERF	<i>Ethylene Response Factor</i> ; Fator de Resposta ao Etileno

ESTs	<i>Expressed Sequence Tag</i> ; Etiqueta de Sequência Expressa
ET	<i>Ethylene</i> , Etileno
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i> ; Imunidade Desencadeada por Efetores
ETS	<i>Effector-Triggered Susceptibility</i> ; Susceptibilidade Desencadeada por Efetores
FDR	<i>False Discovery Rate</i> ; Taxa de Falsa Descoberta
FLS2	<i>Flagellin-Sensitive 2</i>
FM	<i>Molecular Functions</i> ; Funções Moleculares
GABA	<i>Gamma-Amino-Butyric Acid</i> ; Ácido Gama-Aminobutírico
GO	<i>Gene Ontology</i> ; Ontologia Gênica
g_s	<i>Stomatal Conductance</i> ; Condutância Estomática
GST	<i>Glutathione S-transferase</i> ; Glutathione S-Transferase
HR	<i>Hypersensitive Response</i> ; Resposta Hipersensitiva
IPA	Instituto Agronômico de Pernambuco
JA	<i>Jasmonic Acid</i> ; Ácido Jasmônico
JA-Ile	<i>Jasmonoyl-Isoleucine</i>
JAs	<i>Jasmonates</i> ; Jasmonatos
JAZ	<i>Jasmonate ZIM domain</i>
JID	<i>JAZ interaction domain</i>
KAT	<i>L-3-Ketoacyl-CoA-Thiolase</i>
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KO	KEGG Orthology
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i> ; Proteínas de Embriogênese Tardia.
LOX	<i>Lipoxygenase</i>
LRR-RLKs	<i>Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Protein Kinases</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ; Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos
MeJA	<i>methyl jasmonate</i> ; metil jasmonato

miRNAs	MicroRNAs
mRNA	<i>RNA Messenger</i> ; RNA Mensageiro
MVA	<i>Mevalonic Acid</i>
MYMIV	<i>Mungbean Yellow Mosaic India Virus</i>
MYMV	<i>Mungbean Yellow Mosaic Virus</i>
NBS-LRR	<i>Nucleotide Binding Site Leucine-Rich Repeat</i> ; Sítio de Ligação ao Nucleotídeo - Repetição Nucleotídica Rica em Leucina
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NeVomics	<i>Network-based Visualization for Omics</i>
NIK1	<i>NSP-Interacting Kinase I</i>
NIK2	<i>NSP-Interacting Kinase II</i>
NIP	<i>Nodulin26-like Intrinsic Proteins</i> ; Proteínas de Membrana de Nódulos
ObPV	<i>Obuda Pepper Virus</i>
OPR3	<i>OPDA Reductase 3</i>
OrMV	<i>Ornithogalum Mosaic Virus</i>
PAMPs	<i>Pathogen-Associated Molecular Patterns</i> ; Padrão Molecular Associado a Patógenos
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> ; Análise de Componentes Principais
PCD	<i>Programmed Cell Death</i> ; Morte Celular Programada
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Reação em Cadeia da Polimerase
PIP	<i>Plasma Membrane Intrinsic Protein</i> ; Proteínas Insnttrinseca de Membrana Plasmática
PPP	<i>Pentose Phosphate Pathway</i> ; Via das Pentoses Fosfato
PR	<i>Pathogenesis-Related</i> ; Proteínas Relacionadas à Patogênese
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> ; Receptores de Reconhecimento de Padrões
PRX	<i>Peroxiredoxin</i> ; Peroxirredoxina
PStV	<i>Peanut Stripe Virus</i>
PTGS	<i>Post-Transcriptional Gene Silencing</i> ; Silenciamento Gênico Pós-

	Transcricional
PTI	<i>PAMP-Triggered Immunity</i> ; Imunidade Desencadeada por PAMP
PVA	<i>Potato Virus A</i>
PVX	<i>Potato Virus X</i>
PVY	<i>Potato Virus Y</i>
PVY ^{NTN}	<i>Potato Virus Y^{NTN}</i>
qPCR	<i>Real Time quantitative PCR</i> ; PCR quantitativo em Tempo Real
QTLs	<i>Quantitative Trait Loci</i> ; Lócus de Herança Quantitativa
RB	<i>Biological Replicates</i> ; Réplicas Biológicas
Rbohs	<i>Respiratory bust oxidase homologues</i>
RdRp	<i>RNA-dependent RNA polymerase</i> ; RNA polimerase dependente de RNA
RH	<i>Relative Humidity</i> ; Umidade Relativa
RIN	<i>RNA Integrity Number</i>
RLKs	<i>Receptor-Like Kinase</i>
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNA-Seq	<i>RNA Sequencing</i> ; Sequenciamento de RNA
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; Espécies Reativas de Oxigênio
RTM1	<i>Restricted TEV I Movement</i>
RTM2	<i>Restricted TEV II Movement</i>
RTM3	<i>Restricted TEV III Movement</i>
SAM	<i>S-Adenosylmethionine</i>
SAR	<i>Systemic Acquired Resistance</i> ; Resistência Sistêmica Adquirida
SA	<i>Salicylic Acid</i> ; Ácido Salicílico
siRNAs	<i>Small interfering RNA</i> ; Pequenos RNAs de interferência
SMV	<i>Soybean Mosaic Virus</i>
SrMV	<i>Sorghum Mosaic Virus</i>
sRNAs	<i>Small RNA</i> ; Pequenos RNA não codificantes
SuperSAGE	<i>Super Serial Analysis of Gene Expression</i>

TAD	<i>Putative transcriptional activation domain</i>
TBSV	<i>Tomato Bushy Stunt Virus</i>
TCA	<i>Tricarboxylic Acid Cycle</i>
TCV	<i>Turnip Crinkle Virus</i>
TFs	<i>Transcription Factors</i> ; Fatores de Transcrição
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i> ; Silenciamento Gênico Transcricional
TIP	<i>TCV Interacting Protein</i>
TIP	<i>Tonoplast Intrinsic Proteins</i> ; Proteínas Intrínsecas de Tonoplasto
TIR	<i>Toll-Interleucin</i> ; Receptor de Interleucina 1
TLPs	<i>Thaumatococcus-like Proteins</i>
TMV	<i>Tobacco Mosaic Virus</i> ; Vírus do Mosaico do Tabaco
TMV-cg	<i>Crucifer-infecting Tobacco Mosaic Virus</i>
ToMV	<i>Tomato Mosaic Virus</i> , Vírus do Mosaico do Tomate
TRX	<i>Thioredoxin</i> ; Tiorredoxina
TSWV	<i>Tomato Spotted Wilt Virus</i>
TuMV	<i>Turnip Mosaic Virus</i>
TYLCV	<i>Tomato Yellow Leaf Curl Virus</i>
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UR	<i>Up-Regulated</i> ; Induzido
VpdL	<i>Vapor Pressure Deficit on Leaf</i> , Déficit de Pressão de Vapor na Folha
VPg	Proteína Viral associada ao Genoma
VubHLH	<i>basic Helix-Loop-Helix</i> de <i>Vigna unguiculata</i>
WCIMV	<i>White Clover Mosaic Potexvirus</i>
WMV	<i>Watermelon Mosaic Virus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	OBJETIVOS.....	24
1.1.1	Objetivo Geral.....	24
1.1.2	Objetivos Específicos.....	24
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	27
2.1	TAXONOMIA, CENTRO DE ORIGEM, CENTRO DE DOMESTICAÇÃO E INTRODUÇÃO NO BRASIL.....	27
2.2	FEIJÃO-CAUPI E SUA IMPORTÂNCIA ESTRATÉGICA NO BRASIL E NO MUNDO.....	28
2.3	FEIJÃO-CAUPI E RESPOSTAS AOS ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS.....	29
2.3.1	Fatores abióticos vs feijão-caupi: um enfoque na seca.....	30
2.3.2	Fatores bióticos vs feijão-caupi: um enfoque nas viroses.....	31
2.3.2.1	Vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV).....	32
2.3.2.2	Vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV).....	33
2.4	MECANISMOS VEGETAIS ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA À SECA.....	34
2.5	MECANISMOS VEGETAIS ASSOCIADOS À DEFESA CONTRA VÍRUS.....	37
2.5.1	PTI e ETI: o papel da imunidade inata na interação planta vs vírus.....	38
2.5.1.1	PTI em Vírus.....	40
2.5.1.2	Mecanismos vegetais de defesa dominante contra vírus.....	42
2.5.2	Mecanismos vegetais de defesa recessiva contra vírus.....	45
2.5.3	Mecanismos vegetais de defesa contra vírus mediados por RNAi.....	46
2.6	ÔMICAS EM FEIJÃO-CAUPI: COWPEA GENOMICS CONSORTIUM (CpGC).....	47
3	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

APÊNDICE A – ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA COMPARATIVA REVELA MECANISMOS MOLECULARES CONSERVADOS EM FEIJÃO-CAUPI NA RESPOSTA PRECOCE A DOIS VÍRUS DE RNA DISTINTOS.....	65
APÊNDICE B – REPROGRAMAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DE FEIJÃO-CAUPI DURANTE DOIS DIFERENTES MOMENTOS FISIOLÓGICOS DO ESTRESSE DE DESIDRATAÇÃO RADICULAR.....	124
APÊNDICE C – FATORES DE TRANSCRIÇÃO BHLH EM FEIJÃO-CAUPI: GENÔMICA ESTRUTURAL E TRANSCRIPTÔMICA SOBRE ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS.....	169
APÊNDICE D – THE COWPEA KINOME: GENOMIC AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS UNDER BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA FRONTIERS...	213
APÊNDICE E - <i>VIROSES EM FEIJÃO-CAUPI: FONTES DE RESISTÊNCIA, MARCADORES MOLECULARES, ÔMICAS E BIOTECNOLOGIA</i> - CAPÍTULO DE LIVRO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO.....	214
APÊNDICE F - CURRÍCULO VITAE (LATTES) ARTEMISA NAZARÉ COSTA BORGES.....	215

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi é uma das leguminosas mais consumidas mundialmente, sendo cultivada principalmente pelas populações de baixa renda por suas propriedades alimentícias (BOUKAR et al., 2016; MUÑOZ-AMATRIAÍN et al., 2017). Entre os atributos nutricionais que conferem a essa cultura notável relevância está o seu alto teor proteico, aliado a uma excelente fonte de vitaminas, sais minerais e fibras (FREIRE-FILHO et al., 2005). No Brasil, em especial nas regiões Norte e Nordeste, associada à sua importância nutricional, essa espécie ainda apresenta um relevante impacto nos índices socioeconômicos, isso por compreender o principal grão que compõe a dieta da população dessas regiões, além de se tratar de uma das principais fontes de emprego e renda (FREIRE-FILHO et al., 2011).

Apesar do seu elevado valor estratégico, o feijão-caupi apresenta severas perdas de produtividade quando cultivado sob condições desfavoráveis, o que impacta negativamente a economia e a sobrevivência das populações produtoras / consumidoras desse grão. O cultivo em regiões com limitações hídricas frequentes é responsável por grande proporção das perdas de colheita dessa leguminosa. Sob tal condição, a produtividade média do feijão-caupi pode ser reduzida de 1167 kg de grãos.ha⁻¹ para 466 kg.ha⁻¹ (BASTOS et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011). A deficiência hídrica, no entanto, é uma condição comum em grande parte das regiões produtoras de feijão-caupi, como a região Nordeste do Brasil. No ano de 2018, essa região foi responsável por 65% da produção nacional desse grão, abrangendo uma área de mais de 1,2 milhões ha, o que corresponde a aproximadamente 84% de toda área nacional destinada à produção de feijão-caupi (Embrapa Arroz e Feijão, 2020), esses dados associados às características edafoclimáticas dessa região, tornam o déficit hídrico uma grande ameaça à produção nacional.

As viroses, por sua vez, constituem um dos estresses bióticos mais danosos à produtividade dessa leguminosa. Entre a vasta gama de fitopatógenos que acometem o feijão-caupi, destacam-se o Vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV) e o Vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV). Plantas infectadas com um desses dois vírus apresentam sintomas típicos de mosaico grave nas folhas infectadas (BASTOS, 2016). O CPSMV, ainda, destaca-se por sua severidade, o que resulta em uma das doenças virais mais devastadoras em

feijão-caupi. Já o CABMV corresponde a 16% de todas as viroses que acometem essa leguminosa (LIMA; SITTOLIN; LIMA, 2005). Portanto, ambos os vírus são responsáveis por sérias perdas anuais de colheitas (BOOKER et al., 2005; NÉYA et al., 2015).

Como sistema de defesa frente a perturbações de natureza biótica e abiótica, as plantas mobilizam uma variedade de mecanismos moleculares de resposta subjacentes ao estresse, os quais levam à reprogramação de vários processos fisiológicos e metabólicos (GREENHAM et al., 2017; MUTWAKIL et al., 2017). A compreensão de tais mecanismos torna-se um passo vital para o desenvolvimento de cultivares tolerantes e resistentes a agentes estressores. A utilização de abordagens metodológicas que possibilitam a análise dos padrões de expressão gênica em plantas sob condições de estresse, como o sequenciamento massivo de transcritos realizado por meio de plataformas de sequenciamento de nova geração (RNA-Seq) associado à PCR quantitativa em tempo real (qPCR), têm possibilitado a identificação e seleção de genes-candidatos, bem como auxiliado na elucidação de vias metabólicas, envolvidos na resistência a vírus (KUNDU et al., 2019; SUN; FAN; HE, 2019) e na tolerância à seca (HASAN et al., 2019; YOU et al., 2019; LIU; DENG; TIAN, 2020).

Diante da temática atual de feijão-caupi frente a estresses, *Cowpea Genomics Consortium* (CpGC) desenvolveu diversos ensaios de transcriptômica para essa cultura e, atualmente, disponibiliza de dados moleculares associados a análises globais de transcriptomas de feijão-caupi submetidos a diferentes condições estressantes, tanto de caráter biótico quanto abiótico, sendo elas: déficit hídrico (desidratação radicular) e exposição a vírus (injúria + inoculação com CABMV; injúria + inoculação com CPSMV). Assim, com a disponibilidade de dados do CpGC, elementos importantes da maquinaria celular de feijão-caupi, atuantes na resposta a viroses e déficit hídrico, podem ser estudados em nível transcricional e com alto rendimento. A análise global desses transcriptomas, por sua vez, torna possível a mineração de vias metabólicas, famílias gênicas ou transcritos individuais intimamente envolvidos nos processos de resistência/tolerância à tais estresses.

Neste contexto, o presente estudo objetivou caracterizar o comportamento transcricional de feijão-caupi mediante a imposição de estresses bióticos (após inoculação por CABMV e CPSMV) e abiótico (desidratação radicular), por meio de

análises abrangentes dos perfis globais de expressão gênica em resposta aos referidos estresses através de abordagens genômicas e transcriptômicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Geral

Avaliar o comportamento transcricional de acessos de feijão-caupi sob déficit hídrico (desidratação radicular), por meio da análise global do transcriptoma, bem como analisar transcritos coexpressos após exposição à injúria mecânica e inoculação com dois vírus distintos (CABMV e CPSMV), contribuindo para o entendimento de processos moleculares de resposta a esses estresses em *Vigna unguiculata*.

1.2.2 Objetivos Específicos

Identificar, analisar e caracterizar transcritos diferencialmente expressos em resposta ao processo de injúria mecânica + inoculação com CPSMV ou injúria mecânica + inoculação com CABMV), nas bibliotecas de expressão gênica do CpGC (*Cowpea Genomics Consortium*).

Comparar, intraespecificamente, os transcriptomas das cultivares resistentes aos vírus analisados, minerando diferentes grupos de transcritos coexpressos (coinduzidos ou coreprimidos), denominados de Assinaturas Transcricionais Conservadas – ATCs.

Gerar um banco de dados local das ATCs, produto da análise do “item b”, com suas respectivas contagens nas diferentes bibliotecas RNA-Seq e modulação de sua expressão gênica.

Identificar e analisar os termos GO enriquecidos associados às ATCs, a fim de traçar as funções moleculares e processos biológicos altamente ativos nas respostas de defesa de feijão-caupi frente ao estresse aplicado.

Mapear os diferentes conjuntos de ATCs nas vias metabólicas e de sinalização do MapMan, a fim de apresentar um painel visual e compreensivo para

interpretação biológica.

Analisar os promotores dos genes codificadores de ATCs no genoma de feijão-caupi, minerando o possível enriquecimento de elementos cis-regulatórios associados à determinadas famílias de fatores de transcrição.

Analisar a possível conservação e ortologia, em diversas espécies de Viridiplantae, dos loci codificadores de ATCs em de feijão-caupi.

Validar, via qPCR, a expressão de ATCs alvos, que estejam envolvidos em etapas cruciais do metabolismo dessa espécie em resposta às referidas condições estressantes

Identificar, analisar e caracterizar transcritos diferencialmente expressos responsivos ao déficit hídrico (desidratação radicular), nas bibliotecas de expressão gênica do CpGC (*Cowpea Genomics Consortium*).

Avaliar parâmetros fisiológicos de feijão-caupi sob condição de deficiência hídrica.

Gerar um banco de dados local dos transcritos responsivos ao déficit hídrico, produto da análise do “item i”, com suas respectivas contagens nas diferentes bibliotecas RNA-Seq e modulação de sua expressão gênica.

Identificar e analisar os termos GO enriquecidos associados aos transcritos responsivos ao déficit hídrico, a fim de traçar os processos biológicos altamente ativos nas respostas de defesa de feijão-caupi frente ao estresse aplicado.

Ancorar os transcritos responsivos ao déficit hídrico nas vias metabólicas e de sinalização alocadas na base de dados *KEGG Pathway*, a fim de gerar um painel visual e compreensivo para interpretação biológica.

Escrutinar o possível enriquecimento de determinadas famílias gênicas para os transcritos responsivos ao déficit hídrico.

Analisar os promotores dos genes codificadores dos transcritos responsivos ao déficit hídrico no genoma de feijão-caupi, minerando a presença e possível enriquecimento de elementos cis-regulatórios associados a determinadas famílias de fatores de transcrição.

Analisar a possível conservação e ortologia, em diversas espécies de Viridiplantae, dos loci codificadores de transcritos responsivos ao déficit hídrico em de feijão-caupi.

Validar, via qPCR, a expressão de transcritos-alvos responsivos ao déficit hídrico, que estejam envolvidos em etapas cruciais do metabolismo dessa espécie

em resposta à referida condição estressante.

Identificar, analisar e caracterizar genes bHLH no genoma de *V. unguiculata* (VubHLH).

Localizar os domínios e motivos conservados característicos dos genes VubHLH para a realização de estudos comparativos com sequências de genes previamente caracterizadas.

Realizar análise fenética para comparar os genes VubHLH com bHLH de outras espécies disponíveis em bancos públicos, inferindo sobre sua estrutura, função e classificação em subfamílias.

Identificar os mecanismos de expansão dos VubHLHs no genoma do feijão-caupi.

Analisar os promotores dos VubHLH, minerando o possível enriquecimento de elementos cis-regulatórios associados à determinadas famílias de fatores de transcrição.

Analisar a possível conservação e ortologia, em diversas espécies de Viridiplantae, dos loci codificadores de VubHLH.

Estabelecer um perfil da expressão dos VuPKs sob as condições de desidratação radicular e infúria seguida de inoculação viral.

Validar, via qPCR, a expressão de VubHLHs alvos, que estejam envolvidos em etapas cruciais do metabolismo dessa espécie em resposta às referidas condições estressantes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TAXONOMIA, CENTRO DE ORIGEM, CENTRO DE DOMESTICAÇÃO E INTRODUÇÃO NO BRASIL.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma importante leguminosa utilizada como gênero alimentício em muitas nações em desenvolvimento devido ao seu excelente conteúdo nutricional, baixo custo e disponibilidade (FREIRE-FILHO et al., 2005; COWPEA GENOMICS, 2018). Essa espécie é também conhecida por outros nomes vulgares, tais como: feijão-de-corda e feijão macassar (na região Nordeste), feijão miúdo (na região Sul), feijão catador e feijão gerutuba (em algumas regiões do estado da Bahia e norte de Minas Gerais), e feijão fradinho (no estado do Rio de Janeiro) (FREIRE-FILHO et al., 1999). Trata-se de uma cultura diploide ($2n = 22$ cromossomos), dicotiledônea, pertencente à ordem Fabales, família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolinae, gênero *Vigna* e seção Catiang (FRAHM-LELIVELD, 1965; MARÉCHAL et al., 1978; PADULOSI; NG, 1997; VERDCOURT, 1970).

A mencionada espécie é originária da África (FREIRE-FILHO, 1988; ZEVEN; DE WET, 1982), porém há indícios de que a origem do grupo tenha ocorrido a partir do continente asiático (SIMON et al., 2007). Já em relação à sua domesticação, a exata região da realização desse processo tem sido objeto de especulações e discussões. Alguns autores (NG; MARÉCHAL, 1985; NG, 1995; VAILLANCOURT; WEEDEN, 1992) sugeriram que o centro de domesticação do feijão-caupi poderia estar situado no oeste da África, devido: (1) ao alto nível de diversidade morfológica dos acessos cultivados na região; (2) à existência de possíveis intermediários entre os feijões-caupi cultivado e selvagem; (3) às mais antigas evidências arqueológicas para tal espécie se localizarem na região de Gana; e (4) à identificação de acessos cultivados e selvagens com idênticos DNAs cloroplastidiais, na Nigéria. Um segundo centro de domesticação estaria situado no nordeste da África, pois: (1) há ausência de um acesso ecologicamente selvagem no oeste da África; (2) existe um elevado nível de diversidade morfológica para tal espécie na região que se estende da Etiópia à África do Sul (BAUDOIN, MARÉCHAL, 1985); e (3) resultados alcançados

em estudos de etnobotânica e ensaios com isoenzimas sinalizam positivamente para tal situação (PAQUET, 1996).

A introdução dessa leguminosa no continente americano ocorreu, provavelmente, no século XVI. Colonizadores espanhóis e portugueses são os atores principais desse processo. Inicialmente, o feijão-caupi foi introduzido nas colônias espanholas. Posteriormente, tal processo ocorreu no Brasil por meio de colonizadores portugueses, durante a segunda metade do século XVI. O estado da Bahia foi o primeiro a apresentar registros da referida espécie, a qual foi, em seguida, dissipada para outras regiões do país (FREIRE-FILHO, 1988). Por outro lado, Simon et al. (2007) destacam que um possível papel dos escravos africanos trazidos para o Brasil não pode ser descartado. Milhões de escravos foram trazidos para o Brasil, diretamente da África, a maioria para os portos de Recife, Salvador, Rio de Janeiro e São Luiz. Registros históricos indicam que a maioria dos escravos veio de Angola, Moçambique e Congo. Eles trouxeram grande parte de sua cultura e também sementes de plantas usadas em rituais ou em seus pratos favoritos, como é o caso do feijão-caupi, em parte justificando a diversidade genética encontrada no estudo em questão (SIMON et al., 2007).

2.2 FEIJÃO-CAUPI E SUA IMPORTÂNCIA ESTRATÉGICA NO BRASIL E NO MUNDO

Globalmente, o feijão-caupi é uma das 23 espécies cultivadas mais importantes (COWPEA GENOMICS, 2018). No ano de 2018, a produção mundial dessa leguminosa foi de mais de 72 milhões de toneladas, abrangendo uma área de 12,5 milhões de ha, resultando em uma produtividade de 578,8 kg/ha (FAO, 2020).

No que tange ao Brasil, tal cultura destaca-se por sua importância socioeconômica. É uma forte geradora de emprego e renda, além de representar uma excelente fonte de proteínas, contendo todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, minerais e grande quantidade de fibras dietéticas (FREIRE-FILHO et al., 2005). Apresenta produção e consumo destacados nas regiões Norte e Nordeste do país, com recente expansão para áreas de cerrado. Indicadores de emprego e faturamento associados à cultura atestam sua participação na geração de 961.993 empregos, com o valor de produção estimado em cerca de R\$ 643 milhões (ROCHA

et al., 2017). Adicionalmente, nosso país é o terceiro maior exportador mundial dessa leguminosa, atrás somente de Estados Unidos da América e Peru, respectivamente (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2017).

De acordo com as estimativas obtidas pela (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2020) a produção do feijão-caupi em nível nacional no ano de 2018, foi de 738.048 toneladas colhidas em 1.486.023 hectares, apresentando uma produtividade de 497 kg/ha. Tais dados representam a maior produtividade já registrada para a cultura desde 1985. O estado de Pernambuco correspondeu a 283 kg/ha da produtividade brasileira, com uma área cultivada de 188.030 hectares.

O feijão-caupi é bem adaptado às condições de clima e solo das regiões Norte e Nordeste, sendo possuidor de uma grande variabilidade genética. Isso o torna versátil, podendo ser usado em diferentes sistemas de produção, tradicionais ou modernos, além de fonte de genes de elevado potencial biotecnológico. Seu consumo diminui a dependência quase que exclusiva do feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), outra tradicional leguminosa de forte apelo socioeconômico (FREIRE-FILHO et al., 2011). Além disso, o feijão-caupi também se destaca por ser amplamente utilizado na alimentação de animais, sendo empregado na forma de forragem verde, feno e ensilagem (FREIRE-FILHO et al., 2005). Além do exposto, estudos revelaram que a mencionada espécie pode apresentar importância na área da saúde, frente à identificação da molécula conhecida como BTCl (*Black eyed-pea Trypsin Chymotrypsin Inhibitor*) que tem a capacidade de matar células cancerígenas humanas sem agredir células saudáveis (BOLGUE, 2011). Dessa forma, o feijão-caupi é considerado uma espécie plural e de valor estratégico.

2.3 FEIJÃO-CAUPI E RESPOSTAS AOS ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

Embora a importância agrônômica e nutricional do feijão-caupi seja indiscutível, sua produtividade ainda se encontra em níveis médios, sendo comprometida por estresses bióticos e abióticos, os quais figuram como sérias ameaças à agricultura e resultam na degradação do ambiente. Perdas resultantes desses estresses conduzem à diminuição do rendimento médio das colheitas em mais de 50%, representando assim um grande desafio diante da crescente população mundial (GAO et al., 2007).

Os fatores bióticos compreendem as relações diretas entre a planta e outros organismos, que podem lhes trazer benefícios ou resultar em danos lesivos, neste último caso tornando-se um fator de estresse (HARTLEY, 2001). Os fatores abióticos, por sua vez, compreendem parâmetros e recursos da natureza necessários para o desenvolvimento do vegetal. Porém, quando disponíveis em níveis extremos ou insuficientes, tornam-se elementos estressantes, prejudiciais à sua sobrevivência (SCHULZE; BECK; MULLER-HOHENSTEIN, 2005).

2.3.1 Fatores abióticos vs feijão-caupi: um enfoque na seca

A seca é um dos fatores que mais afetam a produção do feijão-caupi (BOUKAR et al., 2016). Alguns mecanismos de adaptação a essa condição já foram descritos para genótipos dessa espécie, a qual apresenta recursos genéticos potencialmente tolerantes devido à sua capacidade de crescer em solos com baixa disponibilidade hídrica (CARDONA; JARMA; ARÁMENDIZ, 2013). Isso a torna um modelo interessante para investigar os mecanismos genéticos da adaptação à seca. Apesar de tais particularidades, a exposição prolongada a um período de estiagem ainda compromete, significativamente, o rendimento de acessos de elite da mencionada cultura. Assim, alguns estudos vêm sendo executados. Os genótipos Santo Inácio, BRS-Paraguaçu, Pingo-de-ouro-1-2 e Pingo-de-ouro-2 (BASTOS et al., 2011) são tidos como referência para tal finalidade. Mecanismos fisiológicos relacionados à tolerância à seca têm sido descritos para os alguns dos referidos genótipos. Rivas et al. (2016) ao estudarem o comportamento fotossintético *in vivo* de duas cultivares contrastantes de feijão-caupi [(Pingo de Ouro 1-2 (tolerante) e Santo Inácio (sensível)] sob diferentes condições hídricas (condições ótima de irrigação, condições de seca e reidratação), sugeriram, para Pingo de Ouro 1-2, um mecanismo de tolerância à seca relacionado à manutenção do status hídrico da parte aérea, em função de um maior potencial de água na folha, após 10 dias de análise sob condições de seca. Além disso, os resultados apresentados demonstraram que a cultivar tolerante apresentou uma recuperação mais rápida da fotossíntese após a reidratação.

Segundo dados apresentados pela Embrapa Arroz e Feijão (2020), a produtividade média anual registrada para o feijão-caupi no ano de 2018 foi de apenas 497 Kg ha⁻¹, valor considerado baixo em relação aos padrões de outras

espécies vegetais próximas. O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris*), por exemplo, apresentou produtividade anual média de 1.496 Kg ha⁻¹ para esse mesmo período. Apesar de adaptada às condições ambientais de cultivo, essa baixa produtividade do feijão-caupi é resultante de vários fatores (NASCIMENTO et al., 2011), como: o uso de sementes não melhoradas; o cultivo em solos de baixa fertilidade; e, principalmente, a ocorrência de precipitações pluviométricas irregulares, sendo que a seca é condição comum no Nordeste do país. Em condições favoráveis, plantas de feijão-caupi podem produzir mais de 1.000 kg de grãos.ha⁻¹, mas a seca reduz esse potencial para aproximadamente 466 kg.ha⁻¹ (BASTOS et al., 2011; NASCIMENTO et al., 2011).

Além do exposto, condições de seca podem influenciar diretamente nas respostas de defesa do feijão-caupi contra patógenos. Ao estudarem o efeito da seca sobre a interação de plantas de feijão-caupi ao *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), Silva et al. (2016) relataram que a referida condição aumentou a suscetibilidade dessa leguminosa ao CPSMV, nos momentos iniciais após a inoculação.

2.3.2. Fatores bióticos vs feijão-caupi: um enfoque nas viroses

No contexto das interações bióticas, destacam-se doenças causadas por agentes patogênicos (incluindo fungos, bactérias e nematoides), além de predação por insetos. As viroses são, por sua vez, consideradas os fatores bióticos mais limitantes ao cultivo do feijão-caupi (BARROS, 2010).

Os vírus são agentes infecciosos cuja incidência e severidade variam dependendo do hospedeiro, do vetor e da fonte de inóculo (CAMARÇO et al., 2009). No Brasil, entre os principais vírus que infectam o feijão-caupi, destacam-se o Vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV) e o Vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV), devido à severidade com que acometem a cultura (BASTOS, 2016).

Os vírus CPSMV e CABMV possuem RNA de fita simples, de sentido positivo [ssRNA(+)], com uma cauda poli-A na extremidade 3' (KING et al., 2012), sendo classificados no reino Riboviria (um provável clado monofilético de vírus de RNA; WALKER et al., 2019). O CPSMV pertence à ordem Picornavirales e à família Secoviridae. O CABMV, por sua vez, é identificado apenas em nível de família

(Potyviridae) (KING *et al.*, 2012). Estudos filogenéticos realizados com sequências de RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) agruparam Potyviridae e Secoviridae em diferentes clados (Koonin *et al.*, 2008). Adicionalmente, outro estudo executado a partir do mesmo substrato de análise (RdRp) dividiu os vírus de RNA (+) em três grupos filogeneticamente distintos, sendo os Secoviridae pertencentes ao clado 1 e os Potyviridae, ao clado 3 (WOLF *et al.*, 2018).

2.3.2.1. Vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV)

Existem relatos de disseminação do CPSMV em praticamente todas as regiões produtoras de feijão-caupi no país, tendo sua ocorrência registrada nos seguintes estados brasileiros: Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal (BRIOSO *et al.*, 1994). Apresenta fácil transmissão mecânica e em condições naturais é transmitido por espécies de besouros dos gêneros *Diabrotica* e *Cerotoma* (COSTA *et al.*, 1978), havendo, também, registros de sua transmissão pelo manhoso (*Chalcodermus bimaculatus*) (ATHAYDE-SOBRINHO; VIANA; SANTOS, 2000).

Os principais sintomas associados a essa virose são: mosaico intenso, encrespamento do limbo foliar (em virtude das bolhosidades) e a presença de mosqueado, ou seja, alternância de zonas de coloração verde-clara com outras de cor verde-escura nos folíolos (Figura 1). Também pode ser observado subdesenvolvimento das nervuras principais, resultando em franzimento e redução do limbo e distorção foliar. As sementes obtidas de plantas doentes apresentam-se deformadas, murchas e manchadas, com redução de seu poder germinativo (BASTOS, 2016).

Figura 1 - Morfologia de uma planta de feijão-caupi sob inoculação com Vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV)



Fonte: (BARROS, 2010)

Quando infectadas no início do ciclo, as plantas apresentam intenso nanismo, o que pode ocasionar severas perdas. Essa virose pode diminuir a produção do feijão-caupi em até 80%, dependendo da idade em que a planta foi infectada (BASTOS, 2016). A melhor forma de controle a ser adotada é por meio da utilização de cultivares comerciais altamente resistentes, como a BR 10 - Piauí, BR 14 - Mulato e BR 17 - Gurguéia. Outras medidas podem ser tomadas, como controle dos vetores, plantio em época de baixa população dos vetores e eliminação das plantas hospedeiras silvestres (BASTOS, 2016).

2.3.2.2. Vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV)

O CABMV pertence ao gênero *Potyvirus*, o qual reúne mais de 100 espécies virais que infectam plantas, correspondendo a 16% de todas as viroses que acometem esses organismos, o que justifica a grande importância econômica do referido grupo (LIMA; SITTOLIN; LIMA, 2005). Sua transmissão ocorre em segundos, por meio de várias espécies de pulgões (como *Aphis cracivora* e *Myzus persicae*) e afídeos, através de “picadas de prova” (transmissão não persistente; (BASTOS, 2016; GRAY, 1996). Adicionalmente, tal vírus pode ser transmitido também pelas sementes (BASTOS, 2016).

Os sintomas são caracterizados pelo aparecimento, nos folíolos, de um mosaico forte marcado por áreas amareladas alternadas por outras de verde normal

(Figura 2). A presença de faixas verdes nas nervuras pode estar associada ou não à distorção foliar. Quando as plantas são infectadas no início de seu desenvolvimento, elas podem apresentar redução no porte, podendo levar ao nanismo com redução drástica na produção de sementes.

Figura 2 - Morfologia de uma planta de feijão-caupi sob inoculação com Vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV)



Fonte: (BARROS, 2010)

As medidas de controle para o CABMV são praticamente as mesmas recomendadas para o CPSMV: emprego de cultivares resistentes [como o IT85F-2687; (OLIVEIRA et al., 2012; ROCHA et al., 1996)], uso de sementes sadias, eliminação de plantas hospedeiras do vírus, controle da população de vetores, bem como plantio em época de baixa população desses vetores. Recomenda-se, ainda, o uso de fileiras adensadas de milho ou sorgo, para proteger a cultura, plantadas 15 dias antes do plantio de feijão-caupi (BASTOS, 2016).

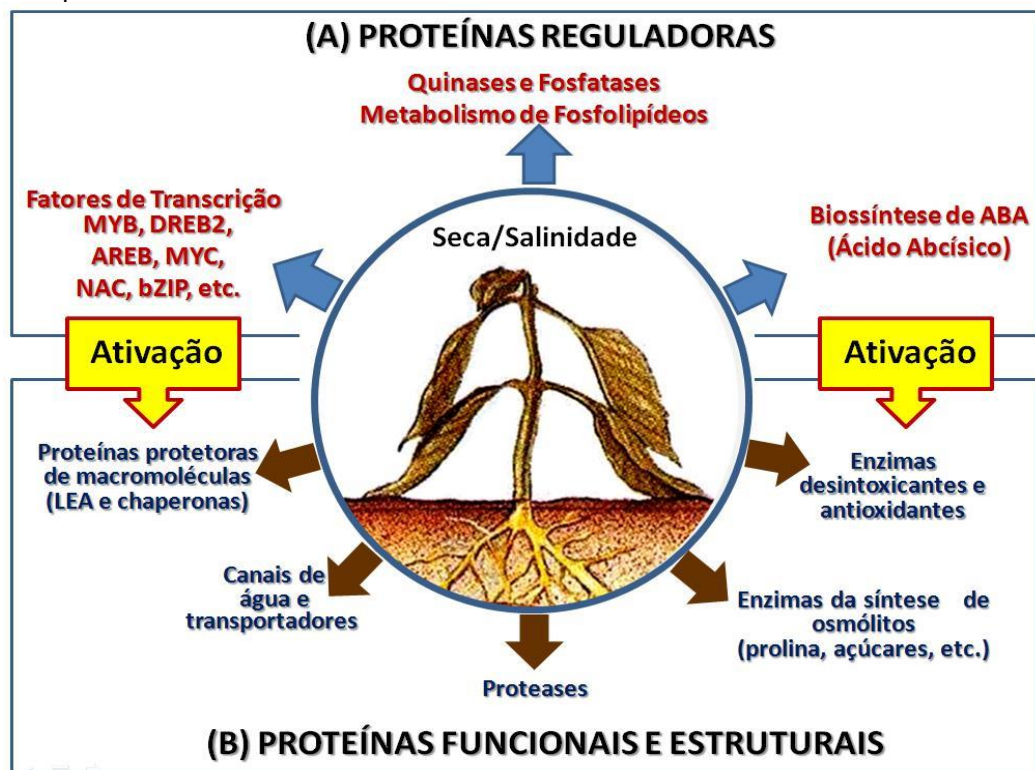
2.4. MECANISMOS VEGETAIS ASSOCIADOS À TOLERÂNCIA À SECA

Frente às condições de seca, as plantas contam com uma maquinaria celular diversificada, atuante em níveis estratificados como percepção, sinalização, controle transcricional e reorganização de vias responsivas ao estresse (BARTELS; SOUER, 2003; PANDEY, 2008).

Os mecanismos genéticos de percepção que estão relacionados às respostas à seca nos vegetais incluem diversas classes de genes, os quais têm sido

tradicionalmente divididos em dois grupos: (I) proteínas reguladoras; e (II) proteínas funcionais e estruturais (BENKO-ISEPPON et al., 2011) (Figura 3).

Figura 3 - Principais categorias de genes envolvidos na resposta vegetal a estresses abióticos, com ênfase para seca. Após a percepção do estresse são acionados grupos de genes envolvidos na regulação e transdução de sinais (A), acionando cascatas de sinalização que induzem genes que codificam proteínas diretamente envolvidas nos mecanismos de tolerância ao referido estresse (B)



Fonte: (BENKO-ISEPPON et al., 2011)

O primeiro grupo (Figura 3A) inclui genes que estão envolvidos na cascata de sinalização e no controle transcricional, a exemplo das proteínas quinases (MUHAMMAD et al., 2019) e das diferentes classes de fatores de transcrição (TFs) (JOSHI et al., 2016), respectivamente. Já o segundo grupo (Figura 3B), inclui genes codificadores de proteínas que funcionam diretamente na proteção de membranas [como as aquaporinas - AQPs (ZHOU et al., 2012)], genes codificadores de chaperonas [como proteínas LEA (*Late embryogenesis abundant*; (MAGWANGA et al., 2018; PARK et al., 2005)], além de codificadores de enzimas para biossíntese de osmólitos (AHN; PARK; PARK, 2011).

À medida que as condições de seca aumentam, alguns osmólitos, como poliaminas, açúcares (trealose, frutano), aminoácidos (prolina), álcoois de açúcar (manitol, sorbitol, D-ononitol), betaínas e compostos relacionados [GABA (Ácido

gama-aminobutírico, glicinabetaína], se acumulam nas células vegetais, auxiliando o sistema de defesa antioxidante e mantendo a homeostase iônica (SINGH et al., 2015). Em estudos realizados com plantas de amendoim contrastantes em relação à tolerância à seca, foi observado que acessos tolerantes apresentaram níveis mais elevados de prolina em comparação às suscetíveis (PADMAVATHI; RAO, 2013; RANGANAYAKULU et al., 2015). Além disso, aplicação exógena de prolina e glicinabetaína melhorou a tolerância à seca em algodão (NOREEN et al., 2013). De modo semelhante, o pré-tratamento com poliaminas exógenas levou ao aumento nos níveis de prolina e à redução dos efeitos nocivos da seca em pepino (KUBIŚ; FLORYSZAK; ARASIMOWICZ, 2014).

Após a percepção da escassez de água através das raízes, as plantas enviam sinais à parte aérea para se aclimatar. Nesse sentido, um dos principais mecanismos compreende a síntese de ABA (Ácido abscísico) nas raízes, o qual é transportado via xilema para as folhas, enquanto mensageiros secundários induzem o fechamento estomático (MAHAJAN; TUTEJA, 2005). Processos controlados por ABA são primordiais para a tolerância à seca. Conforme demonstrado por Frey et al. (2012), mutação em genes NCED (responsáveis pela biossíntese de ABA) resultam em aumento da susceptibilidade ao mencionado estresse. Além disso, aplicação exógena de ABA, ácido salicílico (SA) e ácido gama-aminobutírico (GABA) resultaram em maior tolerância à seca em *Agrostis stolonifera* (Poaceae), resultando na manutenção da estabilidade da membrana e do status de água nas folhas (LI et al., 2017).

Além do exposto, o ácido jasmônico (JA), semelhantemente ao ABA, atua como regulador de muitos processos relacionados à tolerância à seca. Nesses processos estão envolvidos genes que fazem parte tanto das vias de biossíntese quanto da sinalização desse fitôrmônio. Foi observado que o aumento nos níveis de 12-OPDA, um precursor do JA, promove maior tolerância à seca, além de abertura estomática reduzida (SAVCHENKO et al., 2014). Sob condições de seca há incremento nos níveis de JA-Ile, resultando na ativação de OsbHLH148 que induz a expressão de OsDREB1, melhorando assim, a tolerância à seca em arroz (SEO et al., 2011). Plantas de arroz com mutação nos genes JAZ, um regulador negativo da sinalização mediada por JA, apresentaram maior tolerância à seca em comparação às plantas selvagens. Adicionalmente, a superexpressão desses genes ocasionou maior susceptibilidades ao estresse (FU et al., 2017).

Os TFs são outro grupo indispensável de proteínas reguladoras centrais envolvidas na reprogramação transcricional de muitos genes em resposta à seca (GAHLAUT et al., 2016). Análises transcriptômicas envolvendo plantas submetidas à condição de seca têm demonstrado diversas classes de TFs relacionadas à tolerância à seca. Por exemplo, a espécie xerófita do deserto *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn, uma planta altamente tolerante à seca, quando submetida à condição de seca induziu a transcrição de diversos TFs, os quais incluíram: DREB, AP2/EREBP, B-2a, ERF2, MYB e Zinc finger family (WANG; WANG; YANG, 2017). Em milho, Zhang et al. (2017) ao estudarem as respostas transcricionais entre dois acessos contrastantes em relação à tolerância à seca, identificaram uma super-representação de TFs exclusivamente no genótipo tolerante. Semelhantemente, ao comparar a resposta de três espécies de algodão sob condições de seca, observou-se que algumas classes de TFs foram induzidas exclusivamente no genótipo tolerante (HASAN et al., 2019). Esses estudos apontam que esses genes podem ser usados para melhorar a tolerância à seca.

2.5. MECANISMOS VEGETAIS ASSOCIADOS À DEFESA CONTRA VÍRUS

Plantas e patógenos potencializaram uma complexa interação ao longo da evolução. A troca de sinais entre ambos é essencial para determinar os resultados dessa associação. Vale ressaltar que os modelos atuais desenvolvidos para explicar essa dinâmica coevolutiva planta-patógeno foram construídos investigando patógenos não-virais (JONES; DANGL, 2006). No tocante a vírus, as respostas de defesa vegetal também envolvem uma série de eventos de reconhecimento, sinalização e resposta. Entretanto, essas respostas têm sido discriminadas com algumas diferenças em comparação ao proposto para bactérias e fungos (NICAISE, 2014).

Em geral, os principais mecanismos de defesa vegetal empregados para contrapor as infecções virais são basicamente: resistência dominante, resistência recessiva e resistência baseada no silenciamento por RNA (NICAISE, 2014). Além destes mecanismos, esta revisão também abordará a PTI (*PAMP-Triggered Immunity*) como ferramenta de defesa antiviral em plantas.

2.5.1 PTI e ETI: o papel da imunidade inata na interação planta vs vírus

A troca de sinais entre plantas e patógenos é essencial para determinar os resultados da associação entre ambos. Assim, as plantas desenvolveram mecanismos de imunidade inata dependentes do reconhecimento de estruturas conservadas e moléculas efetoras provenientes do patógeno por meio de duas classes distintas de receptores, resultando em um sistema imune inato estratificado em duas camadas (DODDS; RATHJEN, 2010; BOLLER; HE, 2009):

Primeira camada: imunidade desencadeada por padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen Associated Molecular Patterns* - PAMPs), denominada tecnicamente de PTI (*PAMP-Triggered Immunity*)

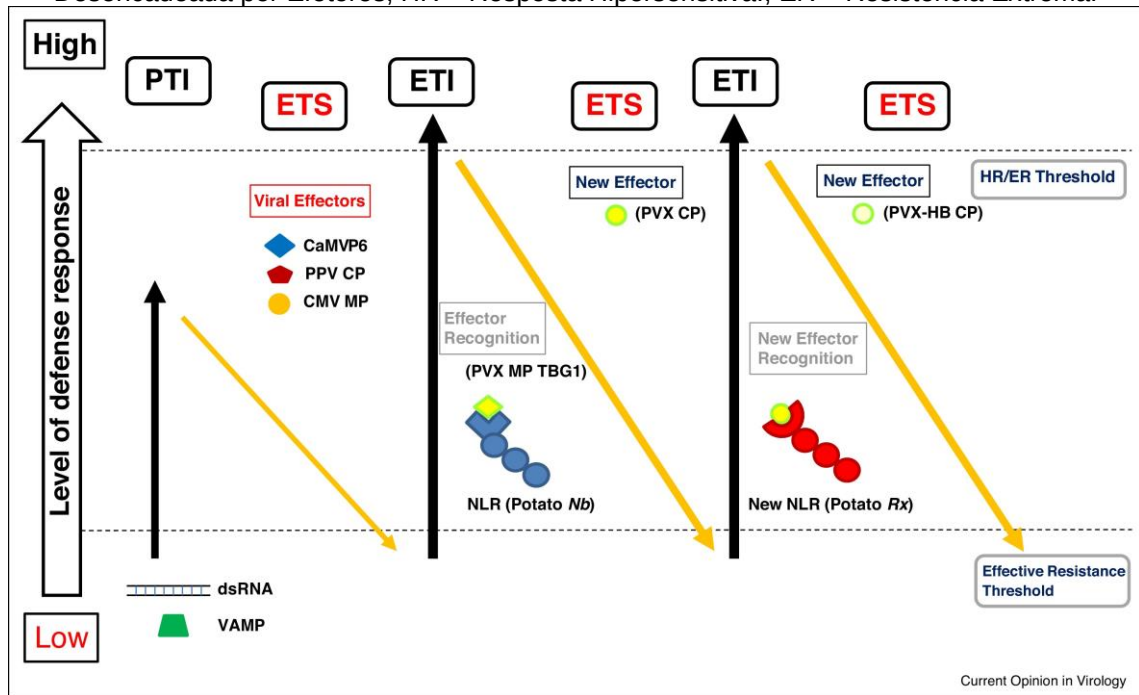
Segunda camada: imunidade desencadeada por efetores, ou ETI (*Effector-Triggered Immunity*).

A PTI caracteriza-se como a primeira linha de defesa vegetal contra patógenos. Na superfície da célula hospedeira, os PAMPs são reconhecidos por proteínas receptoras transmembranares, denominadas receptores de reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* - PRRs). A resposta mediada pela percepção de PAMPs desencadeia uma série de mecanismos moleculares com o intuito de restringir o crescimento do patógeno. Por sua vez, a segunda classe de percepção envolve o reconhecimento de moléculas efetoras, liberadas pelos patógenos, por receptores intracelulares denominados proteínas R [*disease resistance (R) protein*], este reconhecimento induz a ETI (BOLLER; FELIX, 2009; CHISHOLM et al., 2006; JONES; DANGL, 2006).

O modelo para a evolução do sistema imune em plantas, denominado modelo zigue-zague, foi proposto por Jones; Dangl (2006). Entretanto, apesar de amplamente aceito, esse foi elaborado tendo por base as interações entre plantas e patógenos não-virais. Posteriormente, vários estudos demonstraram fortes evidências da atuação do sistema imune inato das plantas em resposta às infecções virais. Por exemplo, Zvereva; Pooggin (2012) propuseram o primeiro modelo baseado nas interações planta-vírus, adaptado pelo modelo anteriormente proposto por Jones; Dangl (2006). O modelo zigue-zague, considerado o mais atual para imunidade inata de plantas, abrange as interações durante a infecção por vírus, conforme proposto por PALUKAITIS; YOON (2020), suportado pelos trabalhos de ZVEREVA; POOGGIN (2012) e JONES; DANGL (2006) (Figura 4). Ainda, esses

autores estabeleceram o termo VAMP (Padrões Moleculares Associados a Vírus), que são os PAMPs derivados de infecções virais.

Figura 4 - Modelo Zigue-zague para a evolução da imunidade inata das plantas contra agentes patogênicos virais. Legenda: VAMP - Padrões Moleculares Associados a Vírus; PTI - Imunidade Desencadeada por PAMPs; ETS - Suscetibilidade Desencadeada por Efetores; ETI - Imunidade Desencadeada por Efetores; HR – Resposta Hipersensitiva.; ER – Resistência Extrema.



Fonte: (PALUKAITIS; YOON, 2020)

Conforme demonstrado na Figura 4, a interação planta-vírus segue uma sucessão de fases. Na primeira fase, a percepção de VAMPs pelas plantas desencadeia a PTI. O RNA viral de cadeia dupla (dsRNA - *double-stranded* RNA viroses) tem sido descrito como o principal VAMP estudado (NIEHL et al., 2016). Na fase seguinte, os agentes patogênicos virais e bem-sucedidos fornecem efetores que suprimem a PTI, resultando na suscetibilidade desencadeada por efetores (ou ETS - *Effector-triggered Susceptibility*). Alguns efetores virais já identificados incluem a proteína P6 do CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), a proteína do capsídeo (CP) do PPV (*Plum pox virus*) e a proteína de movimento (MP) do CMV (*Cucumber mosaic virus*), conforme representado na Figura 4.

Na fase três, um efector é reconhecido por um produto específico do gene R vegetal, ativando a ETI e induzindo uma resposta hipersensitiva (HR), como o reconhecimento do efector viral PVX MP TGB1 pelo gene R da batata (gene Nb) (Figura 4). Alguns genes R, por sua vez, desencadeiam um tipo de resistência

denominada resistência extrema (*extreme resistance*, ER), sem a expressão de qualquer sintoma e resposta de hipersensibilidade (MOFFETT, 2009). O gene Rx de batata, por exemplo, reconhece o efector viral PVX-HB CP, induzindo a ETI e desencadeando uma ER (Figura 4). Na fase posterior, os patógenos podem desenvolver mecanismos (perda ou modificação do efector especificamente reconhecido) para evitar a ETI. Para combater tal estratégia de ‘camuflagem’, as plantas desenvolvem novas especificidades de genes R, com a finalidade de acionar novamente a ETI (Figura 4).

Além disso, alguns estudos têm fornecido evidências moleculares de que os mecanismos de defesa mediados pelo silenciamento do RNA e a imunidade inata estão intimamente associados (ZHU et al., 2013; ZVEREVA; POOGGIN, 2012), como proposto no modelo zigue-zague adaptado de ZVEREVA; POOGGIN (2012).

2.5.1.1 PTI em Vírus

Os PRRs vegetais, presentes na superfície das células, são capazes de reconhecer PAMPs e ativar a resposta de defesa contra os patógenos em potencial. Os PAMPs são moléculas altamente conservadas provenientes dos microrganismos e que desempenham função essencial na sobrevivência dos mesmos (BOLLER; FELIX, 2009). A ligação entre o domínio extracelular do PRR com o epítipo do PAMP ocasiona mudanças na estrutura do receptor e desencadeia a ativação de uma cascata de sinalização citoplasmática mediada pelo domínio intracelular do PRR (MONAGHAN; ZIPFEL, 2012), culminando em diversificadas respostas.

As respostas típicas de PTI, incluem o influxo de íons Ca^{2+} para o interior da célula, o efluxo de ânions, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), deposição de calose na parede celular, expressão de genes envolvidos na resistência, (BOLLER; FELIX, 2009), além da produção de fitormônios como etileno (ET) (CHINCHILLA et al., 2007; ZIPFEL et al., 2004) e ácido salicílico (SA) (BOLLER; FELIX, 2009). Além disso, há a ativação da cascata de sinalização MAPK, poucos minutos após o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs, a qual induz a reprogramação da expressão de genes PR (*Pathogenesis-Related Genes*) (NICAISE et al., 2009, NÜHSE et al., 2000, STOTZ et al., 2014)

Um dos argumentos para os vírus não terem sido incluídos nos primeiros modelos relacionados ao sistema imune inato em plantas, é que estes não são

vistos como codificadores de PAMPs e efetores típicos desencadeadores de PTI e ETI (BOLLER; FELIX, 2009; SCHWESSINGER; RONALD, 2012). Assim, as respostas de defesa antivirais em plantas eram pensadas, principalmente, na resistência mediada por RNA (VOINNET, 2001, 2005). Em contrapartida, os vírus adquiriram a capacidade de fornecer fatores de virulência à célula vegetal para suprimir os componentes da maquinaria de silenciamento de RNA (RAJA; WOLF; BISARO, 2017). Dados recentes apontam a presença de PTI e componentes relacionados como alternativa para limitar as infecções virais (KØRNER et al., 2013; NICAISE, 2014; NICAISE; CANDRESSE, 2017).

Diversos estudos demonstraram a presença de respostas típicas de PTI durante a interação planta-vírus, entre elas: fluxos de íons (OTULAK; GARBACZEWSKA, 2011), produção de ROS (DENG et al., 2016; DÍAZ-VIVANCOS et al., 2008), sinalização de ET (DZIURKA et al., 2016; KØRNER et al., 2013; SANSREGRET et al., 2013), deposição de calose (ZAVALIEV et al., 2013), SA (KUNDU et al., 2019; SADE et al., 2014; WHITHAM; YANG; GOODIN, 2006), ativação de MAPK (KØRNER et al., 2013). Além disso, muitos vírus expressam proteínas Avr que desencadeiam a ETI. Nesta perspectiva, algumas revisões atuais sugerem que a PTI é acionada como resposta primária, visto que, a ETI é uma resposta para contrapor a ETS, que por sua vez, é uma resposta viral na tentativa de evadir ou reprimir a resposta do PTI nas plantas (NICAISE, 2014).

Corroborando as informações acima citadas, foi demonstrado que plantas de *Arabidopsis* que sofreram mutações no *BRI1 associated kinase 1* (BAK1) demonstraram resistência aumentada quando exposta a três diferentes vírus de RNA, sendo eles: OrMV (*Ornithogalum mosaic virus*), TMV (*Tobacco mosaic virus*), e TCV (*Turnip crinkle virus*) (KØRNER et al., 2013). O BAK1 é um *Leucine-rich repeat receptor-like protein kinases* (LRR-RLKs) que é relatado como um regulador central da PTI em plantas, visto que interage com vários PRRs (CHINCHILLA et al., 2009; CHINCHILLA et al., 2007; HEESE et al., 2007). Adicionalmente, os resultados apresentados por (KØRNER et al., 2013) mostraram que a inoculação com vírus provocou respostas PTI, como o aumento na produção de etileno, ativação de MAPK e inibição de crescimento de plântulas. Apoiando os argumentos que vírus podem ser reconhecidos por PRRs, foi demonstrado que dois outros receptores LRR-RLKs (NIK1 e NIK2) estão intimamente associados à defesa da planta contra geminivírus (FONTES et al., 2004; SANTOS et al., 2010).

Essas descobertas trazem o conceito da ocorrência de PTI como resposta de imunidade antiviral em plantas. Nesta perspectiva, NICAISE, (2014) aborda como os mecanismos de defesa antivirais baseados em PTI podem ser empregados como novas fontes de resistências em plantas.

2.5.1.2. Mecanismos vegetais de defesa dominante contra vírus

Frequentemente a resistência dominante é mediada pelo efeito de genes R, que codificam para receptores intracelulares (produto dos genes R). A maioria dos produtos dos genes R das plantas pertence à família NBS-LRR (sítio de ligação ao nucleotídeo - repetição nucleotídica rica em leucina, do inglês *nucleotide binding site leucine-rich repeat*) (QIAN et al., 2017; SHAO et al., 2016), sendo classificadas em dois principais tipos com base em sua estrutura N-terminal: TIR-NBS-LRR [possui um domínio de receptor de interleucina 1 denominado TIR (Toll-interleucina-1)] e CC-NBS-LRR [possui um domínio de bobina espiralada – CC [*coiled-coil*]] (RONDE; BUTTERBACH; KORMELINK, 2014). Para revisão abrangente a respeito dos genes NBS-LRR ver BEZERRA-NETO et al. (2020).

Os vírus de RNA expressam genes Avr (fatores de avirulência) cujos produtos são reconhecidos especificamente pelos genes R como uma defesa em resposta à ETS. O produto dos genes R, de forma direta ou indireta, reconhecem os efetores de patógenos (Avr), estabelecendo assim a imunidade desencadeada por efector (ETI) (CHISHOLM; COAKER et al., 2006; JONES; DANGL, 2006). Em comparação com a PTI, a ETI é mais forte e geralmente exibe uma resposta hipersensitiva (HR) associada a morte celular programada (PCD) (JONES; DANGL, 2006). Após o efetivo reconhecimento dos efetores (Avr) pelo respectivo gene R, uma série de eventos de sinalização e respostas secundárias (sistêmicas) são iniciados, entre os quais pode-se citar: produção de espécies reativas de oxigênio (ROS); ativação de cascatas MAPK; produção de fitormônios, em especial o ácido salicílico (SA); indução de proteínas PR (BEZERRA-NETO et al., 2020; CALIL; FONTES, 2017; MANDADI; SCHOLTHOF, 2013; NICAISE, 2014).

A interação entre os receptores dos hospedeiros (genes R) e os efetores de patógeno (fatores Avr) foi definida, inicialmente, pelo modelo gene-a-gene proposto por (FLOR, 1971). Neste modelo, determinou-se que, para cada gene R que condiciona uma resposta de resistência no hospedeiro, existe um gene Avr

complementar no patógeno, o qual codifica uma molécula elicitora. A percepção dessas moléculas por parte do gene R é específica e resulta na ativação de sinais que levam à produção de vários mecanismos de defesa. Caso o patógeno não possua o gene Avr correspondente a determinado gene R, caracteriza-se uma interação compatível, resultando na susceptibilidade do hospedeiro (planta) em relação ao patógeno (FLOR, 1971). No tocante aos vírus, algumas evidências sustentam essa hipótese, incluindo o gene N da planta do tabaco. A interação direta entre a proteína N (codificada por um gene R) e o domínio p50 da helicase (fator Avr) do *Tobacco mosaic virus* (TMV), foi descrita conferindo resistência ao referido vírus (UEDA et al., 2006).

Além do exposto, alguns genes R também foram relatados reconhecendo indiretamente os efetores. Assim, outros modelos têm sido propostos para a interação entre proteínas Avr e proteínas R, a exemplo, a hipótese 'guarda' e o modelo *decoy*. A hipótese guarda postula que os efetores do patógeno são reconhecidos indiretamente pelo produto do gene R (*guard protein*), através do monitoramento de proteínas guardadas (*guard protein*) (JONES; DANGL, 2006). No modelo *decoy*, por sua vez, durante as interações planta-patógeno, as plantas sintetizam proteínas que são bastante similares às proteínas alvo dos efetores, denominadas proteínas iscas. Essas proteínas desempenham papel crucial, ligando-se aos efetores produzidos pelos patógenos e mediando a interação destes com o produto dos genes R (VAN DER HOORN; KAMOUN, 2008).

Um exemplo típico da hipótese 'guarda' durante as interações planta vs vírus pode ser observado pela ação da proteína HRT de *Arabidopsis* em resposta ao *Turnip crinkle virus* (TCV). A proteína HRT (produto do gene R) desencadeia a resposta hipersensitiva (HR) no ecótipo Dijon 17 (Di-17) de *Arabidopsis* em resposta à inoculação com TCV (COOLEY et al., 2000). Isso ocorre por meio do reconhecimento da proteína capsidial de TCV [TCV CP (fator Avr)]. A TCV CP, por sua vez, além de ser o determinante Avr para a resposta mediada por HRT, também interage com um fator de transcrição (TF) da família NAC, o TCV *interacting protein* (TIP). TIP liga-se a uma região de 25 aa na região N-terminal do domínio R de TCV CP (REN; QU; MORIS, 2000). A interação TIP-TCV CP é necessária para a resposta de defesa mediada por HRT, uma vez que, a coexpressão de TCV CP e TIP impede a localização nuclear de TIP. Em resposta, HRT detecta a disponibilidade celular alterada de TIP e aciona uma cascata de resposta de defesa que conduz à morte

celular visando conter a invasão por TCV. Deste modo, foi proposto que HRT “guarda” o TF TIP, sugerindo que o TIP poderia estar envolvido na resistência de *Arabidopsis* ao TCV de forma consistente com a hipótese guarda (REN; QU; MORIS, 2005).

Vários genes R do tipo NBS-LRR já foram demonstrados conferindo resistência contra vírus, alguns deles estão sumarizados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 – Exemplos selecionados (compilados da literatura) de vírus reconhecidos por produtos do gene NBS-LRR em plantas.

Gene R	Tipo	Patógeno	Referência
N	TIR-NBS-LRR	TMV (<i>Tobacco mosaic virus</i>)	PADGETT et al., 1997; WHITHAM et al., 1994)
Rx1	CC-NBS-LRR	PVX (<i>Potato virus X</i>)	BENDAHDANE; KANYUKA; BAULCOMBE, 1999
Rx2	CC-NBS-LRR	PVX (<i>Potato virus X</i>)	BENDAHDANE et al., 2000
HRT	CC-NBS-LRR	TCV (<i>Turnip crinkle virus</i>)	COOLEY et al., 2000; REN; QU; MORRIS, 2000
RCY1	CC-NBS-LRR	<i>Cucumber mosaic virus strain Y</i>	TAKAHASHI et al., 2001; 2002
CYR1	CC-NBS-LRR	MYMV (<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>)	MAITI; PAUL; PAL, 2012
Sw-5	SD-CC-NBS-LRR	TSWV (<i>Tomato spotted wilt virus</i>)	HALLWASS et al., 2014; PEIRÓ et al., 2014
Rsv1	CC-NBS-LRR	SMV (<i>Soybean mosaic virus</i>) SMV (<i>Soybean mosaic virus</i>) WMV (<i>Watermelon mosaic virus</i>)	WEN et al., 2013
GmKR3	TIR-NBS-LRR	BPMV (<i>Bean pod mottle virus</i>) BCMV (<i>Bean common mosaic virus</i>)	XUN et al., 2019
Tm-2(2)	CC-NBS-LRR	ToMV (<i>Tomato mosaic virus</i>)	LANFERMEIJER et al., 2003
NRG1	CC-NBS-LRR	TMV (<i>Tobacco mosaic virus</i>)	PEART et al., 2005

Fonte: A autora (ano).

Vale ressaltar que alguns genes R não pertencentes à classe NBS-LRR também foram descritos atuando contra infecções virais em plantas, por exemplo, os genes RTM1, RTM2 e RTM3, que conferem resistência em *A. thaliana* a uma gama

de vírus da família Potyviridae (COSSON et al., 2012); e o Tm-1 de *S. hirsutum*, que confere resistência ao ToMV (ISHIBASHI et al., 2007). Nestes dois casos, os genes R não desencadeiam as respostas de hipersensibilidade e nem a produção de ácido salicílico (SA), típicas da ETI, levando a suposições de novas estratégias de defesa que não aquelas comumente conhecidas para os genes R do tipo NBS-LRR.

2.5.2 Mecanismos vegetais de defesa recessiva contra vírus

A resistência recessiva é uma das mais frequentes nas respostas das plantas contra patógenos virais (TRUNIGER; ARANDA, 2009), visto que aproximadamente 100 genes relacionados à resistência de plantas a vírus possuem herança recessiva (KANG; YEAM; JAHN, 2005). Esse tipo de resistência caracteriza-se pela mutação ou perda de componentes do hospedeiro necessários para um passo do ciclo de vida do vírus (DIAZ-PENDON et al., 2004). O estudo desses genes de resistência recessiva identificou que eles estão associados ao mecanismo de tradução (ROBAGLIA; CARANTA, 2006), mais especificamente aos fatores de iniciação da tradução em eucariontes (eIFs). Em particular, destacam-se as famílias de proteínas de fatores de iniciação 4E (eIF4E) e 4G (eIF4G) e suas isoformas eIF(iso)4E e eIF(iso)4G (JULIO et al., 2015; TRUNIGER; ARANDA, 2009; WANG; KRISHNASWAMY, 2012).

O eIF4E desempenha importante papel no início da tradução do mRNA (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010). Sua principal função é se ligar ao cap-5' (5'-7mGpppN) dos mRNAs maduros, levando ao recrutamento de eIF4G e outros eIFs, formando o complexo eIF4F essencial no processo de formação do complexo de pré-iniciação 43S no mRNA (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008). Estudos com vírus do gênero *Potyvirus* mostraram que algumas proteínas virais interagem com eIF4E (ou com a sua isoforma eIF(iso)4E), como, por exemplo, a VPg (ou seu precursor o NIa) (GRZELA et al., 2006) e a HC-Pro (ALA-POIKELA et al., 2011). Essas interações são de extrema importância para a virulência desses vírus. Assim, mutações de perda de função (recessivas) em eIF4E (e suas isoformas) resultam em resistência de diversas plantas a estes agentes virais (KANG et al., 2005; ROBAGLIA; CARANTA, 2006; STEIN, et al., 2005). Em amendoim, o silenciamento dos genes *PeaeIF4E* e *PeaeIF(iso)4E* diminuiu significativamente o acúmulo do *Peanut stripe vírus* (PStV) (XU, XIE, et al., 2017); em pimentas, mutações

simultâneas e o silenciamento de eIF4E e eIF(iso)4E conferiram resistência ao *Chilli veinal mottle vírus* (ChiVMV) e redução do acúmulo do vírus, respectivamente (HWANG et al., 2009).

2.5.3 Mecanismos vegetais de defesa contra vírus mediados por RNAi

Um dos principais mecanismos de defesa vegetal contra vírus é o RNA de interferência (RNAi). Esse mecanismo depende de pequenos RNAs não-codificantes (*small* RNAs - sRNAs) e resulta no silenciamento específico de genes virais. Os sRNAs possuem entre 21 a 30 nucleotídeos de comprimento e, de acordo com o precursor e via de biogênese, podem ser classificados com *small interfering* RNAs (siRNAs), microRNAs (miRNAs) (BARTEL, 2009). Em plantas, as vias de silenciamento são controladas por diferentes mecanismos, sendo eles: o silenciamento gênico pós-transcricional [ou *post-transcriptional gene silencing* (PTGS)]; e o silenciamento gênico transcricional [ou *transcriptional gene silencing* (TGS)]. PTGS pode ser mediado tanto por miRNA quanto por siRNA. Enquanto que, TGS é mediada por siRNA (BOLOGNA; VOINET, 2014).

Diversos trabalhos demonstraram a importância do silenciamento por RNAi na defesa vegetal contra vírus. Por exemplo, foi observado que as proteínas AGO1 e AGO4 apresentam importante papel na regulação transcricional da resposta de plantas transgênicas de *A. thaliana* inoculadas com *Cucumber mosaic vírus* - CMV (HAMERA et al., 2012). Estudos também demonstraram que o silenciamento mediado por RNAi é um mecanismo de defesa vegetal muito importante em resposta a infecções por CPSMV e vírus do gênero *Potyvirus*. A exemplo, linhagens de *A. thaliana* que antes eram resistentes ao *Turnip mosaic vírus* (TuMV), tornaram-se susceptíveis ao vírus na ausência das proteínas DCL4 e DCL2. Além disso, foi observado que a grande maioria dos siRNAs são dependentes de DCL4 e RDR1, embora defesas antivirais totais também exigiram DCL2 e RDR6 (GARCIA-RUIZ et al., 2010). Cruz; Aragão (2014), por meio de linhagens transgênicas de feijão-caupi, testaram a ação do silenciamento por RNAi como mecanismo de defesa frente a inoculação com CAMBV e CPSMV. Foi utilizado um constructo de RNAi para silenciar o gene do cofator da proteinase de CPSMV e o gene da proteína de revestimento de CABMV. Como resultado, as plantas transgênicas apresentaram

resistência aos dois vírus simultaneamente inoculados, quando comparadas às plantas não transformadas.

2.6. ÔMICAS EM FEIJÃO-CAUPI: *COWPEA GENOMICS CONSORTIUM* (CpGC)

O Brasil tem dado sua parcela de contribuição para o desenvolvimento científico do feijão-caupi, disponibilizando importantes ferramentas para aplicação em seus programas de melhoramento e decifrando as bases moleculares de sua robustez perante alguns estresses. A UFPE (Universidade Federal de Pernambuco) está no centro de uma rede de pesquisa (*Cowpea Genomics Consortium* (CpGC), antigo ‘Projeto Brasileiro do Transcriptoma do Feijão-Caupi’ (rede NordEST); <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/vigna/>) que organizou um leque de laboratórios para executar ensaios de:

- (a) Genômica Estrutural: desenvolvimento de mapa genético ancorador de QTLs associados à tolerância a seca e à resistência à CPSMV e CABMV;
- (b) Transcriptômica: análises de bibliotecas SuperSAGE, RNA-Seq e de ESTs (*Expressed Sequence Tags*) associadas a estresses bióticos (inoculação com CABMV ou CPSMV) e abióticos [alta salinidade (NaCl, 100 mM) e desidratação radicular], visando identificar genes-candidatos úteis para o melhoramento da cultura.

Além das referidas bibliotecas, o CpGC gerou 49.820 ESTs de folhas e raízes obtidas a partir da exposição da cultura a diferentes estresses bióticos e abióticos. Essas foram agrupadas em conjunto com 264.945 ESTs depositados no banco de dados Cowpea HarvEST V.1.33 (<http://harvest.ucr.edu/>) e GenBank (NCBI), estando disponíveis para ancorar e anotar transcritos em análise.

A partir desse esforço, desde o início desta década dados abordando a fisiologia molecular de feijão-caupi sob estresses vêm sendo publicados. Kido et al. (2011) mineraram dados em bibliotecas SuperSAGE para a produção de um catálogo de quinases expressas em feijão-caupi sob diferentes condições de estresses biótico (inoculação com CABMV) e abióticos (injúria mecânica foliar e alta salinidade); Wanderley-Nogueira et al. (2010) por sua vez, realizaram avaliação *in silico* de genes PR-2 no banco de dados de ESTs do CpGC, obtido a partir dos mesmos estresses analisados por Kido et al. (2011). Além disso, Amorim et al. (2018) disponibilizaram os primeiros genes de referência estatisticamente elencados

para normalização de ensaios de expressão gênica em feijão-caupi sob seca e alta salinidade. Somado a esses dados já publicados, diversos outros abordando temas como ‘desidratação radicular e regulação de aquaporinas’, ‘desidratação radicular e orquestração transcricional da biossíntese de inositóis’, ‘desidratação radicular e orquestração de genes associados a enzimas participantes da fosforilação oxidativa’, ‘análise da expressão de TLPs (*thaumatins-like proteins*) sob infecções virais’, dentre outros, estão sendo manuscritos.

Logo, observa-se que o CpGC possui significativa disponibilidade de dados moleculares associados a análises globais dos transcriptomas de feijão-caupi submetidos a diferentes condições. Assim, o conteúdo informacional de tal Consórcio permite estudar, especificamente, diversos temas ainda pouco analisados pela ótica da transcriptômica, mesmo em espécies cultivadas de importância econômica.

3 CONCLUSÕES

A expressão de diversos genes, componentes de importantes vias metabólicas do feijão-caupi, é modulada mediante condições adversas (bióticas ou abióticas), em diferentes tempos / genótipos / estresses analisados.

Há uma conservação na resposta direcionada à percepção e defesa precoce/inicial do feijão-caupi, quando submetido à exposição a diferentes vírus (injúria mais inoculação com CABMV ou CPSMV).

A conservação das respostas de defesa precoces está relacionada tanto a respostas imunológicas quanto à injúria, induzindo genes componentes do sistema imune inato da planta, limpeza de ROS e vias de transdução de sinal, sendo a via dependente de JA a principal atuante nessa resposta conservada.

O feijão-caupi, quando submetido ao estresse de desidratação radicular, antes de acionar respostas fisiológicas, apresenta uma intensa reprogramação transcricional. Genes componentes das vias de sinalização celular são induzidos no início do desencadeamento desse processo. Em condições mais severas, essa leguminosa reprograma o seu transcriptoma para acionar diferentes classes de fatores de transcrição, proteínas estruturais, enzimas e transcritos responsivos a hormônios, evidenciando a heterogeneidade dos atores e a complexidade da resposta vegetal a esse estresse. Além disso, genes relacionados à resposta a estresses bióticos são induzidos, sugerindo uma estratégia de defesa multifacetada desse vegetal, visando possíveis combates contra agentes patogênicos oportunistas.

Grande parte desses genes induzidos em resposta ao estresse de desidratação radicular e na resposta de defesa precoce aos vírus CABMV e CPSMV é regulada pela família de fatores de transcrição bHLH.

O feijão-caupi possui 175 genes da família de TFs bHLH em seu genoma (*VubHLH*) agrupados em 26 subfamílias e distribuídos de forma heterogênea ao longo dos seus 11 cromossomos. A expansão dos *VubHLHs* no genoma de feijão-caupi é resultado, principalmente, de mecanismos de duplicação gênica, WGD/segmental, dispersa e em tandem. Esses genes podem estar envolvidos em diversas respostas de defesa a estresses biótico e abióticos estando, majoritariamente, envolvidos na resposta ao estresse de desidratação radicular quando comparado à resposta de defesa precoce aos vírus CABMV e CPSM.

REFERÊNCIAS

- AHN, C.; PARK, U.; PARK, P. B. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*, **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 4, p. 669–674, dezembro. 2011. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.10.134.
- ALA-POIKELA, M.; GOYTIA, E.; HAIKONEN, T. et al. Helper Component Proteinase of the Genus *Potyvirus* Is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E and Contains a 4E Binding Motif, **Journal of Virology**, v. 85, n. 13, p. 6784–6794, julho.2011. DOI: 10.1128/jvi.00485-11.
- AMORIM, L. L. B.; FERREIRA-NETO, J. R. C.; BEZERRA-NETO, J. P. et al. Cowpea and abiotic stresses: Identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR, **Plant Methods**, v. 14, n. 1, outubro. 2018. DOI: 10.1186/s13007-018-0354-z.
- ATHAYDE-SOBRINHO, C.; VIANA, F.; SANTOS, A. Doenças do feijão caupi. In: CARDOSO, M. (Org.), **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**, Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2000. p. 157–183. Disponível em: [http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=1111902&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22ATHAYDE SOBRINHO, C.%22&qFacets=\(autoria:%22ATHAYDE SOBRINHO, C.%22\) AND \(\(ano-meta:%222000%22\)\)&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1](http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=pc&id=1111902&biblioteca=vazio&busca=autoria:%22ATHAYDE SOBRINHO, C.%22&qFacets=(autoria:%22ATHAYDE SOBRINHO, C.%22) AND ((ano-meta:%222000%22))&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1). Acesso em: 14 mar. 2020.
- BARROS, Gislanne Brito. **Identificação e caracterização de plantas de feijão-caupi obtidas por meio de retrocruzamento resistentes aos vírus Cowpea severe mosaic virus (CPSMV) e Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV)**. 2010. 54 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) - Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, RJ, agosto. 2010.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions, **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-233, janeiro.2009.DOI: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- BARTELS, D.; SOUER, E. Molecular responses of higher plants to dehydration. In: HIRT, H., SHINOZAKI, K. (Org.), **Plant Responses to Abiotic Stress**, [S.l.], Springer, Berlin, Heidelberg, 2003. p. 9–38. DOI: 10.1007/978-3-540-39402-0_2.
- BASTOS, E. A. **A Cultura do feijão-caupi no Brasil**. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1065493/a-cultura-do-feijao-caupi-no-brasil>. Acesso em: 14 mar. 2020.
- BASTOS, E. A.; NASCIMENTO, S. P.; DA SILVA, E. M. et al. Identificação de genótipos de feijão-caupi tolerantes à seca, **Revista Ciencia Agronomica**, v. 42, n. 1, p. 100–107, março. 2011. DOI: 10.1590/S1806-66902011000100013.
- BAUDOIN, J.P.; MARÉCHAL, R. Genetic diversity in Vigna. In: SINGH, S.R.; RACHIE, K.O. **Cowpea research, production, and utilization**. Chichester: John Wiley and Sons, 1985. p.3-11.

BENDAHDANE, A.; KANYUKA, K.; BAULCOMBE, D. C. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses, **Plant Cell**, v. 11, n. 5, p. 781–791, maio .1999. DOI: 10.1105/tpc.11.5.781.

BENDAHDANE, A.; QUERCI, M.; KANYUKA, K. et al. Agrobacterium transient expression system as a tool for the isolation of disease resistance genes: Application to the Rx2 locus in potato, **Plant Journal**, v. 21, n. 1, p. 73–81, janeiro.2000. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2000.00654.x.

BENKO-ISEPPON, A. M.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; BERLARMINO, L. C. et al. Prospecção de Genes de Resistência à Seca e à Salinidade em Plantas Nativas e Cultivadas (Exploration of Genes for Resistance to Drought and Salinity in Native and Cultivated Plants), **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 4, n. 6, p. 1112–1134, março. 2011. DOI: 10.26848/rbgf.v4.6.p1112-1134. Disponível em: <https://periodicos.ufpe.br/revistas/rbgfe/article/view/232764>. Acesso em: 8 fev. 2020.

BEZERRA-NETO, J. P.; ARAÚJO, F. C.; FERREIRA-NETO, J. R. C. et al. NBS-LRR genes—Plant health sentinels: Structure, roles, evolution and biotechnological applications. **Applied Plant Biotechnology for Improving Resistance to Biotic Stress**, p. 63–120, 2020. DOI: 10.1016/b978-0-12-816030-5.00004-5.

BOLLER, T.; FELIX, G. A Renaissance of Elicitors: Perception of Microbe-Associated Molecular Patterns and Danger Signals by Pattern-Recognition Receptors, **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, n. 1, p. 379–406, junho. 2009. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346.

BOLLER, T.; HE, S. Y. Innate immunity in plants: An arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. **Science**, v. 324, n. 5928, p. 742–744, maio. 2009 DOI: 10.1126/science.1171647.

BOLOGNA, N. G.; VOINET, O. The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis , **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, n. 1, p. 473–503, abril. 2014. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-035728.

BOOKER, H.M.; UMAHARAN, P.; DAVID, C.R. Effect of *Cowpea severe mosaic virus* on crop growth characteristics and yield of cowpea. **Plant Dis**, v.89, p.515–520, maio.2005. DOI: 10.1094/PD-89-0515.

BOUKAR, O.; FATOKUN, C. A.; HUYNH, B. L. et al. Genomic tools in cowpea breeding programs: Status and perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 757, junho. 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.00757.

BRIOSO, P.S.T.; DUQUE, F.F.; SAYÃO, F.A.D., et al. "Vírus do mosaico severo do caupi - infecção natural em mungo verde, *Vigna radiata*", **Fitopatologia Brasileira**, v.19, p.420–429, 1994.

CALIL, I. P.; FONTES, E. P. B. Review: part of a special issue on plant immunity, **Annals of Botany**, v. 119, p. 711–723, 2017. DOI: 10.1093/aob/mcw200. Disponível em: www.aob.oxfordjournals.org.

- CAMARÇO, R. F. E. A.; QUEIROZ, A. K.; DE ANDRADE, E. C. et al. Biological, serological and molecular comparison between isolates of *Cowpea severe mosaic virus*, **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 239–244, 2009. DOI: 10.1590/S1982-56762009000400006.
- CARDONA, A. C.; JARMAO, A.; ARAMÉNDIZ, T. H. Drought adaptation mechanisms in the cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). A review, **Revista Colombiana de Ciencias Horticolas**, v. 7, n. 2, p. 277–288, 2013.
- CHINCHILLA, D.; SHAN, L.; HE, P. et al. One for all: the receptor-associated kinase BAK1, **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 10, p. 535–541, outubro. 2009. DOI: 0.1016/j.tplants.2009.08.002.
- CHINCHILLA, D.; ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S. et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence, **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 497–500, julho. 2007. DOI: 10.1038/nature05999.
- CHISHOLM, S. T.; COAKER, G.; DAY, B. et al. Host-microbe interactions: Shaping the evolution of the plant immune response. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 203–214, fevereiro. 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.008.
- COOLEY, M. B.; PATHIRANA, S.; WU, H. J. et al. Members of the *Arabidopsis* HRT/RPP8 family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens, **Plant Cell**, v. 12, n. 5, p. 663–676, 2000. DOI: 10.1105/tpc.12.5.663.
- COSSON, P.; SCHURDI-LEVRAUD, V.; LE, Q. H. et al. The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: Natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes, **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, junho. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0039169.
- COSTA, C. L.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W., et al. "*Ceratomyxa arcuata* (Oliv.) um crismelídeo vetor do mosaico da Vigna no Brasil", **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 81–82, 1978.
- CRUZ, A. R. R.; ARAGÃO, F. J. L. RNAi-based enhanced resistance to *Cowpea severe mosaic virus* and *Cowpea aphid-borne mosaic virus* in transgenic cowpea, **Plant Pathology**, v. 63, n. 4, p. 831–837, agosto. 2014. DOI: 10.1111/ppa.12178. DOI: 10.1111/ppa.12178.
- DENG, X. G.; ZHU, T.; ZOU, L. J. et al. Orchestration of hydrogen peroxide and nitric oxide in brassinosteroid-mediated systemic virus resistance in *Nicotiana benthamiana*, **Plant Journal**, v. 85, n. 4, p. 478–493, fevereiro. 2016. DOI: 10.1111/tpj.13120.
- DIAZ-PENDON, J. A.; TRUNIGER, V.; NIETO, C. et al. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. **Molecular Plant Pathology**, v. 5, n. 3, p. 223–233, maio. 2004. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2004.00223.x.
- DÍAZ-VIVANCOS, P.; CLEMENTE-MORENO, M. J.; RUBIO, M. et al. Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to

plum pox virus, **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 8, p. 2147–2160, maio. 2008. DOI: 10.1093/jxb/ern082.

DODDS, P. N.; RATHJEN, J. P. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-**pathogen interactions**, v. 11, n.8, p. 539-548, agosto. 2010. DOI: 10.1038/nrg2812.

DZIURKA, M.; JANECKO, A.; JUHÁSZ, C. et al. Local and systemic hormonal responses in pepper leaves during compatible and incompatible pepper-tobamovirus interactions, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 355–364, dezembro. 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.10.013.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. **Socioeconomia para Arroz e Feijão**. 2020. Disponível em: <http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>. Acesso em: 14 mar. 2020.

FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION). **FAOSTAT**. 2020. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Acesso em: 14 mar. 2020.

FLOR, H. H. Current Status of the Gene-For-Gene Concept, **Annual Review of Phytopathology**, v. 9, n. 1, p. 275–296, setembro. 1971. DOI: 10.1146/annurev.py.09.090171.001423. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>. Acesso em: 9 fev. 2020.

FONTES, E. P. B.; SANTOS, A. A.; LUZ, D. F. et al. The geminivirus nuclear shuttle protein is a virulence factor that suppresses transmembrane receptor kinase activity, **Genes and Development**, v. 18, n. 20, p. 2545–2556, outubro. 2004. DOI: 10.1101/gad.1245904.

FRAHM-LELIVELD, J. A. Cytological data on some wild tropical *Vigna* species and cultivars from cowpea and asparagus bean, **Euphytica**, v. 14, n. 3, p. 251–270, novembro. 1965. DOI: 10.1007/BF00149509.

FREIRE-FILHO, F. R. Origem, evolução e domesticação do caupi. In: ARAUJO, J. P. P., WATT, E. E. (Org.), **O caupi no Brasil**. Goiânia: EMBRAPA-CNPAF; Ibadan: IITA, 1988. Cap. 1, p. 26-46., 1988.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D. et al. Melhoramento genético. In: FREIRE-FILHO, F. R., LIMA, J. A. DE A., RIBEIRO, V. Q. (Org.), **Feijão-caupi: Avanços tecnológicos**. Embrapa Informação Tecnológica, Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 28–92.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D. et al. Melhoramento genético de caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na região Nordeste. In: QUEIROZ, M., GOEDERT, C., RAMOS, S. (Org.), **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o nordeste brasileiro**, 1. ed. Petrolina, 1999. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/157696/melhoramento-genetico-de-caupi-vigna-unguiculata-l-walp-na-regiao-nordeste>. Acesso em: 14 mar. 2020.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. D. R. et al. **Feijão-Caupi no Brasil Produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2011.

FREY, A.; EFFROY, D.; LEFEBVRE, V. et al. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members, **The Plant Journal**, v. 70, n. 3, p. 501–512, maio.2012. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2011.04887.x.

FU, J.; WU, H.; MA, S. et al. OSJAZ1 attenuates drought resistance by regulating JA and ABA signaling in rice, **Frontiers in Plant Science**, v. 8, dezembro. 2017. DOI: 10.3389/fpls.2017.02108.

GAHLAUT, V.; JAISWAL, V.; KUMAR, A. et al. Transcription factors involved in drought tolerance and their possible role in developing drought tolerant cultivars with emphasis on wheat (*Triticum aestivum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 129, n. 11, p. 2019–2042, novembro. 2016. DOI: 10.1007/s00122-016-2794-z.

GANGULI, S.; DEY, A.; BANIK, R. et al. Analyses of MYMIV-induced transcriptome in *Vigna mungo* as revealed by next generation sequencing, **Genomics Data**, v. 7, p. 226–228, março. 2016. DOI: 10.1016/j.gdata.2016.01.005.

GAO, J.P.; CHAO, D.Y.; LIN, H.X. Understanding Abiotic Stress Tolerance Mechanisms: Recent Studies on Stress Response in Rice, **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 6, p. 742–750, junho. 2007. DOI: 10.1111/j.1744-7909.2007.00495.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1744-7909.2007.00495.x>. Acesso em: 8 fev. 2020.

GARCIA-RUIZ, H.; TAKEDA, A.; CHAPMAN, E. J. et al. Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip mosaic virus infection, **Plant Cell**, v. 22, n. 2, p. 481–496, fevereiro.2010. DOI: 10.1105/tpc.109.073056.

GOODFELLOW, I. G.; ROBERTS, L. O. Eukaryotic initiation factor 4E. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.40, n. 12, p. 2675-2680, janeiro. 2008. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.10.023.

GRAY, S. M. Plant virus proteins involved in natural vector transmission. **Trends in Microbiology**, v. 4, n.7, p. 259-264, julho.1996. DOI: 10.1016/0966-842X(96)10040-8.

GREENHAM, K.; GUADAGNO, C. R.; GEHAN, M. A., et al. Temporal network analysis identifies early physiological and transcriptomic indicators of mild drought in brassica rapa., **eLife**, v. 6, 18 ago. 2017. DOI: 10.7554/eLife.29655.

GRZELA, R.; STROKOVSKA, L.; ANDRIEU, J. P. et al. Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E, **Biochimie**, v. 88, n. 7, p. 887–896, julho.2006. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.02.012.

HALLWASS, M.; DE OLIVEIRA, A. S.; DE CAMPOS DIANESE, E. et al. The *Tomato*

spotted wilt virus cell-to-cell movement protein (NSM) triggers a hypersensitive response in Sw-5-containing resistant tomato lines and in *Nicotiana benthamiana* transformed with the functional Sw-5b resistance gene copy, **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 9, p. 871–880, dezembro. 2014. DOI: 10.1111/mpp.12144.

HAMERA, S.; SONG, X.; SU, L. et al. *Cucumber mosaic virus* suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities, **Plant Journal**, v. 69, n. 1, p. 104–115, jan. 2012. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04774.x.

HARTLEY, S. E. Plant Interactions with Biotic Factors. **Encyclopedia of Life Sciences**, abril. 2001. DOI: 10.1038/npg.els.0003203. Disponível em:

<http://doi.wiley.com/10.1038/npg.els.0003203>. Acesso em: 8 fev. 2020.

HASAN, M. M. U.; MA, F.; ISLAM, F. et al. Comparative Transcriptomic Analysis of Biological Process and Key Pathway in Three Cotton (*Gossypium* spp.) Species Under Drought Stress, **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, abril. 2019. DOI: 10.3390/ijms20092076.

HEESE, A.; HANN, D. R.; GIMENEZ-IBANEZ, S. et al. The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 29, p. 12217–12222, julho. 2007. DOI: 10.1073/pnas.0705306104.

HWANG, J.; LI, J.; LIU, W. Y. et al. Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to *Chilli veinal mottle virus* in pepper, **Molecules and Cells**, v. 27, n. 3, p. 329–336, março. 2009. DOI: 10.1007/s10059-009-0042-y.

ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). [S.d.]. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/>. Acesso em: 14 mar. 2020.

ISHIBASHI, K.; MASUDA, K.; NAITO, S. et al. An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene, **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 34, p. 13833–13838, agosto. 2007. DOI: 10.1073/pnas.0703203104.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 2, p. 113–127, fevereiro. 2010.

JASROTIA, R. S.; IQUEBAL, M. A.; YADAV, P. K. et al. Development of transcriptome based web genomic resources of yellow mosaic disease in *Vigna mungo*, **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 23, n. 4, p. 767–777, outubro. 2017. DOI: 10.1007/s12298-017-0470-7.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, novembro. 2006. DOI: 10.1038/nature05286.

JOSHI, R.; WANI, S. H.; SINGH, B. et al. Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions, **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1029, julho. 2016. DOI: 10.3389/fpls.2016.01029.

JULIO, E.; COTUCHEAU, J.; DECORPS, C. et al. A Eukaryotic Translation Initiation

Factor 4E (eIF4E) is Responsible for the “va” Tobacco Recessive Resistance to Potyviruses, **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 33, n. 3, p. 609–623, junho. 2015. DOI: 10.1007/s11105-014-0775-4.

KANG, B.C.; YEAM, I.; JAHN, M.M. Genetics of plant virus resistance. **Annu Rev Phytopathol.** v. 43, p. 581-621. setembro. 2005. DOI: 10.1146/annurev.phyto.43.011205.141140.

KANG, B.C.; YEAM, I.; FRANTZ, J. D. et al. The pvr1 locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg, **The Plant Journal**, v. 42, n. 3, p. 392–405, março. 2005. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02381.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2005.02381.x>. Acesso em: 9 fev. 2020.

KIDO, E. A.; BARBOSA, P. K.A.; FERREIRA NETO, J. R. C. et al. Identification of Plant Protein Kinases in Response to Abiotic and Biotic Stresses Using SuperSAGE, **Current Protein & Peptide Science**, v. 12, n. 7, p. 643–656, novembro. 2011. DOI: 10.2174/1389203711109070643. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1389-2037&volume=12&issue=7&spage=643>. Acesso em: 14 mar. 2020.

KING, Andrew MQ et al. Virus taxonomy. **Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**, p. 486-487, 2012.

KOONIN, Eugene V. et al. The Big Bang of picorna-like virus evolution antedates the radiation of eukaryotic supergroups. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 925-939, 2008.

KØRNER, J. C.; KLAUSER, D.; NIEHL, A. et al. The immunity regulator BAK1 contributes to resistance against diverse RNA viruses, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 11, p. 1271–1280, novembro. 2013. DOI: 10.1094/MPMI-06-13-0179-R.

KUBIŚ, J.; FLORYSZAK, W.J.; ARASIMOWICZ, J.M. Polyamines induce adaptive responses in water deficit stressed cucumber roots, **Journal of Plant Research**, v. 127, n. 1, p. 151–158, janeiro. 2014. DOI: 10.1007/s10265-013-0585-z.

KUNDU, A.; SINGH, P. K.; DEY, A. et al. Complex molecular mechanisms underlying MYMIV-resistance in *Vigna mungo* revealed by comparative transcriptome profiling, **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dezembro. 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-45383-w.

LANFERMEIJER, Frank C. et al. Cloning and characterization of the durable tomato mosaic virus resistance gene Tm-2 2 from *Lycopersicon esculentum*. **Plant molecular biology**, v. 52, n. 5, p. 1039-1051, 2003.

LI, Z.; YU, J.; ENG, Y. et al. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*), **Physiologia Plantarum**, v. 159, n. 1, p. 42–58, janeiro. 2017. DOI: 10.1111/ppl.12483.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnoses e Estratégias de Controle

de Doenças Ocasionaladas por Vírus. Melhoramento Genético. In: FREIRE-FILHO, F., RIBEIRO, V., LIMA, J. et al. (Org.), **Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos**, Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2005. p. 405–459. Disponível em: <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=67465&biblioteca=CPA MN&busca=autoria:%22SITTOLIN, I.%22&qFacets=autoria:%22SITTOLIN, I.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>. Acesso em: 14 mar. 2020.

MAGWANGA, R. O.; LU, P.; KIRUNGU, J. N. et al. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton, **BMC Genetics**, v. 19, n. 1, janeiro. 2018. DOI: 10.1186/s12863-017-0596-1..

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

MAITI, S.; PAUL, S.; PAL, A. Isolation, characterization, and structure analysis of a non-TIR-NBS-LRR encoding candidate gene from MYMIV-resistant *Vigna mungo*, **Molecular Biotechnology**, v. 52, n. 3, p. 217–233, novembro. 2012. DOI: 10.1007/s12033-011-9488-1..

MANDADI, K. K.; SCHOLTHOF, K. B. G. Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease?, **Plant Cell**, v. 25, n. 5, p. 1489-1505, maio. 2013. DOI: 10.1105/tpc.113.111658.

MARÉCHAL, R.; MASCHERPA, J.; STAINIER, F. Étude taxonomique d'un groupe complexe d'espèces des genres *Phaseolus* et *Vigna* (Papilionaceae) sur la base de données morphologiques et polliniques, traitées par l'analyse informatique, **Boissiera**: v.28. 1978.

MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance, **Advances in virus research**, v.75, n.1, p. 1-33, janeiro. 2009. DOI: 10.1016/S0065-3527(09)07501-0.

MONAGHAN, J.; ZIPFEL, C. Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, n.4, p. 349-357, agosto. 2012. DOI: 10.1016/j.pbi.2012.05.006.

MUHAMMAD, T.; ZHANG, J.; MA, Y. et al. Overexpression of a mitogen-activated protein kinase SIMAPK3 positively regulates tomato tolerance to cadmium and drought stress, **Molecules**, v. 24, n. 3, fevereiro. 2019. DOI: 10.3390/molecules24030556..

MUNGUTI, F.; MAINA, S.; NYABOGA, E. N. et al. Transcriptome Sequencing Reveals a Complete Genome Sequence of Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus from *Passion Fruit* in Kenya, **Microbiology resource announcements**, v. 8, n. 2, janeiro. 2019. DOI: 10.1128/MRA.01607-18. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30643906>. Acesso em: 16 jan. 2020.

MUÑOZ-AMATRIÁN, M. et al. Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. **Plant J**, v. 89, p. 1042–1054, 2017.

MUTWAKIL, M. Z., HAJRAH, N. H., ATEF, A., *et al.* "Transcriptomic and metabolic responses of *Calotropis procera* to salt and drought stress", **BMC Plant Biology**, v. 17, n. 1, p. 231, 4 dez. 2017. DOI: 10.1186/s12870-017-1155-7. Disponível em: <https://bmcpplantbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12870-017-1155-7>. Acesso em: 4 jun. 2020.

NASCIMENTO, S. P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C. E. *et al.* Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi, **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 15, n. 8, p. 853–860, junho. 2011. DOI: 10.1590/S1415-43662011000800013.

NÉYA, B.J.; ZIDA, P.E.; SÉRÉMÉ, D.; LUND, O.S.; TRAORÉ, O. Evaluation of yield losses caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in 21 cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) Varieties in burkina faso. **Pakistan J Biol Sci**, v.18, n.7, p.304–313, junho.2015.DOI: 10.3923/pjbs.2015.304.313.

NG, N. Q. Cowpea: *Vigna unguiculata* (Leguminosae-Papilionoideae). In: SMARTT, J., SIMMONDS, N. W. (Org.), **Evolution of crop plants**, Harlow, Longman Scientific & Technical, 1995. p. 326–332.

NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. Cowpea taxonomy, origin and germplasm. In: SINGH, S. R.; RACHIE K. O. **Cowpea Research, Production and Utilization**. Chichester: John Wiley and Sons, 1985. p.11-21.

NICAISE, V. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. **Frontiers in Plant Science**, v.21, n.5, novembro. 2014. DOI: 10.3389/fpls.2014.00660.

NICAISE, V.; ROUX, M.; ZIPFEL, C. Recent advances in PAMP-Triggered immunity against bacteria: Pattern recognition receptors watch over and raise the alarm, **Plant Physiology**, v. 150, n. 4, p. 1638–1647, agosto. 2009. DOI: 10.1104/pp.109.139709.

NICAISE, V.; CANDRESSE, T. *Plum pox virus* capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity, **Molecular Plant Pathology**, v. 18, n. 6, p. 878–886, agosto. 2017. DOI: 10.1111/mpp.12447.

NIEHL, Annette *et al.* Double-stranded RNA s induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. **New Phytologist**, v. 211, n. 3, p. 1008-1019, 2016.

NOREEN, S.; UR, H.; ATHAR, R. *et al.* Interactive effects of watering regimes and exogenously applied osmoprotectants on earliness indices and leaf area index in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) crop. **Pak. J. Bot**, v.45,n.6, p. 1873- 1881, setembro. 2013.

NÜHSE, T. S.; PECK, S. C.; HIRT, H. *et al.* "Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the Arabidopsis thaliana MAPK 6, **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 11, p. 7521–7526, março. 2000. DOI: 10.1074/jbc.275.11.7521..

OLIVEIRA, C. R. R.; FREIRE-FILHO, F. R.; SOCORRO R.N.M. *et al.* Reação de

genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*, **Bragantia**, v.71, n.1, p. 59 - 66, outubro. 2012.

OTULAK, K.; GARBACZEWSKA, G. Cellular localisation of calcium ions during potato hypersensitive response to *Potato virus Y*, **Micron**, v. 42, n. 5, p. 381–391, julho. 2011. DOI: 10.1016/j.micron.2010.11.001.

PADGETT, H. S.; WATANABE, Y.; BEACHY, R. N. Identification of the TMV replicase sequence that activates the N gene-mediated hypersensitive response, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 10, n. 6, p. 709–715, fevereiro. 1997. DOI: 10.1094/MPMI.1997.10.6.709.

PADMAVATHI, T. A. V.; RAO, D. M. Differential accumulation of osmolytes in 4 cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought stress, **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 151–159, junho. 2013. DOI: 10.1007/s12892-012-0102-2.

PADULOSI, S., NG, N. Q., Origin, taxonomy and morphology of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: SINGH, B. B. (Org.), **Advances in Cowpea Research**, Tsukuba, 1997. p. 1–12.

PANDEY, G. K. Emergence of a novel calcium signaling pathway in plants: CBL-CIPK signaling network. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 14, n. 2, p.51-68, abril. 2008. DOI: 10.1007/s12298-008-0005-3.

PAQUET, R. S. Cultivated cowpea (*Vigna unguiculata*): genetic organization and domestication". In: PICKERSGILL, B., LOCK, J. M. (Org.), **Advances in legume systematics: Legumes of economic importance**, 1996. p. 101–108.

PARK, B. J.; LIU, Z.; KANNO, A. et al. Increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA, **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 2, p. 165–171, fevereiro. 2005. DOI: 10.1007/s10725-004-7924-y.

PEART, Jack R. et al. NRG1, a CC-NB-LRR protein, together with N, a TIR-NB-LRR protein, mediates resistance against tobacco mosaic virus. **Current biology**, v. 15, n. 10, p. 968-973, 2005.

PEIRÓ, A.; CAÑIZARES, M. C.; RUBIO, L. et al. The movement protein (NSm) of *Tomato spotted wilt virus* is the avirulence determinant in the tomato Sw-5 gene-based resistance, **Molecular Plant Pathology**, v. 15, n. 8, p. 802–813, outubro. 2014. DOI: 10.1111/mpp.12142.

QIAN, L. H.; ZHOU, G. C.; SUN, X. Q. et al. Distinct patterns of gene gain and loss: Diverse evolutionary modes of NBS-encoding genes in three solanaceae crop species, **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 7, n. 5, p. 1577–1585, maio. 2017. DOI: 10.1534/g3.117.040485.

RAJA, P.; WOLF, J. N.; BISARO, D. M. RNA silencing directed against

geminiviruses: Post-transcriptional and epigenetic components. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1799, n.4, p. 337-351, março. 2017. DOI: 10.1016/j.bbagr.2010.01.004.

RANGANAYAKULU, S. G.; SUDHAKAR, C.; REDDY, S. P. Effect of water stress on proline metabolism and leaf relative water content in two high yielding genotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting drought tolerance, **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.3,n.1, p.97-103, fevereiro.2015. Disponível em: <http://www.jebas.org><http://www.jebas.org>. Acesso em: 8 fev. 2020.

REN, T.; QU, F.; MORRIS, T. J. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus, **Plant Cell**, v. 12, n. 10, p. 1917–1925, agosto. 2000. DOI: 10.1105/tpc.12.10.1917.

REN, T.; QU, F.; MORRIS, T. J. The nuclear localization of the *Arabidopsis* transcription factor TIP is blocked by its interaction with the coat protein of Turnip crinkle virus, **Virology**, v. 331, n. 2, p. 316–324, janeiro. 2005. DOI: 10.1016/j.virol.2004.10.039.

RIVAS, R.; FALCÃO, H. M.; RIBEIRO, R. V. et al. Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration, **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 101–107, março. 2016. DOI: 10.1016/j.sajb.2015.08.008.

ROBAGLIA, C.; CARANTA, C. Translation initiation factors: A weak link in plant RNA virus infection. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 1, p. 40-45, janeiro. 2006. DOI: 10.1016/j.tplants.2005.11.004.

ROCHA, M.M.; DAMASCENO S, K. J.; MENEZES JUNIOR, J. A. N.. **Cultivo de Feijão-caupi: Importância econômica** Teresina, [s.n.], 2017. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=imprimirspportl... Acesso em: 14 mar. 2020.

ROCHA, M. M.; LIMA, J. A. A.; FREIRE-FILHO, F. R. et al. **Resistencia de caupi de tegumento branco a algumas estirpes de comovirus, potyvirus e cucumovirus**. Teresina, [s.n.], 1996. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/53796/resistencia-de-caupi-de-tegumento-branco-a-algumas-estirpes-de-comovirus-potyvirus-e-cucumovirus>. Acesso em: 14 mar. 2020.

RONDE, D.; BUTTERBACH, P.; KORMELINK, R. Dominant resistance against plant viruses. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 307, p. 1-17, junho. 2014. DOI: 10.3389/fpls.2014.00307.

SADE, D.; SADE, N.; SHRIKI, O. et al. Water balance, hormone homeostasis, and sugar signaling are all involved in tomato resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*, **Plant Physiology**, v. 165, n. 4, p. 1684–1697, julho. 2014. DOI: 10.1104/pp.114.243402.

SANSREGRET, R.; DUFOUR, V.; LANGLOIS, M. et al. Extreme Resistance as a

Host Counter-counter Defense against Viral Suppression of RNA Silencing, **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, p. e1003435, junho. 2013. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003435. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1003435>. Acesso em: 8 fev. 2020.

SANTOS, A. A.; LOPES, K. V. G.; APFATA, J. A. C. et al. NSP-interacting kinase, NIK: A transducer of plant defence signalling. **Journal of Experimental Botany**, v.61,14,p. 3839 - 3845, setembro. 2010. DOI: 10.1093/jxb/erq219.

SAVCHENKO, T.; KOLLA, V. A.; WANG, C. Q. et al. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought, **Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 1151–1160, março 2014. DOI: 10.1104/pp.113.234310.

SCHULZE, E.; BECK, E.; MULLER-HOHENSTEIN, K. **Plant Ecology**. New York, Springer, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/aob/article/97/1/153/155688>. Acesso em: 14 mar. 2020.

SCHWESSINGER, B.; RONALD, P. C. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures, **Annual Review of Plant Biology**, v. 63, n. 1, p. 451–482, junho. 2012. DOI: 10.1146/annurev-arplant-042811-105518. Disponível em: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-arplant-042811-105518>. Acesso em: 28 jan. 2020.

SEO, J.S.; JOO, J.; KIM, M.J. et al. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice, **The Plant Journal**, v. 65, n. 6, p. 907–921, março 2011. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2010.04477.x. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2010.04477.x>. Acesso em: 4 fev. 2020.

SHAO, Z. Q.; XUE, J. Y.; WU, P. et al. Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns, **Plant Physiology**, v. 170, n. 4, p. 2095–2109, abril. 2016. DOI: 10.1104/pp.15.01487.

SILVA, R. G. G.; VASCONCELOS, I. M.; MARTINS, T. F. et al. Drought increases cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) susceptibility to cowpea severe mosaic virus (CPSMV) at early stage of infection, **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 109, p. 91–102, dezembro. 2016. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.09.010.

SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V. et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna Savi* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting, **Genome**, v. 50, n. 6, p. 538–547, junho. 2007. DOI: 10.1139/G07-029.

SINGH, M.; KUMAR, J.; SINGH, S. et al. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, p. 407-424, setembro. 2015. DOI: 10.1007/s11157-015-9372-8.

SINGH, P. K.; PATEL, A.; GANGULI, S. et al. Molecular modeling and simulation of

three important components of Plant Pathogen Interaction cascade in *Vigna mungo*, **Bioinformation**, v. 13, n. 10, p. 323–326, outubro. 2017. DOI: 10.6026/97320630013323.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Feijão-Caupi conquista mercado internacional**. 2017. Disponível em: <https://www.sna.agr.br/46345-2/>. Acesso em: 14 mar. 2020.

SOOSAAR, J. L. M.; BURCH-SMITH, T. M.; DINESH-KUMAR, S. P. Mechanisms of plant resistance to viruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n.10, p. 789-798, outubro. 2005. DOI: 10.1038/nrmicro1239.

STEIN, N.; PEROVIC, D.; KUMLEHN, J. et al. The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.), **Plant Journal**, v. 42, n. 6, p. 912–922, junho. 2005. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02424.x.

STOTZ, H. U.; MITROUSIA, G. K.; DE WIT, P. J. G. M. et al. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens. **Trends in Plant Science**, v. 19, n.8, p. 491-500, agosto. 2014. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.04.009.

SUN, Y., FAN, M., HE, Y. "Transcriptome analysis of watermelon leaves reveals candidate genes responsive to *Cucumber green mottle mosaic virus* infection", **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, 1 fev. 2019. DOI: 10.3390/ijms20030610.

TAKAHASHI, H.; MILLER, J.; NOZAKI, Y. et al. RCY1, an *Arabidopsis thaliana* RPP8/HRT family resistance gene, conferring resistance to *Cucumber mosaic virus* requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism, **Plant Journal**, v. 32, n. 5, p. 655–667, dezembro. 2002. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2002.01453.x.

TAKAHASHI, H.; SUZUKI, M.; NATSUAKI, K. et al. Mapping the Virus and Host Genes Involved in the Resistance Response in *Cucumber Mosaic Virus*-Infected *Arabidopsis thaliana*, **Plant and Cell Physiology**, v. 42, n. 3, p. 340–347, março. 2001. DOI: 10.1093/pcp/pce039. Disponível em: <http://academic.oup.com/pcp/article/42/3/340/1859254/Mapping-the-Virus-and-Host-Genes-Involved-in-the>. Acesso em: 9 fev. 2020.

TRINKS, D.; RAJESWARAN, R.; SHIVAPRASAD, P. V. et al. Suppression of RNA Silencing by a Geminivirus Nuclear Protein, AC2, Correlates with Transactivation of Host Genes, **Journal of Virology**, v. 79, n. 4, p. 2517–2527, fevereiro. 2005. DOI: 10.1128/jvi.79.4.2517-2527.2005.

TRUNIGER, V.; ARANDA, M. A. Recessive resistance to plant viruses. **Advances in virus research**, v. 75, p. 119-159, 2009. DOI: 10.1016/S0065-3527(09)07504-6.

UEDA, H.; YAMAGUCHI, Y.; SANO, H. Direct interaction between the tobacco mosaic virus helicase domain and the ATP-bound resistance protein, N factor during the hypersensitive response in tobacco plants, **Plant Molecular Biology**, v. 61, n. 1–

2, p. 31–45, maio 2006. DOI: 10.1007/s11103-005-5817-8.

VAILLANCOURT, R. E., WEEDEN, N. F. Chloroplast dna polymorphism suggests nigerian center of domestication for the cowpea, *Vigna unguiculata* (leguminosae), **American Journal of Botany**, v. 79, n. 10, p. 1194–1199, outubro. 1992. DOI: 10.1002/j.1537-2197.1992.tb13716.x.

VAN DER HOORN, R. A. L.; KAMOUN, S. From guard to decoy: A new model for perception of plant pathogen effectors, **Plant Cell**, v. 20, n. 8, p. 2009–2017, agosto. 2008. DOI: 10.1105/tpc.108.060194.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the “Flora of Tropical East Africa”: III, **Kew Bulletin**, v. 24, n. 3, p. 379, 1970. DOI: 10.2307/4102845.

VOINNET, O. Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections. **Nature Reviews Genetics**, v.6,n.3,p. 206-220, março.2005. DOI: 10.1038/nrg1555.

VOINNET, O. RNA silencing as a plant immune system against viruses. **Trends in Genetics**, v. 17, n. 8,p . 449-459, agosto. 2001. DOI: 10.1016/s0168-9525(01)02367-8.

WANDERLEY-NOGUEIRA, A. C.; SOARES-CAVALCANTI, N. D. M.; BELARMINO, L. C.et al. In silico screening for pathogenesis related-2 gene candidates in *Vigna unguiculata* transcriptome. 6160 LNBI. **Anais [...]** [S.l.], Springer, Berlin, Heidelberg, 15 out. 2010. p. 70–81. DOI: 10.1007/978-3-642-14571-1_6.

WALKER, Peter J. et al. Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Archives of virology*, v. 164, n. 9, p. 2417-2429, 2019.

WANG, A.; KRISHNASWAMY, S. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. **Molecular Plant Pathology**, v. 13,n7, p. 795-803, setembro. 2012. DOI: 10.1111/j.1364-3703.2012.00791.x.

WANG, P.; WANG, F.; YANG, J. De novo assembly and analysis of the *Pugionium cornutum* (L.) Gaertn. transcriptome and identification of genes involved in the drought response, **Gene**, v. 626, p. 290–297, agosto. 2017. DOI: 10.1016/j.gene.2017.05.053.

WEN, R. H.; KHATABI, B.; ASHFIELD, T.et al. The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent *Soybean mosaic virus* are recognized by different resistance genes at the complex rsv1 locus, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 2, p. 203–215, fevereiro. 2013. DOI: 10.1094/MPMI-06-12-0156-R.

WHITHAM, S. A.; YANG, C.; GOODIN, M. M. Global impact: Elucidating plant responses to viral infection. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 19, n.11, p. 1207-1215, novembro. 2006. DOI: 10.1094/MPMI-19-1207.

WHITHAM, S.; DINESH-KUMAR, S. P.; CHOI, D. et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor, **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1101–1115, 23 setembro. 1994. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90283-6.
WOLF, Yuri I. et al. Origins and evolution of the global RNA virome. **MBio**, v. 9, n. 6, 2018.

XU, M.; XIE, H.; WU, J. et al. Translation initiation factor eIF4E and eIFiso4E are both required for Peanut stripe virus infection in peanut (*Arachis hypogaea* L.), **Frontiers in Microbiology**, v. 8, março. 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00338.

XUN, H.; YANG, X.; HE, H. et al. Over-expression of GmKR3, a TIR–NBS–LRR type R gene, confers resistance to multiple viruses in soybean, **Plant Molecular Biology**, v. 99, n. 1–2, p. 95–111, janeiro. 2019. DOI: 10.1007/s11103-018-0804-z.

ZAVALIEV, R.; LEVY, A.; GERA, A. et al. Subcellular dynamics and role of *Arabidopsis* β -1,3-glucanases in cell-to-cell movement of tobamoviruses, **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 26, n. 9, p. 1016–1030, setembro. 2013. DOI: 10.1094/MPMI-03-13-0062-R.

ZEVEN, A. C.; DE WET, J. M. J. **Dictionary of cultivated plants and their regions of diversity. Excluding most ornamentals, forest trees and lower plants.** 2 ed. Wageningen, 1982.

ZHANG, X.; LIU, X.; ZHANG, D. et al. Genome-wide identification of gene expression in contrasting maize inbred lines under field drought conditions reveals the significance of transcription factors in drought tolerance, **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 1 julho. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0179477.

ZHOU, S.; HU, W.; DENG, X. et al. Overexpression of the Wheat Aquaporin Gene, TaAQP7, Enhances Drought Tolerance in Transgenic Tobacco, **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 20 dezembro. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052439.

ZHU, S.; JEONG, R. D.; LIM, G. H. et al. Double-Stranded RNA-Binding Protein 4 Is Required for Resistance Signaling against Viral and Bacterial Pathogens, **Cell Reports**, v. 4, n. 6, p. 1168–1184, setembro. 2013. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.018.

ZIPFEL, C.; ROBATZEK, S.; NAVARRO, L. et al. Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception, **Nature**, v. 428, n. 6984, p. 764–767, abril. 2004. DOI: 10.1038/nature02485.

ZVEREVA, A. S.; POOGGIN, M. M. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2578–2597, outubro. 2012. DOI: 10.3390/v4112578.

APÊNDICE A - ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA COMPARATIVA REVELA MECANISMOS MOLECULARES CONSERVADOS EM FEIJÃO-CAUPI NA RESPOSTA PRECOCE A DOIS VÍRUS DE RNA DISTINTOS

Artemisa Nazaré Costa Borges^a; José Ribamar Costa Ferreira-Neto^a; Ana Maria Benko-Iseppon^a

^a Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil.

Autor para correspondência:

Ana Maria Benko-Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Telefone: 55-81-2126-7816; Fax: 55-82-2126-8522; E-mail: ana.iseppon@ufpe.br

Resumo

Vigna unguiculata (L.) Walp. (feijão-caupi; Leguminosae) é uma das principais culturas de subsistência em diversos países em desenvolvimento, especialmente devido ao alto conteúdo proteico dos seus grãos. *Cowpea aphid-born mosaic virus* (CABMV) e *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) são os principais vírus que causam perdas de produtividade dessa leguminosa. Estudos envolvendo os mecanismos conservados de resposta precoce do feijão-caupi a esses vírus são, contudo, pouco conhecidos. Nesse estudo, foi realizada uma comparação entre diferentes transcriptomas (injúria mecânica |

inoculação CABMV vs injúria mecânica | inoculação CPSMV) após dois tempos precoces de aplicação dos estresses (1h e 16h), a fim de obter um melhor entendimento dessa conservação de resposta precoce subjacente ao processo de inoculação viral em feijão-caupi. Nós identificamos transcritos coexpressos (coinduzidos ou coreprimidos), denominados de ‘Assinaturas Transcricionais Conservadas’ (ATCs) nos transcriptomas de *V. unguiculata*. Os conjuntos de ATCs apresentaram perfis de expressão gênica distintos em relação aos tempos analisados, indicando um maior investimento na percepção e defesa precoce/inicial dessa cultura. As análises genômicas e transcriptômicas das ATCs indicaram que as respostas conservadas precoces são direcionadas às respostas imunológicas e à injúria, estando relacionadas, principalmente, a vias de transdução de sinal, como TFs, diversas classes de quinases (MAPKKKs e CDPKs), sensores de Ca^{2+} e fitormônios (especialmente o ácido jasmônico e o etileno), além de mecanismos que levam à redução dos danos causados por tais estresses (ATCs associadas à limpeza de ROS). Além disso, a indução de várias ATCs codificadoras de RLKs, genes R, biogênese de ROS e proteínas PRs apontam para a ativação do sistema imune inato vegetal. Os resultados desse estudo permitiram a identificação e a análise de transcritos coexpressos na resposta precoce a essas duas principais viroses que acometem o feijão-caupi, além de permitirem um maior conhecimento acerca do efeito simultâneo da injúria e de vírus nessa cultura. Nossos resultados fornecem, portanto, subsídios para futuras pesquisas voltadas ao melhoramento vegetal do feijão-caupi e espécies proximalmente relacionadas, visando o desenvolvimento de cultivares resistentes a múltiplas viroses.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, Injúria Mecânica, Defesa Vegetal, Fatores de Transcrição, Sinalização Celular.

1. Introdução

O feijão-caupi é uma leguminosa amplamente cultivada em solos pobres de áreas quentes e secas da África, Ásia, América do Sul e Estados Unidos da América (Boukar *et al.*, 2016). Essa espécie destaca-se por apresentar um alto conteúdo proteico em seus grãos (~30 % de proteínas), além de ser geradora de emprego e renda para pequenos produtores rurais, principalmente em países em desenvolvimento (Boukar *et al.*, 2016; 2019; Muñoz-Amatriaín *et al.*, 2017).

Apesar da sua tolerância perante certas condições ambientais adversas, essa cultura é ameaçada por diversos fatores bióticos e edafoclimáticos. Dentre os fitopatógenos, os vírus CABMV [*Cowpea aphid-born mosaic virus* – com relatos de redução de até 85% na produção (Booker *et al.*, 2005)] e CPSMV [*Cowpea severe mosaic virus* – com relatos de perdas de até 64% na produção (Néya *et al.*, 2015)], são os causadores dos maiores impactos negativos ao cultivo do feijão-caupi. Para sua penetração, ambos os vírus dependem de injúria mecânica, executada por insetos vetores (Costa *et al.*, 1978; Pirone, 1991; Gray, 1996; Bastos, 2016). Após seu estabelecimento, tais vírus produzem padrões típicos de um mosaico grave nas folhas infectadas (Bastos, 2016), caracterizado por áreas amareladas, alternadas por outras de verde normal. Adicionalmente, o CPSMV ocasiona encrespamento do limbo foliar, em virtude da formação de bolhosidades (Bastos, 2016).

Em infecções por bactérias e fungos, a primeira linha de defesa vegetal ocorre nos segundos e minutos iniciais, por meio do reconhecimento de PAMPs/MAMPs (*Microbial- or Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ou DAMPs (*Damage-Associated Molecular Patterns*) pelos PRRs (*Patterns Recognition Receptors*). Os eventos de defesa vegetal uma hora após infecção (hpi) são, principalmente: o acúmulo de cálcio (Ca^{2+}) no citoplasma, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), a

ativação das cascatas MAPK, produção de fitohormônios e reprogramação transcricional (revisado por Dallagnol e Araújo-Filho, 2018). Estudos que investigam a modulação da expressão gênica na resposta vegetal muito precoce a infecções virais são, contudo, incipientes. Baebler et al. (2009), ao analisar os perfis de expressão de cultivares de batata susceptíveis (cv. Igor) e tolerantes (cv. Santé) ao PVY (*Potato virus Y*) observaram um maior nível de expressão gênica 0,50 hora após inoculação (hpi) na cv. Santé enquanto, na cv. Igor, ocorreu um aumento na expressão após 12 hpi (revisado por Baebler et al., 2020). Em soja, por sua vez, foi observado que o gene *Rsv3* confere resistência extrema ao SMV (*Soybean mosaic virus*) e que essa resposta de defesa começa a ser montada já nas primeiras horas após a infecção (2 a 8 hpi), por meio de uma complexa rede de regulação mediada por fatores de transcrição e sinalização hormonal. Os autores ainda sugerem que as modulações transcricionais durante as primeiras horas pós-inoculação podem ser cruciais para determinar a indução de uma resposta de resistência ou susceptibilidade na soja (DeMers et al., 2020). Essa percepção e sinalização iniciais, relacionadas à uma defesa vegetal mais rápida e eficaz, são, portanto, importantes vias na resposta vegetal e necessitam ser mais detalhadamente estudadas.

Estudos preliminares demonstraram que, quando infectados por diferentes vírus, os vegetais tendem a modular a expressão de um conjunto similar de genes. Miozzi et al. (2014), por exemplo, identificaram conservação de respostas vegetais a três diferentes geminivírus, grupo de vírus de DNA de fita simples. Rodrigo et al., (2012), por sua vez, ao compararem o perfil de expressão de *Arabidopsis thaliana*, demonstraram várias respostas conservadas para diferentes vírus de RNA (incluindo quatro pertencentes ao gênero *Potyvirus*). O resultado desse estudo apontou, adicionalmente,

que certo grau de conservação se mantém mesmo quando comparada a resposta a vírus de RNA e de DNA (Rodrigo *et al.*, 2012).

O *Cowpea Genomics Consortium* (CpGC), rede brasileira para estudos em ômicas do feijão-caupi, disponibilizou dados moleculares associados a transcriptomas dessa cultura submetida à injúria mecânica seguida de inoculações virais de CABMV ou CPSMV (simulando o processo de exposição natural aos vírus). Esses ensaios foram projetados tanto para entender, individualmente, a resposta da mencionada cultura para cada dueto analisado, bem como para possibilitar a integração e comparação entre os mesmos. Tais ensaios apresentam desenhos experimentais semelhantes, com a utilização de acessos resistentes às viroses estudadas, além de tempos de tratamento, metodologia de cultivo e aplicação de estresse (injúria mecânica seguida de inoculação viral) idênticos.

Em vista do exposto, o presente trabalho pretende endereçar algumas questões, a saber: (I) Há uma resposta transcricional em comum (conservada) entre acessos resistentes de feijão-caupi para as duas principais viroses que acometem essa cultura (CABMV e CPSMV), em tempos muito precoces (1 e 16 h) após aplicação do estresse? (II) Existem diferenças na conservação das categorias moduladas nos tempos amostrados (1 e 16h)? (III) Quais as principais categorias de genes e vias metabólicas relacionadas aos eventos moleculares conservados iniciais que ocorrem nas respostas de defesa precoce do feijão-caupi aos vírus CABMV e CPSMV? (IV) Os genes coexpressos nas situações analisadas são amplamente presentes entre espécies de Viridiplantae?

O trabalho aqui apresentado é o primeiro estudo envolvendo mecanismos conservados na resposta mais precoce de defesa do feijão-caupi a vírus (injúria seguida de inoculação com CABMV ou CPSMV), os quais estão relacionados à percepção,

sinalização e ajuste das respostas iniciais de defesa dessa leguminosa frente ao estresse imposto. Nossos resultados fornecem, portanto, um panorama geral dos primeiros mecanismos acionados nas respostas iniciais conservadas na espécie em questão.

2. Material e Métodos

2.1 Material vegetal, desenho experimental e aplicação dos estresses

Os experimentos de injúria mecânica seguida de inoculação com CABMV (*Cowpea aphid-born mosaic virus*) e CPSMV (*Cowpea severe mosaic virus*) foram realizados, de maneira independente, em condições controladas em casa de vegetação no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA - Recife, Pernambuco, Brasil). Para o ensaio com CABMV, utilizou-se o genótipo resistente IT85F-2687 (Rocha *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2012); para CPSMV, usou-se o genótipo resistente BR-14 Mulato (Cardoso *et al.*, 1990).

Ambos os acessos foram semeados por 21 dias, sob fotoperíodo natural e temperatura variando entre 28 e 32°C. Para a inoculação viral, as folhas componentes dos trifólios mais jovens foram previamente injuriadas mecanicamente com carborundum (carbeto de silício), visando permitir a penetração do vírus no interior do vegetal. Posteriormente, executou-se a aplicação de cada inóculo viral nos respectivos genótipos (**Figura 1A**). O tecido foliar foi coletado após dois tempos de tratamento de injúria mecânica | inoculação viral: 1 hora (T1h) e 16 horas (T16h). Cada tratamento possui seu respectivo controle negativo absoluto: 1 hora (C1h) e 16 horas (C16h) (**Figura 1A**). Ao final de cada tempo, as folhas das mudas dos tratamentos e respectivos controles foram imediatamente coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenadas a -80 ° C, até a extração do RNA total.

O desenho experimental foi um fatorial de 2 x 2 (cultivar vs extensão do período de inoculação) com três réplicas biológicas (RBs) para cada controle e tratamento

implementados. Cada uma dessas RBs foi composta por cinco plantas. Cada tratamento foi realizado em área isolada para evitar o impacto de compostos voláteis usados pelas plantas para comunicação.

A fim de simular o processo infeccioso em ambiente natural, o componente de estresse analisado nos dois ensaios foi uma combinação de injúria mecânica e inoculação viral. Os tempos precoces de 1 e 16h após aplicação do estresse foram analisados, permitindo investigar os mecanismos relacionados à percepção e sinalização iniciais de defesa do feijão-caupi frente aos vírus CABMV e CPSMV.

2.2 Extração do RNA e síntese das bibliotecas de RNA-Seq

Foram sintetizadas e sequenciadas 12 bibliotecas (**Figura 1B**) para cada acesso estudado, abrangendo os tempos de tratamento | controle acima mencionados. O RNA total foi isolado por meio do kit ‘SV *Total RNA Isolation System*’ (Promega, US), seguindo-se protocolo do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA total extraído foram avaliadas por meio gel de Agarose (1,5%) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA). Apenas amostras com *RNA integrity number* (RIN) ≥ 8.0 foram sequenciadas. Um kit ‘RNA^{am} TruSeq® Stranded LT-Set A’ (RS-122-2101) (Illumina, San Diego, CA, EUA) foi empregado na purificação do RNA mensageiro e construção de bibliotecas de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. *Reads paired-end*, com extensão de 100 pb, foram geradas via sistema Illumina HiSeq 2500, empregando-se os seguintes kits: ‘HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2’ (PE-402-4002); ‘SBS Kit v2’ (200 Cycle; FC-402-4021); e ‘TruSeq® Stranded mRNA LT - Set A’ (RS-122-2101). Todas as etapas executadas neste item foram realizadas no Centro de Genômica Funcional, da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil).

As descrições de todas as bibliotecas, acessos e tempos de tratamento do RNA-Seq utilizados neste trabalho estão disponíveis na **Tabela S1**.

2.3 Montagem e análise de expressão diferencial das bibliotecas de RNA-Seq

As bibliotecas RNA-Seq sequenciadas para o ensaio de injúria mecânica | inoculação de CPSMV (12 bibliotecas) e injúria mecânica | inoculação de CABMV (12 bibliotecas) foram montadas juntamente com outras 12 bibliotecas RNA-Seq de feijão-caupi disponíveis no banco de dados do CpGC [oriundas de ensaios de transcriptômica de feijão-caupi (acesso tolerante Pingo de Ouro) submetido à condição de desidratação radicular]. Essa estratégia de montagem conjunta permitiu a obtenção de transcritos maiores e mais robustos.

A montagem *de novo* foi realizada após a remoção dos adaptadores. As leituras sem os requisitos mínimos de qualidade [valores phred de 30 (Q30)] foram descartadas. A qualidade das sequências foi avaliada por meio da ferramenta FastQC 0.11.8. A montagem e análise de dados foi realizada por meio do pipeline RNA-Seq *de novo* versão 3.1.3 desenvolvido por Bourgey et al. (2019). As leituras brutas foram filtradas para qualidade usando Trimomatic 0.36 (Bolger et al., 2014) com as seguintes opções: HEADCROP: 13, TRAILING: 30, MINLEN: 32. O software Trinity 2.0.4 foi usado para a montagem do transcriptoma de novo (Haas et al., 2013). O transdecodificador 2.0.1 foi usado para identificar as regiões de codificação candidatas no transcriptoma gerado e para procurar quadros de leitura abertos (ORFs). O Trinotate 2.0.2 foi usado para realizar a anotação funcional do transcriptoma usando os arquivos de transcriptoma gerados pelo Trinity, enquanto o Transdecoder gerou o arquivo de sequência de peptídeo das ORFs candidatas finais.

2.4 Análise de expressão diferencial e identificação de ATCs

A partir dos transcritos montados, foi executada a análise de expressão diferencial (T1h vs. C1h e T16h vs. C16h), via edgeR (Robinson *et al.* 2010), determinada com base no $\log_2FC$ e no *p-value*. Considerou-se os transcritos induzidos

(*up-regulated*) e reprimidos (*down-regulated*) quando os valores de $\log_2FC$ foram, respectivamente, superiores a 1 ou inferiores a -1, e associados a um $p\text{-value} < 0,05$ (**Figura 1C**). Tal processo foi realizado de forma independente para cada ensaio aqui estudado.

A partir dos transcritos diferencialmente expressos em ambos os ensaios, foram mineradas/identificadas as Assinaturas Transcricionais Conservadas (ATCs), as quais obedeceram a seguinte configuração (**Figura 1C**):

- ATC1hUR (transcrito induzido tanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CABMV quanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CPSMV, após 1 hora de aplicação dos estresses);
- ATC1hDR (transcrito reprimido tanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CABMV quanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CPSMV, após 1 hora de aplicação dos estresses);
- ATC16hUR (transcrito induzido tanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CABMV quanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CPSMV, após 16 horas de aplicação dos estresses);
- ATC16hDR (transcrito reprimido tanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CABMV quanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CPSMV, após 16 horas de aplicação dos estresses).

2.5 Ortologia de loci codificadores de ATCs entre espécies de Viridiplantae

Para a detecção de ortologia entre genes codificadores de ATCs de feijão-caupi e outros táxons previamente analisados (**Figura 1D**), utilizou-se informações já contidas na base de dados Phytozome. No PhytoMine foi criada uma query com as identidades dos genes a serem analisados em relação aos 93 genomas montados e anotados de 82

espécies Viridiplantae. Os dados foram analisados pelo software InParanoid (Sonnhammer e Östlund, 2015), o qual está implementado no PhytoMine.

2.6 Análise de enriquecimento de termos GO

Para a análise de enriquecimento via ontologia gênica, usou-se a ferramenta NeVOmics (*Network-based Visualization for Omics*; Zúñiga-León *et al.*, 2018) (**Figura 1D**), que identifica termos GO estatisticamente super-representados em um determinado conjunto de genes / proteínas. O NeVOmics adota o algoritmo estatístico ‘GeneMerge’ para identificar as categorias super-representadas no conjunto de dados analisados. A super-representação foi determinada via distribuição hipergeométrica ($p < 0,05$) e correção de FDR ($FDR < 0,05$) (Zúñiga-León *et al.*, 2018).

O NeVOmics usa um arquivo de entrada em texto simples contendo uma lista de genes (ID do gene KEGG) ou proteínas (UniProt Entry ID) obtidos pela abordagem ômica. Devido ao número reduzido de proteínas anotadas para *V. unguiculata* na base de dados UniProt, a anotação foi realizada em *Phaseolus vulgaris*, espécie filogeneticamente muito próxima do feijão-caupi (Delgado-Salinas *et al.*, 2011). Os transcriptomas completos dos contrastes ‘T1h vs. C1h’ (para ATC1hUR e ATC1hDR) e ‘T16h vs. C16h’ (para ATC16hUR e ATC16hDR) foram usados como background nas análises de enriquecimento do NeVOmics.

Para recuperar os Ids do UniProt de *P. vulgaris*, uma busca BLASTp foi realizada ($\text{cutoff} < e^{-10}$) entre os proteomas de *P. vulgaris* (na UniProt) e as sequências proteica obtidas a partir dos transcritos traduzidos de feijão-caupi do CpGC (ver tópico 2.3). Apenas o best-hit para cada alinhamento foi utilizado nessa análise.

2.7 Anotação funcional e mapeamento das ATCs em vias metabólicas e de sinalização

Para a anotação das ATCs (**Figura 1D**), foram realizadas buscas de similaridade usando alinhamentos baseados em sequência e domínio. Inicialmente, cada ATC foi comparada (BLASTn; e-value cut-off $< 1.0e^{-10}$) contra o transcriptoma putativo de feijão-caupi (Vunguiculata_469_v1.1t.) e de *P. vulgaris* (Pvulgaris_442_v2.1) alocados no banco de dados Phytozome. Em seguida, os transcritos foram anotados em seus domínios, determinados via banco de dados Pfam (e-value cut-off $< 1.0e^{-5}$) (El-Gebali *et al.*, 2019). O resultado dessas anotações permitiu identificar a função biológica putativa das ATCs.

Para identificar o envolvimento das ATCs em vias metabólicas e de sinalização, empregou-se o software MapMan 3.5.1R2 (Thimm *et al.* 2004). Para tal, as ATCs de feijão-caupi foram atribuídas ao MapMan bins, com base no arquivo de mapeamento de *P. vulgaris*: Phaseolus vulgaris v1.0 (Commonbean.txt).

Posteriormente, o alinhamento contra *P. vulgaris*, descrito acima, foi utilizado para relacionar cada ATC de feijão-caupi ao seu respectivo ID no arquivo de mapeamento MapMan (**Figura 1D**).

2.8 Mineração das ATCs constituintes das vias de biossíntese de ácido jasmônico e etileno

A compilação dos resultados apresentados no presente estudo sugeriu a influência de ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) nas respostas transcricionais conservadas sob análise. Desse modo, a partir de dados da literatura apresentados para etileno (Zarembinski e Theologis, 1994; Vandenbussche *et al.*, 2012) e ácido jasmônico (Wasternack e Kombrink, 2010 e Wasternack e Song, 2017), as vias de biossíntese desses dois fitormônios foram reconstruídas manualmente. Em seguida, as ATCs

codificadoras de cada uma das enzimas, identificadas pelo seu respectivo EC number, foram mapeadas nessas vias.

2.9 Análise de elementos cis-regulatórios enriquecidos (CCREs) em regiões promotoras

Sequências de regiões promotoras (1.0 kb) de genes que codificam as ATCs foram obtidas junto ao banco de dados Phytozome v.12.1.6. As regiões promotoras foram submetidas à análise de enriquecimento de elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs), via ferramenta AME (*Analysis of Motif Enrichment*; Mcleay e Bailey, 2010) (**Figura 1D**). Essa análise permite identificar CCREs conhecidos que estão relativamente enriquecidos, quando comparados a um conjunto de sequências controle. Esse foi composto de regiões promotoras (1.0 kb) de todos os genes do genoma de *V. unguiculata* (v1.1; Lonardi *et al.*, 2019), obtidos junto ao banco de dados Phytozome.

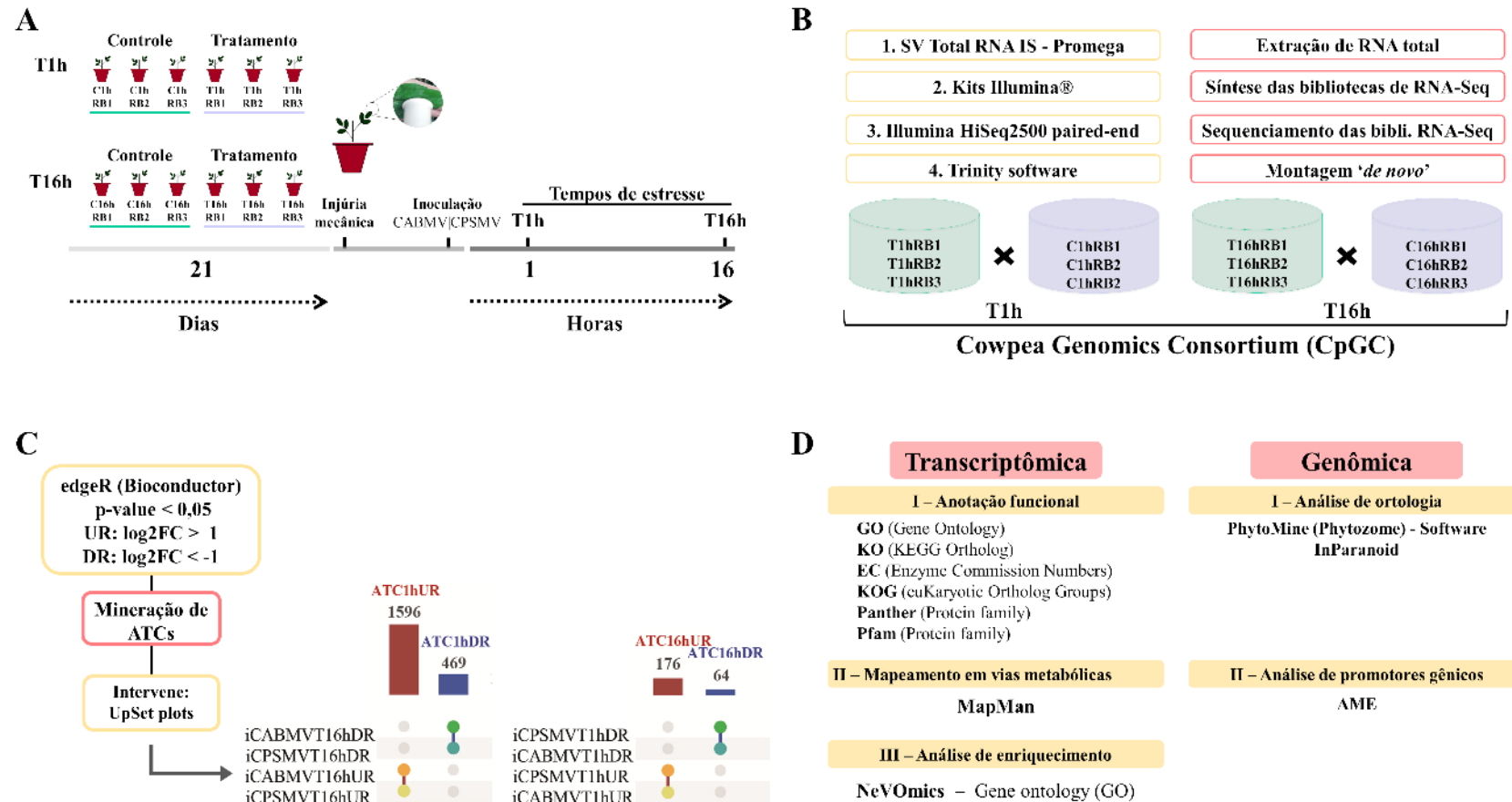


Figura 1. Esquema das etapas realizadas no presente trabalho: **A**. Esboço do desenho experimental e simulação do processo de exposição a vírus (injúria mecânica | inoculação com CPSMV ou CABMV) nos genótipos estudados; **B**. Informações gerais (kits, metodologia de sequenciamento, além de software e tipo de montagem) sobre as bibliotecas RNA-Seq do CpGC; **C**. Parâmetros para análise de expressão diferencial e mineração de ATCs; **D**. Análises exploratórias realizadas e ferramentas de bioinformática utilizadas. **Legenda:** iCPSMV: Injúria mecânica + CPSMV; iCABMV: Injúria mecânica + CABMV; T1h: 'T1h vs. C1h' (tratamento de injúria mecânica | inoculação viral 1h vs. controle absoluto 1h); T16h: 'T16h vs. C16h' (tratamento de injúria mecânica | inoculação viral 16h vs. controle absoluto 16h); RB: réplica biológica; iCABMT1h: (T1h vs. C1h, ensaio CABMV); iCPSMT1h: (T1h vs. C1h, ensaio CPSMV); iCABMT16h: (T16h vs. C16h, ensaio CABMV); iCPSMT16h: (T16h vs. C16h, ensaio CPSMV); ATCs: Assinaturas Transcricionais Conservadas; UR: up-regulated (ou induzido); DR: down-regulated (ou reprimido); AME: *Analysis of Motif Enrichment*.

3. Resultados

3.1 Transcriptômica das ATCs

3.1.1 *Quantitativo de ATCs expressas*

Em resposta à injúria mecânica | CPSMV, foram identificados 101.468 transcritos expressos. Desses, 8.149 (~ 8,03%) foram diferencialmente expressos (DE), sendo 5.060 induzidos (iCPSMVT1hUR) e 3.089 reprimidos (iCPSMVT1hDR) (**Figura 2A**). Para o contraste 'T16h vs. C16h', 5.992 (~ 5,9%) foram DE, sendo 3.250 induzidos (iCPSMVT16hUR) e 2.742 reprimidos (iCPSMVT16hDR) (**Figura 2B**). Em resposta à injúria mecânica | CABMV, foram identificados 100.770 transcritos expressos. Desses, 12.318 (~12,2%) foram DE na comparação 'T1h vs. C1h', sendo 8.157 induzidos (iCABMVT1hUR) e 4.161 reprimidos (iCABMVT1hDR) (**Figura 2A**). Para o contraste 'T16h vs. C16h', 4.758 (~ 4,7%) transcritos foram DE, sendo 2.906 induzidos (iCABMVT16hUR) e 1.852 reprimidos (iCABMVT16hDR) (**Figura 2B**).

Dentre os DEGs, analisou-se especificamente os ATCs, identificando-se 1596, 469, 176 e 64 transcritos ATC1hUR, ATC1hDR, ATC16hUR e ATC16hDR, respectivamente (**Figura 2A e 2B**). A lista completa de todas as ATCs (ATC1hUR, ATC1hDR, ATC16hUR e ACT16hDR), associadas às suas respectivas modulações e anotações funcionais estão detalhadas na **Tabela S2**.

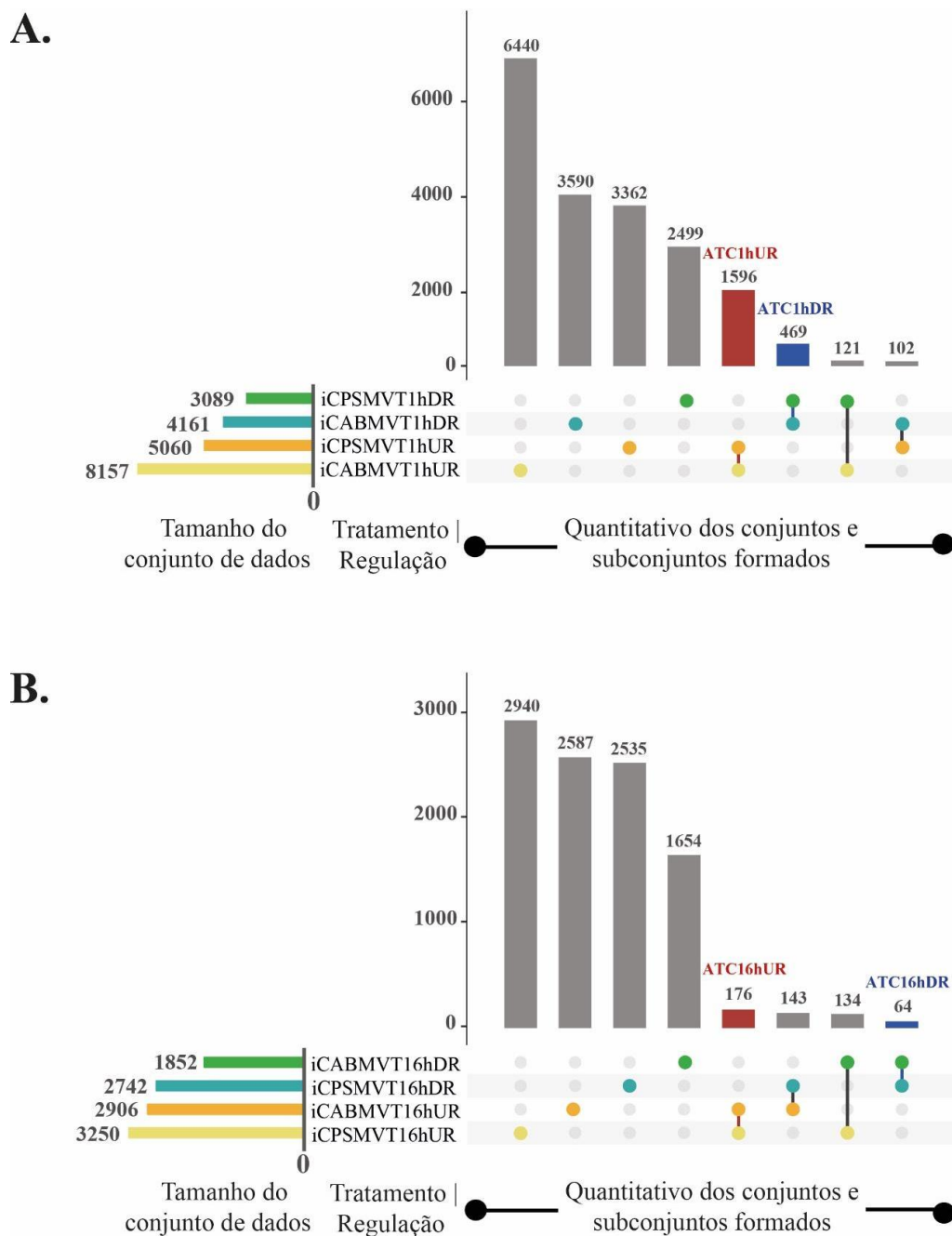


Figura 2. Quantitativo de transcritos diferencialmente expressos em feijão-caupi em resposta aos estresses estudados [injúria mecânica seguida de inoculação de CPSMV (iCPSMV) e injúria mecânica seguida de inoculação de CABMV (iCABMV)]. **(A)** Conjunto de transcritos diferencialmente expressos para o tratamento T1h. **(B)** Conjunto de transcritos diferencialmente expressos para o tratamento T16h. Barras em vermelho e azul indicam, respectivamente, conjuntos de ATCs induzidas (UR) e reprimidas (DR). **Legenda:** UR: up-regulated (ou induzido); DR: down-regulated (ou reprimido); T1h: ‘T1h vs. C1h’ (tratamento de injúria mecânica | inoculação viral 1h vs. controle absoluto 1h); T16h: ‘T16h vs. C16h’ (tratamento de injúria mecânica | inoculação viral 16h vs. controle absoluto 16h); ATCs: Assinaturas Transcricionais Conservadas.

Adicionalmente, as ATCs foram contrastadas em relação à escala temporal (**Figura 3**) mostrando transcritos exclusivos e compartilhados em ATC1hUR vs. ATC16hUR, ATC1hDR vs. ATC16hDR. Como resultado, encontrou-se diferenças acentuadas nesses conjuntos. Os dados demonstraram que apenas 24 ATCs (~ 1,6%) em ATC1hUR mantiveram-se presentes em ATC16hUR, enquanto nenhuma ATC em ATC1hDR foi observada em ATC16hDR (**Figura 3**).

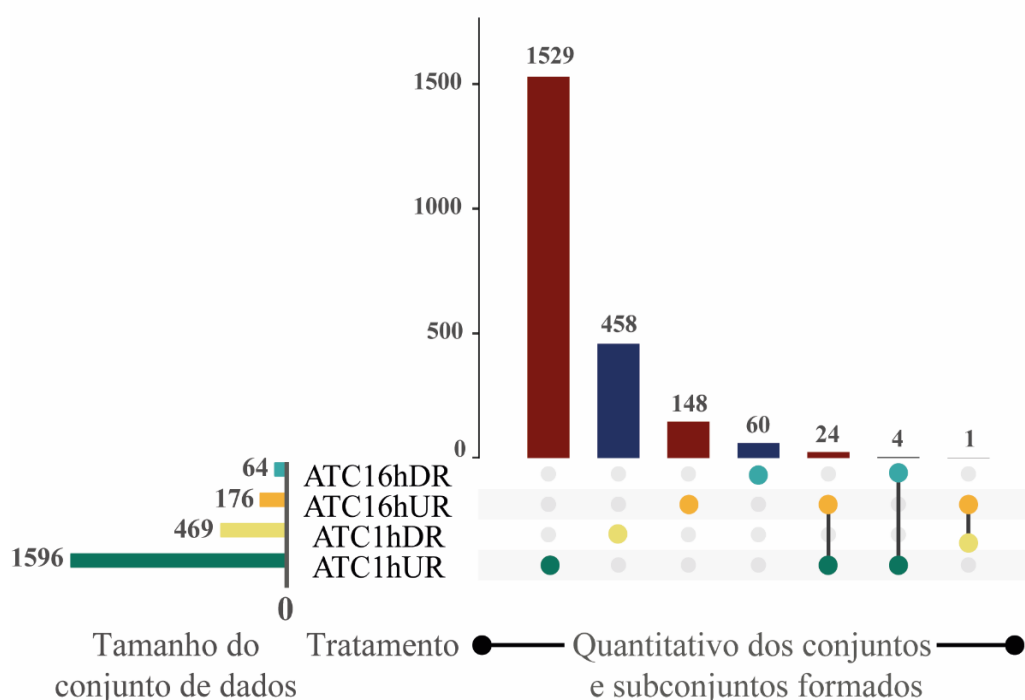


Figura 3. Quantitativo das ATCs induzidas e reprimidas que foram comuns nos dois diferentes tempos de estresse (ATC1hUR vs ATC16hUR e ATC1hDR vs ATC16hDR). **Legenda:** UR: up-regulated (ou induzido); DR: down-regulated (ou reprimido); 1h: ‘T1h vs. C1h’ (tratamento de injúria mecânica | inoculação viral 1h vs. controle absoluto 1h); 16h: ‘T16h vs. C16h’ (tratamento de injúria mecânica | inoculação viral 16h vs. controle absoluto 16h); ATCs: Assinaturas Transcricionais Conservadas.

3.1.2 ATCs e seus termos GO enriquecidos: processos biológicos e funções moleculares

Os termos GO identificados para cada conjunto de ATCs foram submetidos à análise pelo NeVOmics, visando indicar aqueles estatisticamente enriquecidos no que

tange às categorias de função molecular (FM) e processo biológico (PB). Em ATC1hUR, identificou-se quatro termos enriquecidos para FM e sete para PB (**Figura 4**); para ATC16hUR, identificou-se cinco para FM e cinco para PB (**Figura 5**).

Em ATC1hUR, os termos para FM foram relacionados à atividade de ‘transferase’ e ‘oxiredutase’ [*transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups* (TA_g); *oxidoreductase activity* (OX)] (**Figura 4**). Ainda em ATC1hUR, foi enriquecido o termo GO ‘*allene-oxide cyclase activity*’ (AOC_a). Todas as ATCs que compõem esse último termo foram codificadoras de enzimas-chave (AOC2 e AOC3) da via de biossíntese de ácido jasmônico. Observou-se, adicionalmente, dentro da categoria FM, o termo ‘*channel activity*’ (CH_a) (**Figura 4**). Dentre as ATCs que o compõem, todas foram pertencentes à família de proteínas de canais ‘aquaporinas’ (AQPs), sendo representadas por membros das subfamílias PIP (PIP2;2); TIP (TIP1;1, TIP1;3 e TIP2;1) e NIP (NIP1;2 e NIP5) (**Figura 4**).

Os termos enriquecidos para PB, em ATC1hUR, foram relacionados a componentes estruturais da planta [*plant-type cell wall organization*’ (CW_o) e ‘*phloem development*’ (PD)], além dos processos relacionados ao metabolismo de lipídios, ácidos graxos e carboidratos [*lipid catabolic process*’ (LC); ‘*fatty acid biosynthetic process*’ (FAB); ‘*carbohydrate metabolic process*’ (CM)] (**Figura 4**). Os dois outros termos GO enriquecidos nessa categoria foram relacionados ao metabolismo de ácido jasmônico [*jasmonic acid biosynthetic process*’ (JAB); ‘*response to jasmonic acid*’ (JAR)].

Dentre as ATCs componentes dos termos CM, JAB e JAR, observa-se transcritos codificadores de proteínas que podem atuar tanto como responsivas à invasão por patógenos, quanto como reguladoras das respostas imunes vegetais. No primeiro caso, daquelas relacionadas ao termo CM, assinalam-se as proteínas PR (*Pathogenesis-*

related), dentre elas a PR-2 e as quitinases (PR-8 e PR-11) (**Figura 4**). No segundo caso, relacionadas ao termo JAb, assinalam-se as enzimas-chave (AOC2 e AOC3) da via de biossíntese do ácido jasmônico associada ao referido processo (**Figura 4**), já para JAr, assinala-se o fator de transcrição RAP2.6L (**Figura 4**).

Figura 4. Rede de interação de termos GO enriquecidos, nas categorias FM e PB, para o conjunto ATC1hUR. Círculos centrais (em roxo para PB e em verde para FM) das redes de interação representam o termo GO enriquecido, enquanto círculos laterais (em vermelho) correspondem às proteínas componentes do termo em questão. Adaptado do output da ferramenta NeVOmics. **Legenda:** PB (processo biológico) enriquecido (CWo: plant-type cell wall organization; LC: lipid catabolic process; FAb: fatty acid biosynthetic process; PD: phloem development; CM: carbohydrate metabolic process; JAb: jasmonic acid biosynthetic process; JAr: response to jasmonic acid); FM (função molecular) enriquecida (AOCa: allene-oxide cyclase activity; CHa: channel activity; TAg: transferase activity, transferring acyl groups other than amino-acyl groups; OX: oxidoreductase activity); ATC1hUR (conjunto de transcritos induzidos tanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CABMV quanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CPSMV, após 1 hora de aplicação dos estresses); UR: up-regulated (ou induzido); ATCs: Assinaturas Transcricionais Conservadas.

Para ATC16hUR, os termos GO enriquecidos para PBs foram: '*DNA replication initiation*' (RI); '*carbohydrate metabolic process*' (CM); '*defense response*' (DRe); '*response to biotic stimulus*' (BR); '*response to wounding*' (WR) (**Figura 5**). Desses, os três últimos (DRe, BR, WR) destacam-se por estarem diretamente relacionados ao conjunto de estresses impostos. Tanto para DRe, quanto para BR, as proteínas PR foram importantes componentes, sendo as PR-10 enriquecidas em ambos os termos (**Figura 5**). Em relação ao termo enriquecido WR, elementos, como proteínas PR (PR-6), se destacaram (**Figura 5**).

Ainda em ATC16hUR, outros termos GO enriquecidos para FMs menos relacionados ao conjunto de estresses investigados também foram enriquecidos, a citar: '*oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor*' (OXn); '*hydrolase activity*' (HY) (**Figura 5**). Além disso, também foram envolvidos os processos relacionados à replicação do DNA: '*DNA primase activity*' (DP); '*DNA helicase activity*' (DH); e '*helicase activity*' (HA) (**Figura 5**).

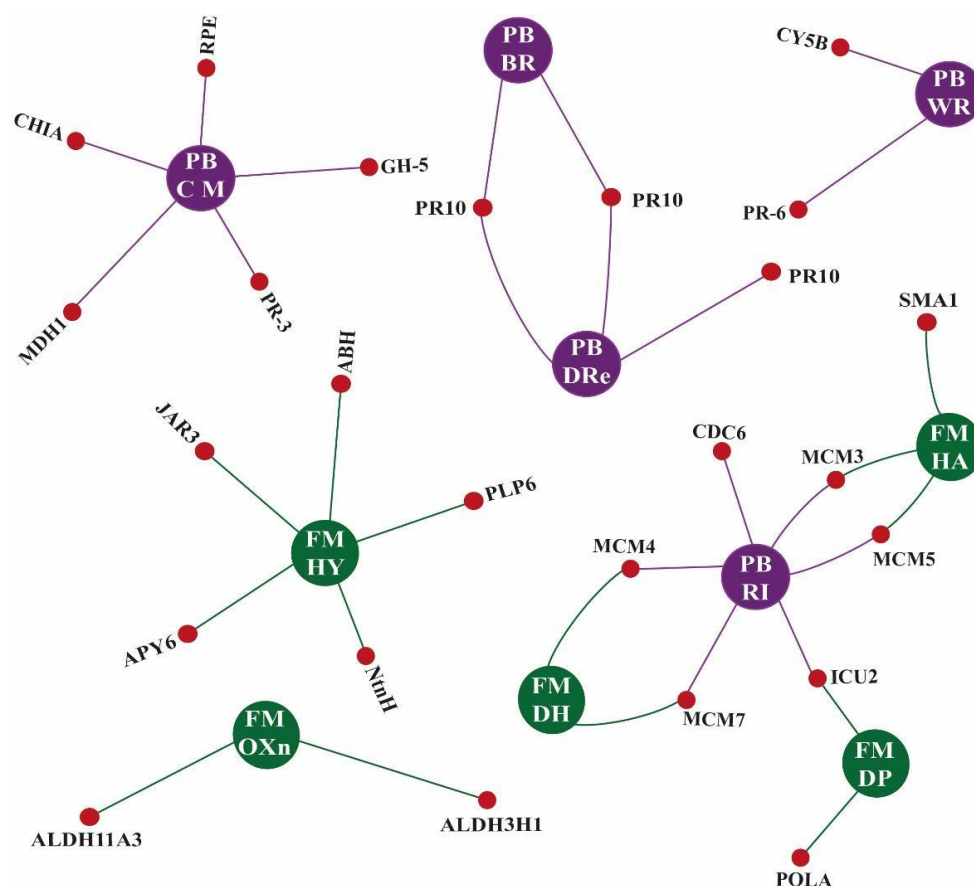


Figura 5. Rede de interação de termos GO enriquecidos, nas categorias FM e PB, para o conjunto ATC16hUR. Círculos centrais (em roxo para PB e em verde para FM) das redes de interação representam o termo GO enriquecido, enquanto que círculos laterais (em vermelho) correspondem às proteínas componentes do termo em questão. Adaptado do output da ferramenta NeVOmics. **Legenda:** PB (processo biológico) enriquecido (RI: DNA replication initiation; WR: response to wounding; BR: response to biotic stimulus; DR: defense response; CM: carbohydrate metabolic process); FM (função molecular) enriquecida (DP: DNA primase activity; DH: DNA helicase activity; HA: helicase activity; OXn: oxidoreductase activity, acting on the aldehyde or oxo group of donors, NAD or NADP as acceptor; HY: hydrolase activity); ATC16hUR (conjunto de transcritos induzidos tanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CABMV quanto em resposta à injúria mecânica | inoculação de CPSMV, após 16 horas de aplicação dos estresses); UR: up-regulated (ou induzido); ATCs: Assinaturas Transcricionais Conservadas.

Em relação aos alvos reprimidos, identificou-se quatro termos GO enriquecidos em FM e três em PB, para ATC1hDR (**Material S1**); para ATC16hDR, nenhum termo

GO foi enriquecido. Os IDs e as respectivas anotações das ATCs associados a cada um dos termos GO enriquecidos para FM e PB são apresentados, detalhadamente, em **Tabela S3** e **Tabela S4**.

3.1.3 ATCs e vias metabólicas e de sinalização associadas

Os conjuntos ATC1hUR, ATC1hDR, ATC16hUR e ATC16hDR foram mapeados nas diferentes vias (metabólicas e de sinalização) de resposta ao estresse biótico do MapMan. Tal ação apresentou, graficamente, a resposta conservada do feijão-caupi frente ao conjunto de estresses aqui analisados.

Constatou-se que o quantitativo de ATCs relacionadas às respostas de defesa em T16h (ATC16hUR e ACT16hDR) foi menor, quando comparado ao tempo de T1h (ATC1hUR e ATC1hDR) (**Figura 6**). Para T16h, informações relativas à presente análise podem ser vistas no **Material S2**.

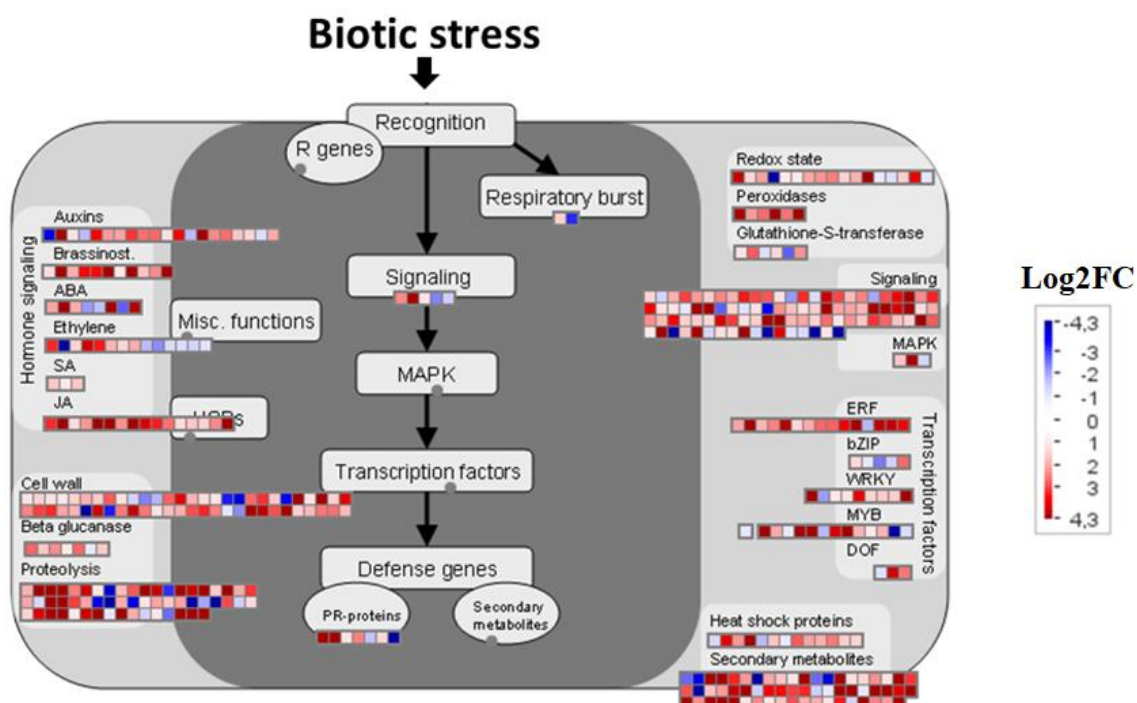


Figura 6. ATCs mapeadas nas vias de resposta a estresse biótico do MapMan para T1h (ATC1hUR em vermelho e ATC1hDR, em azul).

Em ATC1hUR e ATC1hDR, os dados revelaram que ambos os genótipos resistentes de feijão-caupi, quando sob o conjunto de estresses aqui estudado, modulam a transcrição, principalmente, de: genes ‘R’, proteínas ‘PRs’, proteínas de sinalização, várias classes de fatores de transcrição (TFs) e genes associados às vias de sinalização por fitormônios (**Figura 6, Tabela S5**). Houve, adicionalmente, genes relacionados ao metabolismo secundário, proteólise, metabolismo da parede celular e resposta ao estresse oxidativo (**Figura 6, Tabela S5**).

Os elementos componentes dessas vias serão observados nos subitens a seguir, focando-se somente no subconjunto induzido, ATC1hUR, onde são evidenciados os atores que participam ativamente do processo estudado.

a. Enzimas responsivas ao estresse oxidativo ou sinalização hormonal:

No que tange à primeira categoria, as ATCs foram mapeadas nos seguintes módulos: ‘*Redox State*’ (ATCs anotadas para: TRX2, TRX1, PDI2, APX3, dentre outras), ‘*Peroxidases*’ (ex.: PRX52, PRX25, PRX64) e ‘*Glutathione-S-Transferases*’ (ex.: GSTU25, GSTU8, GSTU20) (**Figura 6, Tabela S5**).

Análises adicionais de mapeamento na via ‘Plant-pathogen interaction’ (ko04626) do KEGG (**Material S3**), identificaram que em ATC1hUR, além das referidas enzimas de limpeza de ROS, também estão presentes ATCs que fazem parte da biogênese de ROS, nesse caso, representadas pela enzima Rboh.

Em relação à segunda categoria desta seção, as respostas conservadas de defesa foram relacionadas à biossíntese de ácido jasmônico (JA; LOX1, LOX2, AOC3, AOC4, OPR1, OPR2, OPR3) e etileno (ET, ACS1, ACS6, ACO3), além da indução de ATCs responsivas aos fitormônios ácido abscísico (ABA; ex.: ABA2, HVA22F), ácido salicílico (SA; ex.: BSMT); brassinosteroides (BR; ex.: NILR1, BIM1, DWARF 4, BR6OX2), auxina (ex.: ILL6, SAUR, ARF, GH3, IAR3) (**Figura 6, Tabela S5**).

b. Sinalização e Fatores de Transcrição:

Identificou-se 76 ATCs mapeadas na categoria ‘*signaling*’ em T1h. Destacaram-se as ATCs codificadoras de *Receptor-like kinase* (RLKs), MAPKK kinases (MAPKKKs), Ca^{2+} *dependent protein kinases* (CPKs ou CDPKs), *calmodulin-like proteins* (CMLs) e *calmodulin-binding protein* (CaM-binding) (**Figura 6, Tabela S5**).

No grupo das RLKs, merecem menção as codificadoras de *pattern recognition receptors* (PRRs) que atuam na percepção de PAMPs (**Figura 6, Tabela S5**): PXY/TDR-CORRELATED (PXC1); SRF8; LYSM RLK1-INTERACTING KINASE 1; BAK1-*interacting receptor-like kinase* 1 (BIR1); ER-LIKE1 (ERL1); FLAGELLIN-SENSITIVE 2 (FLS2); Cys-rich RLK (CRK10, CRK42, CRK10, CRK29, CRK2); Lectin-RLK (LecRK-IV.1, LecRK-S.2, LecRK-S.4, LecRK-S.7) e BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE 3 (BSK3).

Em relação aos TFs, verificou-se que AP2/ERF, WRKY e MYB foram predominantes na resposta inicial de defesa (**Figura 6**).

c. Genes R e proteínas PRs:

Quatro ATCs codificadoras de genes R, pertencentes à classe NBS-LRR (dois TIR-NBS-LRR e dois CC-NBS-LRR), foram exclusivamente moduladas em ATC1hUR (**Figura 6, Tabela S6**), indicando o recrutamento precoce desses genes em resposta ao processo mimetizado de exposição ao vírus (ou seja, injúria mecânica seguida de inoculação dos respectivos vírus). Em relação às proteínas PR, 26 ATCs foram exclusivamente moduladas no referido conjunto. As famílias de PR que compõem o referido grupo foram: PR-2, PR-5, PR-9 (peroxidases), chitinases e PR-10 (**Figura 6, Tabela S6**).

3.1.4 ATCs e fitormônios: um foco nas vias de biossínteses JA e ET

Análises anteriores (item 3.1.2 – **Figura 4**; item 3.1.3, seção ‘a’) demonstraram que, em ATC1hUR, três termos GO associados a JA foram enriquecidos. Adicionalmente, dados do MapMan, para sinalização hormonal, também sugeriram a importância desses fitormônios (**Figura 6, Tabela S5**), bem como indicaram a indução de TFs associados ao processo de regulação de suas vias metabólicas (como AP2/ERF e WRKY; **Figura 6**) no processo de resposta estudado.

Com o exposto, devido à potencial influência do JA observada nesse estudo e ao conhecido papel sinérgico entre JA e ET, a dinâmica desses dois fitormônios foi submetida a estudos mais detalhados. As vias de biossíntese desses hormônios foram reconstruídas a partir de dados da literatura (ver tópico 2.9) e as ATCs associadas foram mineradas nas bibliotecas RNA-Seq analisadas (**Tabela S7**).

A biossíntese de ET requer a ação de três enzimas, conforme descrito por Zarembinski e Theologis, (1994), Vandenbussche *et al.* (2012): *S-adenosylmethionine synthetase* (SAM synthetase); *1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase* (ACS); e *1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase* (ACO). As três foram componentes do conjunto ATC1hUR (**Figura 7, Tabela S7**), sendo que tal fato sugere, transcricionalmente, que a via de biossíntese do etileno é inteiramente induzida na resposta conservada precoce deste estudo.

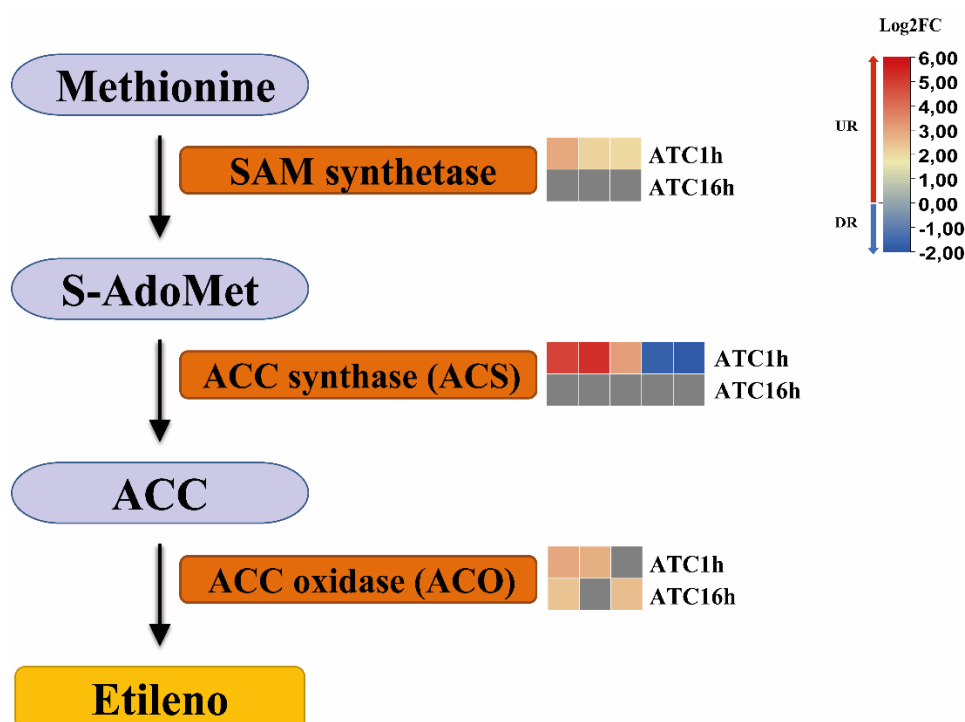


Figura 7. Apresentação das enzimas envolvidas na via de biossíntese* do Etileno (ET), bem como apresentação da modulação das ATCs** que as codificam. *Desenhada conforme descrito por Zarembinski e Theologis, (1994), e Vandenbussche *et al.* (2012). **Quadrados coloridos ao lado do nome da enzima representam as ATCs que codificam para a respectiva enzima. As cores dos quadrados representam a modulação transcricional em termos de Log2FC.

A biossíntese do JA, por sua vez, requer sete enzimas principais e vários compartimentos celulares, conforme descrito por Wasternack e Song, (2017). Notavelmente, os dados do presente estudo sugeriram que o processo mencionado ocorre apenas no conjunto ATC1hUR. O referido conjunto de ATCs apresentou transcritos para cinco enzimas da referida via, a citar: *13-lipoxygenase* (13-LOX; 1), *allene oxide synthase* (AOS; 2), *allene oxide cyclase* (AOC; 4), *OPDA reductase* 3 (OPR3; 11) e *L-3-ketoacyl-CoA-thiolase* (KAT; 2) (**Figura 8, Tabela S7**).

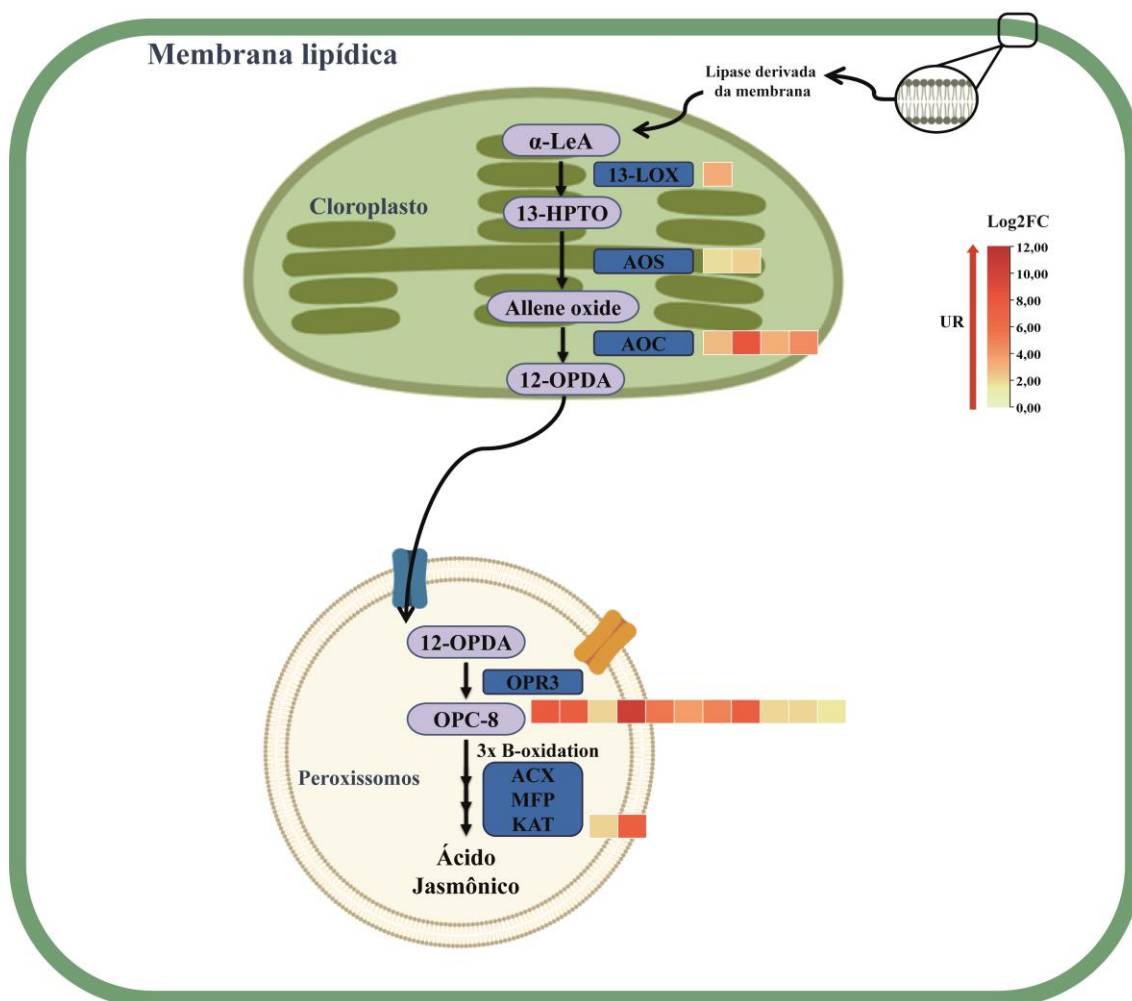


Figura 8. Apresentação das enzimas envolvidas na via de biossíntese* do Ácido Jasmônico (JA), bem como apresentação da modulação das ATCs** que as codificam. *Desenhada conforme descrito por Wasternack e Song, (2017). **Quadrados coloridos ao lado do nome da enzima representam as ATCs que codificam para a respectiva enzima. As cores dos quadrados representam a modulação transcricional em termos de Log2FC.

Com o exposto, há indicações transcricionais de que a biossíntese de ET e JA compreendem respostas conservadas nos diferentes acessos resistentes submetidos ao conjunto de estresses aqui analisados. Tal conservação se deu, preferencialmente, em ATC1hUR, sugerindo que tais hormônios foram peças-chave no combate precoce ao processo de exposição ao vírus.

3.2 Genômica das ATCs

3.2.1 Ortologia de loci codificadores de ATCs de feijão-caupi entre Viridiplantae

Investigou-se a conservação dos loci codificadores das ATCs de feijão-caupi entre diversas espécies de Viridiplantae. A maior abundância de ortólogos foi observada entre feijão-caupi com outras espécies de Fabaceae, como: *P. vulgaris*, *Glycine max* e *Medicago truncatula* (**Figura 9**). Dentre essas, 90% dos genes codificadores de ATCs de feijão-caupi apresentaram ortólogos nas duas primeiras espécies (**Figura 9**). Adicionalmente, um expressivo número de ortólogos (variando de 67% a 79%) também foi observado em espécies distantes filogeneticamente, pertencentes às famílias Salicaceae, Malvaceae, Brassicaceae, Rosaceae, Euphorbiaceae, Linaceae, Solanaceae, Myrtaceae, Phrymaceae e Crassulaceae (**Figura 9**).

A distribuição e o quantitativo dos ortólogos entre feijão-caupi com diversas espécies de Viridiplantae nos quatro conjuntos de dados analisados (ATC1hUR, ATC1hDR, ATC16hUR e ATC16hDR) estão representados graficamente na **Figura 9**.

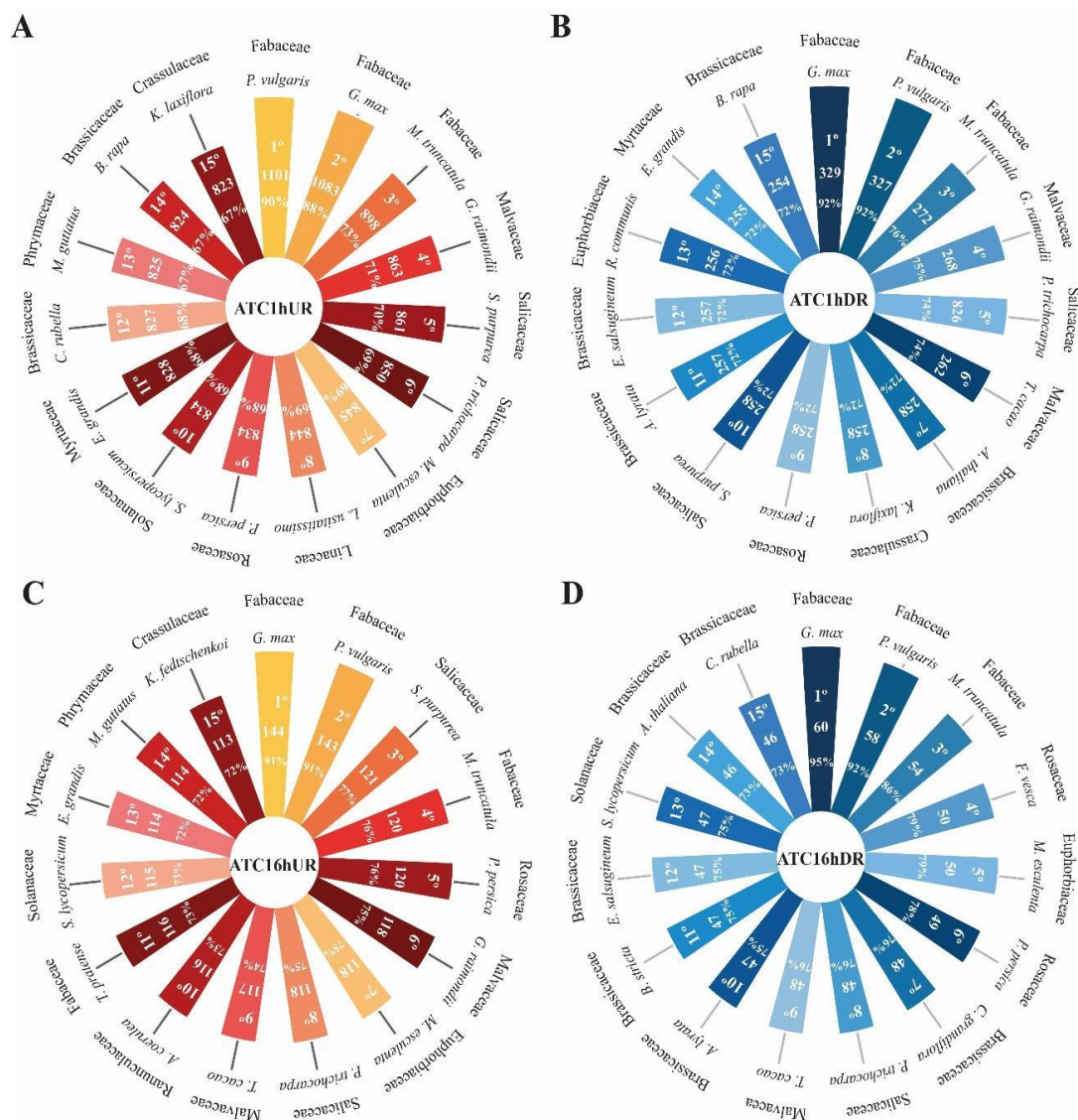


Figura 9. Relações de ortologia dos loci de feijão-caupi ancoradores de ATCs (**A.** ATC1UR; **B.** ATC1DR; **C.** ATC16UR; e **D.** ATC16DR), apresentando as espécies (e respectivas famílias), o quantitativo absoluto e a porcentagem de loci conservados nas mesmas.

3.2.2 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos enriquecidos (CCREs)

Identificou-se 73 CCREs enriquecidos em regiões promotoras de genes codificadores de ATC1hUR. Esses estiveram associados a oito diferentes famílias de

TFs (**Tabela S8**): bHLH, AP2/ERF, bZIP, Helix-Turn-Helix, B3, CG-1, CAMTA, Dof-type.

Trinta e dois (~ 44,0%) dos CCRES acima mencionados estiveram associados à família bHLH e 25 (~ 34,0%) à AP2/ERF. Para essa última classe, 12 foram membros da subfamília ERF. Essas famílias participam diretamente, dentre outros processos, das vias de sinalização hormonal, especialmente às relacionadas ao JA e ao ET. Isso ratifica a importância dessas vias na resposta conservada de defesa aos estresses aqui estudados em feijão-caupi (ver item 3.1.3 e 3.1.4).

Os três CCRES mais significativamente enriquecidos em promotores de ATC1hUR foram associados a MYC3 (**Figura 10A**), MYC2 (**Figura 10B**) e MYC4 (**Figura 10C**), os quais regulam positivamente a maioria das respostas dependentes de JA.

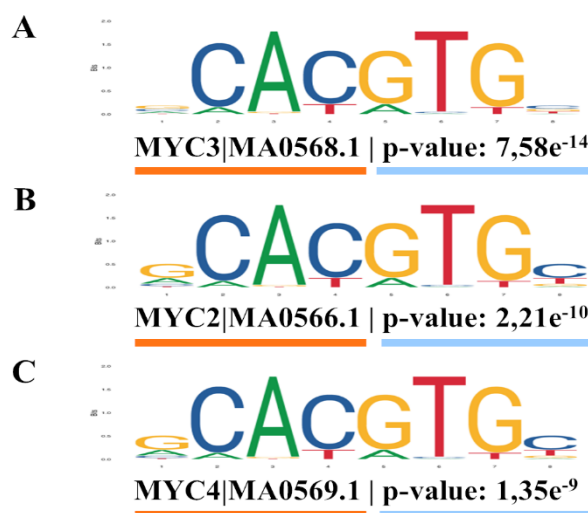


Figura 10. Os três motivos de elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs) estatisticamente mais enriquecidos em promotores de ATC1hUR, apresentando sua conservação (*logo sequence*), p-value (grifados em azul), bem como a anotação do respectivo fator de transcrição associado e sua Matrix JASPAR ID (grifados em laranja) Adaptado do output do software AME.

Para ATC16hUR, no entanto, não se identificou enriquecimento de CCRES.

3.3 Modelo tentativo da resposta da defesa precoce de feijão-caupi frente ao processo de exposição a vírus

Os resultados do presente estudo permitiram fornecer um panorama das principais vias conservadas relacionadas à percepção, sinalização e resposta de defesa precoce de feijão-caupi frente ao estresse combinado de injúria mecânica | inoculação viral (em conjunto, denominados de processo de exposição a vírus), baseado em análises de enriquecimento e mapeamento em vias de sinalização e metabólicas. Para o conjunto de dados ATC1hUR, nossos resultados foram bastante abrangentes e esclarecedores. Isso nos levou a propor um rascunho dos mecanismos abrangidos por essas respostas transcricionais conservadas muito precoces relativas ao processo de exposição a vírus em feijão-caupi.

De modo geral, essas respostas transcricionais conservadas de feijão-caupi nos primeiros momentos após exposição aos vírus estudados envolvem, transcricionalmente, a ação de diversos receptores, vias de sinalização e várias classes de genes de defesa. Os principais mecanismos de resposta precoce conservados estão resumidos na **Figura 11**.

Os dados transcricionais sugerem que a percepção ao estresse combinado se estabelece, principalmente, por meio de duas classes de receptores. Os receptores de membrana PRRs atuam na primeira camada de defesa (e percepção) e os genes R, receptores intracelulares, são acionados na segunda camada de defesa (**Figura 6,**

Figura 11). Em conjunto, essas duas classes constituem o sistema imune inato da planta que, mediante percepção e sinalização, agem na resposta inicial ao dano causado por esses microrganismos. Além dos componentes relacionados ao sistema imune inato, também se identificou uma rede de sinalização eficiente e intimamente relacionada em feijão-caupi, com destaque para as ROS, Ca^{2+} , cascatas MAPKs, TFs e fitormônios (**Figura 6, Figura 7, Figura 8, Figura 11**). Destaca-se que essas principais vias de sinalização acionadas são responsivas tanto à injúria mecânica quanto à vírus.

Dentre os componentes das vias de sinalização, sugere-se que ROS, em especial H_2O_2 , desempenham importantes funções nessa resposta precoce dessa planta. Foi sugerida a Rboh como a principal enzima envolvida na produção de H_2O_2 na resposta precoce ao processo de exposição a vírus em feijão-caupi (**Material S3, Figura 11**). Em seguida, sugere-se que as proteínas de membrana PIPs, pertencentes à família das aquaporinas, são responsáveis pela transmissão do sinal apocitoplasmático de H_2O_2 (**Figura 4, Figura 11**). Nesse processo, parece ocorrer um equilíbrio entre a produção e eliminação de ROS, assegurado pelas ATCs codificadoras de enzimas de limpeza dessas espécies reativas, principalmente, ascorbato peroxidases, tiorredoxina, peroxirredoxinas e glutathione-S-transferase. Além disso, a indução de diversas ATCs sensoras de Ca^{2+} (**Figura 6, Figura 11**), como CDPKs e CMLs, indicam a ativação do Ca^{2+} como um mensageiro secundário.

Além dessas vias de sinalização, as cascatas MAPKs são importantes componentes na transdução de sinal, podendo estar envolvidas na indução de diversos fatores relacionados à defesa da planta, incluindo a ativação de TFs e biossíntese de fitormônios.

Identificou-se bHLH, WRKY e AP2-ERFs (**Figura 6, Figura 10, Figura 11**) como as famílias mais abundantes de TFs e intimamente relacionadas às vias de

sinalização mediadas por fitormônios. Ainda, os dois últimos TFs podem atuar na indução de genes responsivos à defesa, como as proteínas PRs. Dentre as vias de transdução de sinal de fitormônios, observou-se uma ativação simultânea de JA e ET nessa resposta precoce ao processo de exposição a vírus (**Figura 7, Figura 8, Figura 11**), sugerindo a complexidade planta/injúria+vírus/fitôrmônio. Em paralelo, as proteínas PRs também apresentaram importante papel na resposta precoce de defesa conservada, sendo, possivelmente, relacionadas ao estabelecimento da SAR em feijão-caupi (**Figura 11**).

4. Discussão

4.1 Transcriptômica das ATCs

4.1.1 Aspectos gerais

A análise comparativa executada no presente trabalho permitiu a identificação de um elevado número de transcritos coexpressos (ATCs). O estudo dessas ATCs, forneceu um panorama geral da conservação da resposta de defesa precoce aos vírus CABMV e CPSMV. A conservação dessa resposta foi observada, majoritariamente, nos momentos iniciais (T1h; principalmente, ATC1hUR), sendo atenuada com o passar do tempo (T16h) (**Figura 2**). Resultado semelhante foi reportado para plantas de batata inoculadas com duas diferentes cepas do PVY, sendo observado um elevado número de genes diferencialmente expressos em comum entre os dois tratamentos nos tempos iniciais após aplicação do estresse (4 hpi), havendo uma resposta mais específica no tempo posterior (10 hpi) (Goyer et al., 2015). Esse é um indicativo de que, à medida que o tempo de tratamento se prolonga, a resposta de feijão-caupi se torna menos conservada, ou seja, mais específica para cada vírus inoculado e/ou genótipo-dependente, uma vez que essas duas vertentes (vírus e genótipo) variaram entre os

ensaios realizados. Não podemos descartar, contudo, o efeito da resposta à injúria como parte dessa conservação na resposta precoce.

A identidade das ATCs diferencialmente expressas 1 h após aplicação do estresse (ATC1hUR e ATC1hDR) é, preponderantemente, diferente daquelas atuantes após 16 h de aplicação do estresse (ATC16hUR e ATC61hDR), indicando que a resposta conservada de feijão-caupi é, portanto, tempo-específica e precoce. Assim, torna-se necessário investigar e identificar, em cada etapa, os atores responsivos ao estresse analisado, a fim de compreender as estratégias conservadas precoces e subsequentes do feijão-caupi no combate à infecção viral.

4.1.2 Análise de enriquecimento de termos GO

A análise funcional das ATCs forneceu, por sua vez, um panorama geral de uma rede altamente complexa de respostas precoces conservadas, as quais foram diretamente associadas à percepção, sinalização e resposta de defesa conservada ao processo de exposição aos vírus. O enriquecimento de PBs, como ‘*defense response*’ (DRe), ‘*response to biotic stimulus*’ (BR) e ‘*response to wounding*’ (WR), apontaram que as principais vias que regulam as respostas precoces conservadas do feijão-caupi medeiam respostas imunológicas e associadas à injúria, canalizando recursos para mitigar os efeitos do estresse tanto da injúria como do agente viral.

Entre as ATCs induzidas que contribuíram para o enriquecimento de funções moleculares, destacaram-se as codificadoras de aquaporinas (AQPs, como TIPs, PIPs e NIPs), proteínas comumente associadas ao transporte de água e solutos (Maurel *et al.*, 2015). O potencial multifuncional desse grupo proteico relacionado aos estresses abordados no nosso trabalho vem sendo descoberto e relatado na literatura. As aquaporinas são responsivas tanto à injúria mecânica (An *et al.*, 2015; Bae *et al.*, 2011), quanto à invasão por patógenos. Plantas de tomate resistentes ao TYLCV (*Tomato*

yellow leaf curl virus) apresentaram, por exemplo, níveis mais elevados de transcritos TIP1;1 quando comparadas a plantas susceptíveis. Além disso, o silenciamento dessas TIPs comprometeu a defesa dessas plantas, tornando esses acessos resistentes em susceptíveis (Sade *et al.*, 2014). Em *Arabidopsis*, PIPs medeiam o transporte citoplasmático de H₂O₂ apoplástico (tipo de ROS de maior estabilidade), que é induzido por PAMPs (Tian *et al.* 2016). Para NIPs, até o momento, não há relatos de seu envolvimento na resposta aos estresses aqui estudados.

Outro grupo de proteínas de destaque foram as proteínas PR, componentes centrais responsáveis pelo enriquecimento dos termos ‘*carbohydrate metabolic process*’ (CM), ‘*defense response*’ (DR), ‘*response to biotic stimulus*’ (BR) e ‘*response to wounding*’ (WR). Algumas PRs já apresentaram ação documentada contra o TMV (*Tobacco mosaic virus*), como a PR-2a, a PR-3 (Šindelářová e Šindelář, 2005) e a PR-10 (Park *et al.* 2004). A atividade antiviral de PR-10 também foi demonstrada em cana-de-açúcar. Peng *et al.* (2017) observaram que, em resposta ao *Sorghum mosaic virus* (SrMV), proteínas PR-10 tiveram sua expressão induzida em plantas resistentes, enquanto foram reprimidas nas suscetíveis. Adicionalmente, outros estudos têm demonstrado a atuação de proteínas PR na resposta de defesa à injúria, a exemplo das PR-1 (Mitsuhara *et al.*, 2008; Chandrashekar *et al.*, 2018), PR-2 e PR-6 (Ji, 2014).

4.1.3 ATCs e biossíntese de fitormônios: foco em JA e ET

Dentro do conjunto ATC1hUR, a modulação de três termos relacionados ao metabolismo de JA foi observada, sendo: *response to jasmonic acid* (JAr); ‘*jasmonic acid biosynthetic process*’ (JAb); ‘*allene-oxide cyclase activity*’ (AOCa). Os dois últimos foram enriquecidos devido ao elemento AOC (**Figura 4**), que compreende uma enzima chave na via de biossíntese de JA (Wasternack e Kombrink, 2010; Wasternack e Song, 2017). Adicionalmente, cinco enzimas da via mencionada (a citar: 13-LOX,

AOS, AOC, OPR3 e KAT) estão presentes em ATC1hUR (ver tópico 3.1.4). Nossos resultados demonstram, transcricionalmente, que tanto as vias de biossíntese como as responsivas ao JA foram altamente moduladas. Portanto, pressupõe-se que mudanças no conteúdo endógeno de JA e seus derivados tenham fortes implicações na conservação da resposta de feijão-caupi atuando, primordialmente, nas fases mais precoces do processo de exposição a vírus (injúria mecânica seguida de inoculação viral).

O JA e seus derivados, conhecidos como jasmonatos (JAs), são descritos com duplo papel na sinalização ao estresse biótico e abiótico (Ahmad *et al.*, 2016). Após a injúria mecânica, são ativadas enzimas biossintéticas de JA, como as LOXs (Chauvin *et al.*, 2013; Glauser *et al.*, 2009) e AOS (León, 2001) que levam ao aumento local e sistêmico de JAs. Em *Vigna mungo*, a superexpressão de genes que codificam enzimas AOS e AOC foi associada à resistência ao MYMIV (*Mungbean yellow mosaic india virus*) (Chakraborty e Basak, 2018). Em batata, genes AOS induzidos em resposta à injúria são necessários para a acumulação de JA e do seu precursor, o OPDA, em tecidos proximais e distais à injúria (Taurino *et al.*, 2014).

Já o ET, além de mediar ações em resposta à injúria mecânica (Heyman *et al.*, 2018), também apresenta diversas implicações nas redes de sinalização relacionadas à resistência vegetal a determinados vírus, como, por exemplo, no estabelecimento da ER (*extreme resistance*) contra TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) em plantas de tabaco (Sansregret *et al.*, 2013).

Os processos regulados com ET iniciam-se com a indução da biossíntese desse fitormônio (Kende, 2001), a qual envolve três etapas de reação enzimática realizadas por SAM *synthetase*, ACS e ACO (Kende, 1993; Zarembinski e Theologis, 1994, Vandenbussche *et al.*, 2012). No presente estudo, observou-se a presença dessas três enzimas em ATC1hUR, o que pode implicar no aumento dos níveis desse fitormônio.

Entre esses genes codificadores de enzimas biossintéticas de ET, vários estão envolvidos nas respostas vegetais antivirais e a injúria. As enzimas ACO e ACS atuam na resposta antivirais em diferentes vegetais, como a batata, a pimenta, o feijão comum, *Arabidopsis* (Nie *et al.*, 2002, Dziurka *et al.*, 2016, Clarke *et al.*, 1998). Além disso, em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, a superexpressão de uma *SbSAMS* (*Solanum brevidens* SAM synthetase) levou à expressão de genes responsivos à injúria mecânica (Kim *et al.*, 2015). As CDPKs e cascatas MAPKs também estão envolvidas na biossíntese de etileno induzida por injúria mecânica, por meio da regulação transcricional de genes ACS em *Arabidopsis* (*AtACS*) (Li *et al.*, 2018).

JA e ET participam, portanto, de várias redes de sinalização e regulação durante a resposta da planta a vírus e injúria mecânica. Nossos dados sugerem uma interconexão transcricional entre as vias de sinalização desses fitormônios na ativação das respostas conservadas de defesa de feijão-caupi frente à exposição viral, sendo a via dependente de JA a principal atuante na resposta de defesa precoce/inicial, seguida da via dependente de ET.

4.1.4 ATCs e vias gerais de metabolismo e de sinalização associadas

As análises de vias metabólicas e de sinalização do MapMan destacaram a participação de ATC1hUR em quatro diferentes frentes de resposta aos estresses analisados em conjunto, sendo:

a. Enzimas responsivas ao estresse oxidativo e sinalização hormonal

A presença de ATCs associadas à biogênese de ROS em ATC1hUR, representada pela Rboh (*respiratory burst oxidase homologues*), é um indicativo transcricional da sinalização mediada por esses compostos. Em resposta ao ataque patogênico (Torres *et al.*, 2002; Torres e Dangl, 2005; Kadota *et al.*, 2014) e à injúria mecânica (Miller *et al.* 2009; Suzuki e Mittler 2012), as enzimas NADPH oxidases de

plantas, as Rbohs, estão envolvidas na produção de H_2O_2 apoplástico. No processo de defesa antiviral, o H_2O_2 , dependente de Rboh, desempenha importante papel na resistência sistêmica a vírus induzida por brassinosteróides (BR) em *Nicotiana benthamiana* (Deng *et al.* 2016).

Por outro lado, em concentrações elevadas, as ROS são substâncias nocivas que implicam em danos para a célula (Apel e Hirt, 2004). Adicionalmente, o mapeamento de ATC1hUR nas vias Redox State, Peroxidases e Glutathione-S-Transferases reflete a participação de ATCs relacionadas à limpeza de ROS na resposta precoce conservada sob análise. Portanto, o presente estudo sugere, transcricionalmente, que a modulação da expressão gênica voltada para o balanço adequado entre a produção, transporte e limpeza de ROS propicia um mecanismo de defesa em potencial, por meio de uma efetiva sinalização.

Os hormônios vegetais desempenham, por sua vez, um importante papel na imunidade das plantas. A análise de vias metabólicas revelou que, além de JA e ET, ATCs relacionadas ao ácido salicílico (SA); auxina, ácido abscísico (ABA) e brassinosteróide (BRs) foram presentes em ATC1hUR. O SA é apontado como um dos principais reguladores das respostas de resistência contra vírus (Whitham *et al.*, 2006), sendo crucial para a HR (repota hipersensível; Fu e Dong *et al.*, 2013) e o estabelecimento da SAR (resistência sistêmica adquirida; Durrant e Dong, 2004; Gao *et al.*, 2015). O ABA, por sua vez, está envolvido na resposta aprimorada das plantas a alguns vírus (Alazem e Lin 2017). As auxinas, no entanto, parecem não ter implicações positivas diretas nas respostas antivirais em plantas (Alazem e Lin 2015). A presença de ATCs relacionadas a esse hormônio em ATC1hUR pode estar relacionada à resposta ao dano mecânico ou ser uma especificidade encontrada na espécie analisada. Em *N.*

attenuata, foi observado o aumento nos níveis de auxina em folhas injuriadas mecanicamente após ataque simulado de *M. sexta* (Machado *et al.*, 2013).

b. Sinalização:

As ATCs codificadoras de *receptor-like kinase* (RLKs) destacaram-se em relação às demais ATCs. Diversos RLKs são receptores de reconhecimento de padrão localizados na membrana plasmática (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*), responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). A percepção bem-sucedida por parte dos PRRs desencadeia uma série de eventos de sinalização à jusante que levam a respostas de defesa, estabelecendo assim, a PTI (*PAMP-triggered immunity*) (Boller e He, 2009; Dodds e Raathen, 2010; Macho e Zipfel, 2014). Estudos apontam o envolvimento de RLKs de plantas no reconhecimento de dsRNAs virais (*Double-stranded RNA viruses*). Nessas interações, os constituintes virais atuam como PAMPs, induzindo respostas típicas de PTI dependentes de PRRs (Zorzatto *et al.*, 2015). Kundu *et al.* (2019), sugeriram que a ativação de PRRs em resposta à vírus está diretamente relacionada à resistência por meio de um ‘sistema de alerta precoce’. Assim, os perfis de expressão dessas ATCs relacionadas aos PRRs indicam que a ativação da PTI pode ser uma primeira linha de defesa conservada em feijão-caupi em resposta a vírus.

Adicionalmente, os dados de ATC1hUR indicaram a ativação de outras vias de sinalização na resposta de defesa precoce em feijão-caupi, destacando-se a mediada por Ca^{2+} e as cascatas MAPKKKs. Vários estudos têm apontado que o aumento na concentração de Ca^{2+} citosólico atua como mensageiro secundário durante as interações planta-patógeno (Knight *et al.*, 1991; Aldon *et al.*, 2018), além da atuação nas respostas ao estresse abiótico (Dodd *et al.* 2010; Kurusu *et al.* 2012). Nossos dados, onde vários

componentes relacionados à sinalização de Ca^{2+} , incluindo CMLs, CaM-binding e CDPKs, foram observados em ATC1hUR, corroboram com a literatura.

Por sua vez, as MAPKKKs são componentes iniciais na cascata de sinalização das MAPKs, envolvendo diversos eventos de fosforilação de resíduos de Serina (S), Treonina (T) e Tirosina (Y) (Ichimura *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2010) representando, assim, um meio primário para regular a transcrição e ativação de diversas respostas de defesa. A via de sinalização MAPKs têm ação positiva na resistência vegetal antiviral, através da regulação dos níveis de expressão de proteínas PRs (Patel *et al.*, 2017) e genes R (Jin *et al.*, 2003). A superexpressão de MPK17 em plantas transgênicas de tabaco, por exemplo, aumentou a resistência dessa planta ao CMV (*Cucumber mosaic virus*) e PVY (*Potato virus Y*) (Pan *et al.*, 2012). A resposta à injúria, por sua vez, ativou MEKK1, MPK3, MPK19 em *Arabidopsis* (Hadiarto *et al.*, 2006).

Por fim, os fatores de transcrição (TFs) apresentam importantes funções reguladoras nos processos de defesa vegetal a estresses bióticos e abióticos. Dentre eles, a família WRKY se destaca como responsiva a esses tipos de estresses em plantas (Jiang *et al.*, 2014). Em *Arabidopsis*, por exemplo, o WRKY8 é induzido em resposta ao dano mecânico e a diversos patógenos (por exemplo, CMV), por meio de vias dependentes de fitormônios (Chen *et al.*, 2010).

c. Genes R:

O produto dos genes R, de forma direta ou indireta, reconhecem os efetores de patógenos, estabelecendo assim a imunidade desencadeada por efector (ETI, ou *Effector Triggered Immunity*) (Jones e Dangl, 2006; Chisholm *et al.*, 2006). As ATCs codificadoras de duas classes de genes R do tipo NBS-LRR (TIR-NBS-LRR e CC-NBS-LRR) foram observadas simultaneamente aos PRRs em ATC1hUR, sugerindo que

a ETI pode ser desencadeada por efetores derivados de vírus (ou seja, proteínas virais) nos genótipos resistentes de feijão-caupi. Vários genes R da classe NBS-LRR foram relatados relacionados com a resistência contra patógenos virais em plantas (Maiti *et al.*, 2012; Wen *et al.*, 2013; Xun *et al.*, 2019). Dessa forma, quando tomados em conjunto, nossos resultados transcricionais sugerem que, nas respostas conservadas precoces de defesa antivirais em feijão-caupi, a PTI atuou em conjunto com a ETI na tentativa de restringir os vírus ou limitar os danos causados por eles. A percepção de vírus pelos PRRs e genes R, possivelmente, está relacionada ao desencadeamento de uma cascata de eventos de sinalização a jusante, o que fica evidente pela indução de diversas ATCs relacionadas à sinalização mediada por Ca^{2+} , cascatas MAPKs, ROS, famílias de TFs e biossíntese de fitormônios.

4.2 Genômica das ATCs

4.2.1 Ortologia de loci codificadores de ATCs de feijão-caupi entre Viridiplantae

A mineração de genes ortólogos codificadores de ATCs entre diversas espécies de Viridiplantae apontou um elevado índice de conservação, sugerindo a importância desses genes no clado analisado. Os maiores índices, entretanto, ocorreram dentro das fabáceas, com destaque para soja (*G. max*), a luzerna (*M. truncatula*) e feijão comum (*P. vulgaris*). Um maior número de ortólogos foi observado entre feijão-caupi e feijão comum, espécie proximamente relacionada com alto grau de sintenia compartilhada e com divergência aproximada de 10 milhões de anos (Liu *et al.*, 2013; Lonardi *et al.*, 2019).

4.2.2 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs)

Os CCREs associados às famílias de TFs bHLH e AP2/ERF foram os mais abundantes entre os estatisticamente enriquecidos em ATC1hUR. Em relação à bHLH destaca-se a subfamília bHLH-III (d+e), da qual fazem parte MYC2, 3, 4. Já para

AP2/ERF, os CCREs associados à subfamília ERF foram os mais representativos em termos quantitativos. Esses dados sugerem que MYCs e ERFs regulam a maioria dos genes responsivos ao conjunto de estresses aqui aplicado.

MYCs e ERFs foram propostos para atuar como reguladores principais em dois diferentes ramos que orquestram a reprogramação transcricional mediada por JA em resposta à injúria e patógenos (Lorenzo *et al.*, 2004). Um desses ramos é regulado por MYC2 e ativa, preferencialmente, genes responsivos ao ferimento, seja ele mecânico ou causado por insetos herbívoros. MYC2 é um regulador mestre das respostas de JA à injúria (Yan *et al.*, 2013), e MYC3 e MYC4 têm ação aditiva ao MYC2 na regulação dos níveis de JA em resposta ao ferimento (Zhang *et al.*, 2020).

Os ERF, por sua vez, são reguladores positivos da sinalização mediada por ET e JA (Vandenbussche *et al.*, 2012). Por exemplo, o RAP2.6L, que contribuiu para o enriquecimento do termo JAr em ATC1hUR (ver tópico 3.1.2), mostrou-se responsivo ao JA, bem como a ET e SA (Huang *et al.*, 2013; Krishnaswamy *et al.*, 2011), sugerindo que alguns ERF possam integrar vias de sinalização hormonal. Além disso, os ERF constituem importantes atores em redes de regulação responsivas a patógenos (Lorenzo *et al.*, 2004) bem como em resposta ao dano mecânico (Asahina *et al.*, 2011).

Conclusão

A identificação e a análise das ATCs possibilitaram a investigação da conservação das respostas de defesa precoce do feijão-caupi a viroses (injúria mais inoculação com CABMV ou CPSMV), sob uma perspectiva ainda não explorada, indicando essas ATCs como promissores alvos biotecnológicos. Essa análise revelou que, transcionalmente, o feijão-caupi apresenta mecanismos conservados de resposta precoce a diferentes vírus, sendo observada, majoritariamente, nos momentos mais iniciais (1h). Já nos momentos posteriores (16h), mecanismos de defesa específicos

parecem ser acionados. A análise funcional das ATCs atuantes nas respostas mais precoces (1h) indicaram uma conservação direcionada para uma rápida percepção e sinalização voltada para a indução de vias convergentes para respostas à injúria e vírus. Entre essas principais respostas de defesa precoce conservadas estão: a indução de componentes das duas camadas do sistema imune inato da planta (PTI e ETI), de vias de sinalização altamente complexas e interconectadas, onde atuam diversas classes de TFs, proteínas quinases e importantes vias de sinalização hormonal, especialmente relacionadas ao JA, além de proteínas PRs e enzimas associadas à limpeza de ROS. Ainda, os loci codificadores das ATCs apresentaram elevada conservação com outras leguminosas, principalmente com *P. vulgaris*, espécie mais proximamente relacionada ao feijão-caupi. Nossos resultados irão, portanto, impulsionar o conhecimento integrativo acerca dos mecanismos gerais da resposta de defesa / resistência dessa cultura a diferentes viroses. Estudos futuros de investigação do papel dessas ATCs na interação entre vírus e plantas hospedeiras são, contudo, necessários para uma maior compreensão dessa resposta de defesa vegetal a múltiplos vírus.

Referências

- Ahmad P, Rasool S, Gul A, Sheikh SA, Akram NA, Ashraf M, Kazi AM, Gucel S (2016) Jasmonates: multifunctional roles in stress tolerance. *Frontiers in Plant Science* 7: 813.
- Alazem M, He MH, Moffett P, Lin NS (2017) Absciscic acid induces resistance Against *Bamboo mosaic virus* through Argonaute2 and 3. *Plant Physiology* 174(1): 339–355.
- Alazem M and Lin NS (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host-virus interactions. *Molecular Plant Pathology* 16(5): 529–540.

- Alazem M and LinnNS (2017) Antiviral roles of abscisic acid in plants. *Frontiers in Plant Science* 8:1760
- Aldon D, Mbengue M, Mazars C, Galaud JP (2018) Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 19(3):665.
- An F, Zou Z, Cai X, Wang J, Rookes J, Lin W, Cahill D, Kong L (2015) Regulation of HbPIP2;3, a Latex-abundant water transporter, is associated with latex dilution and yield in the rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *PloS One* 10(4): e0125595.
- Apel K and Hirt H (2004) Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- Asahina M, Azuma K, Pitaksaringkarn W, Yamazaki T, Mitsuda N, Ohme-Takagi M, Yamaguchi S, Kamiya Y, Okada K, Nishimura T, Koshiha T, Yokota T, Kamada H, Satoh S (2011) Spatially selective hormonal control of RAP2.6L and ANAC071 transcription factors involved in tissue reunion in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(38):16128–16132.
- Bae EK, Lee H, Lee JS, Noh EW (2011) Drought, salt and wounding stress induce the expression of the plasma membrane intrinsic protein 1 gene in poplar (*Populus alba* × *P. tremula* var. *glandulosa*). *Gene* 483(1-2): 43–48.
- Baebler S, Krecic-Stres H, Rotter A, Kogovsek P, Cankar K, Kok EJ, Gruden K, Kovac M, Zel J, Pompe-Novak M, Ravnikar M (2009) PVY(NTN) elicits a diverse gene expression response in different potato genotypes in the first 12 h after inoculation. *Molecular Plant Pathology* 10(2):263–275.

- Baebler Š, Coll A, Gruden (2020) Plant molecular responses to *Potato virus Y*: a continuum of outcomes from sensitivity and tolerance to resistance. *Viruses* 12(2):217.
- Bastos, EA (2016) A Cultura do feijão-caupi no Brasil. Embrapa Meio-Norte, Teresina, 71pp.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 30(15): 2114–2120.
- Boller T and He SY (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* (New York, N.Y.) 324(5928):742–744.
- Booker HM, Umaharan P, McDavid CR (2005) Effect of *Cowpea severe mosaic virus* on crop growth characteristics and yield of cowpea. *Plant Disease* 89(5):515–520.
- Boukar O, Belko N, Chamarthi S, Togola A, Batieno J, Owusu E, Fatokun C (2019) Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. *Plant Breeding* 138(4):415-424.
- Boukar O, Fatokun CA, Huynh BL, Roberts PA, Close TJ (2016) Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. *Frontiers in Plant Science* 7: 757.
- Cardoso MJ, Freire Filho FR, Athayde Sobrinho C (1990) BR 14 MULATO: nova cultivar de feijão macassar para o Estado do Piauí. EMBRAPA-UEPAE de Teresina.
- Chakraborty N, and Basak J (2018) Comparative transcriptome profiling of a resistant vs. susceptible *Vigna mungo* cultivar in response to *Mungbean yellow mosaic*

- India virus* infection reveals new insight into MYMIV resistance. *Current Plant Biology* 15: 8-24.
- Chandrashekar N, Ali S, Grover A (2018) Exploring expression patterns of PR-1, PR-2, PR-3, and PR-12 like genes in *Arabidopsis thaliana* upon *Alternaria brassicae* inoculation. *3 Biotech* 8(5):230.
- Chauvin A, Caldelari D, Wolfender JL, Farmer EE (2013) Four 13-lipoxygenases contribute to rapid jasmonate synthesis in wounded *Arabidopsis thaliana* leaves: a role for lipoxygenase 6 in responses to long-distance wound signals. *The New Phytologist* 197(2): 566–575.
- Chen L, Zhang L, Yu D (2010) Wounding-induced WRKY8 is involved in basal defense in *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* MPMI 23(5): 558–565.
- Chisholm ST, Coaker G, Day B, Staskawicz, BJ (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124(4):803–814.
- Clarke SF, Burritt DJ, Jameson PE, Guy PL (1998) Influence of plant hormones on virus replication and pathogenesis-related proteins in *Phaseolus vulgaris* L. infected with white clover mosaic potexvirus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53(4):195-207.
- Costa CL, Lin MT, Kitajima EW, Santos AA, Mesquita RCM, Freire FRF (1978) *Cerotoma arcuata* (Oliv.) um crisomelídeo vetor do mosaico da *Vigna* no Brasil. *Fitopatologia Brasileira*, 3.
- Dallagnol LJ and Araujo Filho JV (2018) Resistência genética de plantas a patógenos. Resistência genética: de plantas a patógenos. Pelotas: Ed. UFPel.

- Delgado-Salinas A, Thulin M, Pasquet R, Weeden N, Lavin M (2011) *Vigna* (Leguminosae) sensu lato: the names and identities of the American segregate genera. *American Journal of Botany* 98(10):1694–1715.
- DeMers LC, Redekar NR, Kachroo A, Tolin SA, Li S, Saghai Maroof, MA (2020) A transcriptional regulatory network of Rsv3-mediated extreme resistance against *Soybean mosaic virus*. *PloS One* 15(4):e0231658.
- Deng XG, Zhu T, Peng XJ, Xi DH, Guo H, Yin Y, Zhang DW, Lin HH (2016) Role of brassinosteroid signaling in modulating *Tobacco mosaic virus* resistance in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports* 6:20579.
- Dodds PN and Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* 11(8):539–548.
- Dziurka M, Janeczko A, Juhász C, Gullner G, Oklestková J, Novák O, Saja D, Skoczowski A, Tóbiás I and Barna B (2016) Local and systemic hormonal responses in pepper leaves during compatible and incompatible pepper-tobamovirus interactions. *Plant Physiology and Biochemistry* 109:355–364.
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A *et al.* (2019) The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research* 47: 427–432.
- Fu ZQ and Dong X (2013) Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual Review of Plant Biology* 64:839–863.
- Gao QM, Zhu S, Kachroo P, Kachroo A (2015) Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science* 6:228.
- Glauser G, Dubugnon L, Mousavi SA, Rudaz S, Wolfender JL, Farmer EE (2009) Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid

- accumulation in wounded *Arabidopsis*. The Journal of Biological Chemistry 284(50):34506–34513.
- Gray SM (1996) Plant virus proteins involved in natural vector transmission. Trends in Microbiology 4(7) : 259–264.
- Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, Couger MB, Eccles D, Li B, Lieber M, MacManes MD, Ott, M *et al.* (2013) De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. Nature Protocols 8(8);1494–1512.
- Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y, Azuma T, Yasuda, T (2006) Activation of *Arabidopsis* MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. Planta 223(4):708–713.
- Heyman J, Canher B, Bisht A, Christiaens F, De Veylder L (2018) Emerging role of the plant ERF transcription factors in coordinating wound defense responses and repair. Journal of Cell Science 131(2):e208215.
- Huang Z, Zhao P, Medina J, Meilan R, Woeste K (2013) Roles of JnRAP2.6-like from the transition zone of black walnut in hormone signaling. PloS One 8(11):e75857.
- Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A *et al.* (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. Trends in Plant Science 7(7): 301-308.
- Jiang Y, Duan Y, Yin J, Ye S, Zhu J, Zhang F, Lu W, Fan D, Luo K (2014) Genome-wide identification and characterization of the *Populus* WRKY transcription factor family and analysis of their expression in response to biotic and abiotic stresses. Journal of Experimental Botany 65(22): 6629–6644.

- Jin H, Liu Y, Yang KY, Kim CY, Baker B, Zhang S (2003) Function of a mitogen-activated protein kinase pathway in N gene-mediated resistance in tobacco. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 33(4):719–731.
- Jones JD and Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444(7117): 323–329.
- Kadota Y, Sklenar J, Derbyshire P, Stransfeld L, Asai S, Ntoukakis V, Jones JD, Shirasu K, Menke F, Jones A, Zipfel C (2014) Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Molecular Cell* 54(1):43–55.
- Kende H (2001) Hormone response mutants: A plethora of surprises. *Plant Physiology*, 125(1) : 81–84.
- Kim SH, Kim SH, Palaniyandi SA, Yang SH, Suh JW (2015) Expression of potato S-adenosyl-L-methionine synthase (SbSAMS) gene altered developmental characteristics and stress responses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry : PPB* 87:84–91.
- Knight MR, Read ND, Campbell AK, Trewavas AJ (1993) Imaging calcium dynamics in living plants using semi-synthetic recombinant aequorins. *The Journal of Cell Biology* 121(1):83–90.
- Krishnaswamy S, Verma S, Rahman MH, Kav NN (2011) Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2.6, RAP2.6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 75(1-2):107–127.
- Kundu A, Singh PK, Dey A, Ganguli S, Pal A (2019) Complex molecular mechanisms underlying MYMIV-resistance in *Vigna mungo* revealed by comparative transcriptome profiling. *Scientific Reports* 9(1):8858.
- Kurusu T, Nishikawa D, Yamazaki Y, Gotoh M, Nakano M, Hamada H, Yamanaka T, Iida K *et al.* (2012) Plasma membrane protein OsMCA1 is involved in

- regulation of hypo-osmotic shock-induced Ca^{2+} influx and modulates generation of reactive oxygen species in cultured rice cells. *BMC Plant Biology* 12:11.
- León, J, Rojo E, Sánchez-Serrano JJ (2001) Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany* 52(354):1–9.
- Li S, Han X, Yang L, Deng X, Wu H, Zhang M, Liu Y, Zhang S, Xu J (2018) Mitogen-activated protein kinases and calcium-dependent protein kinases are involved in wounding-induced ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* 41(1):134–147.
- Lonardi S, Muñoz-Amatriaín M, Liang Q, Shu S, Wanamaker SI, Lo S, Tanskanen J, Schulman AH, Zhu T, Luo MC *et al* (2019) The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 98(5):767–782.
- Lorenzo O, Chico JM, Sánchez-Serrano JJ, Solano R (2004) JASMONATE-INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16(7):1938–1950.
- Machado RA (2015). The role of soluble sugars and starch in plant-herbivore interactions: signaling and ecological consequences (Doctoral dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena).
- Macho AP and Zipfel C (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular Cell* 54(2):263–272.
- Maiti S, Paul S, Pal A (2012) Isolation, characterization, and structure analysis of a non-TIR-NBS-LRR encoding candidate gene from MYMIV-resistant *Vigna mungo*. *Molecular Biotechnology* 52(3):217–233.

- Maurel C, Boursiac Y, Luu DT, Santoni V, Shahzad Z, Verdoucq L (2015) Aquaporins in Plants. *Physiological Reviews* 95(4):1321–1358.
- McLeay RC and Bailey TL (2010) Motif enrichment analysis: a unified framework and an evaluation on ChIP data. *BMC Bioinformatics* 11:165.
- Miller G, Schlauch K, Tam R, Cortes D, Torres MA, Shulaev V, Dangl JL, Mittler R (2009) The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Science Signaling* 2(84):e45.
- Miozzi L, Napoli C, Sardo L, Accotto GP (2014) Transcriptomics of the interaction between the monopartite phloem-limited geminivirus *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* and *Solanum lycopersicum* highlights a role for plant hormones, autophagy and plant immune system fine tuning during infection. *PloS One* 9(2):e89951.
- Mitsuhara I, Iwai T, Seo S, Yanagawa Y, Kawahigasi H, Hirose S, Ohkawa Y, Ohashi Y (2008) Characteristic expression of twelve rice PR1 family genes in response to pathogen infection, wounding, and defense-related signal compounds (121/180). *Molecular Genetics and Genomics* 279(4):415–427.
- Muñoz-Amatriaín M, Mirebrahim H, Xu P, Wanamaker SI, Luo M, Alhakami H, Alpert M, Atokple I *et al.* (2017) Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 89(5): 1042–1054.
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* 10(7):339–346.
- Néya BJ, Zida PE, Sérémé D, Lund OS, Traoré O (2015) Evaluation of yield losses caused by *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) in 21 cowpea (*Vigna*

- unguiculata* (L.) Walp.) varieties in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 18(7):304-313.
- Nie X, Singh RP, Tai GC (2002) Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses. *Genome* 45(5):905–913.
- Oliveira CRRD, Freire Filho FR, Nogueira MDSDR, Barros, GB, Eiras, M, Ribeiro VQ, Lopes, ÂCDA (2012). Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. *Bragantia* 71(1):59-66.
- Pan J, Zhang M, Kong X, Xing X, Liu Y, Zhou Y, Liu Y, Sun L, Li D (2012) ZmMPK17, a novel maize group D MAP kinase gene, is involved in multiple stress responses. *Planta* 235(4):661–676.
- Park CJ, Kim KJ, Shin R, Park JM, Shin YC, Paek KH (2004) Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 37(2):186–198.
- Patel A, Dey N, Chaudhuri S, Pal A (2017) Molecular and biochemical characterization of a *Vigna mungo* MAP kinase associated with *Mungbean yellow mosaic India virus* infection and deciphering its role in restricting the virus multiplication. *Plant Science* 262:27–140.
- Peng Q, Su Y, Ling H, Ahmad W, Gao S, Guo J, Que Y, Xu L (2017) A sugarcane pathogenesis-related protein, ScPR10, plays a positive role in defense responses under *Sporisorium scitamineum*, SrMV, SA, and MeJA stresses. *Plant Cell Reports* 36(9) :1427–1440.
- Pirone TP (1991) Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. *Semin. Virol* 2:81-87.

- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* (Oxford, England) 26(1):139–140.
- Rocha MM, Lima, JAA, Freire Filho FR, LIMA V (1996) Resistencia de caupi de tegumento branco a algumas estirpes de comovirus, potyvirus e cucumovirus. In Embrapa Meio-Norte-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 4., 1996, Teresina. Resumos. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1996. 100-101 pp.
- Rodrigo G, Carrera J, Ruiz-Ferrer V, del Toro FJ, Llave C, Voinnet O, Elena SF (2012) A meta-analysis reveals the commonalities and differences in *Arabidopsis thaliana* response to different viral pathogens. *PloS One* 7(7): e40526.
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 61:621–649.
- Sade D, Sade N, Shriki O, Lerner S, Gebremedhin A, Karavani A, Brotman Y, Osorio S, Fernie AR, Willmitzer L, Czosnek H, Moshelion M (2014) Water balance, hormone homeostasis, and sugar signaling are all involved in tomato resistance to *Tomato yellow leaf curl virus*. *Plant Physiology* 165(4):1684–1697.
- Sansregret R, Dufour V, Langlois M, Daayf F, Dunoyer P, Voinnet O, Bouarab K. (2013) Extreme resistance as a host counter-counter defense against viral suppression of RNA silencing. *PLoS Pathogens*, 9(6):e1003435.
- Šindelářová MILADA and Šindelář LUDĚK (2005) Isolation of pathogenesis-related proteins from TMV-infected tobacco and their influence on infectivity of TMV. *Plant Protect. Sci* 41:52-57.
- Sonnhammer EL and Östlund G (2015) InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Research* 43: 234–239.

- Suzuki N and Mittler R (2012) Reactive oxygen species-dependent wound responses in animals and plants. *Free Radical Biology & Medicine* 53(12):2269–2276.
- Taurino M, Abelenda JA, Río-Alvarez I, Navarro C, Vicedo B, Farmaki T, Jiménez P, García-Agustín P *et al.* (2014) Jasmonate-dependent modifications of the pectin matrix during potato development function as a defense mechanism targeted by *Dickeya dadantii* virulence factors. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 77(3): 418–429.
- Thimm O, Bläsing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Krüger P, Selbig J, Müller LA *et al.* (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* 37(6): 914–939.
- Tian S, Wang X, Li P, Wang H, Ji H, Xie J, Qiu Q, Shen D, Dong H (2016) Plant Aquaporin AtPIP1;4 links apoplastic H₂O₂ induction to disease immunity pathways. *Plant Physiology* 171(3):1635–1650.
- Torres, MA and Dangl, JL (2005) Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology* 8(4): 397–403.
- Torres MA, Dangl JL, Jones JD (2002) *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(1): 517–522.
- Vandenbussche F, Vaseva I, Vissenberg K, Van Der Straeten D (2012) Ethylene in vegetative development: a tale with a riddle. *The New Phytologist* 194(4):895–909.

- Wasternack C and Kombrink E (2010) Jasmonates: structural requirements for lipid-derived signals active in plant stress responses and development. *ACS Chemical Biology* 5(1):63–77.
- Wasternack C and Song S (2017) Jasmonates: biosynthesis, metabolism, and signaling by proteins activating and repressing transcription. *Journal of Experimental Botany* 68(6):1303–1321.
- Wen RH, Khatabi B, Ashfield T, Saghai Maroof MA, Hajimorad MR (2013) The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent *Soybean mosaic virus* are recognized by different resistance genes at the complex Rsv1 locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26(2): 203–215.
- Whitham SA, Yang C, Goodin MM (2006) Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19(11): 1207–1215.
- Xun H, Yang X, He H, Wang M, Guo P, Wang Y, Pang J, Dong Y, Feng X, Wang S, Liu B (2019) Over-expression of GmKR3, a TIR-NBS-LRR type R gene, confers resistance to multiple viruses in soybean. *Plant Molecular Biology* 99:95–111.
- Yan L, Zhai Q, Wei J, Li S, Wang B, Huang T, Du M, Sun J, Kang L, Li CB, Li C (2013) Role of tomato lipoxygenase D in wound-induced jasmonate biosynthesis and plant immunity to insect herbivores. *PLoS Genetics* 9(12): e1003964.
- Zarembinski TI and Theologis A (1994) Ethylene biosynthesis and action: a case of conservation. *Plant Molecular Biology* 26(5): 1579–1597.
- Zhang C, Lei Y, Lu C, Wang L, Wu J (2020) MYC2, MYC3, and MYC4 function additively in wounding-induced jasmonic acid biosynthesis and catabolism. *Journal of Integrative Plant Biology* 62(8):1159–1175.

- Zorzatto C, Machado JP, Lopes KV, Nascimento KJ, Pereira WA, Brustolini OJ, Reis PA *et al.* (2015). NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* 520(7549):679–682.
- Zúñiga-León E, Carrasco-Navarro U, Fierro F (2018) NeVOmics: an enrichment tool for gene ontology and functional network analysis and visualization of data from omics. *Technologies Genes* 9(12):569.

Materiais Suplementares

Para acessar o material suplementar deste trabalho, acesse o link:
<http://bit.ly/Supplementary-BORGESetal-2019>

Tabela S1. Bibliotecas de RNASeq de feijão-caupi geradas pelo Cowpea Genomics Consortium (CpGC), incluindo tratamentos, tipos de estresse, número de transcritos sequenciados e método de sequenciamento utilizado.

Tabela S2. Anotação Funcional dos quatro conjuntos de ATCs (ATC1hUR, ATC1hDR, ATC16hUR, ATC16hDR) de feijão-caupi em resposta a injúria | inoculação por CABMV e CPSMV com base nos principais bancos de dados públicos.

Tabela S3. Termos GO enriquecidos na categoria Função Molecular (FM) determinados pela ferramenta NeVOmics para as ATCs de feijão-caupi em resposta a injúria | inoculação por CABMV e CPSMV.

Tabela S4 Termos GO enriquecidos na categoria Processos Biológicos (PB) determinados pela ferramenta NeVOmics para as ATCs de feijão-caupi em resposta a injúria | inoculação por CABMV e CPSMV.

Tabela S5. ATCs mapeadas nas vias de resposta a estresse biótico do MapMan para T1h (ATC1hUR e ATC1hDR).

Tabela S6. ATCs codificadoras de genes de defesa e proteínas relacionadas a patogenicidade.

Tabela S7. ATCs participantes das vias de biossíntese do Etileno e Ácido Jasmônico moduladas em resposta a injúria | inoculação por CABMV ou CPSMV.

Tabela S8. Análise de enriquecimento de motivos cis-regulatórios em promotores de genes codificadores de ATCs modulados em feijão-caupi após 1 hora (T1) de aplicação do estresse combinado (injúria mecânica | infecção por CABMV ou CPSMV).

**APÊNDICE B - REPROGRAMAÇÃO DO TRANSCRIPTOMA DE
FEIJÃO-CAUPI DURANTE DOIS DIFERENTES MOMENTOS
FISIOLÓGICOS DO ESTRESSE DE DESIDRATAÇÃO
RADICULAR**

José Ribamar Costa Ferreira-Neto^a; **Artemisa Nazaré Costa Borges^a**; Ana Maria Benko-Iseppon^a

^a Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil.

Autor para correspondência:

Ana Maria Benko-Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Telefone: 55-81-2126-7816; Fax: 55-82-2126-8522; E-mail: ana.iseppon@ufpe.br

RESUMO

O presente trabalho analisou os efeitos da desidratação radicular sobre os mecanismos moleculares e fisiológicos da cultivar Pingo de Ouro de feijão-caupi, tolerante à seca em diferentes tempos [25 min (T25), 75 min (T75) e 150 min (T150)]. Alterações significativas nos parâmetros fisiológicos analisados (taxas fotossintética e de transpiração, concentração intercelular de CO₂ e condutância estomática) foram observadas nos tempos mais avançados (T75 e T150). Dessa forma, escolheu-se os tempos limítrofes de tratamento (T25 e T150) para geração do transcriptoma. Análises indicaram que em T25 já se iniciou uma intensa reprogramação transcricional face à condição imposta. Com base nos dados, os transcriptomas foram definidos como: RD25 - ‘*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*’ e RD150 - ‘*transcriptoma de sinalização, reação e ajuste*’ ao estresse analisado. Além de termos associados à resposta à desidratação, os processos biológicos enriquecidos em T25 (T25 | UR) e T150 (T150 | UR) indicaram termos associados à resposta a estresses bióticos. Tal dado revela uma importante estratégia, pois as plantas são frequentemente sujeitas a combinações complexas de fatores estressantes. No que tange às famílias gênicas induzidas, cerca de 40% apresentam envolvimento em processos de sinalização celular para T25 | UR. Por sua vez T150 | UR compreendeu basicamente fatores de transcrição (TFs), proteínas estruturais, enzimas e transcritos responsivos a hormônios. A análise genômica da ortologia dos loci codificadores de transcritos T25 | UR e T150 | UR indicou elevada conservação entre genomas de Viridiplantae, com destaque para leguminosas. Em relação aos elementos cis-regulatórios (CCREs) enriquecidos, aqueles associados aos TFs C2H2, bZIP e bHLH para T25 | UR e T150 | UR se destacaram, indicando um papel crucial na etapa de percepção e indução da resposta à desidratação. O presente trabalho adiciona informação aos mecanismos moleculares de resposta a um estresse abiótico em feijão-caupi e disponibiliza alvos de forte apelo biotecnológico e com grande potencial para o melhoramento genético da espécie estudada.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, crosstalk, sinalização celular, fatores de transcrição, ROS.

Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa de grande importância, cultivada comumente em solos pobres de áreas quentes e secas onde outros feijões não se adaptam. Apresenta ampla plasticidade fenotípica e desempenho fisiológico robusto sob uma gama de estresses bióticos e abióticos. O Brasil é responsável por 12% da produção mundial dessa cultura (Boukar *et al.*, 2016). Esse país tem dado sua parcela de contribuição para o desenvolvimento científico dessa leguminosa, por meio do *Cowpea Genomics Consortium* (CpGC; antiga rede NordEST de Biotecnologia; <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/vigna/>). Tal consórcio possui significativa disponibilidade de dados moleculares abrangendo a resposta de feijão-caupi a interações bióticas e fatores abióticos. Dentre os transcriptomas disponíveis, destacam-se aqueles oriundos da exposição do acesso Pingo de Ouro – considerado um dos mais tolerantes à seca (Bastos *et al.*, 2011) – a diferentes tempos de desidratação radicular. Tal estresse é componente dos complexos efeitos do déficit hídrico, condição que tende a se tornar mais recorrente devido às perspectivas de aquecimento global (Misra *et al.*, 2014).

Diante de condições estressantes, as plantas devem ser capazes de perceber, processar e traduzir diferentes estímulos em respostas adaptativas. O entendimento das respostas coordenadas pelo organismo envolve uma descrição detalhada dos mecanismos que ocorrem aos níveis celular e molecular. No que tange à seca (ou situações de desidratação radicular), sinais extracelulares são convertidos em sinais intracelulares através da geração de mensageiros secundários que ativam fatores de transcrição, proteínas quinases e outros atores, levando à expressão diferencial de genes específicos, ao acúmulo de produtos gênicos induzidos pelo estresse e, finalmente, à proteção contra o estresse. Uma das formas de estudar e se ter acesso a essas diferentes etapas da adaptação vegetal se dá através de metodologias de transcriptômica, as quais estudam as populações de transcritos produzidos em um dado tecido, num determinado momento e sob um determinado estímulo.

Apesar da importância mencionada acima para o feijão-caupi, dados de ômicas para essa cultura ainda são incipientes quando comparados aos disponíveis para outras leguminosas. Somente no ano de 2019, o genoma de tal espécie foi disponibilizado publicamente (Lonardi *et al.*, 2019). Adicionalmente, *data mining* na base de dados de literatura científica MEDLINE (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) com as *keywords* ‘cowpea AND transcriptome AND stress’ resultou na recuperação de 14 itens. Desses, apenas sete (Führs *et al.*, 2008; Kido *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2016; Zuo *et al.*, 2018; Spriggs *et al.*, 2018; de Jesús-Pires *et al.*, 2019) abordam, realmente, a temática da transcriptômica tendo feijão-caupi como espécie alvo, sendo os trabalhos de Kido *et al.* (2011) e de Jesus-Pires *et al.* (2019) representantes dos esforços do CpGC.

O presente trabalho visa agregar valor aos estudos em ômicas de feijão-caupi sob condições não favoráveis, executando uma análise molecular abrangente de sua resposta quando submetido à desidratação radicular. Para tal, foram escrutinados dois momentos fisiológicos distintos:

- (i) O tratamento inicial abrangeu os primeiros 25 minutos (RD25) após a imposição da desidratação radicular. O conjunto dos dados fisiológicos de RD25, oriundos da análise dos tecidos foliares dos indivíduos estudados, não indicavam que os mesmos estavam sob estresse. O transcriptoma radicular desse tratamento foi interpretado como ‘*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*’ à nova condição imposta;

(ii) O segundo e o terceiro tratamentos abrangeram os intervalos de 75 (RD75) e 150 (RD150) minutos após a imposição da desidratação radicular. Nesses momentos, a maioria dos dados fisiológicos para RD75, além de todos os dados fisiológicos para RD150, indicavam que o acesso estudado estava sob estresse. O transcriptoma do tratamento temporalmente mais abrangente, RD150, foi escrutinado. Esse foi interpretado como '*transcriptoma de sinalização, reação e ajuste*' ao estresse imposto.

Dessa forma, dois níveis de informação (fisiológico e molecular) foram analisados visando gerar um panorama abrangente dos diferentes contextos (percepção, sinalização e reação) de resposta de Pingo de Ouro a uma condição comumente encontrada na natureza e com profundos desdobramentos sociais e econômicos. Os genes e transcritos aqui escrutinados se tornarão alvos de forte apelo biotecnológico e com grande potencial para o melhoramento genético da espécie estudada via uso de Biotecnologia, além de agregar valor informacional à fisiologia molecular de feijão-caupi sob estresse.

2. Material e métodos

2.1 Material biológico, desenho experimental e aplicação de estresse

Sementes de *Vigna unguiculata*, cv. Pingo de Ouro, foram tratadas com 0,05% (w/v) Thiram (tetramethylthiuram disulfide) e germinadas durante dois dias a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura e umidade relativa de $65\% \pm 5\%$. As mudas foram transferidas para um sistema hidropônico (Rodrigues *et al.*, 2012) com solução nutritiva aerada e balanceada com pH 6,6 (Hoagland e Arnon, 1950), em um delineamento experimental em blocos casualizados, com três réplicas biológicas (**Figura Suplementar 1A e 1B.1**). Cada réplica biológica foi composta de dois indivíduos. As plântulas foram colocadas em suportes, de modo que as raízes das mudas ficassem completamente imersas na solução (**Figura Suplementar 1A**). As plântulas foram cultivadas por três semanas (estádio de desenvolvimento V3) em casa de vegetação sob um fotoperíodo natural de aproximadamente 13/11 h ciclo claro/escuro, temperatura de $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa (RH). Após esse período, o tratamento de desidratação radicular foi iniciado retirando a solução nutritiva das plantas tratadas (**Figura Suplementar 1A**). Raízes e folhas foram coletados após 25 min (tratamento RD25), 75 min (tratamento RD75) e 150 min (tratamento RD150) após a remoção da solução (**Figura Suplementar 1B.1**). Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração do RNA. Para cada período de tempo, as respectivas plantas controle (**Figura Suplementar 1B.1**) foram mantidas na solução nutritiva em ambiente separado e coletadas no mesmo período.

2.2 Análise fisiológica

Os efeitos fisiológicos dos tratamentos foram monitorados em termos de taxa fotossintética (A), condutância estomática (g_s), concentração intercelular de CO_2 (C_i), taxa de transpiração (E), e déficit de pressão de vapor na folha (VpdL). Os dados foram coletados usando duas plantas de cada réplica biológica nos diferentes períodos de tratamento (RD25, RD75 e RD150) e nas respectivas condições controle (**Figura Suplementar 1B.1**). Todas as medições foram realizadas na quarta folha completamente expandida a partir do ápice, usando um sistema LI-COR, modelo LI-6400 ajustado a uma intensidade de luz de $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Martins *et al.*, 2008; Rodrigues *et al.*, 2012). A ANOVA dos dados fisiológicos foi gerada utilizando o

programa SAS, comparando os efeitos dos tratamentos dentro da cultivar. Os desvios-padrão foram calculados a partir de três réplicas biológicas. Para avaliar o efeito do tratamento de desidratação radicular, foi aplicado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para comparar as trocas gasosas de Pingo de Ouro sob condições de controle e tratamento. Adicionalmente, a resposta das plantas ao tratamento de desidratação radicular ao longo de cada ponto de coleta também foi analisada isoladamente.

2.3 Bibliotecas de RNA-Seq: síntese e sequenciamento

O RNA usado foi oriundo das plantas utilizadas nas análises fisiológicas, sendo isolado por meio do kit ‘SV Total RNA Isolation System’ (Promega, USA), seguindo-se protocolo do fabricante. A concentração e a qualidade do RNA total extraído foram avaliadas em gel de Agarose (1,5% p/v) e com o ‘Agilent 2100 Bioanalyzer’ (Agilent Technologies, EUA). Apenas amostras com RNA integrity number (RIN) ≥ 8.0 foram sequenciadas. Um kit ‘RNAm TruSeq® Stranded LT-Set A’ (RS-122-2101) (Illumina, San Diego, CA, EUA) foi empregado na purificação do RNA mensageiro e construção de bibliotecas de cDNA de acordo com as instruções do fabricante. *Reads paired-end*, com extensão de 100 pb, foram geradas via sistema Illumina HiSeq 2500, empregando-se os seguintes kits: ‘HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2’ (PE-402-4002); ‘SBS Kit v2’ (200 Cycle; FC-402-4021); e ‘TruSeq® Stranded mRNA LT - Set A’ (RS-122-2101), pelo Centro de Genômica Funcional, da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil).

Foram sintetizadas 12 bibliotecas abrangendo as réplicas biológicas de RD25 | Cont.25 e RD150 | Cont.150 (**Figura Suplementar 1B.2**), sequenciadas em duplicatas técnicas, gerando um total de 24 bibliotecas sequenciadas.

2.4 Bibliotecas de RNA-Seq: montagem e análise de expressão diferencial

As 24 bibliotecas RNA-Seq sequenciadas para o ensaio de desidratação radicular foram montadas juntamente com outras 24 bibliotecas RNA-Seq de feijão-caupi disponíveis no banco de dados do CpGC [24 oriundas de ensaios de transcriptômica de feijão-caupi submetido à inoculação viral por *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV); e outras 24 oriundas da inoculação dessa cultura por *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV)]. Tal montagem conjunta permitiu a obtenção de transcritos maiores e mais robustos. Setenta e duas réplicas (12 réplicas biológicas para desidratação radicular + 12 réplicas biológicas para CABMV + 12 réplicas biológicas para CPSMV, com duas réplicas técnicas cada) foram submetidas ao pipeline RNA-Seq do GenPipes (Bourgey *et al.*, 2019; <https://bitbucket.org/mugqic/genpipes/src/master/>). Abaixo, são apresentados, resumidamente, os passos executados pelo referido pipeline.

As métricas de qualidade das *reads* foram acessadas utilizando o software RNA-SeQC v1.1.8 (Deluca *et al.*, 2012). O pacote Trimmomatic v0.36 foi utilizado para remoção dos adaptadores e de sequências de baixa qualidade (Bolger *et al.*, 2014). As *reads* foram trimadas na extremidade 3' para se obter sequências com um phred score ≥ 30 . Os adaptadores do sequenciamento Illumina foram removidos das *reads* e todas as *reads* foram selecionadas para ter um comprimento de pelo menos 32 bp.

Em seguida, o software STAR v3.5.3a (Dobin *et al.*, 2013) foi utilizado para o mapeamento das *reads* contra o genoma de referência disponível para *Vigna unguiculata* v1.1 (Lonardi *et al.*, 2019), alocado no Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>), mantendo-se aquelas que não foram mapeadas. O software Picard v2.9, por sua vez, foi usado para mascarar as duplicatas sem removê-las, considerando pontuação (score) por qualidade das bases (Van der Auwera *et al.*, 2013), enquanto os transcritos foram montados com o pacote Cufflinks

v2.2.1. Toda análise de expressão diferencial foi feita de forma independente para cada ensaio (desidratação radicular; CABMV; CPSMV).

A partir do GenPipes, a análise de expressão diferencial para cada um dos tempos de desidratação radicular aplicado foi realizada contra seu respectivo controle, usando-se o software Cuffdiff (Trapnell *et al.*, 2013), seguido da normalização com o Cuffnorm (Trapnell *et al.*, 2013). Foram considerados diferencialmente expressos transcritos que apresentaram $\text{Log}_2\text{FC} \geq 1,0$ ou $\leq -1,0$, $p < 0,05$ e $\text{FDR} < 0,05$. Ao longo do trabalho, o contraste de expressão ou de dados fisiológicos para ‘RD25 vs Cont.25’ foi denominado de **T25**; o mesmo aplicou-se para ‘RD150 vs Cont.150’ foi denominado de **T150**.

Os gráficos de PCA (*Principal Component Analysis*) foram gerados com valores de Log_2CPM , para analisar os perfis transcricionais das bibliotecas (controles e tratadas) do ensaio de desidratação radicular. O seguinte comando foi usado:

2.5 Submissões dos dados de RNA-Seq

Os dados de RNA-Seq do presente estudo foram submetidos ao NCBI BioProject (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/>), e os números de acesso são os seguintes:

Root dehydration | Submission ID: SUB6876291

Root dehydration | BioProject ID: PRJNA605156

Root dehydration | BioSample ID: SAMN14051116

Mechanical injury + CABMV | Submission ID: a adicionar

Mechanical injury + CABMV | BioProject ID: a adicionar

Mechanical injury + CABMV | BioSample ID: a adicionar

Mechanical injury + CPSMV | Submission ID: a adicionar

Mechanical injury + CPSMV | BioProject ID: a adicionar

Mechanical injury + CPSMV | BioSample ID: a adicionar

2.6 Análise de enriquecimento de famílias gênicas

A análise de enriquecimento de famílias gênicas foi executada por meio da plataforma web GenFam (<http://mandadilab.webfactional.com/home/>) (Bedre e Mandadi, 2019). Essa plataforma é uma ferramenta abrangente de análise de classificação e enriquecimento para o genoma de plantas alocadas no banco de dados Phytozome (Phytozome v12.0). Como um teste *default*, o GenFam fornece o teste exato de Fisher ($p < 0,05$), que depende da proporção dos dados observados, em vez de no valor de uma estatística de teste para estimar a probabilidade de genes de interesse correspondentes a uma categoria específica. Para endereçar o falso positivo resultante de múltiplas comparações, especialmente quando a lista de input de genes é muito grande (>1000), o GenFam subsequentemente emprega a correção da taxa de falsa descoberta ($\text{FDR} < 0,05$; no caso predefinido, obtida pelo método de Bonferroni). O genoma do feijão-caupi foi usado como um background do banco de dados das famílias gênicas.

2.7 Análise de enriquecimento de ontologia gênica

Para a análise proposta, usou-se a ferramenta NeVOmics (Network-based Visualization for Omics; Zúñiga-León *et al.*, 2018), que identifica termos GO relacionados a Processos Biológicos estatisticamente super-representados (enriquecidos) em um determinado conjunto de genes/proteínas.

O NeVOmics adota o algoritmo estatístico ‘GeneMerge’ para identificar as funções ou categorias super-representadas no conjunto de dados analisado. Uma

distribuição hipergeométrica (no presente caso, $p < 0,05$) e uma correção de FDR (no presente caso, $FDR < 0,05$) foram aplicadas para identificar as anotações de função estatisticamente mais representadas. O transcriptoma total de T25 e T150 foram usados como *background* nas análises de enriquecimento executadas pelo NeVOmics para os respectivos tratamentos. O NeVOmics usa um arquivo de entrada em texto sem formatação, contendo uma lista de genes (ID do KEGG) ou proteínas (ID do UniProt) obtidos pela abordagem ômica. Devido ao reduzido número (48364 / 92, unreviewed / reviewed – Junho | 2020) de proteínas anotadas para *Vigna unguiculata* na base de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>), usou-se a anotação de seus ortólogos em *Arabidopsis thaliana*. Tal espécie é detentora de um volume de dados muito mais abundante (163877, unreviewed – Junho | 2020) na base de dados mencionada, além de apresentar o melhor índice de curadoria da informação (16181, reviewed – Junho | 2020) entre todas as plantas com sequências depositadas na referida base. Para obtenção do UniProt IDs de *A. thaliana*, usou-se o arquivo ‘Vunguiculata_469_v1.1.annotation_info’ para recuperar a coluna ‘Best-hit-arabi-name’ que contém a anotação do respectivo homólogo da Brassicaceae mencionada. Os ortólogos foram identificados segundo as ações do item 2.9. Posteriormente, os respectivos UniProt IDs dos ortólogos curados foram recuperados na base de dados The Arabidopsis Information Resource (<https://www.arabidopsis.org/tools/bulk/protein/index.jsp>).

2.8 Análise in silico de vias metabólicas

Estudos *in silico* da dinâmica transcricional do metabolismo de Pingo de Ouro sob desidratação radicular foram executados a partir de dados conjuntos obtidos de bibliotecas RNA-Seq do presente trabalho combinadas com os diagramas de mapas metabólicos do banco de dados KEGG Pathway. Para tal, usou-se o arquivo ‘Vunguiculata_469_v1.1.annotation_info’, do banco de dados Phytozome, para recuperar o KO (KEGG Orthology) identifier para cada transcrito induzido nos diferentes tempos de tratamentos estudados. A modulação do transcrito foi associada a seu respectivo KO e tal expressão foi mapeada nas vias metabólicas pela ferramenta ‘KEGG Mapper-Search & Color Pathway’ (https://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html).

2.9 Análise de ortologia

Para a detecção de ortologia entre as partes analisadas, utilizou-se informações já contidas na base de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>). Na seção PhytoMine (*an InterMine interface to data from Phytozome*), foi criada uma query em forma de lista com as identidades dos genes a serem analisados em relação aos 93 genomas montados e anotados de 82 espécies de Viridiplantae. O resultado é oriundo de ações do software InParanoid (Sonnhammer e Östlund, 2015). Esse programa usa os valores de similaridade *pairwise*, calculados usando o NCBI-BLAST entre dois proteomas completos para a construção de grupos ortólogos. Um grupo de ortologia é inicialmente composto por duas pseudo *seeds* ortólogas que são encontradas pelo melhor hit recíproco entre dois proteomas. Mais sequências são adicionadas ao grupo se existirem sequências nos dois proteomas que estão mais próximas da *seed* ortóloga correspondente do que de qualquer sequência no outro proteoma. Esses membros de um grupo ortólogo são chamados *inparalogs*. Um valor de confiança é fornecido para cada *inparalog* que mostra o quão proximamente relacionado é à sua *seed* ortóloga.

2.10 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos

Sequências de regiões promotoras (1.0 kb) dos genes codificadores das isoformas presentes em T25 | UR e T150 | UR foram obtidas junto ao banco de dados

Phytozome v.12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), via API (*Application Programming Interface*) disponibilizado pelo referido banco. Os motivos (elementos cis-reguladores candidatos, ou CCRES) em cada promotor, foram minerados via software MEME v5.0.3 (Bailey e Elkan 1994; <http://meme-suite.org/tools/meme>). Para cada motivo identificado, o software reporta um *e-value* correspondente. No presente trabalho, adotou-se um *e-value* $< 10^{-2}$ como um ponto de corte para a caracterização de *bona fide* CCRES. O número máximo de motivos analisados no presente estudo foi 10. Esses continham entre seis e 50 nucleotídeos de extensão. A linha de comando usada é mostrada abaixo:

- `meme (file name) -dna -oc . -nostatus -time 18000 -mod anr -nmotifs 10 -minw 6 -maxw 50 -objfun classic -revcomp -markov_order 0.`

Após a análise do software MEME, o software TomTom v4.11.2 (Gupta *et al.* 2007; <http://meme-suite.org/tools/tomtom>) foi usado acoplado ao banco de dados JASPAR (file: JASPAR2018_CORE_plants_non-redundant), visando designar um determinado fator de transcrição aos *bona fide* CCRES minerados. Tal software alinha dos CCRES ainda anônimos, resultantes da análise via MEME, contra um banco de dados (JASPAR) de motivos anotados. Esses alinhamentos são avaliados por meio dos seguintes critérios estatísticos: *p-value* (cut-off $< 10^{-2}$) e *q-value* (*false discovery rate*, FDR cut-off $< 10^{-2}$). Neste trabalho, as identidades associadas aos *bona fide* CCRES foram relacionadas ao melhor alinhamento obtido (*best hit*). A linha de comando usada é mostrada abaixo:

- `tomtom -no-ssc -oc . -verbosity 1 -min-overlap 5 -mi 1 -dist pearson -evaluate -thresh 10.0 query_motifs db/JASPAR/JASPAR2018_CORE_plants_non-redundant.meme`

3. Resultados

3.1 Fisiologia do cultivar Pingo de Ouro sob desidratação radicular

Em RD25, as plantas de Pingo de Ouro não apresentaram diferenças significativas em relação às respectivas plantas controle. As principais alterações na maioria dos parâmetros fisiológicos foram observadas em RD75. A taxa fotossintética (**Figura 1A**), taxa de transpiração (**Figura 1B**), condutância estomática (**Figura 1C**) e déficit de pressão de vapor na folha (**Figura 1E**) foram significativamente reduzidos neste tratamento. Para RD150, soma-se a todos os parâmetros mencionados anteriormente o aumento significativo da concentração intercelular de CO₂ (**Figura 1D**). Por fim, considerando a temperatura ambiente, a temperatura das folhas não aumentou significativamente (dados não mostrados), mesmo nas condições mais severas (RD150).

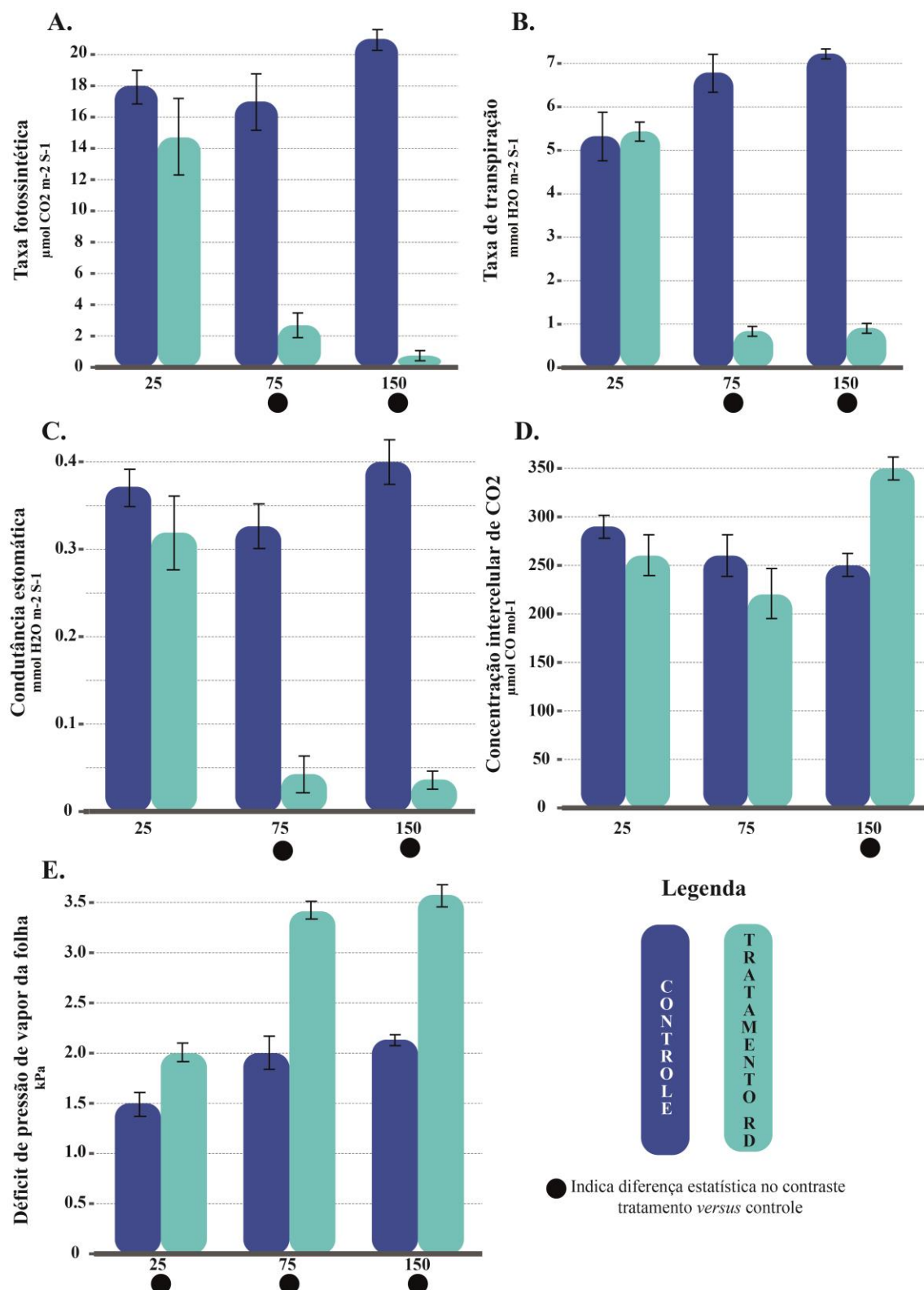


Figura 1. Parâmetros fisiológicos de feijão-caupi (estudo de trocas gasosas) nos tratamentos estudados [RD25 (folhas coletadas 25 min após a remoção da solução hidropônica); RD75 (folhas coletadas após 75 min após a remoção da solução hidropônica); RD150 (folhas coletadas após 150 min após a remoção da solução hidropônica)] e seus respectivos controles [Control25 (controle do tratamento RD25); Control75 (controle do tratamento RD75); Control150 (controle do tratamento RD150)]: **A.** Taxa fotossintética; **B.** Taxa de transpiração; **C.** Condutância estomática; **D.** Concentração intracelular de CO_2 ; **E.** Déficit de pressão de vapor na folha (kPa). **Legenda:** RD (Desidratação Radicular).

3.2 Transcriptômica

a. Análise descritiva exploratória dos dados de expressão gênica: revelando as diferenças entre T25 e T150

Estudou-se o efeito da desidratação radicular nos transcriptomas do acesso tolerante em dois contrastes distintos: T25 e T150. Tal escolha se baseou nos dados fisiológicos do ensaio (**Figura 1A, 1B, 1C, 1D e 1E**), os quais demonstraram que somente a partir do tratamento de 75 minutos (RD75) a cv. Pingo de Ouro foi impactada pelo estresse aplicado. Dessa forma, escolheu-se tempos extremos de tratamento para comparação de sua orquestração transcricional, denominando-se:

- RD25, como ‘*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*’ ao estresse aplicado;
- RD150, como ‘*transcriptoma de sinalização, reação e ajuste*’ à mencionada condição.

As diferenças fisiológicas em RD25 e RD150 são reverberadas molecularmente nos respectivos transcriptomas. Isso pode ser visto na PCA (*Principal Component Analysis*) apresentada na **Figura 2** que apresenta três grandes blocos: um com as amostras controle (Cont.25 e Cont.150) e dois independentes com os respectivos tratamentos (RD25 e RD150), em posições extremas no plano cartesiano.

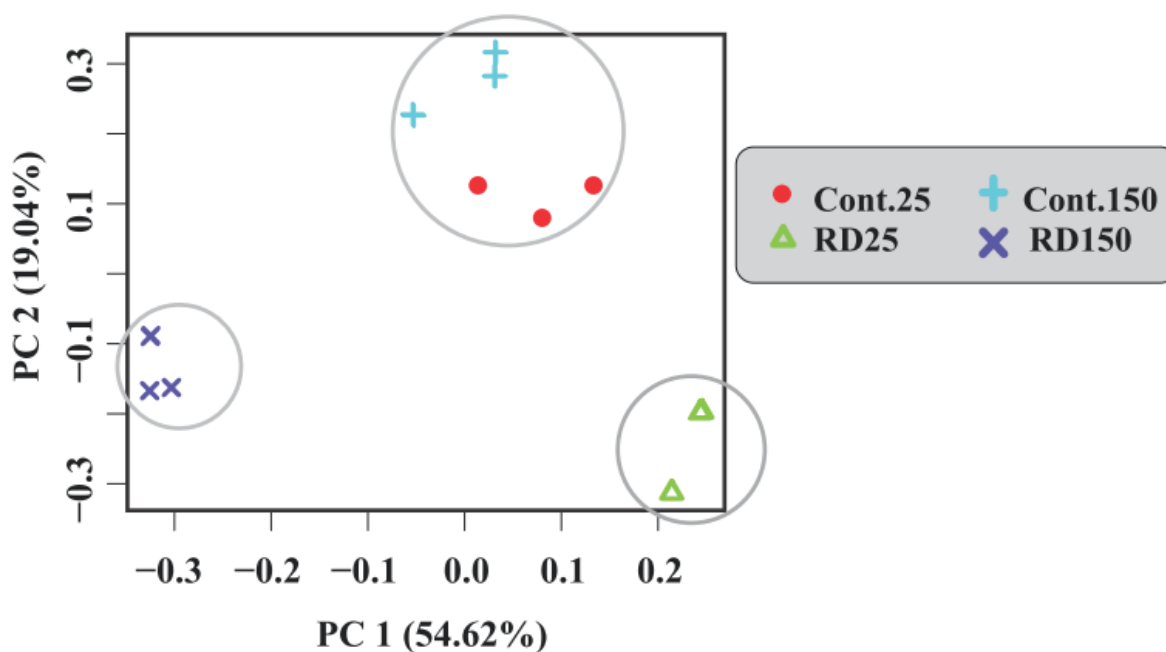


Figura 2. PCA (*Principal Component Analysis*) para bibliotecas RNA-Seq controle (Cont.25 e Cont.150) e tratamento (RD25 e RD150) estudadas. Cada elemento plotado no gráfico PCA representa uma réplica biológica. Os círculos cinzentos agrupam amostras semelhantes. Destaca-se que em RD25 há 3 triângulos verdes, porém dois muito próximos e quase sobrepostos. **Legenda:** RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle).

O gráfico PCA de expressão gênica fornece um mapa das distâncias entre amostras a partir das quais as características dos dados de RNA-Seq (perfis transcricionais) podem ser inferidas. Essa análise foi capaz de explicar 73,66% de toda a variação nos dados, considerando os dois eixos principais (PC1 e PC2). Um claro efeito dependente do tempo na regulação gênica foi observado no primeiro componente principal (PC1), explicando 54,62% da variação da amostra; enquanto que o estresse aplicado explica 19,04% da variação observada.

b. T25 vs T150: regulação exclusiva ou compartilhada das isoformas nos tratamentos

A **Figura 2** revelou que tratamentos e controles tem um perfil transcricional distinto. Entretanto, eles podem apresentar membros conservados cuja modulação pode diferir. Com a análise a seguir, visa-se constatar as similaridades e especificidades entre transcriptomas analisados. Para T25, 1527 isoformas apresentaram expressão diferencial (DE), sendo 991 induzidas (*up-regulated* ou UR) e 536 reprimidas (*down-regulated* ou DR) (**Figura 3A**). Tal resultado indica que apesar das plantas não se encontrarem sob estresse pelos dados fisiológicos (ver **item 3.1**), a cultivar tolerante percebe a nova condição imposta e inicia um processo de reorganização molecular interna, alterando a regulação transcricional de componentes de seu transcriptoma controle. Para T150, 1532 isoformas apresentaram DE, sendo 855 induzidas e 677 reprimidas (**Figura 3A**), as quais estão sendo moduladas no âmbito do estresse refletido pelos dados fisiológicos.

Apesar dos quantitativos semelhantes acima apresentados, a diferença dos momentos fisiológicos amostrados (**item 3.1**) é reverberada nos transcriptomas obtidos. Dividindo-se as isoformas em conjuntos formados de acordo com sua regulação (25 | UR, 150 | UR, 25 | DR, 150 | DR; **Figura 3A**), percebe-se que os transcriptomas de T25 e T150 apresentaram características regulatórias bastante distintas. Cerca de 63% das isoformas presentes e induzidas em T25 o são somente nesse tratamento (**Figura 3A**). Adicionalmente, os dados da análise de conjuntos (**Figura 3A**) nos indicam que essas isoformas não são constituintes do conjunto de isoformas diferencialmente expressas (UR + DR) do T150, tornando-as exclusivamente induzidas em T25. Soma-se a isso o fato de que 30% das isoformas UR em T25 tornam-se DR em T150, significando que 93% (63% + 30%) das isoformas UR em T25 o são somente nesse tempo de tratamento (**Figura 3A**). Apenas cerca de 7% das isoformas induzidas se mantém dessa forma em T25 e T150 (**Figura 3A**), sugerindo a intrínseca relação desse subgrupo de isoformas com a resposta duradoura ao estresse de desidratação na cultivar estudada.

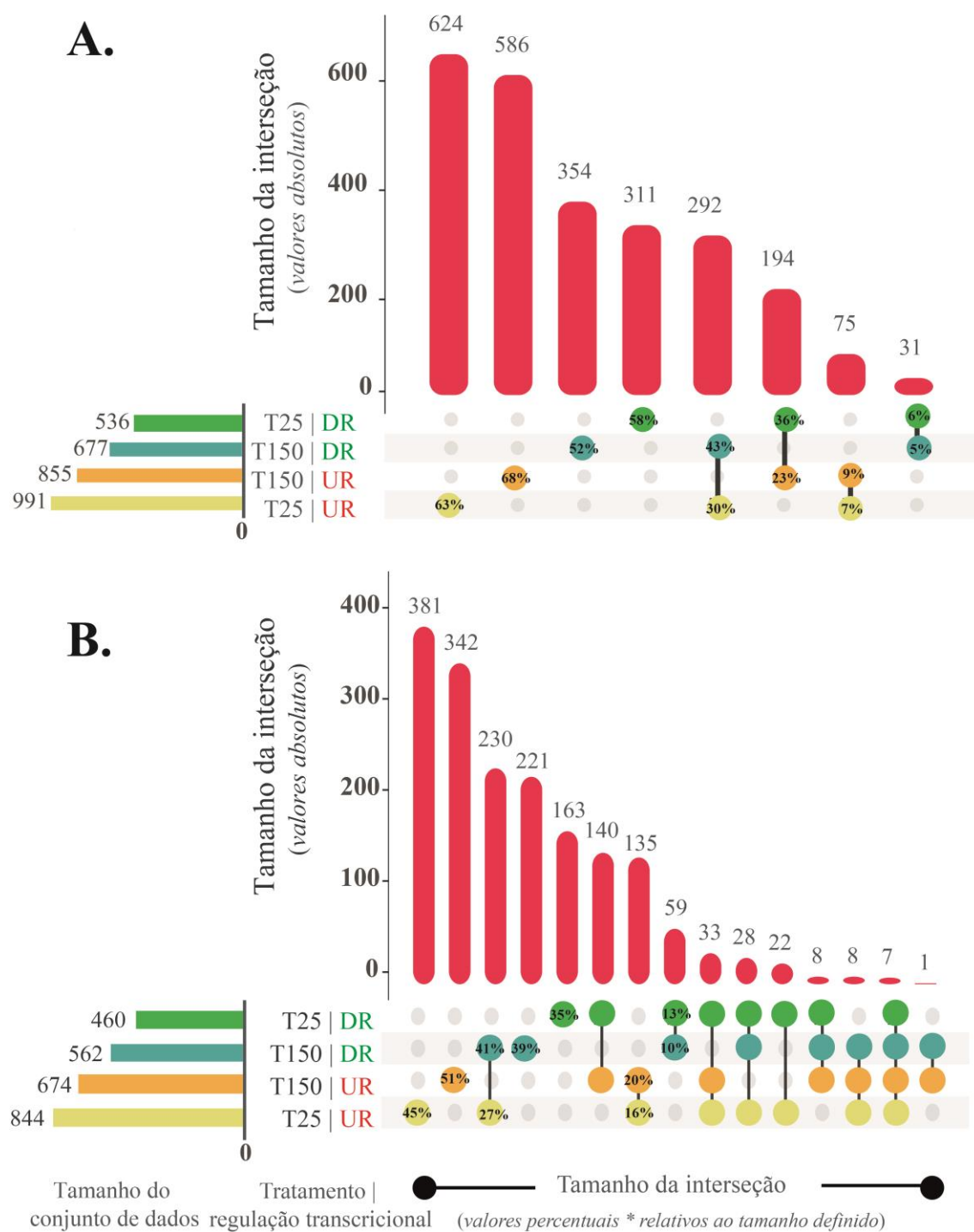


Figura 3. Caracterização da expressão diferencial dos transcriptomas (T25 e T150) de Pingo de Ouro, a partir da análise das isoformas expressas ‘A.’, bem como dos loci que as codificam ‘B.’, usando-se teoria de conjuntos. **Legenda:** T25 (‘RD25 vs Cont.25’); T150 (‘RD150 vs Cont.150’); UR: up-regulated; DR: down-regulated; RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle).

No que tange à repressão transcricional, também cerca de 94% (58% + 36%) são reprimidas apenas em T25 (**Figura 3A**). Apenas cerca de 6% das isoformas reprimidas se mantêm dessa forma em T25 e T150 (**Figura 3A**). Esses dados, somados aos relatados acima, revelam uma clara diferença entre o ‘*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*’ e o ‘*transcriptoma de sinalização, reação e ajuste*’ da cv. Pingo de Ouro sob desidratação radicular.

Quando as análises se centram na identidade dos genes (loci) codificadores das isoformas diferencialmente expressas, observa-se que o índice de especificidade decresce fortemente: cerca de 45% dos loci ancoram isoformas presentes ou induzidas somente em T25 (**Figura 3B**). Agrega-se a essa informação o fato de que 27% dos genes ancoradores de isoformas induzidas em T25, passam a ancorar isoformas reprimidas em T150. No cômputo final, tem-se 72% de loci induzidos apenas em T25. Em se tratando de reprimidos, no cômputo geral, tem-se que 77% dos loci são reprimidos apenas em T25. No que tange às similaridades, cerca de 13 e 16% dos loci analisados foram reprimidos ou induzidos em ambos os tempos de tratamento.

c. T25 | UR vs T150 | UR: caracterização funcional por meio de análise de enriquecimento de termos GO

Uma vez que a melhor abordagem para a caracterização das diferenças entre os transcriptomas de T25 e T150 se baseia no estudo das isoformas expressas [em detrimento de seus loci codificadores (veja seção 3.2 ‘item b’)], executou-se a análise de enriquecimento de termos GO dessas, visando sua potencial caracterização funcional. Para tal, os conjuntos de isoformas foram categorizados de acordo com o item anterior (**Figura 3A, 3B**). Os mecanismos implementados pela cultivar tolerante nos tempos de tratamento estudados foram visualizados e entendidos por meio do escrutínio dos processos biológicos enriquecidos (**Figura 4 e Figura 5**).

Em relação ao dueto ‘T25 | UR’ (**Figura 4**), observou-se que houve enriquecimento de seis termos GO [*‘defense response (DRe)’*, *‘cytoplasmatic translation (CT)’*, *‘response to oxidative stress (RO)’*, *‘response to chitin (RCh)’*, *‘response to salt stress (RS)’*, *‘response to cadmium ion (RCa)’*] (**Figura 4**).

Para o dueto ‘T150 | UR’, encontrou-se oito termos GO enriquecidos [*‘defense response (DRe)’*, *‘defense response to bacterium (DRb)’*, *‘response to wounding (RWo)’*, *‘indole glucosinate metabolic process (IG)’*, *‘glutathione metabolic process (GM)’*, *‘toxin catabolic process (TC)’*, *‘response to salt stress (RS)’*, e *‘response to water deprivation (RWa)’*] (**Figura 5**).

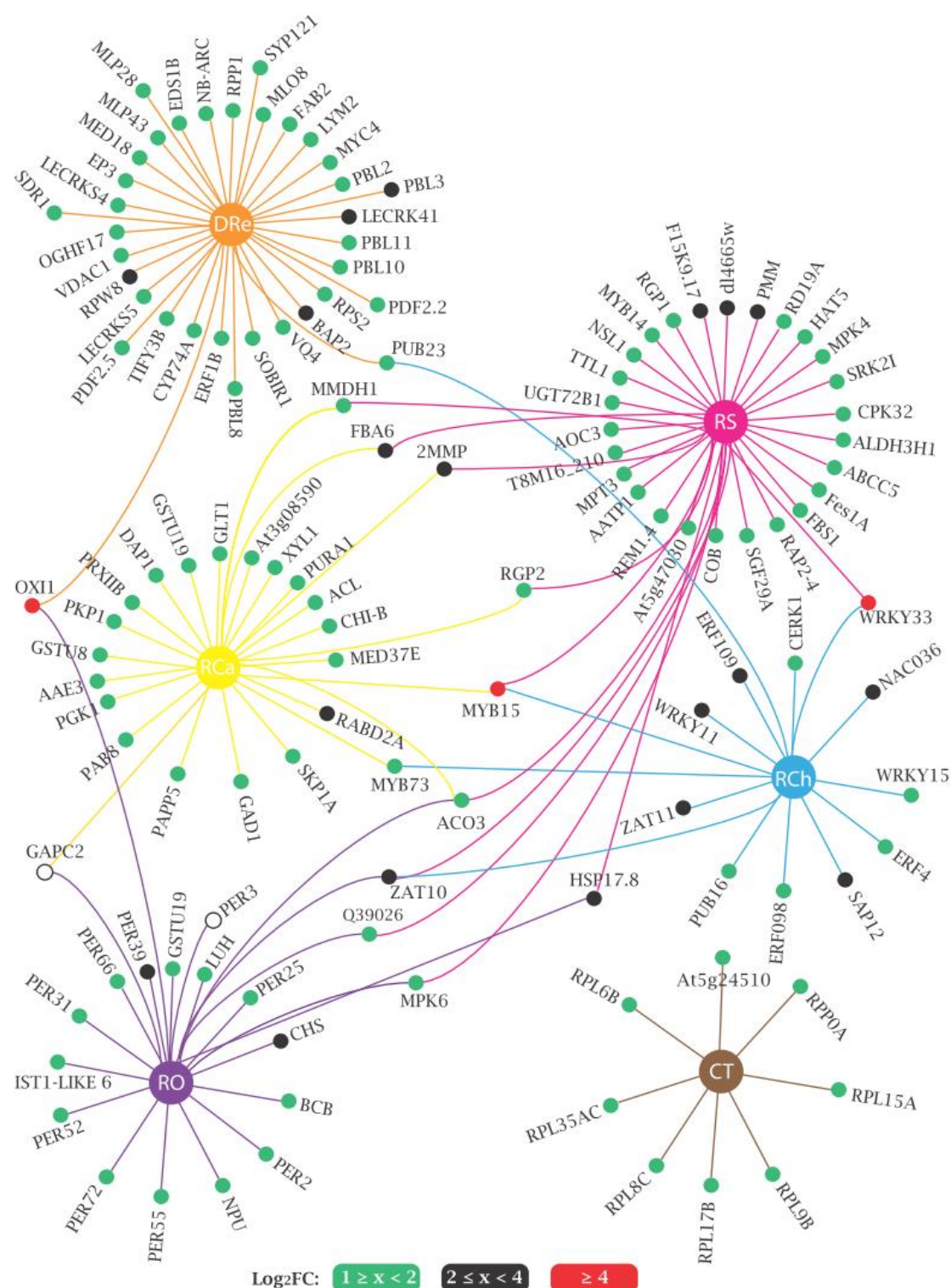


Figura 4. Processos biológicos enriquecidos para transcritos induzidos em T25 (T25 | UR), evidenciando a rede de interação (linhas coloridas) dos elementos associados (proteínas). Os pontos coloridos (verde, preto e vermelho) nos acrônimos proteicos (segundo seus nomes ortólogos de *Arabidopsis*) correspondem ao *fold-change* (Log2FC) encontrado no presente estudo e estão de acordo com a escala apresentada. As cores das linhas estão associadas às cores dos nós centrais que contêm a abreviação do processo biológico enriquecido. Diferentes linhas coloridas conectadas a uma determinada proteína (pontos coloridos) indicam que essa proteína participa de diferentes processos enriquecidos. **Legenda:** T25 ('RD25 vs Cont.25'); Termos GO enriquecidos (DRe: defense response; RS: response to salt stress; RCa: response to cadmium ion; RCh: response to chitin; RO: response to oxidative stress; CT: cytoplasmic translation); RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle); UR (*up-regulated* ou induzido) Adaptado do *output* da ferramenta NeVOmics.

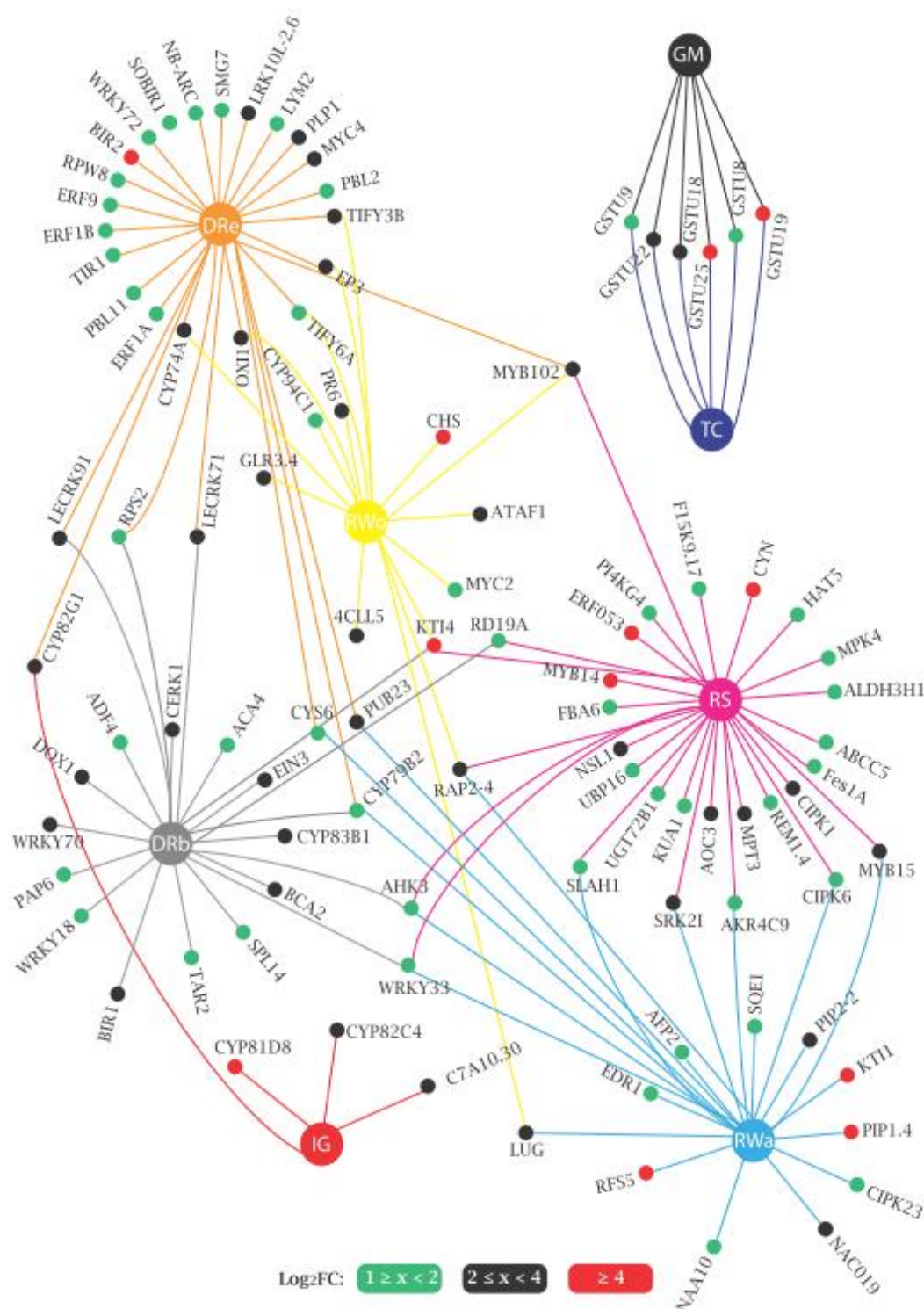


Figura 5. Processos biológicos enriquecidos para transcritos induzidos em T150 (T150 | UR), evidenciando a rede de interação (linhas coloridas) dos elementos associados (proteínas). Os pontos coloridos (verde, preto e vermelho) nos acrônimos proteicos (segundo seus nomes ortólogos de *Arabidopsis*) correspondem ao *fold-change* (Log2FC) encontrado no presente estudo e estão de acordo com a escala apresentada. As cores das linhas estão associadas às cores dos nós centrais que contêm a abreviação do processo biológico enriquecido. Diferentes linhas coloridas conectadas a uma determinada proteína (pontos coloridos) indicam que essa proteína participa de diferentes processos enriquecidos. **Legenda:** T150 ('RD150 vs Cont.150'); Termos GO enriquecidos (DRe: defense response; DRb: defense response to bacterium; RS: response to salt stress; GM: glutathione metabolic process; IG: indole glucosinolate metabolic process; TC: toxin catabolic process; RWo: response to wounding; RWa: response to water deprivation; RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle); UR (*up-regulated* ou induzido) Adaptado do *output* da ferramenta NeVOmics.

É válido ressaltar a presença dos termos enriquecidos ‘*response to chitin* (RCh)’ (T25 | UR), ‘*defense response* (DRe)’ (T25 | UR e T150 | UR) e ‘*defense response to bacterium* (DRb)’ (T150 | UR) (**Figura 4** e **Figura 5**). Tal dado sugere a ativa participação na percepção e sinalização do estresse aqui estudado, bem como na reorganização molecular de Pingo de Ouro, de elementos e processos associados à resposta a estresses bióticos. Os elementos constituintes desses termos enriquecidos são bastante diversos, encontrando-se: fatores de transcrição (ex: família ERF: ERF9, ERF109 e ERF1B; família MYC: MYC4; família WRKY: WRKY15, WRKY18, WRKY33, WRKY70; etc.); peptídeos antimicrobianos (ex: Defensinas - PDF2.5 e PDF2.2); quinases (ex: PBL2, PBL3, OXI1, PBL11, etc.); *LRR-receptor-like kinase* (ex: BIR2); codificantes de proteínas de resistência a doenças (ex: RPW8, RPP1, RPS2, NB-ARC), dentre outros (**Figura 4** e **Figura 5**).

A redundância do enriquecimento do termo GO ‘*response to salt stress* (RS)’ (**Figura 4** e **Figura 5**) sugere que, em T25 | UR e T150 | UR, a cultivar tolerante apresenta seu metabolismo iônico e/ou osmótico perturbado. Tal termo é composto por elementos associados à sinalização, como quinases (ex: CPK32, SRK2I, MPK6, MPK4, AHK3, PI4KG4), fatores de transcrição (ex: RAP2.4, WRKY33, MYB15 e MYB14), dentre outros. A perturbação iônica, em T25, também é refletida pelo enriquecimento do termo ‘*response to cadmium ion* (RCa)’ (**Figura 4**), um metal que figura entre os mais fitotóxicos. Apesar de tal íon não constar na composição da solução de micronutrientes de Hoagland e Arno (1950), um conjunto de transcritos codificadores - dentre outras moléculas - de enzimas (ex: GSTU8, GSTU19, GLT1, etc.) e fatores de transcrição (ex: MYB73, MYB15), cuja ontologia gênica indica participação no metabolismo de cádmio, foi implementado na resposta da cultivar estudada. Isso sugere que uma cascata de eventos semelhantes aos ocasionados pela exposição de vegetais ao cádmio, foi executada pelas plantas sob desidratação radicular.

Por fim, o último termo GO biologicamente informativo enriquecido para T25 | UR foi ‘*response to oxidative stress* (RO)’ (**Figura 4**). Este termo abrange por definição ‘qualquer processo que resulte em uma mudança no estado ou na atividade de uma célula ou organismo como resultado do estresse oxidativo, um estado geralmente resultante da exposição a altos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS)’ (<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/GTerm?id=GO:0006979>). Isto sugere que, já no tempo de tratamento inicial, as plantas se encontravam sob o impacto de ROS (Espécies Reativas de Oxigênio - *Reactive Oxygen Species*) e implementaram mecanismos para processá-las. Esse fato pode ser evidenciado através da análise dos elementos componentes do termo enriquecido. Enzimas antioxidantes, como peroxidases (ex: PER3, PER25, PER2, PER75, PER52, PER72, PER31, PER66 e PER39) e *glutathione transferases* (ex: GSTU19), além de enzimas sintetizadoras de metabólitos antioxidantes (ex: CHS, uma enzima chave da via de biossíntese de flavonoides/isoflavonoides), são as principais representantes (**Figura 4**).

No que tange a T150 | UR, os dados fisiológicos indicaram que os indivíduos estavam sob estresse de desidratação radicular, devido a alterações em diversas taxas analisadas (**Figura 1A, 1B, 1C, 1D e 1E**). A condição estressante também é refletida em nível molecular, uma vez que o termo GO ‘*response to water deprivation* (RWa)’ foi enriquecido (**Figura 5**). Proteínas estruturais como aquaporinas (ex: PIP2-2, PIP1.4), fatores de transcrição (ex: RAP2.4, WRKY33, MYB15, NAC019, etc.), proteínas participantes de processos de sinalização (ex: SRK2I, CIPK6, AHK3, EDR1) e enzimas metabólicas (ex: RFS5, SQE, CYP79B2, etc.) são elementos componentes do referido termo (**Figura 5**).

Ainda em T150 | UR, observou-se o enriquecimento do termo ‘*indole glucosinate metabolic process* (IG)’ (**Figura 5**). Esse termo abrange ‘as reações químicas e vias que resultam na formação de indole glucosinolates’

(<https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0042343>). Os elementos que compõem o termo ‘IG’ são compostos, basicamente, por *Cytochrome P450 monooxygenases* (ex: C7A10.30, CYP82G1 e CYP81D8) (**Figura 5**).

O estresse oxidativo, por sua vez, ainda se apresenta como um importante subproduto da condição aqui analisada, uma vez que o termo ‘*glutathione metabolic process (GM)*’ se apresentou enriquecido em T150 | UR (**Figura 5**). *Glutathione* é um importante tiol antioxidante e também um limpador de compostos eletrofílicos reativos, marcando compostos eletrofílicos para remoção durante o estresse oxidativo (Martínez-Ballesta *et al.*, 2015). A superfamília *glutathione S-transferase* (ex: GSTU22, GSTU18, GSTU9, GSTU25, GSTU8, GSTU19; **Figura 5**), que catalisam a conjugação de *glutathione* reduzida a uma ampla gama de substratos, geralmente resultando em desintoxicação de ROS, representa os elementos que compõem o termo enriquecido.

A análise da **Figura 5** nos mostra que todos os elementos dos termos enriquecidos ‘*glutathione metabolic process (GM)*’ e ‘*toxin catabolic process (TC)*’ são compartilhados entre si, sugerindo, basicamente, que as *glutathione S-transferases* apresentam uma função dupla em Pingo de Ouro sob desidratação radicular: além de atuar na limpeza de ROS, potencialmente atuam na remoção/degradação de outros subprodutos tóxicos gerados devido à perturbação de sua homeostase.

Por fim, para T150 | UR, o termo ‘*response to wounding (RWO)*’ também se apresentou enriquecido (**Figura 5**). Elementos como fatores de transcrição (ex: RAP2-4, ATAF1, MYC4 e MYB102), enzimas metabólicas (ex: CHS, CYP74A, CYP74A, etc.), dentre outros, constituem o mencionado termo enriquecido (**Figura 5**).

No que tange ao dueto T25 | DR, não houve resultado de enriquecimento. Para T150 | DR, os termos não se apresentaram biologicamente informativos (*translation, cytoplasmic translation, ribosomal large subunit assembly, translational elongation*; **Tabela Suplementar 1**).

d. Famílias gênicas envolvidas na resposta à desidratação radicular em Pingo de Ouro

Para os conjuntos de isoformas T25 | UR, T150 | UR, T25 | DR e T150 | DR foram minerados membros de, respectivamente, 78, 73, 65 e 66 famílias gênicas diferentes (dados não apresentados), nos evidenciando a complexa diversidade dos transcriptomas obtidos. Em relação às famílias gênicas enriquecidas, o quantitativo cai severamente, sendo:

- T25 | UR (oito: *Class III Peroxidase, Calmodulin, Phosphatase 2A, EIL Transcription Factor, MAP Kinase, Cytoplasmic Ribosomal Protein, 14-3-3 Protein, bHLH Transcription Factor*) (**Figura 6A**);
- T150 | UR (nove: *Glutathione S-transferase, Monolignol Biosynthesis, CBL-interaction Serine-threonine Kinase, Early Auxin Responsive GH3, Cytochrome P450, Expansin, EIL Transcription Factor, Miscellaneous Membrane Protein, bHLH Transcription Factor*) (**Figura 6B**);
- T25 | DR (sete: *EIL Transcription Factor, CBL-interaction Serine-threonine Kinase, NAC Transcription Factor, Phosphatase 2A, Inorganic Solute Cotransporter, FtsH, CCAAT-DR Transcription Factor*) (**Figura 6C**);
- T150 | DR (dois: *Lipid Metabolism e Miscellaneous Membrane Protein*) (**Figura 6D**).

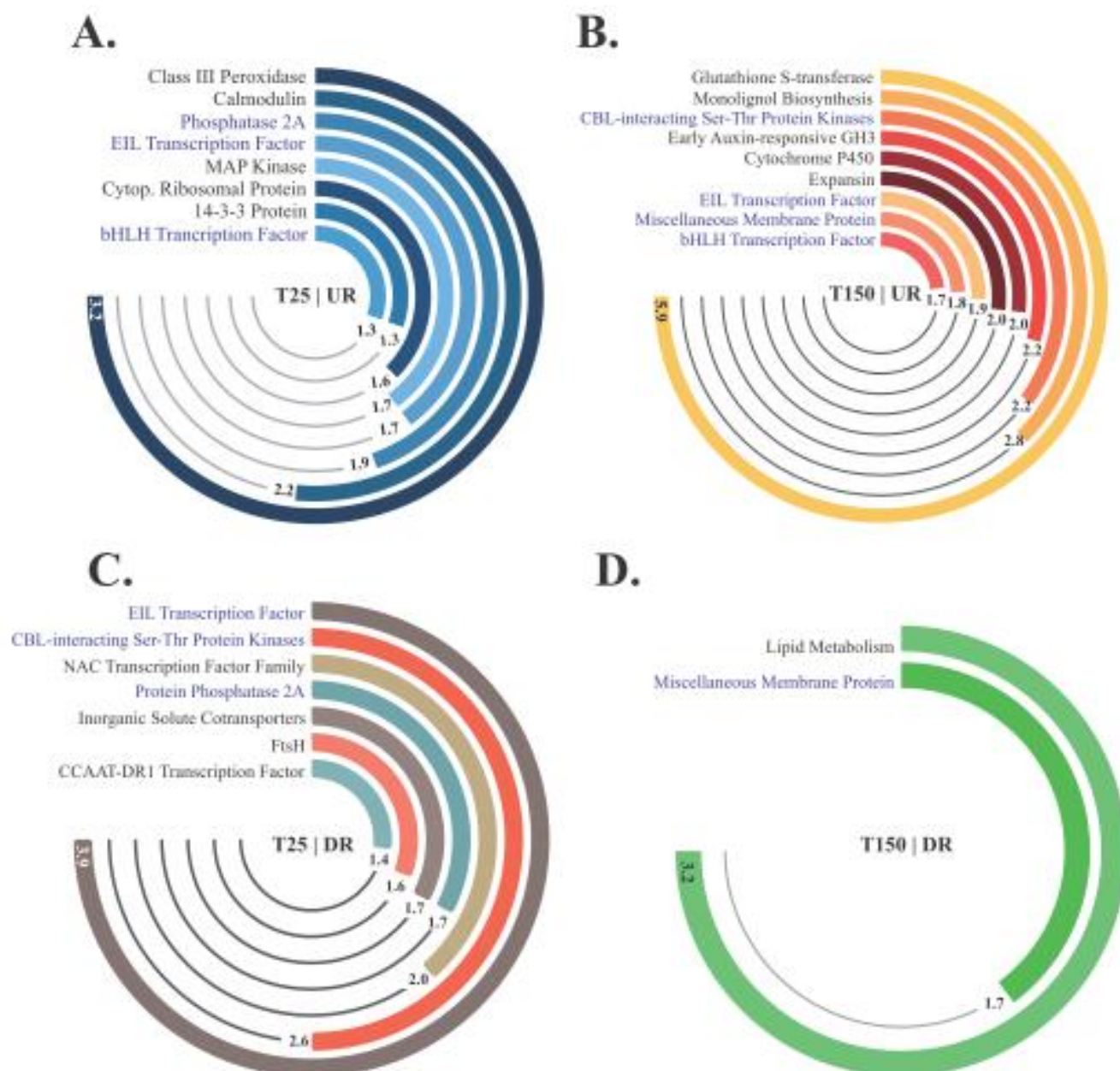


Figura 6. Famílias gênicas enriquecidas para os diferentes duetos: **A.** T25 | UR; **B.** T150 | UR; **C.** T25 | DR; e **D.** T150 | DR. Famílias gênicas escritas em azul estão presentes em mais de um dos duetos escrutinados: T25 ('RD25 vs Cont.25'); T150 ('RD150 vs Cont.150'). Os resultados foram plotados como gráfico de barras radiais usando as pontuações $-\log_{10}$ do p -value. Quanto maior esse valor, maior o valor de confiança no enriquecimento da família gênica. **Legenda:** UR: induzido ou up-regulated; DR: reprimido ou down-regulated; RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle).

O contraste de 'T25 | UR vs T150 | UR' nos apresenta um reflexo dos diferentes momentos fisiológicos amostrados. Cerca de 40% (*Calmodulin*, *Phosphatase 2A*, *MAP Kinase*) das famílias gênicas enriquecidas para o dueto T25 | UR (**Figura 6A**) apresentam íntimo envolvimento em processos de sinalização celular; para o dueto T150 | UR (**Figura 6B**), constata-se que o mesmo é formado basicamente por fatores de transcrição (EIL e bHLH), proteínas não enzimáticas (*Expansins* e *Miscellaneous Membrane Protein*), enzimas (*Glutathione S-transferase* e *Monolignol Biosynthesis*), transcritos responsivos a hormônios

(*Early Auxin Responsive GH3*), além de proteínas que participam de processos de sinalização (CBL-*interaction Serine-threonine Kinase*). Tal contraste também nos revela que famílias de fatores de transcrição como EIL e bHLH estão intimamente ligados à resposta à desidratação radicular em feijão caupi, sendo enriquecidas tanto em T25 | UR quanto em T150 | UR.

‘EIL’ e ‘*Phosphatase 2A*’ merecem, novamente, menção. Essas famílias gênicas foram enriquecidas tanto em T25 | UR (**Figura 6A**) quanto em T25 | DR (**Figura 6C**). A mesma situação é observada para ‘*Miscellaneous Membrane Protein*’ em T150 | UR e T150 | DR (**Figura 6D**). Considerando-se que esses conjuntos de isoformas são altamente contrastantes (seção 3.2, ‘**item b**’), tal resultado reforça os indícios *in silico* de seleção de diferentes isoformas (*isoform switching*) para desencadear o processo de percepção e adaptação à nova condição imposta.

e. T25 | UR e T150 | UR: orquestração transcricional dos metabólitos primários e secundários

Segundo o *Gene Ontology Project*, a análise dos termos GO referentes a 'Processo Biológico' (seção 3.2, ‘**item c**’ não é equivalente à análise de vias de processos. O GO não representa a dinâmica ou as dependências necessárias para descrevê-las completamente (<http://geneontology.org/docs/ontology-documentation/>). Dessa forma, executou-se um estudo adicional visando entender a dinâmica transcricional de metabolismo da cv. Pingo de Ouro sob desidratação radicular.

Por meio da ferramenta NeVOmics, análises de enriquecimento de vias metabólicas para os duetos T25 | UR e T150 | UR não indicaram enriquecimento (dados não apresentados). Dessa forma, visando contrastar os referidos tempos de tratamento, nossos dados de expressão foram plotados na base de dados KEGG Pathway.

A **Figura Suplementar 2** representa o mapa de referência do metabolismo contido na referida base de dados. As linhas negras da **Figura 7A** e **Figura 7B** representam a topologia dos módulos induzidos em Pingo de Ouro, relativo a T25 e T150, respectivamente. Componentes de vias metabólicas como ‘*Pentose phosphate pathway*’, ‘*Glycolysis/gliconeogenesis*’, ‘*Biosynthetic of sideophore group of nonribosomal peptodes*’, ‘*Valine, leucine and isoleucine biosynthesis*’, ‘*Cysteine and methionine metabolism*’, ‘*Citrate cycle*’, etc., que ocupam a posição central do mapa de referência, se apresentam em destaque para T25 | UR (**Figura 7A**). Adicionalmente, módulos do metabolismo de ‘*Phenylpropanoids biosynthesis*’ e ‘*Steroid Biosynthesis*’ também são induzidos (**Figura 7A**). No que tange a T150 | UR (**Figura 7B**), as vias centrais perdem destaque. Módulos do metabolismo de ‘*Monoterpenoids Biosynthesis*’, ‘*Sesquiterpenoids and triterpenoids biosynthesis*’, ‘*Carotenoid Biosynthesis*’, ‘*Mevalonate pathway*’ passam a ter maior representatividade, numa evidente alteração de padrão, possivelmente associada aos diferentes momentos fisiológicos abordados.

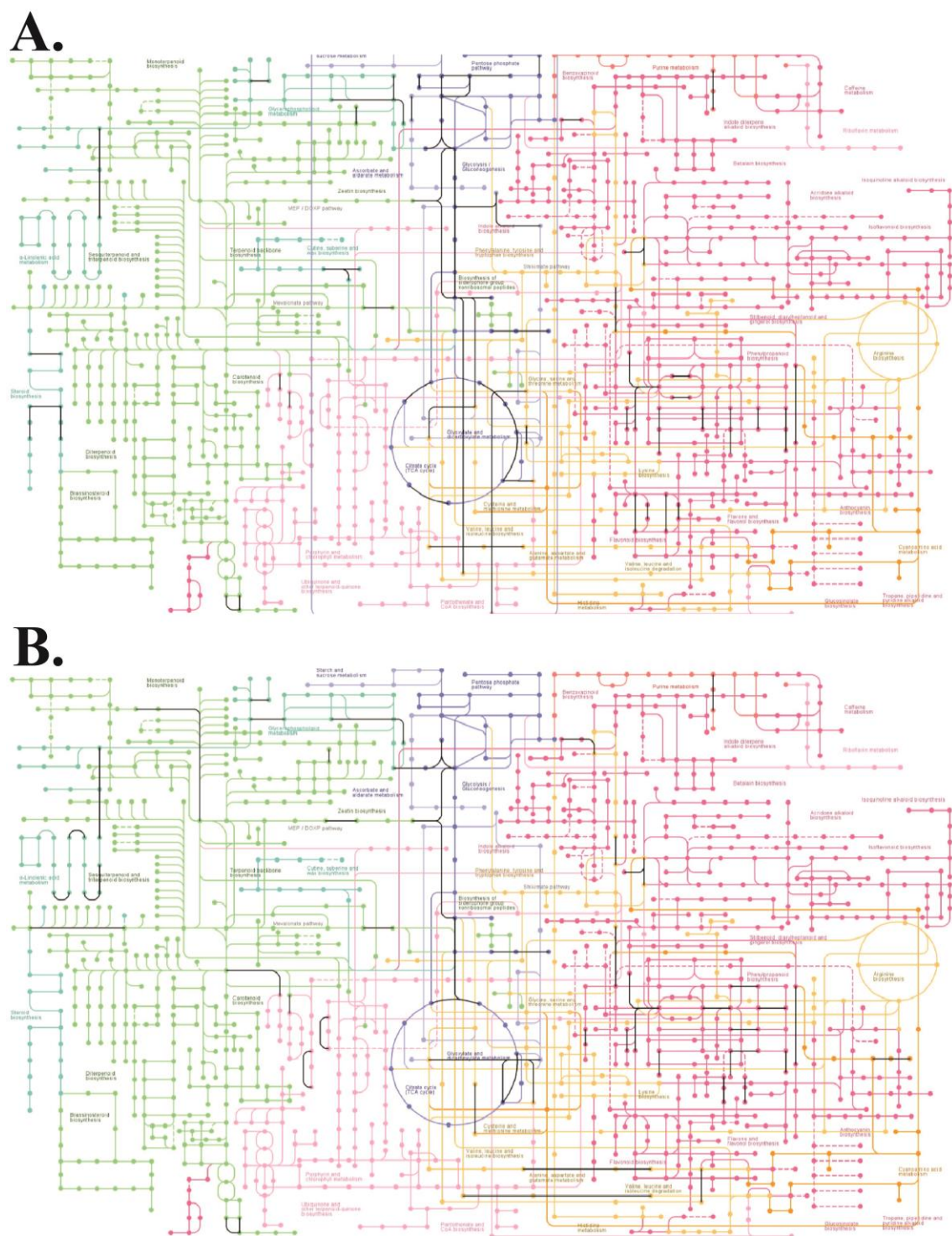


Figura 7. Orquestração transcricional do metabolismo da cv. Pingo de Ouro sob desidratação radicular, para os diferentes duetos: **A.** T25 | UR; **B.** T150 | UR. As linhas negras representam a topologia dos módulos induzidos em Pingo de Ouro, relativos ao mapa de referência do metabolismo contido na base de dados KEGG Pathway.

3.3 Genômica de Pingo de Ouro em resposta à desidratação radicular

a. Mineração de ortólogos no reino Viridiplantae

Dos 93 genomas de Viridiplantae depositados na base de dados Phytozome, 64 – associados a 34 diferentes famílias (**Figura Suplementar 3**) – exibiram relação de ortologia com os conjuntos de loci escrutinados. Os índices obtidos para os 844 loci ancoradores de T25 | UR (**Tabela suplementar 2**) e para 674 loci ancoradores de T150 | UR (**Tabela Suplementar 3**) foram variantes, sendo as 15 espécies com os maiores índices, em relação à feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), representadas na **Figura 8A; 8B**.

As espécies *Phaseolus vulgaris* (T25 | UR: 92%; T150 | UR: 91%), *Medicago truncatula* (T25 | UR: 80%; T150 | UR: 75%) e *Glycine max* (T25 | UR: 90%; T150 | UR: 88%) (**Figura 8A; 8B**) também pertencentes à família Fabaceae são as mais bem representadas nos rankings de ortologia. Apesar da média de conservação variar entre os conjuntos (T25 | UR: 67% vs T150 | UR: 64%; **Figura 8A; 8B**), não houve diferença estatística entre os mesmos.

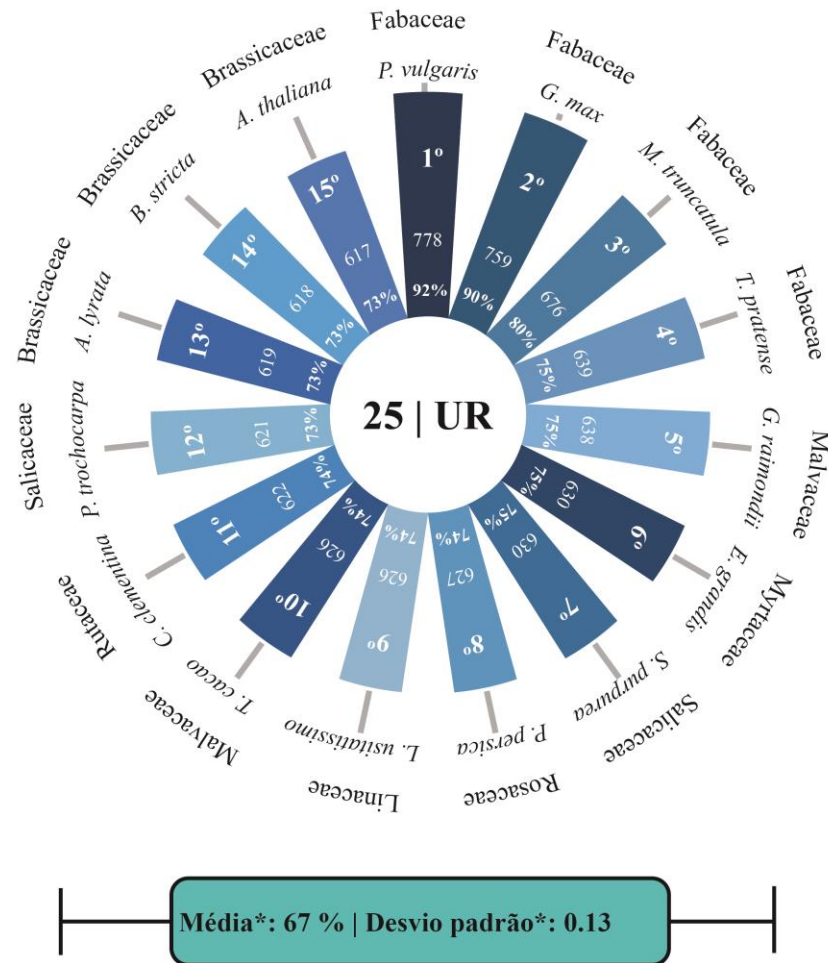
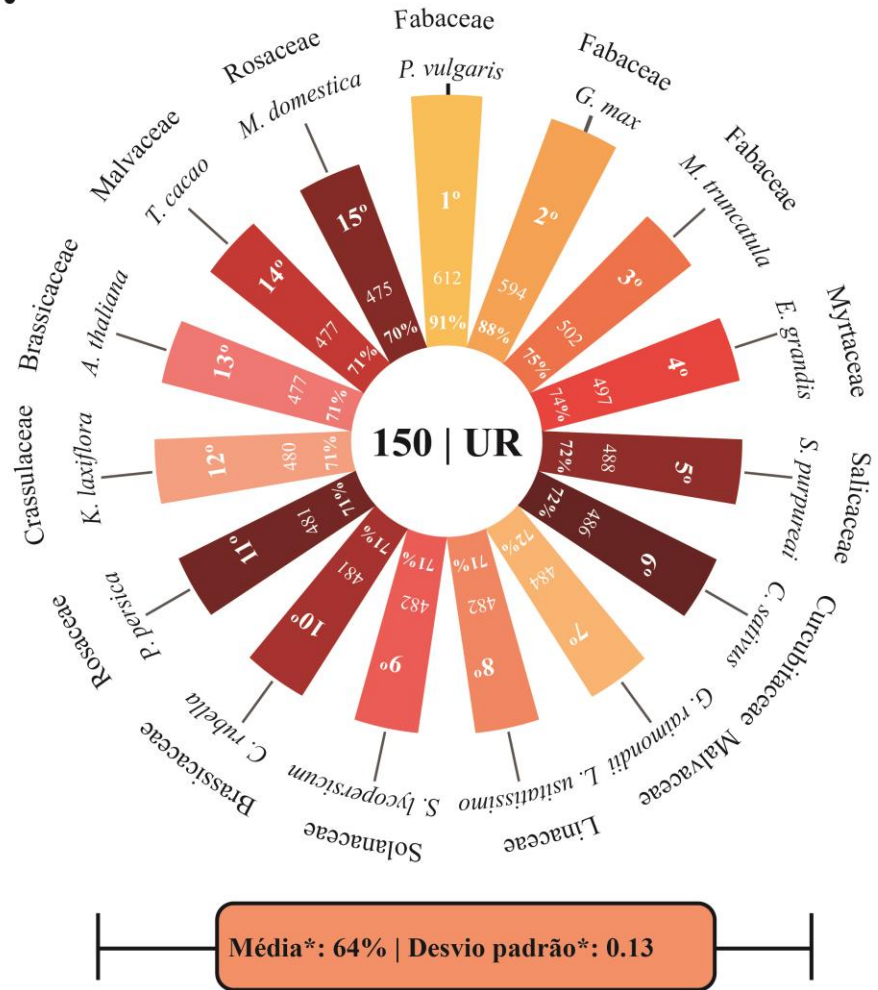
A.**B.**

Figura 8. Relações de ortologia dos loci de feijão-caupi ancoradores de transcritos induzidos (UR) em **A.** T25 ('RD25 vs Cont.25), **B.** T150 ('RD150 vs Cont.150'), apresentando as espécies (e respectivas famílias), o quantitativo absoluto e a porcentagem de loci conservados nas mesmas. *As médias, bem como os desvios padrões apresentados, são relativos a todo o conjunto de dados analisados e não apenas aos quinze organismos com maior grau de ortologia apresentados. **Legenda:** RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle).

b. Enriquecimento de elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs)

Visando melhor caracterizar os genes codificadores das isoformas presentes em T25 | UR e T150 | UR, procedeu-se à análise de seus promotores (1kb) no que tange à mineração, identidade e potencial enriquecimento de elementos cis-regulatórios candidatos. Para genes (844) componentes do dueto T25 | UR, sete dos motivos minerados se apresentaram dentro do *cut-off* estipulado (CCREs | TFs sem a adição da esfera negra em seus boxes; **Figura 9A**), sendo aqui considerados como *bona fide* CCREs. Tal grupo está associado a cinco famílias de fatores de transcrição (**Figura 9A**): C2H2, BPC1, bZIP, MADS e bHLH.

Para genes (674) do dueto T150 | UR, novamente foram minerados sete *bona fide* CCREs, associados a três diferentes famílias de fatores de transcrição (CCREs | TFs sem a adição da esfera negra em seus boxes; **Figura 9B**): C2H2, BPC1, Trihelix. Consta, ainda, um CCRE *bona fide* cuja associação a um respectivo fator de transcrição ainda é indeterminada ('*no match*'; **Figura 9B**).

Contrastando os dados de CCREs (**Figura 9A; 9B**) com a identificação de fatores de transcrição minerados nas famílias gênicas diferencialmente expressas, constatou-se a presença de C2H2, bZIP e bHLH, em ambos os conjuntos, embora nas famílias gênicas resultantes tais fatores de transcrição não se apresentaram enriquecidos (dados não apresentados).

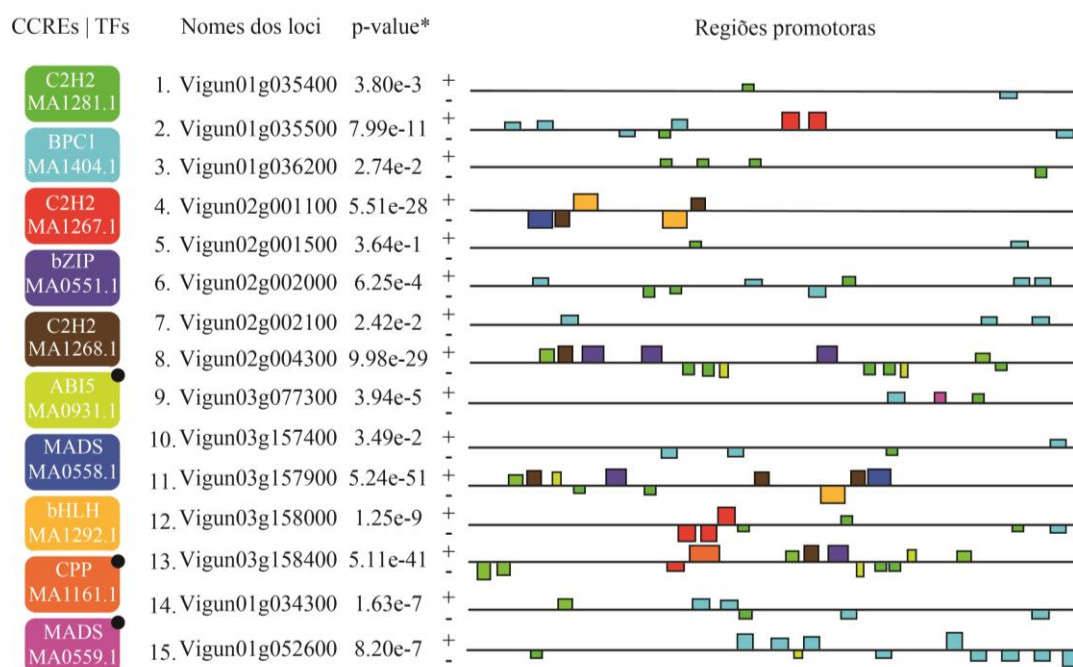
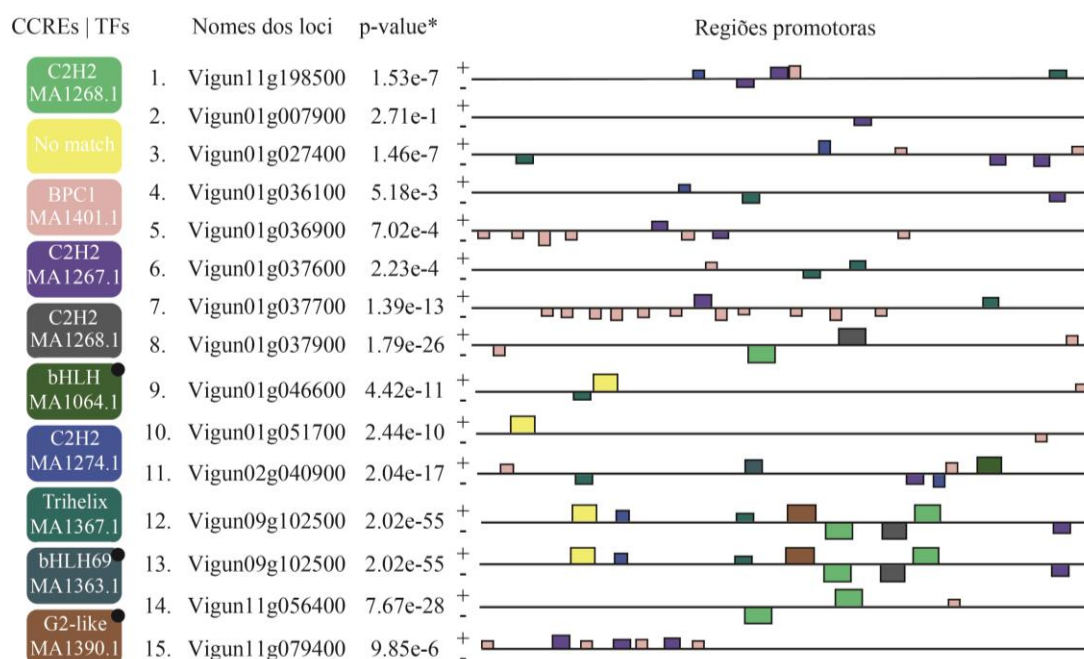
A.**B.**

Figura 9. Conteúdo e distribuição (retângulos coloridos) de motivos [elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs)] ancorados nos promotores de uma amostra* de genes codificadores de isoformas associadas aos seguintes duetos: **A.** T25 | UR; e **B.** T150 | UR. Nos hexágonos coloridos (CCREs) estão contidas informações sobre os fatores de transcrição (TFs) associados, bem como sua respectiva Matrix JASPAR ID. Os símbolos “+” e “-” representam as fitas senso e antissenso das regiões promotoras analisadas. *é definido como a probabilidade de que uma sequência aleatória (com o mesmo comprimento e em conformidade com o background) tenha um *p-value* de posição de modo que o produto seja menor ou igual ao valor calculado para a sequência em teste. Esferas negras indicam motivos com significância estatística acima dos valores adotados de *cut-off* (non bona fide CCREs; *e-value* > 10⁻²). *A amostra de genes plotada foi deliberadamente escolhida para apresentar todos os bona fide CCREs encontrados no conjunto total de promotores analisado. Abreviações: T25 (*RD25 vs Cont.25); T150 (*RD150 vs Cont.10’); RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle).

4. Discussão

4.1 Fisiologia do cultivar Pingo de Ouro sob desidratação radicular

Para o tratamento RD25, não houve alterações fisiológicas significativas em relação ao seu respectivo controle. Tais alterações foram observadas somente a partir de RD75, alcançando seu ápice em RD150. A maioria das respostas exibidas a partir de RD75 são esperadas em plantas sob déficit hídrico. Tais mudanças são acionadas para reduzir a perda desse solvente. A partir de RD75, observou-se a ocorrência de fechamento ou redução da abertura dos estômatos, ocasionando a diminuição da condutância estomática (**Figura 1C**). Como consequência, a captação de carbono fica prejudicada e, portanto, a taxa fotossintética (**Figura 1A**) também diminuiu (Flexas *et al.*, 2004; Flexas *et al.*, 2006) a partir do referido tratamento. Outra consequência do fechamento | redução da abertura estomática é a redução da taxa de transpiração (**Figura 1B**) (Oliveira *et al.*, 2005). Barbosa *et al.* (2013) também observaram queda significativa na taxa de transpiração em outras cultivares de feijão-caupi sob condição de suprimento limitado de água. Tal queda é importante para proteger as plantas contra os efeitos nocivos do déficit hídrico e é implementada para aclimatar o metabolismo vegetal em condições de seca. Segundo Souza *et al.* (2004) e Bertolli *et al.* (2012), em análises de campo, os principais mecanismos de feijão-caupi para evitar o estresse por déficit hídrico incluem minimizar a perda de água (como aqui observado) e investir no crescimento do sistema radicular.

4.2 Alterações moleculares vs alterações fisiológicas: impactos e a questão temporal em foco no estudo

As plantas possuem uma capacidade notável de detectar mudanças nas condições ambientais. No presente trabalho, analisamos duas camadas da resposta do acesso Pingo de Ouro à desidratação radicular: uma transcricional e outra, fisiológica. A camada molecular (transcricional) é a primeira a ser ativada. Aqui, isso ficou evidente pela confrontação dos ‘dados RNA-Seq’ vs ‘dados fisiológicos’, em T25. No referido contraste, apesar da maioria dos dados fisiológicos se manterem estatisticamente inalterados quando comparados à situação controle (**Figura 1A, 1B, 1C e 1D**), os dados RNA-Seq já indicavam extensiva modulação transcricional e alteração do transcriptoma (**Figura 2; Figura 3A; 3B**). Notoriamente, estímulos ambientais externos, quando detectados pelas plantas, ativam cascatas de sinalização à jusante, bem como vias de respostas específicas.

O funcionamento adequado da camada molecular é essencial para o ajustamento fisiológico *a posteriori* e para a tentativa de adaptação à nova condição imposta. Adicionalmente, a ação do denominado ‘*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*’ também pode ter influenciado positivamente na manutenção do *status quo* fisiológico observado em T25. A imposição do estresse por meio da retirada das raízes do contato com a solução nutritiva é um processo agudo, repentino e severo, diferente do desencadeamento do estresse da desidratação na natureza (o qual é gradual). Dessa forma, em T25, a severidade da condição aqui imposta pode ter sido tamponada na fisiologia de Pingo de Ouro, devido à modulação de genes específicos. Com o passar do tempo, entretanto, a severidade do estresse, acentuada no contraste T150 (que abrange o contraste RD150 vs Cont.150), requereu o funcionamento coordenado das alterações moleculares e fisiológicas, visando a sobrevivência do organismo.

4.3 Transcriptômica

a. T25 | UR vs T150 | UR: análise de conjunto e informações gerais

O escrutínio dos conjuntos expressos de isoformas transcricionais (**Figura 3A**) e loci gênicos induzidos (ou *up-regulated*; acrônimo: ‘UR’; **Figura 3B**) nos indicou melhor resolução molecular dos diferentes momentos fisiológicos quando considerado o primeiro substrato mencionado (seção 3, ‘item b’). Esse dado indica a importância da análise de transcriptomas, a qual agrega maiores informações à questão da resposta de vegetais a estresses. Adicionalmente, complementa os dados de genômica e, no presente caso, sugerir a importância de mecanismos geradores de diversidade de transcritos (como *splicing* alternativo e mecanismos associados, por exemplo) durante a ocorrência de condições não favoráveis. Este último item mencionado é resultante da observação de que o conjunto de genes diferencialmente expressos é menos específico do que a sua contraparte de isoformas (seção 3, ‘item b’).

Sugere-se que RD25 (*‘transcriptoma de percepção, sinalização e reação’*) (**Figura 2**) e RD150 (*‘transcriptoma de sinalização, reação e ajuste’*) (**Figura 2**) refletem os diferentes contextos fisiológicos abordados (**Figura 1A, 1B, 1C, 1D e 1E**). Para cada um dos tratamentos realizados, além de processos biológicos intimamente associados à resposta a estresses abióticos, observou-se o enriquecimento de outros notoriamente associados à resposta a estresses bióticos [T25 | UR: ‘*Defense response* (DRe)’ e ‘*Response to chitin* (RCh)’ (**Figura 4**); T150 | UR: ‘*Defense response* (DRe)’ e ‘*Defense response to bacterium* (DRb)’ (**Figura 5**)]. É sabido que as plantas requerem mecanismos intrincados para perceber sinais externos e adaptar sua resposta às condições ambientais. A sobreposição entre as vias individuais de resposta a diferentes estresses pode fornecer à planta um poder regulatório para interconectar uma complexa rede de mecanismos, cada um dos quais pode incluir uma infinidade de proteínas.

Um outro ponto de vista sobre a presença de termos enriquecidos associados a respostas a estresses bióticos é que pode se tratar de uma estratégia ou comportamento natural do organismo tolerante analisado. Em habitats naturais, as plantas são geralmente sujeitas a combinações complexas de fatores estressantes. Isso pode incluir seca, salinidade, patógenos, ataque de pragas e outros. Ensaio abordando os efeitos da ocorrência de múltiplos estresses em vegetais vêm sendo disponibilizados. Prasch e Sonnewald (2013) sugeriram que os fatores abióticos estressantes alteravam significativamente as redes de sinalização específicas para o *Turnip mosaic virus* em *Arabidopsis*. Isso ocasionou a desativação das respostas de defesa e decorreu em maior suscetibilidade do referido vegetal. Sinha *et al.* (2019), por sua vez, também observaram um aumento da incidência de doenças fúngicas [podridão radicular seca (agente patológico: *Rhizoctonia bataticola*) e podridão radicular negra (agente patológico: *Fusarium solani*)] em plantas de grão-de-bico sob estresse severo de seca, quando comparado a condições de campo bem irrigadas. Como observado, a ocorrência de um estresse acarreta diminuição de desempenho (*fitness*) e pode fragilizar organismos considerados tolerantes, como o caso da cultivar Pingo de Ouro. Dessa forma, a mesma pode se utilizar de mecanismos de defesa diversos no período de condição não favorável, visando se manter em alerta constante contra possíveis novos (e distintos) agentes estressantes. Isso pode ser constatado pela caracterização funcional dos elementos constituintes dos termos ‘DRe’, ‘RCh’ e ‘DRb’ (seção 4.3, ‘item b’), os quais apresentam profundo impacto nas barreiras impostas pelos vegetais às interações biológicas nocivas.

b. T25 | UR vs T150 | UR: análise de termos GO enriquecidos e seus desdobramentos moleculares

Dentre os diversos atores minerados (ver seção 3, ‘item b’), o elemento mais modulado para ‘*defense response* (DRe)’ em T25 | UR esteve associado a uma *Serine/threonine-protein kinase* (OXI1; **Figura 4**). O mesmo também é o elemento mais modulado do termo ‘*response to oxidative stress* (RO)’ – T25 | UR (**Figura 4**). Em *Arabidopsis*, Rentel *et al.* (2004) observaram que tal proteína é necessária para a ativação completa das quinases MPK3 e MPK6 (essenciais para a transdução de sinal em resposta para H₂O₂), após o tratamento com ROS (espécies reativas de oxigênio) ou elicitador patogênico. Adicionalmente, OXI1 foi necessária para pelo menos dois processos distintos mediados por ROS: resistência basal à inoculação com *Peronospora parasitica* e crescimento de pelos radiculares (extensões tubulares de célula única de células epidérmicas da raiz), uma resposta essencial ao estresse hídrico (Rentel *et al.*, 2004).

No que tange a ‘*defense response* (DRe)’ – T150 | UR (**Figura 5**), BIR2 foi o elemento associado de maior modulação. Tal proteína atua como um regulador negativo da imunidade desencadeada por PAMP (*Pathogen-associated molecular pattern*). Halter *et al.* (2014) observaram que o BIR2 interage constitutivamente com o BAK1 [uma quinase do tipo LRR-receptor-like (RLK)], impedindo sua interação com o FLS2 (*flagellin sensing 2*, um PRR que reconhece um tradicional PAMP). A percepção do PAMP no ambiente celular leva à liberação de BIR2 do complexo BAK1 e permite o recrutamento de BAK1 no complexo FLS2 (Halter *et al.*, 2014). Dessa forma, observa-se que BIR2 atua como uma isca (ou sentinela) para detecção de PAMPs e ativação de uma importante linha de defesa vegetal. BAK1 está associado aos seguintes processos: hiper-responsividade a PAMPs, morte celular e resistência a patógenos bacterianos (Halter *et al.*, 2014).

Os termos ‘*defense response to bacterium* (DRb)’ – T150 | UR e ‘*response to wounding* (RWo)’ – T150 | UR compartilharam o elemento KTI4 (*Kunitz trypsin inhibitor 4*) entre os mais modulados (**Figura 5**). Tais termos estão respectivamente, direta e indiretamente envolvidos na resposta a estresses bióticos, sendo que vem sendo relatada a ação de KTI4 (nome alternativo KTI1) no referido contexto. A expressão de AtKTI1 (*A. thaliana* KTY1) é induzida tardiamente em resposta a elicitores bacterianos e fúngicos (Li *et al.*, 2008). O silenciamento via RNAi do gene AtKTI1, por sua vez, resultou em maior desenvolvimento de lesões após a infiltração do tecido foliar com a toxina fúngica fumonisina B1 ou com o patógeno bacteriano avirulento *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000, contendo o gene *avrB* (Pst *avrB*) (Li *et al.*, 2008).

Especificamente para ‘*response to wounding* (RWo)’ – T150 | UR, uma chalcona sintase (CHS; **Figura 4**) foi o elemento de maior modulação. CHS é a enzima chave na via de biossíntese de (iso)flavonóides. Hu *et al.* (2019) superexpressaram um gene CHS em tabaco (*Nicotiana tabacum*); tais plantas transgênicas foram mais tolerantes à seca do que as plantas controle.

WRKY33 foi o elemento de maior modulação para o termo ‘*response to chitin* (RCh)’ – T25 | UR (**Figura 4**) e o segundo para ‘*response to salt stress* (RS)’ – T25 | UR (**Figura 4**). No que tange à sua participação na resposta a estresses que causam perturbações osmóticas (como o estresse aqui estudado), Jiang e Deyholos (2009) observaram que a superexpressão do referido fator de transcrição aumentou a tolerância ao estresse osmótico de *Arabidopsis*, aumentando, adicionalmente, a sensibilidade ao ácido abscísico (ABA; hormônio vegetal que se acumula em vegetais sob condição de seca). No que tange a seu papel na defesa vegetal, Zheng *et al.* (2006) mostraram que mutações no gene WRKY33 de *Arabidopsis* causaram maior suscetibilidade aos

patógenos fúngicos *Botrytis cinerea* e *Alternaria brassicicola*, ocasionada por uma redução na expressão da defensina PDF1.2.

Para os termos ‘*response to salt stress* (RS)’ – T25 | UR e ‘*response to cadmium ion* RCa)’ – T25 | UR, MYB15 foi o elemento de maior modulação (**Figura 4**). Ding *et al.* (2009) relataram que a superexpressão de MYB15 em *A. thaliana* transgênica conferiu hipersensibilidade ao ABA e melhorou a tolerância à seca e a estresse salino. As linhagens transgênicas apresentaram sobrevida melhorada e taxas de perda de água reduzidas, quando comparadas ao controle WT sob condições de déficit hídrico.

Para o dueto T150 | UR, além do termo ‘DRe’, ‘DRb’ e ‘RWo’ acima mencionados, outros cinco termos também foram enriquecidos (**Figura 5**), indicando a atuação dos respectivos processos biológicos em tempos mais tardios de resposta à desidratação radicular em Pingo de Ouro. Os termos ‘*glutathione metabolic process* (GM)’ – T150 | UR e ‘*toxin catabolic process* (TC)’ – T150 | UR compartilham todos os seus elementos componentes (**Figura 5**). Os elementos mais modulados foram GSTU19 e GSTU25 (**Figura 5**). Em relação ao primeiro elemento, sua superexpressão em plantas de *Arabidopsis* conferiu tolerância à seca e a estresse salino (Xu *et al.*, 2016). Adicionalmente, tal ação também conferiu tolerância aumentada ao metil viologeno (um composto oxidante) somada ao aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Segundo os autores, isso sugere que GSTU19 pode estar envolvida na neutralização dos danos oxidativos decorrentes da seca ou estresse salino. Para GSTU25, até o momento não há dados de sua caracterização funcional na literatura científica.

Para o termo ‘*response to water deprivation* (RWa)’ – T150 | UR, PIP1.4 e RFS5 foram os elementos mais modulados (**Figura 5**). A caracterização funcional do primeiro elemento indica que ele possui ação estresse-específica em *Arabidopsis*. As plantas transgênicas dessa espécie que superexpressaram PIP1.4 apresentaram uma rápida perda de água sob estresse de manitol (100 mM; agente causador de desidratação celular), o que resultou em retardamentos da germinação e crescimento de plântulas. Por outro lado, as *Arabidopsis* transgênicas que superexpressaram PIP1.4 apresentaram fluxo de água aprimorado e facilitaram a germinação sob estresse de baixas temperaturas (Jang *et al.*, 2007). Nossos dados corroboram o possível envolvimento de PIP1.4 na resposta à desidratação radicular devido à sua indução e alta modulação. O possível mecanismo no qual tal alvo está envolvido, entretanto, carece de maiores averiguações. RFS5, por sua vez, é uma rafinose sintase (sintetiza rafinose), atuando na via metabólica dos oligossacarídeos da família rafinose. Tal gene ainda é pouco estudado, não tendo nenhum ensaio de caracterização funcional disponível na literatura.

Em relação ao termo ‘*response to salt stress* (RS)’ – T150 | UR, ERF53, MYB14 e CYN foram os elementos de maior modulação (**Figura 5**). Desses, apenas ERF53 apresenta dados de caracterização funcional. Hsieh *et al.* (2013) observaram que a superexpressão de AtERF53 (*A. thaliana* ERF53) no duplo mutante *rglg1rglg2* (onde o AtERF53 pode expressar de forma estável) conferiu melhor tolerância ao estresse térmico e resultou em níveis endógenos mais elevados de ABA e do osmólito prolina (importantes respostas à desidratação celular), em comparação com duplos mutantes *rglg1rglg2* não transformados.

Por fim, o termo ‘*indole glucosinate metabolic process*’ (IG) – T150 | UR apresentou o elemento CYP81D8 como o mais modulado (**Figura 5**). Segundo Panozzo *et al.* (2019), a indução de CYP81D8 está correlacionada com o ganho de biomassa radicular, em milho. O sistema radicular das plantas é essencial para a adaptação contra diferentes tipos de estresses abióticos. Um eficiente desenvolvimento radicular é essencial para a sobrevivência de mudas em solos que sofrem secagem rápida da

superfície, enquanto umidade suficiente permanece disponível em camadas mais profundas do solo (Wasaya *et al.*, 2018).

Com o exposto, observa-se que os processos biológicos enriquecidos, bem como suas proteínas componentes apresentadas, são de extrema relevância, podem possuir apelo biotecnológico e indicam como Pingo de Ouro recruta seus genes na tentativa de adaptação à nova condição imposta.

c. Famílias gênicas envolvidas na resposta de feijão-caupi à desidratação radicular

Em T25 | UR (**Figura 6A**), houve preponderância de famílias gênicas enriquecidas associadas a processos de sinalização. Das oito enriquecidas, três (ou ~ 40%: *Calmodulin*, *Phosphatase 2A*, *MAP Kinase*) estão associadas a essa atividade. Proteínas *calmodulin-like* são importantes sensores de Ca^{2+} - um mensageiro secundário universal. Tais proteínas regulam o desenvolvimento da planta, além de responderem a diferentes estímulos ambientais. A associação entre concentração citosólica de cálcio livre e resposta a estresses causadores de distúrbios osmóticos vem sendo documentada (Wilkins *et al.*, 2016). No que tange, especificamente, à seca, apenas recentemente o papel desse mineral tem sido estudado. Jing *et al.* (2019) sugeriram que Ca^{2+} atuou como sinal à montante de H_2O_2 na rede de sinalização de plantas de *Phyllostachys edulis* (Poaceae) sob estresse hídrico. O Ca^{2+} também esteve envolvido no processo de transdução de sinal do fitormônio ABA.

No que tange à fosfatase 2A (PP2A), dados sugerem sua participação na resposta ao estresse de desidratação em várias espécies vegetais. Raízes do mutante *rcn1* [*ROOTS CURL IN NAPHTHYLPHTHALMIC ACID1* (RCN1), componente da subunidade regulatória 'A' de uma PP2A] de *A. thaliana* exibiram crescimento reduzido sob condições de estresse iônico (Na^+ , K^+), osmótico (manitol) e oxidativo (peróxido de hidrogênio) (Blakeslee *et al.*, 2008). Em legumes, a orquestração transcricional de uma PP2A de *Medicago sativa* (MsPP2A) foi induzida por ABA, sugerindo-se sua participação na resposta ao estresse por déficit hídrico (Tóth *et al.*, 2000), devido à íntima associação desse hormônio no referido processo.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), por sua vez, também foram implicadas na sinalização por ABA. Recentemente, um módulo MAPK completo, ativado pelo referido fitormônio, foi divulgado (para revisão ver de Zelicourt *et al.*, 2016).

Das famílias de fatores de transcrição encontradas induzidas em ambos os tratamentos (bHLH e EIL; **Figura 6A; 6B**), apenas bHLH apresenta informações disponíveis de caracterização funcional de alguns de seus membros. Li *et al.* (2019) relataram uma *ZmPTF1* de milho (*Zea mays* PTF1, membro da família bHLH) que regula a tolerância à seca no milho, promovendo o desenvolvimento radicular e a síntese de ABA. Jiang *et al.* (2019), por sua vez, observaram que a expressão heteróloga de *AabHLH35* (*Anthurium andraeanum* bHLH35) em *Arabidopsis* melhorou a tolerância ao frio e à seca no organismo transgênico obtido.

Interessantemente, 'EIL *Transcription Factor*' e 'Phosphatase 2A' apresentaram enriquecimento tanto em T25 | UR (**Figura 6A**), quanto em T25 | DR (**Figura 6C**); algo semelhante ocorre para a família gênica 'Miscellaneous Membrane Protein' em T150 | UR (**Figura 6B**) e T150 | DR (**Figura 6D**). A maioria dos genes vegetais expressa, preferencialmente, uma isoforma em um nível significativamente mais alto, em detrimento de outras. Entretanto, sob condições específicas tal 'preferência' pode ser alterada para outras diferentes isoformas. Em videira (*Vitis vinifera*), mais de 4.000 genes exibiram pelo menos uma troca de isoformas expressas em 124 amostras de

diferentes tecidos, tratamentos de estresse (incluindo estresse por seca e sal) e genótipos (Vitulo *et al.*, 2014). No milho, mais de 3.000 genes com troca de isoformas expressas foram observados no tratamento do estresse hídrico (Thatcher *et al.*, 2016). O significado biológico dessas mudanças nas isoformas expressas em ‘Pingo de Ouro’, entretanto, carece de maiores estudos.

Em relação às famílias gênicas enriquecidas especificamente em T150 | UR, as *Glutathione S-transferases* (GSTUs) se apresentaram corroborando os dados dos processos biológicos enriquecidos a partir da análise dos elementos induzidos nesse tratamento (seção 3.2, ‘item c’; **Figura 5**). GSTUs são os únicos elementos a compor os termos enriquecidos ‘*glutathione metabolic process* (GM)’ e ‘*toxin catabolic process* (TC)’ (seção 3.2, ‘item c’; **Figura 5**). Diversos relatos científicos vêm apresentando o impacto positivos da superexpressão de membros dessa família gênica perante condições de seca (ver seção 4.3, ‘item b’).

A família gênica GH3 também se apresentou enriquecida para T150 | UR. O envolvimento de GH3 na resposta à seca vem sendo recentemente analisado. Kirungu *et al.* (2019), estudando GH3 em *Gossypium hirsutum*, relataram que todos os genes (oito) que foram induzidos sob condições de estresse salino, bem como em condições de seca. A caracterização funcional de Gh_A08G1120 (GH3.5; um dos referidos genes induzidos), através da técnica VIGS (*virus-induced gene silencing*) revelou que a capacidade de tolerar os estresses mencionados das plantas silenciadas foi significativamente reduzida em comparação aos tipos selvagens (Kirungu *et al.*, 2019).

Por fim, a família gênica expansina também se apresentou enriquecida em T150 | UR. Essas proteínas medeiam o afrouxamento da parede celular e o crescimento da planta (raiz e parte aérea). Han *et al.* (2012) superexpressou uma β -expansina de trigo (TaEXPB23) em tabaco. Raízes das linhagens obtidas apresentaram melhor desenvolvimento sob alta salinidade do que sua contraparte selvagem. Tais autores sugeriram que as linhas transgênicas apresentaram maior capacidade de retenção de água, embora o possível mecanismo envolvido ainda tenha permanecido incerto.

d. Orquestração transcricional dos metabólitos primário e secundário

d. 1 Para T25 | UR:

A plotagem dos dados de transcriptômica na base de dados KEGG *Pathway* nos mostrou que há uma alteração da topologia dos módulos metabólicos ativados quando contrastados T25 | UR (**Figura 7A**) vs T150 | UR (**Figura 7B**). Inicialmente, quando as células de Pingo de Ouro não se encontram fisiologicamente estressadas (mas o transcriptoma já se encontra em ativa modulação), observa-se o destaque de módulos *housekeeping*, como: ‘*Pentose phosphate pathway*’, ‘*Glycolysis/gliconeogenesis*’, síntese de aminoácidos (‘*Valine, leucine and isoleucine biosynthesis*’ e ‘*Cysteine and methionine metabolism*’) e ‘*Citrate cycle*’ (**Figura 7A**), etc.

Uma mudança na glicólise e gliconeogênese é considerada uma característica básica de adaptação das plantas ao estresse abiótico. A glicólise é uma importante via metabólica no metabolismo dos carboidratos, e a seca leva a um conteúdo alterado de sacarose e aminoácidos, o que foi revelado por análise metabólica (Broeckling *et al.*, 2005). Em estudo recente realizado por Pan *et al.* (2016), várias enzimas-chave no metabolismo da glicólise/gliconeogênese foram expressas diferencialmente em linhagens tolerantes e suscetíveis sob seca.

A via das pentoses fosfato (*Pentose Phosphate Pathway*, PPP) compreende uma via metabólica paralela à glicólise. A PPP é importante para manter a homeostase do carbono, fornecer moléculas redutoras para o anabolismo e defesa contra o estresse

oxidativo e fornecer precursores para a biossíntese de nucleotídeos e aminoácidos (Stincone *et al.*, 2015). O NADPH, produzido na PPP, pode ser necessário em grandes quantidades para doar elétrons a antioxidantes (que estão presentes em quantidades maiores em plantas estressadas) e neutralizar o aumento da produção de ROS. O destaque do módulo PPP em T25 | UR, associado a suas potenciais funções, vai ao encontro das análises de enriquecimento de processos biológicos no referido tratamento, as quais indicaram o enriquecimento do termo ‘*response to oxidative stress (RO)*’ (**Figura 4**).

No que tange aos aminoácidos, tem-se observado que durante o estresse abiótico (desidratação, estresse salino, etc.), aminoácidos de baixa abundância [como os aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs: leucina, isoleucina e valina)], não são sintetizados, mas se acumulam devido ao aumento do turnover proteico. Tal situação vem sendo reportada principalmente para *A. thaliana* (Hildebrandt, 2018; Huang e Jander, 2017). Em feijão-caupi, entretanto, há indícios transcrpcionais de que BCAAs são sintetizados *de novo* em T25 | UR, o que pode estar associado ao fato de Pingo de Ouro não se encontrar fisiologicamente sob estresse. No mesmo contexto (metabolismo de aminoácidos), observou-se que o módulo ‘*Cysteine and methionine metabolism*’ se destacou em T25 | UR. Dado semelhante também foi observado por Zhang *et al.* (2017), o qual analisou a transcriptômica das vias metabólicas dos aminoácidos nos genótipos de gergelim em resposta à seca. O aumento de níveis específicos de aminoácidos é considerado essencial para a tolerância das plantas a estresses, pois os mesmos podem agir como osmólitos, precursores de metabólitos associados à energia, eliminadores de ROS, bem como potenciais moléculas reguladoras e de sinalização (Hildebrandt *et al.*, 2015; Pratelli *et al.*, 2014).

No que se refere ao ‘*Citrate cycle*’ (ou *Tricarboxylic Acid Cycle* - TCA), existem relatos contraditórios sobre os efeitos da seca no TCA e seus intermediários. Alguns estudos relataram que a seca aumenta os intermediários do TCA, por exemplo em diferentes espécies do gênero *Thymus* (família Lamiaceae; Ashrafi *et al.*, 2018) enquanto outros estudos relataram que o TCA não é afetado ou negativamente afetado pela seca (Araújo *et al.*, 2011). Tais dados somados aos nossos sugerem que mecanismos espécie-específicos influenciam a regulação de TCA em plantas sob condições não favoráveis.

Outros módulos de destaque para T25 | UR foram ‘*Phenylpropanoids biosynthesis*’, e ‘*Steroid Biosynthesis*’ (**Figura 7A**). Os compostos fenólicos, como os fenilpropanoides, são uma importante classe de metabólitos secundários das plantas que desempenham papéis fisiológicos cruciais ao longo do ciclo de vida das plantas. Diversos artigos científicos apontam seu impacto positivo na fisiologia vegetal sobre estresses abióticos (para uma revisão, consultar Sharma *et al.*, 2019).

Por fim, esteroides vegetais são compostos que exercem uma ampla gama de atividades biológicas. Muitos estudos demonstram um efeito positivo da aplicação de esteroides na tolerância das plantas ao estresse salino e à seca (para uma revisão, ver Vriet *et al.*, 2012).

d.2 T150 | UR

Para o presente tratamento (**Figura 7B**), observa-se a preponderância de módulos associados ao metabolismo especializado (diferentemente do que ocorre em T25 | UR; **Figura 7A**). Isso sugere que à medida que a condição imposta passa a estressar o Pingo de Ouro o mesmo recorre ao fino ajuste de vias metabólicas mais específicas. ‘*Mevalonate (MVA) pathway*’ e ‘*Sesquiterpenoids and triterpenoids biosynthesis*’ são interconectadas. Segundo Rodriguez-Concepción e Boronat (2002),

triterpenos e sesquiterpenos são biossintetizados pela via do MVA. Com exceção de sesquiterpenos e seu envolvimento na defesa vegetal (Chadwick *et al.*, 2013), não há informações prévias sobre o envolvimento dessas vias em plantas sob desidratação radicular, tornando-as um interessante substrato para estudos posteriores em feijão-caupi e leguminosas, em geral.

No que se refere a monoterpenos, cujos precursores são oriundos de uma via diferente daquela que sintetiza os terpenos acima mencionados (Pott *et al.*, 2019), dados indicam sua íntima associação na resposta à seca. Radwan *et al.* (2017) observaram em *Salvia officinalis* (Lamiaceae) que as concentrações de monoterpenos, bem como a expressão das monoterpeno-sintases aumentaram enormemente em resposta à seca. Aumento semelhante na concentração de monoterpenos também foi verificado em plântulas de gimnospermas *Pinus sylvestris* L. e *Picea abies* (ambas Pinaceae) quando expostas ao estresse hídrico severo por duas estações de crescimento (Turtola *et al.*, 2003).

4.4 Genômica

a. Mineração de ortólogos no reino Viridiplantae

Ortologia é um conceito central em genômica comparativa, usado para relacionar genes correspondentes em diferentes espécies. Como esperado, as maiores relações de ortologia se dão entre membros da família Fabaceae (da qual *V. unguiculata* é representante). Respectivamente, *P. vulgaris*, *G. max* e *M. truncatula* são as espécies que exibiram maior grau de ortologia (**Figura 8A; 8B**), o que se justifica pela maior disponibilidade de dados no banco consultado. Essas culturas (feijão-caupi, feijão-comum e soja) são importantes economicamente e tal informação pode ser empregada em ações de melhoramento genético de leguminosas. Os índices variantes de ortologia entre as leguminosas estudadas podem ser explicados pelas propriedades da sintenia (conservação) gênica. Essa está intimamente relacionada à distância filogenética entre espécies (Kaló *et al.*, 2004), sendo que análises executadas a partir de 67 proteínas, presentes em 38 espécies de leguminosas, indicaram que feijão-comum e feijão-caupi são grupos irmãos, quando comparados com a soja (Lei *et al.*, 2016). Das leguminosas sob análise, *M. truncatula* (tribo Trifolieae) é a única que não pertence à tribo Phaseoleae, sendo que um menor grau de ortologia em relação ao feijão-caupi, comparativamente às outras leguminosas, já seria esperado (Choi *et al.*, 2004).

Por fim, ressalta-se o considerável índice geral de ortologia (ao menos 64%; **Figura 8A; 8B**) de loci codificadores de T25 | UR e T15 | UR, em relação ao pool de espécies estudado. Tal índice abrangeu 34 diferentes famílias vegetais e sugere a importância desses loci e seus produtos devido a essa ampla conservação. Vale destacar que as leguminosas em questão apresentam um desempenho bem menos adaptado sob seca do que o feijão-caupi, o que deve estar associado a polimorfismos nos genes em questão ou a uma diferente regulação destes elementos, o que demanda estudos de seus elementos cis reguladores candidatos (CCREs) e dos fatores de transcrição envolvidos.

b. Enriquecimento de elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs)

Os CCREs enriquecidos foram associados a importantes fatores de transcrição (TFs) os quais se encontram intimamente envolvidos na resposta a estresses osmótico e de seca. *Bona fide* CCREs associados a C2H2 e BPC1 foram enriquecidos em T25 | UR e T150 | UR sugerindo ativa participação desses TFs na resposta à desidratação radicular em Pingo de Ouro. Yin *et al.* (2017) relataram que o ZAT18 (um TF C2H2)

foi induzido em resposta à seca em *Arabidopsis*. Sob a condição referida, linhas transgênicas que superexpressaram ZAT18 apresentaram menor taxa de perda de água e maior teor de água nas folhas, quando comparadas a plantas controle. Já Huang *et al.* (2009) observaram que ZFP245, um TF do tipo C2H2, aumentou a tolerância do arroz (*Oryza sativa*) à seca. As linhas transgênicas que superexpressaram ZFP245 apresentaram sensibilidade aumentada ao ABA exógeno, sugerindo que o ZFP245 funciona nas respostas ao estresse em questão por meio de uma via dependente do ABA. BPC1, por sua vez, ainda não possui caracterização funcional sob condições não favoráveis.

No que tange aos *bona fide* CCRES específicos de T25 | UR, membros das famílias bZIP (Wang *et al.*, 2019), MADS (Castelán-Muñoz *et al.*, 2019) e bHLH (Li *et al.*, 2019) todos são caracterizados funcionalmente apresentando impacto positivo tanto na fisiologia molecular (ex.: aumentando a síntese ABA ou atuando na via de sinalização do ABA) quanto na morfologia (ex.: promovendo o desenvolvimento radicular) de vegetais sob condições de estresse abióticos como seca, salinidade, etc.

Para os *bona fide* CCRES enriquecidos somente nos promotores dos genes codificadores das isoformas de T150 | UR, destaca-se aqueles associados aos TFs Trihelix. Tal família de fatores de transcrição tem sido recentemente escrutinada quanto ao seu efeito. Xu *et al.* (2018) observaram que AST1 (um membro da família Trihelix de TFs) medeia a tolerância ao estresse salino e osmótico em *Arabidopsis*.

5. Conclusões

O presente trabalho disponibiliza uma abordagem abrangente da resposta do acesso tolerante de feijão-caupi à desidratação radicular (importante vertente do estresse da seca). Foram empregadas duas estratégias (molecular e fisiológica) de análise associadas a dois momentos distintos da dinâmica de uma condição estressante: o desencadeamento do processo e o estresse resultante, propriamente dito. Observou-se que a camada molecular é a primeira a ser ativada: embora os dados fisiológicos não apresentassem variação significativa, quando comparados RD25 e seu respectivo controle, os dados RNA-Seq indicavam extensiva modulação de genes alvos. Tanto RD25 (aqui cunhado como ‘*transcriptoma de percepção, sinalização e reação*’ à nova condição imposta), quanto RD150 (cunhado como ‘*transcriptoma de sinalização, reação e ajuste*’ ao estresse imposto) apresentaram enriquecimento de alguns processos biológicos associados à resposta a estresses bióticos, quando comparados aos respectivos controles. Isso pode indicar a importância de mecanismos de *crosstalk*, bem como sugerir que Pingo de Ouro adota uma estratégia de defesa multifacetada, visando adicionalmente combater possíveis agentes patogênicos oportunistas. No que tange aos processos biológicos associados à resposta a estresses abióticos, destacaram-se: aqueles relativos ao processamento de ROS [‘*response to oxidative stress (RO)*’ T25 | UR, ‘*glutathione metabolic process (GM)*’ T150 | UR e ‘*toxin catabolic process (TC)*’ T150 | UR], metabolismo iônico [‘*response to salt stress (RS)*’ - T25 e T150 | UR] e resposta à desidratação propriamente dita [‘*response to water deprivation (RWa)*’ - T150 | UR]. Tratam-se de mecanismos bastante atuantes na resposta à desidratação celular. Interessantemente, termos como ‘*response to wounding (RWo)*’ - T150 | UR’ e ‘*response to cadmium ion (RCa)*’ - T25 | UR também se apresentaram enriquecidos. Os dados sugeriram que mecanismos de resposta relacionados ao cádmio e ao ferimento podem estar envolvidos em vias de sinalização ou resposta à seca em Pingo de Ouro. Nós sumarizamos as famílias gênicas mais atuantes (enriquecidas) ao longo do ensaio. Para T25 | UR, houve preponderância daquelas associadas a processos de sinalização,

indo ao encontro do momento fisiológico escrutinado. Para T150 | UR, uma miscelânea de fatores de transcrição, quinases e outras enzimas, nos evidenciando a heterogeneidade dos atores e a complexidade da resposta vegetal ao estresse de desidratação radicular. No que tange à dinâmica transcricional das vias metabólicas, houve uma clara mudança de topologia na transição de T25 | UR para T150 | UR: no primeiro, os módulos induzidos estavam associados a funções de *housekeeping*; para o segundo, módulos associados ao metabolismo mais especializado foram ativados.

Em relação à genômica dos genes componentes de T25 | UR e T150 | UR estudados, observa-se que os loci codificadores dos mesmos apresentam elevada conservação em relação aos 93 genomas analisados. Isso reforça a importância desse grupo de genes e os alça ao status de importantes alvos biotecnológicos. Por fim, o estudo dos CCREs nos promotores dos genes dos duetos acima mencionados, nos evidenciou que C2H2 e BPC1 foram enriquecidos em ambos, apesar do seu não enriquecimento nas análises das famílias gênicas.

O presente trabalho auxilia na decodificação dos mecanismos de tolerância (de sinalização e reação) das plantas. Nossos resultados podem ser utilizados para promover o aprimoramento biotecnológico do feijão-caupi perante condições de seca, ou estresses causadores de perturbações osmóticas em geral. Algumas das vias enriquecidas e os genes identificados serão candidatos promissores que podem ser manipulados em outros acessos de feijão-caupi e espécies de leguminosas.

Referências

Araújo WL, Nunes-Nesi A, Nikoloski Z, Sweetlove LEEJ and Fernie AR (2011) Metabolic control and regulation of the tricarboxylic acid cycle in photosynthetic and heterotrophic plant tissues. *Plant Cell Environ* 35:1–21. doi: 10.1111/j.1365-3040.2011.02332.x

Ashrafi M, Azimi-Moqadam M-R, Moradi P, MohseniFard E, Shekari F and Kompany-Zareh M (2018) Effect of drought stress on metabolite adjustments in drought tolerant and sensitive thyme. *Plant Physiol Biochem* 132:391–399. doi: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.09.009>

Bailey TL and Elkan C (1994) Fitting a Mixture Model By Expectation Maximization To Discover Motifs In Biopolymer. undefined

Bastos EA, Nascimento SP, da Silva EM, Filho FRF and Gomide RL (2011) Identificação de genótipos de feijão-caupi tolerantes à seca. *Rev Cienc Agron* 42:100–107. doi: 10.1590/S1806-66902011000100013

Bedre R and Mandadi K (2019) GenFam: A web application and database for gene family-based classification and functional enrichment analysis. *Plant Direct* 3:e00191. doi: 10.1002/pld3.191

Bertolli SC, Rapchan GL and Souza GM (2012) Photosynthetic limitations caused by different rates of water-deficit induction in *Glycine max* and *Vigna unguiculata*. *Photosynthetica* 50:329–336. doi: 10.1007/s11099-012-0036-4

Blakeslee JJ, Zhou HW, Heath JT, Skottke KR, Rodriguez Barrios JA, Liu SY and DeLong A (2008) Specificity of RCN1-mediated protein phosphatase 2A regulation in meristem organization and stress response in roots. *Plant Physiol* 146:539–553. doi: 10.1104/pp.107.112995

Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Genome analysis Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. 30:2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170

Boukar O, Fatokun CA, Huynh B-L, Roberts PA and Close TJ (2016) Genomic Tools in Cowpea Breeding Programs: Status and Perspectives. *Front Plant Sci* 7:757. doi: 10.3389/fpls.2016.00757

Bourgey M, Dali R, Eveleigh R, Chen KC, Letourneau L, Fillon J, Michaud M, Caron M, Sandoval J, Lefebvre F et al. (2019) GenPipes: an open-source framework for distributed and scalable genomic analyses. 8:1–11. doi: 10.1093/gigascience/giz037

Broeckling CD, Huhman D V, Farag MA, Smith JT, May GD, Mendes P, Dixon RA and Sumner LW (2005) Metabolic profiling of *Medicago truncatula* cell cultures reveals the effects of biotic and abiotic elicitors on metabolism. *J Exp Bot* 56:323–336. doi: 10.1093/jxb/eri058

Castelán-Muñoz N, Herrera J, Cajero-Sánchez W, Arrizubieta M, Trejo C, García-Ponce B, Sánchez M de la P, Álvarez-Buylla ER and Garay-Arroyo A (2019) MADS-box genes are key components of genetic regulatory networks involved in abiotic stress and plastic developmental responses in plants. *Front Plant Sci* 10:853. doi: 10.3389/fpls.2019.00853

Chadwick M, Trewin H, Gawthrop F and Wagstaff C (2013) Sesquiterpenoids Lactones: Benefits to Plants and People. *Int J Mol Sci* 14:12780–12805. doi: 10.3390/ijms140612780

Choi HK, Mun JH, Kim DJ, Zhu H, Baek JM, Mudge J, Roe B, Ellis N, Doyle J, Kiss GB et al. (2004) Estimating genome conservation between crop and model legume species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15289–15294. doi: 10.1073/pnas.0402251101

Csordás Tóth É, Vissi E, Kovács I, Szöke A, Ariño J, Gergely P, Dudits D and Dombrádi V (2000) Protein phosphatase 2A holoenzyme and its subunits from *Medicago sativa*. *Plant Mol Biol* 43:527–536. doi: 10.1023/A:1006436925253

de Jesús-Pires C, Ferreira-Neto JRC, Pacifico Bezerra-Neto J, Kido EA, de Oliveira Silva RL, Pandolfi V, Wanderley-Nogueira AC, Binneck E, da Costa AF, Pio-Ribeiro G et al. (2019) Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. *Curr Protein Pept Sci* 21:36–51. doi: 10.2174/1389203720666190318164905

de Zelicourt A, Colcombet J and Hirt H (2016) The Role of MAPK Modules and ABA during Abiotic Stress Signaling. *Trends Plant Sci* 21:677–685. doi: 10.1016/j.tplants.2016.04.004

Deluca DS, Levin JZ, Sivachenko A, Fennell T, Nazaire M-D, Williams C, Reich M, Winckler W and Getz G (2012) RNA-SeQC: RNA-seq metrics for quality control and process optimization. *Bioinforma Appl NOTE* 28:1530–1532. doi: 10.1093/bioinformatics/bts196

Ding Z, Li S, An X, Liu X, Qin H and Wang D (2009) Transgenic expression of MYB15 confers enhanced sensitivity to abscisic acid and improved drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Genet Genomics* 36:17–29. doi: 10.1016/S1673-8527(09)60003-5

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M and Gingeras TR (2013) Sequence analysis STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. 29:15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635

Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H and Ribas-Carbó M (2006) Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: Responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiol Plant* 127:343–352. doi: 10.1111/j.1399-3054.2006.00621.x

Flexas J, Bota J, Loreto F, Cornic G and Sharkey TD (2004) Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol* 6:269–279. doi: 10.1055/s-2004-820867

Führes H, Hartwig M, Molina LEB, Heintz D, Van Dorsselaer A, Braun HP and Horst WJ (2008) Early manganese-toxicity response in *Vigna unguiculata* L. - A proteomic and transcriptomic study. *Proteomics* 8:149–159. doi: 10.1002/pmic.200700478

Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL and Noble WS (2007) Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol* 8:R24. doi: 10.1186/gb-2007-8-2-r24

Halter T, Imkampe J, Mazzotta S, Wierzba M, Postel S, Bücherl C, Kiefer C, Stahl M, Chinchilla D, Wang X et al. (2014) The leucine-rich repeat receptor kinase BIR2 is a negative regulator of BAK1 in plant immunity. *Curr Biol* 24:134–143. doi: 10.1016/j.cub.2013.11.047

Han Y yang, Li A xiu, Li F, Zhao M rong and Wang W (2012) Characterization of a wheat (*Triticum aestivum* L.) expansin gene, TaEXPB23, involved in the abiotic stress response and phytohormone regulation. *Plant Physiol Biochem* 54:49–58. doi: 10.1016/j.plaphy.2012.02.007

Hildebrandt TM (2018) Synthesis versus degradation: directions of amino acid metabolism during *Arabidopsis* abiotic stress response. *Plant Mol Biol* 98:121–135. doi: 10.1007/s11103-018-0767-0

Hildebrandt TM, Nesi AN, Araújo WL and Braun H-P (2015) Amino Acid Catabolism in Plants. *Mol Plant* 8:1563–1579. doi: <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005>

Hsieh EJ, Cheng MC and Lin TP (2013) Functional characterization of an abiotic stress-inducible transcription factor AtERF53 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 82:223–237. doi: 10.1007/s11103-013-0054-z

Hu B, Yao H, Peng X, Wang R, Li F, Wang Z, Zhao M and Jin L (2019) Overexpression of Chalcone Synthase Improves Flavonoid Accumulation and Drought Tolerance in Tobacco. *Preprints* 1–20. doi: 10.20944/PREPRINTS201906.0103.V1

Huang J, Sun SJ, Xu DQ, Yang X, Bao YM, Wang ZF, Tang HJ and Zhang H (2009) Increased tolerance of rice to cold, drought and oxidative stresses mediated by the overexpression of a gene that encodes the zinc finger protein ZFP245. *Biochem Biophys Res Commun* 389:556–561. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.09.032

Huang T and Jander G (2017) Absciscic acid-regulated protein degradation causes osmotic stress-induced accumulation of branched-chain amino acids in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 246:737–747. doi: 10.1007/s00425-017-2727-3

Jang JY, Lee SH, Rhee JY, Chung GC, Ahn SJ and Kang H (2007) Transgenic *Arabidopsis* and tobacco plants overexpressing an aquaporin respond differently to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 64:621–632. doi: 10.1007/s11103-007-9181-8

Jiang L, Tian X, Li S, Fu Y, Xu J and Wang G (2019) The aabhlh35 transcription factor identified from anthurium andraeanum is involved in cold and drought tolerance. *Plants*. doi: 10.3390/plants8070216

Jiang Y and Deyholos MK (2009) Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 69:91–105. doi: 10.1007/s11103-008-9408-3

Jing X, Cai C, Fan S, Wang L and Zeng X (2019) Spatial and temporal calcium signaling and its physiological effects in *Moso Bamboo* under drought stress. *Forests*. doi: 10.3390/f10030224

Kaló P, Seres A, Taylor SA, Jakab J, Kevei Z, Kereszt A, Endre G, Ellis THN and Kiss GB (2004) Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol Genet Genomics* 272:235–246. doi: 10.1007/s00438-004-1055-z

Kido EA, Barbosa PK de A, Ferreira-Neto JRC, Pandolfi V, Houllou-Kido LM, Crovella S, Molina C, Kahl G and Benko-Iseppon AM (2011) Identification of Plant

Protein Kinases in Response to Abiotic and Biotic Stresses Using SuperSAGE. *Curr Protein Pept Sci* 12:643–656. doi: 10.2174/1389203711109070643

Kirungu JN, Magwanga RO, Lu P, Cai X, Zhou Z, Wang X, Peng R, Wang K and Liu F (2019) Functional characterization of Gh-A08G1120 (GH3.5) gene reveal their significant role in enhancing drought and salt stress tolerance in cotton. *BMC Genet.* doi: 10.1186/s12863-019-0756-6

Lei W, Ni D, Wang Y, Shao J, Wang X, Yang D, Wang J, Chen H and Liu C (2016) Intrasppecific and heteroplasmic variations, gene losses and inversions in the chloroplast genome of *Astragalus membranaceus*. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep21669

Li J, Nter Brader G and Tapio Palva E (2008) Kunitz Trypsin Inhibitor: An Antagonist of Cell Death Triggered by Phytopathogens and Fumonisin B1 in *Arabidopsis*. *Mol Plant* • 1:482–495. doi: 10.1093/mp/ssn013

Li Z, Liu C, Zhang Y, Wang B, Ran Q and Zhang J (2019) The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *J Exp Bot* 70:5471–5486. doi: 10.1093/jxb/erz307

Lonardi S, Muñoz-Amatriaín M, Liang Q, Shu S, Wanamaker SI, Lo S, Tanskanen J, Schulman AH, Zhu T, Luo MC et al. (2019) The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Plant J* 98:767–782. doi: 10.1111/tpj.14349

Martínez-Ballesta M, Moreno-Fernández DA, Castejón D, Ochando C, Morandini PA and Carvajal M (2015) The impact of the absence of aliphatic glucosinolates on water transport under salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci.* doi: 10.3389/fpls.2015.00524

Martins PK, Jordão BQ, Yamanaka N, Farias JRB, Beneventi MA, Binneck E, Fuganti R, Stolf R and Nepomuceno AL (2008) Differential gene expression and mitotic cell analysis of the drought tolerant soybean (*Glycine max* L. Merrill Fabales, Fabaceae) cultivar MG/BR46 (Conquista) under two water deficit induction systems. *Genet Mol Biol* 31:512–521.

Misra AK (2014) Climate change and challenges of water and food security. *Int J Sustain Built Environ* 3:153–165. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijbsbe.2014.04.006>

Oliveira AD de, Fernandes EJ and Rodrigues T de JD (2005) Condutância estomática como indicador de estresse hídrico em feijão. *Eng Agrícola* 25:86–95. doi: 10.1590/s0100-69162005000100010

Pan L, Zhang X, Wang J, Ma X, Zhou M, Huang L, Nie G, Wang P, Yang Z and Li J (2016) Transcriptional Profiles of Drought-Related Genes in Modulating Metabolic Processes and Antioxidant Defenses in *Lolium multiflorum*. *Front Plant Sci* 7:519. doi: 10.3389/fpls.2016.00519

Panozzo A, Dal Cortivo C, Ferrari M, Vicelli B, Varotto S and Vamerali T (2019) Morphological Changes and Expressions of AOX1A, CYP81D8, and Putative PFP Genes in a Large Set of Commercial Maize Hybrids Under Extreme Waterlogging. *Front Plant Sci* 10:62. doi: 10.3389/FPLS.2019.00062

Pott DM, Osorio S and Vallarino JG (2019) From Central to Specialized Metabolism: An Overview of Some Secondary Compounds Derived From the Primary Metabolism for Their Role in Conferring Nutritional and Organoleptic Characteristics to Fruit. *Front Plant Sci* 10:835.

Prasch CM and Sonnewald U (2013) Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol* 162:1849–1866. doi: 10.1104/pp.113.221044

Pratelli R and Pilot G (2014) Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *J Exp Bot* 65:5535–5556. doi: 10.1093/jxb/eru320

Radwan A, Kleinwachter M and Selmar D (2017) Impact of drought stress on

specialised metabolism: Biosynthesis and the expression of monoterpene synthases in sage (*Salvia officinalis*). *Phytochemistry* 141:20–26. doi: 10.1016/j.phytochem.2017.05.005

Rentel MC, Lecourieux D, Ouaked F, Usher SL, Petersen L, Okamoto H, Knight H, Peck SC, Grierson CS, Hirt H et al. (2004) OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 427:858–861. doi: 10.1038/nature02353

Rodrigues FA, Marcolino-Gomes J, de Fátima Corrêa Carvalho J, do Nascimento LC, Neumaier N, Farias JRB, Carazzolle MF, Marcelino FC and Nepomuceno AL (2012) Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genet Mol Biol* 35:304–314. doi: 10.1590/S1415-47572012000200011

Rodríguez-Concepción M and Boronat A (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiol* 130:1079–1089. doi: 10.1104/pp.007138

Sharma A, Shahzad B, Rehman A, Bhardwaj R, Landi M and Zheng B (2019) Response of Phenylpropanoid Pathway and the Role of Polyphenols in Plants under Abiotic Stress. *Molecules*. doi: 10.3390/molecules24132452

Sinha R, Irulappan V, Mohan-Raju B, Suganthi A and Senthil-Kumar M (2019) Impact of drought stress on simultaneously occurring pathogen infection in field-grown chickpea. *Sci Rep* 9:1–15. doi: 10.1038/s41598-019-41463-z

Sonnhammer ELL and Ostlund G (2015) InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gku1203

Souza RP, Machado EC, Silva JAB, Lagôa AMMA and Silveira JAG (2004) Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. *Environ Exp Bot* 51:45–56. doi: 10.1016/S0098-8472(03)00059-5

Spriggs A, Henderson ST, Hand ML, Johnson SD, Taylor JM and Koltunow A (2018) Assembled genomic and tissue-specific transcriptomic data resources for two genetically distinct lines of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) walp). *Gates Open Res.* doi: 10.12688/gatesopenres.12777.2

Stincone A, Prigione A, Cramer T, Wamelink MMC, Campbell K, Cheung E, Olin-Sandoval V, Gruning N-M, Kruger A, Tauqeer Alam M et al. (2015) The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biol Rev Camb Philos Soc* 90:927–963. doi: 10.1111/brv.12140

Tan H, Huang H, Tie M, Tang Y, Lai Y and Li H (2016) Transcriptome profiling of two asparagus bean (*Vigna unguiculata* subsp. *sesquipedalis*) cultivars differing in chilling tolerance under cold stress. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0151105

Thatcher SR, Danilevskaya ON, Meng X, Beatty M, Zastrow-Hayes G, Harris C, Van Allen B, Habben J and Li B (2016) Genome-wide analysis of alternative splicing during development and drought stress in maize1[OPEN]. *Plant Physiol* 170:586–599. doi: 10.1104/pp.15.01267

Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL and Pachter L (2013) Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol* 31:46–53. doi: 10.1038/nbt.2450

Turtola S, Manninen A-M, Rikala R and Kainulainen P (2003) Drought stress alters the concentration of wood terpenoids in Scots pine and Norway spruce seedlings.

J Chem Ecol 29:1981–1995.

Van der Auwera GA, Carneiro MO, Hartl C, Poplin R, del Angel G, Levy-Moonshine A, Jordan T, Shakir K, Roazen D, Thibault J et al. (2013) From fastQ data to high-confidence variant calls: The genome analysis toolkit best practices pipeline. *Curr Protoc Bioinforma*. doi: 10.1002/0471250953.bi1110s43

Vitulo N, Forcato C, Carpinelli EC, Telatin A, Campagna D, D'Angelo M, Zimbello R, Corso M, Vannozzi A, Bonghi C et al. (2014) A deep survey of alternative splicing in grape reveals changes in the splicing machinery related to tissue, stress condition and genotype. *BMC Plant Biol*. doi: 10.1186/1471-2229-14-99

Vriet C, Russinova E and Reuzeau C (2012) Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* 24:842–857. doi: 10.1105/tpc.111.094912

Wang W, Qiu X, Yang Y, Kim HS, Jia X, Yu H and Kwak S-S (2019) Sweetpotato bZIP Transcription Factor IbABF4 Confers Tolerance to Multiple Abiotic Stresses. *Front Plant Sci* 10:630. doi: 10.3389/fpls.2019.00630

Wasaya A, Zhang X, Fang Q and Yan Z (2018) Root Phenotyping for Drought Tolerance: A Review. *Agronomy* 8:241. doi: 10.3390/agronomy8110241

Wilkins KA, Matthus E, Swarbreck SM and Davies JM (2016) Calcium-mediated abiotic stress signaling in roots. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.01296

Xu H, Shi X, He L, Guo Y, Zang D, Li H, Zhang W and Wang Y (2018) *Arabidopsis thaliana* Trihelix Transcription Factor AST1 Mediates Salt and Osmotic Stress Tolerance by Binding to a Novel AGAG-Box and Some GT Motifs. *Plant Cell Physiol*. doi: 10.1093/PCP/PCY032

Xu J, Tian Y-S, Xing X-J, Peng R-H, Zhu B, Gao J-J and Yao Q-H (2016) Over-expression of AtGSTU19 provides tolerance to salt, drought and methyl viologen stresses in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 156:164–175. doi: 10.1111/ppl.12347

Yao S, Jiang C, Huang Z, Torres-Jerez I, Chang J, Zhang H, Udvardi M, Liu R and Verdier J (2016) The *Vigna unguiculata* Gene Expression Atlas (VuGEA) from de novo assembly and quantification of RNA-seq data provides insights into seed maturation mechanisms. *Plant J* 88:318–327. doi: 10.1111/tpj.13279

Yin M, Wang Y, Zhang L, Li J, Quan W, Yang L, Wang Q and Chan Z (2017) The *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc finger transcription factor ZAT18 is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *J Exp Bot* 68:2991–3005. doi: 10.1093/jxb/erx157

Zhang Z, Mao C, Shi Z and Kou X (2017) The Amino Acid Metabolic and Carbohydrate Metabolic Pathway Play Important Roles during Salt-Stress Response in Tomato. *Front Plant Sci* 8:1231. doi: 10.3389/fpls.2017.01231

Zheng Z, Qamar SA, Chen Z and Mengiste T (2006) *Arabidopsis* WRKY33 transcription factor is required for resistance to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* 48:592–605. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02901.x

Zúñiga-León E, Carrasco-Navarro U and Fierro F (2018) NeVOmics: An enrichment tool for gene ontology and functional network analysis and visualization of data from OMICs technologies. *Genes (Basel)*. doi: 10.3390/genes9120569

Zuo J, Wang Y, Zhu B, Luo Y, Wang Q and Gao L (2018) sRNAome and transcriptome analysis provide insight into chilling response of cowpea pods. *Gene* 671:142–151. doi: 10.1016/j.gene.2018.05.064

Materiais Suplementares

A. Condições de crescimento e aplicação de estresse



Cultivo em casa de vegetação



Aplicação do estresse

B. Desenhos experimentais realizados

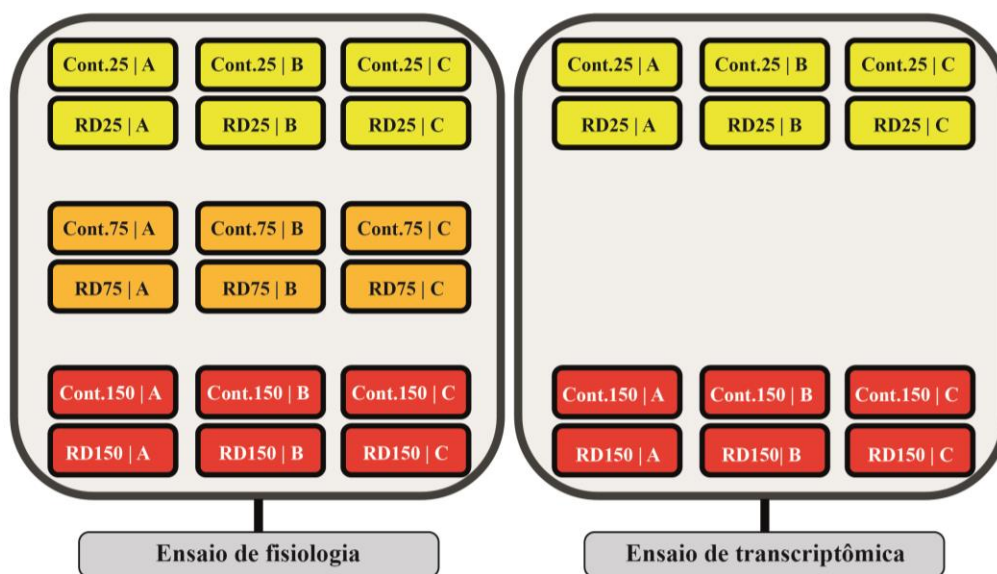


Figura Suplementar 1. Ações prévias implementadas para a execução das análises do presente trabalho. **A.** Condições de crescimento e aplicação de estresse: apresentação do cultivo de Pingo de Ouro via solução hidropônica em ambiente controlado; realização do tratamento de desidratação radicular, retirando as plantas tratadas da solução nutritiva; **B.** Desenhos experimentais implementados para a execução dos ensaios de fisiologia ('1') e transcriptômica ('2'), apresentando três réplicas biológicas (três: A, B, C), tempos de tratamentos empregados [RD25 (raízes e folhas coletadas em 25 minutos após a remoção da solução hidropônica); RD75 (raízes e folhas coletadas em 75 minutos após a remoção da solução hidropônica); RD 150 (raízes e folhas coletadas em 150 minutos após a remoção da solução hidropônica)] e seus respectivos controles não estressados [Cont.25 (tratamento RD25); Cont.75 (RD75); Cont.150 (RD150)] **Legenda:** RD (Desidratação Radicular); Cont. (Controle).

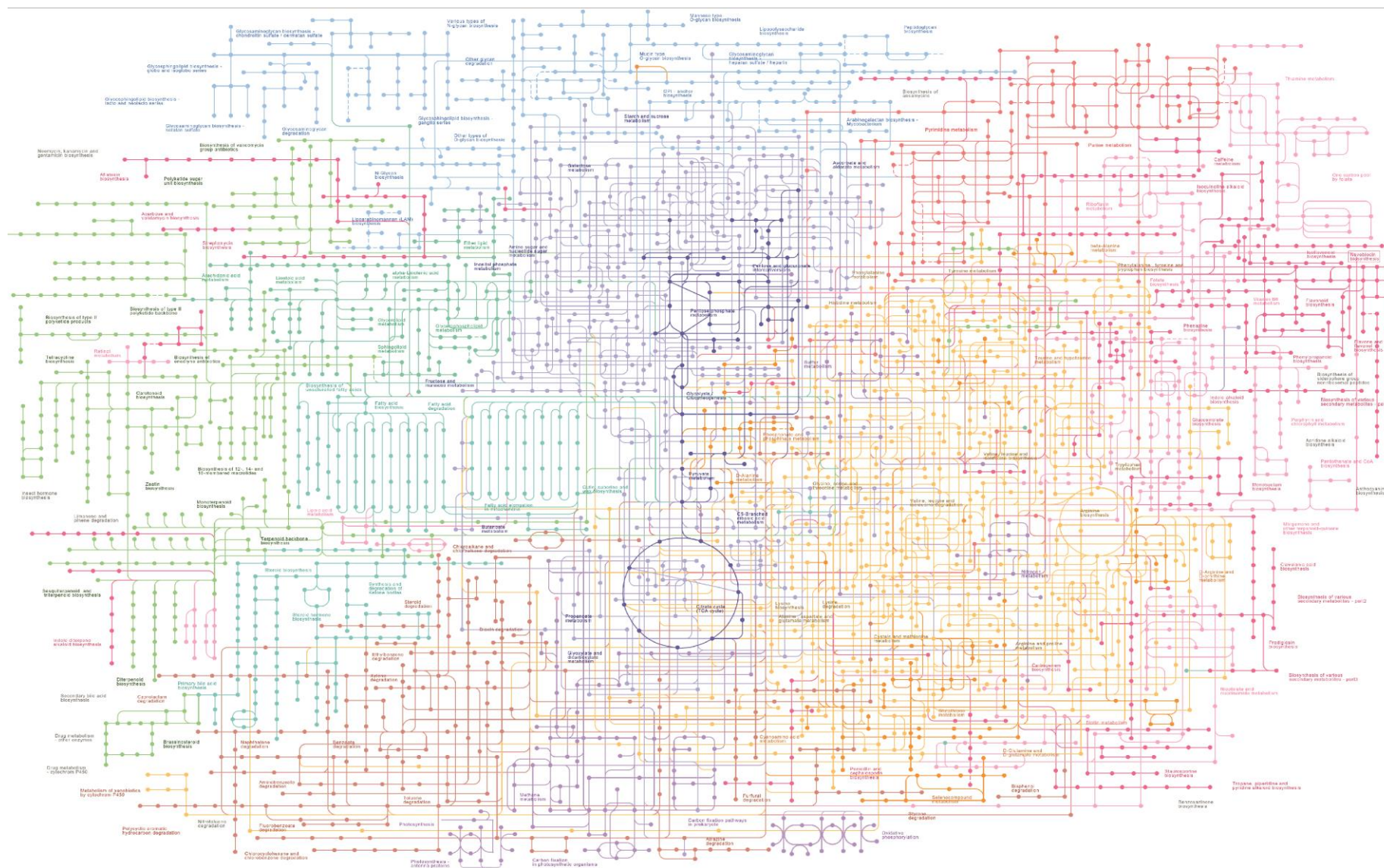


Figura Suplementar 2. Mapa de referência do metabolismo contido na base de dados KEGG Pathway.

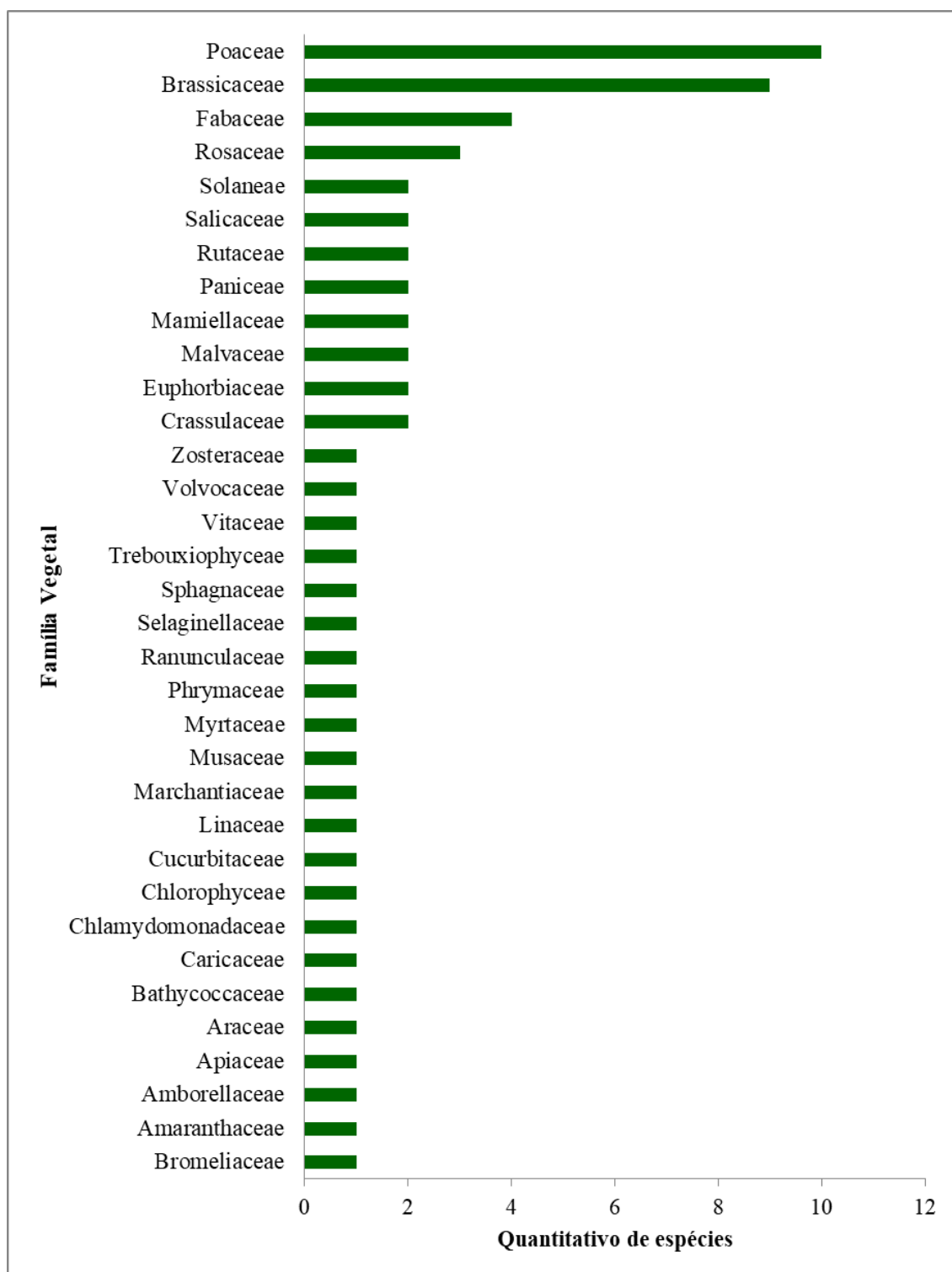


Figura Suplementar 3. Quantitativo de espécies relativas às 34 diferentes famílias vegetais, depositados na base de dados Phytozome, que exibiram relação de ortologia com os loci de feijão-caupi ancoradores de transcritos induzidos (T25 | UR e T150 | UR)

Tabela Suplementar 1. Resultado tabular da análise de enriquecimento de Processos Biológicos (PB) em T150 | DR realizada pelo NeVOmics.

GO	Term	go_list	go_back	tot_list	tot_back	p-value	Bonf_corr	Rank	FDR	Sig	entry
GO:000641 2	translation	42	317	475	13476	1E-13	6,1E-11	1	5E-05	T	O22860;O23238;P0DH99;P49200;P49204; P49209;P49211;P49227;P49637;P49689; P49690;P50883;P51413;P51419;P51430; P56798;P59271;Q42064;Q42351;Q5XF75; Q84WM9;Q8W4H7;Q9ASR1;Q9C8F7;Q9C912; Q9C9C6;Q9FIF3;Q9FLF0;Q9LHN1;Q9LUQ6; Q9LZ57;Q9M2F1;Q9M885;Q9SCM3;Q9SF40; Q9SI20;Q9SJ36;Q9SQT5;Q9SR73;Q9SRK6; Q9T043;Q9ZUT9
GO:000218 1	cytoplasmic translation	8	20	475	13476	1,9E-07	0,00012	2	1E-04	T	O04204;P49209;P51413;Q42064;Q9C912; Q9C9C6;Q9FLV1;Q9LZ57
GO:000002 7	ribosomal large subunit assembly	7	30	475	13476	6,5E-05	0,0389	3	0,00015	T	O04204;P49227;P50883;Q9ASU7;Q9C9C6; Q9LUG5;Q9SQT5
GO:000641 4	translational elongation	8	42	475	13476	9,2E-05	0,05513	4	0,0002	T	P0DH99;Q5XF75;Q84WM9;Q8W4H7;Q9ASR1; Q9FLV1;Q9LXM8;Q9SI20

Tabela Suplementar 2. Relações de ortologia dos loci de feijão-caupi ancoradores de transcritos induzidos em T25 (T25 | UR), apresentando as espécies (e respectivas famílias), o quantitativo absoluto e a porcentagem de loci conservados nas mesmas.

Ordem	Espécies	Família Vegetal	Quantitativo de loci ortólogos	Porcentagem
1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	778	92%
2	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	759	90%
3	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	676	80%
4	<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae	639	76%
5	<i>Gossypium raimondii</i>	Malvaceae	638	76%
6	<i>Eucalyptus grandis</i>	Myrtaceae	630	75%
7	<i>Salix purpurea</i>	Salicaceae	630	75%
8	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	627	74%
9	<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	626	74%
10	<i>Theobroma cacao</i>	Malvaceae	626	74%
11	<i>Citrus clementina</i>	Rutaceae	622	74%
12	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	621	74%
13	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Brassicaceae	619	73%
14	<i>Boechera stricta</i>	Brassicaceae	618	73%
15	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	617	73%
16	<i>Mimulus guttatus</i>	Phrymaceae	617	73%
17	<i>Capsella rubella</i>	Brassicaceae	616	73%
18	<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	615	73%
19	<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Crassulaceae	615	73%
20	<i>Brassica rapa</i> FPsc	Brassicaceae	613	73%
21	<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>	Crassulaceae	612	73%
22	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	612	73%
23	<i>Panicum virgatum</i>	Poaceae	610	72%
24	<i>Setaria italica</i>	Paniceae	610	72%
25	<i>Setaria viridis</i>	Paniceae	609	72%
26	<i>Capsella grandiflora</i>	Brassicaceae	608	72%
27	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solaneae	608	72%
28	<i>Eutrema salsugineum</i>	Brassicaceae	606	72%
29	<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	606	72%
30	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	603	71%
31	<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	603	71%
32	<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	601	71%
33	<i>Brachypodium stacei</i>	Poaceae	600	71%
34	<i>Brachypodium distachyon</i>	Poaceae	599	71%
35	<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	598	71%
36	<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	597	71%
37	<i>Panicum hallii</i>	Poaceae	593	70%
38	<i>Solanum tuberosum</i>	Solaneae	593	70%
39	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	592	70%
40	<i>Fragaria vesca</i>	Rosaceae	588	70%
41	<i>Zea mays</i> PH207	Poaceae	588	70%
42	<i>Zea mays</i>	Poaceae	584	69%
43	<i>Ananas comosus</i>	Bromeliaceae	581	69%
44	<i>Aquilegia coerulea</i>	Ranunculaceae	578	68%
45	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	571	68%
46	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Amaranthaceae	566	67%
47	<i>Amborella trichopoda</i>	Amborellaceae	566	67%
48	<i>Brassica oleracea capitata</i>	Brassicaceae	562	67%
49	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	562	67%
50	<i>Oropetium thomaeum</i>	Poaceae	555	66%
51	<i>Zostera marina</i>	Zosteraceae	555	66%
52	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Araceae	551	65%
53	<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	539	64%
54	<i>Sphagnum fallax</i>	Sphagnaceae	453	54%
55	<i>Physcomitrella patens</i>	Poaceae	448	53%
56	<i>Marchantia polymorpha</i>	Marchantiaceae	446	53%
57	<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	443	52%
58	<i>Volvox carteri</i>	Volvocaceae	316	37%
59	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	Trebouxiophyceae	315	37%
60	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadaceae	314	37%
61	<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyceae	290	34%
62	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	Mamiellaceae	286	34%
63	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	Mamiellaceae	283	34%
64	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Bathycoccaceae	261	31%

Tabela Suplementar 3. Relações de ortologia dos loci de feijão-caupi ancoradores de transcritos induzidos em T150 (T150 | UR), apresentando as espécies (e respectivas famílias), o quantitativo absoluto e a porcentagem de loci conservados nas mesmas.

Ordem	Espécies	Família Vegetal	Quantitativo de loci ortólogos	Porcentagem
1	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Fabaceae	612	91%
2	<i>Glycine max</i>	Fabaceae	594	88%
3	<i>Medicago truncatula</i>	Fabaceae	502	74%
4	<i>Eucalyptus grandis</i>	Myrtaceae	497	74%
5	<i>Salix purpurea</i>	Salicaceae	488	72%
6	<i>Cucumis sativus</i>	Cucurbitaceae	486	72%
7	<i>Gossypium raimondii</i>	Malvaceae	484	72%
8	<i>Linum usitatissimum</i>	Linaceae	482	72%
9	<i>Solanum lycopersicum</i>	Solaneae	482	72%
10	<i>Capsella rubella</i>	Brassicaceae	481	71%
11	<i>Prunus persica</i>	Rosaceae	481	71%
12	<i>Kalanchoe laxiflora</i>	Crassulaceae	480	71%
13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Brassicaceae	477	71%
14	<i>Theobroma cacao</i>	Malvaceae	477	71%
15	<i>Malus domestica</i>	Rosaceae	475	70%
16	<i>Mimulus guttatus</i>	Phrymaceae	475	70%
17	<i>Populus trichocarpa</i>	Salicaceae	474	70%
18	<i>Kalanchoe fedtschenkoi</i>	Crassulaceae	472	70%
19	<i>Boechera stricta</i>	Brassicaceae	470	70%
20	<i>Brassica rapa</i> FPsc	Brassicaceae	470	70%
21	<i>Citrus clementina</i>	Rutaceae	470	70%
22	<i>Arabidopsis lyrata</i>	Brassicaceae	468	69%
23	<i>Capsella grandiflora</i>	Brassicaceae	468	69%
24	<i>Panicum virgatum</i>	Poaceae	466	69%
25	<i>Eutrema salsugineum</i>	Brassicaceae	465	69%
26	<i>Manihot esculenta</i>	Euphorbiaceae	465	69%
27	<i>Setaria italica</i>	Panicaceae	464	69%
28	<i>Citrus sinensis</i>	Rutaceae	463	69%
29	<i>Ricinus communis</i>	Euphorbiaceae	463	69%
30	<i>Setaria viridis</i>	Panicaceae	461	68%
31	<i>Aquilegia coerulea</i>	Ranunculaceae	460	68%
32	<i>Panicum hallii</i>	Poaceae	459	68%
33	<i>Brachypodium distachyon</i>	Poaceae	455	68%
34	<i>Brachypodium stacei</i>	Poaceae	455	68%
35	<i>Oryza sativa</i>	Poaceae	455	68%
36	<i>Trifolium pratense</i>	Fabaceae	455	68%
37	<i>Amaranthus hypochondriacus</i>	Amaranthaceae	454	67%
38	<i>Musa acuminata</i>	Musaceae	452	67%
39	<i>Solanum tuberosum</i>	Solaneae	452	67%
40	<i>Sorghum bicolor</i>	Poaceae	449	67%
41	<i>Zea mays</i>	Poaceae	446	66%
42	<i>Daucus carota</i>	Apiaceae	444	66%
43	<i>Zea mays</i> PH207	Poaceae	444	66%
44	<i>Brassica oleracea capitata</i>	Brassicaceae	443	66%
45	<i>Carica papaya</i>	Caricaceae	441	65%
46	<i>Oropetium thomaeum</i>	Poaceae	440	65%
47	<i>Ananas comosus</i>	Bromeliaceae	437	65%
48	<i>Arabidopsis halleri</i>	Brassicaceae	435	65%
49	<i>Fragaria vesca</i>	Rosaceae	434	64%
50	<i>Vitis vinifera</i>	Vitaceae	432	64%
51	<i>Amborella trichopoda</i>	Amborellaceae	412	61%
52	<i>Zostera marina</i>	Zosteraceae	412	61%
53	<i>Spirodela polyrhiza</i>	Araceae	398	59%
54	<i>Physcomitrella patens</i>	Poaceae	325	48%
55	<i>Selaginella moellendorffii</i>	Selaginellaceae	325	48%
56	<i>Sphagnum fallax</i>	Sphagnaceae	320	47%
57	<i>Marchantia polymorpha</i>	Marchantiaceae	313	46%
58	<i>Volvox carteri</i>	Volvocaceae	247	37%
59	<i>Coccomyxa subellipsoidea</i> C-169	Trebouxiophyceae	245	36%
60	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Chlamydomonadaceae	239	35%
61	<i>Dunaliella salina</i>	Chlorophyceae	228	34%
62	<i>Micromonas pusilla</i> CCMP1545	Mamiellaceae	219	32%
63	<i>Micromonas</i> sp. RCC299	Mamiellaceae	202	30%
64	<i>Ostreococcus lucimarinus</i>	Bathycoccaceae	192	28%

APÊNDICE C - FATORES DE TRANSCRIÇÃO BHLH EM FEIJÃO-CAUPI: GENÔMICA ESTRUTURAL E TRANSCRIPTÔMICA SOBRE ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

Artemisa Nazaré Costa Borges^a; José Ribamar Costa Ferreira-Neto^a; Ana Maria Benko-Iseppon^a

^a Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil.

Autor para correspondência:

Ana Maria Benko-Iseppon, Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Centro de Ciências Biológicas, Av. Prof. Moraes Rego 1235, CEP 50.670-420, Recife, PE, Brasil. Telefone: 55-81-2126-7816; Fax: 55-82-2126-8522; E-mail: ana.iseppon@ufpe.br

Resumo

Os fatores de transcrição (TFs) da família bHLH desempenham importantes funções reguladoras em plantas, especialmente relacionadas ao crescimento, desenvolvimento, sinalização hormonal e resposta a diversos estresses bióticos e abióticos. Estudos envolvendo esse TFs em leguminosas economicamente importantes do gênero *Vigna* são, contudo, incipientes. O presente estudo propôs realizar, pela primeira vez, uma análise abrangente dos genes da família bHLH em todo o genoma de *V. unguiculata* (feijão-caupi), considerando as suas distribuições cromossômicas, características estruturais, motivos conservados, mecanismos de expansão genômica, conservação entre outras espécies vegetais, além dos padrões de expressão frente a estresses abiótico (desidratação radicular) e bióticos (injúria mecânica seguida de inoculação viral). Caracterizou-se 175 genes da família bHLH, distribuídos nos 11 cromossomos de *V. unguiculata* (VubHLH). Esses genes foram classificados em 26 subfamílias de acordo com a similaridade de sequências com *Arabidopsis*, suportadas pela conservação de motivos e padrões estruturais de éxon / íntron. A investigação da expansão genômica indicou que os mecanismos de duplicações WGD / segmental, dispersas e em tandem podem ter desempenhado um papel fundamental na expansão dos VubHLHs, com predominância das duplicações WGD / segmental (115 genes) durante a evolução do feijão-caupi. As razões Ka / Ks mostraram que a maioria dos eventos de duplicação em tandem estavam sob seleção purificadora. Os elementos cis-reguladores, por sua vez, revelaram múltiplas potenciais funções biológicas para os VubHLH identificados, principalmente relacionadas ao desenvolvimento, sinalização hormonal e resposta a diversos estresses. Além disso, os VubHLHs mostraram perfis de expressão diferencial sob diferentes estresses, com sete transcritos induzidos em resposta a mais de um estresse investigado, sugerindo um *crosstalk* desses transcritos em respostas à desidratação radicular e resposta precoce a vírus. Os resultados gerados por esse trabalho fornecem subsídios para futuras pesquisas experimentais em feijão-caupi e em outras leguminosas proximamente relacionadas de importante relevância mundial.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*, crosstalk, desidratação radicular, injúria, CABMV, CPSMV.

Introdução

Fatores de transcrição (TFs) são proteínas que apresentam papel fundamental na regulação da expressão gênica. Ligam-se a sequências específicas de DNA (localizadas nas regiões promotoras) e, posteriormente, se conectam à enzima RNA polimerase, direcionando-a à transcrição de genes específicos (Bassolino et al., 2020). Sem TFs não há ativação (transcrição) gênica.

A família dos FTs bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) é encontrada em todos os organismos eucariontes, sendo a segunda maior nesse grupo de organismos (Feller et al., 2011; Hong, 2016). Essas proteínas são caracterizadas por apresentarem um domínio bHLH altamente conservado, composto por cerca de 50 a 60 aminoácidos (aa) (Pires e Dolan, 2010). Esse domínio é caracterizado por duas regiões funcionalmente distintas: uma básica, que facilita a ligação ao DNA, com aproximadamente 10 a 15 aa na região N-terminal do domínio; e uma região HLH, caracterizada por duas α -hélices (hélice '1' e hélice '2') conectadas por um loop de tamanho e sequências variáveis, com aproximadamente 40 aa na região C-terminal do domínio (Atchley et al., 2000; Massari e Curre, 2000; Pires e Dolan et al., 2010).

As proteínas bHLH apresentam um importante papel na regulação de diversos processos biológicos vegetais, como crescimento, desenvolvimento, vias de transdução de sinais e na biossíntese de metabólitos secundários (Heim et al., 2003; Zhang et al., 2012; Fujisawa et al., 2013; Zhu et al., 2015; Gao et al., 2017). Além disso, essas proteínas estão associadas à resposta vegetal a estresses bióticos e abióticos, pela ativação da expressão de genes responsivos à seca, salinidade, alta temperatura, ataque de patógenos (Wang et al., 2012; Fan et al., 2014; Mao et al., 2018; Wang et al., 2019; Shan et al., 2019), dentre outros.

Com os avanços tecnológicos na área das ômicas, trabalhos envolvendo a identificação genômica e análise funcional dos genes bHLH vêm sendo amplamente descritos na literatura (Lang e Ziu, 2020). Diversas subfamílias gênicas de bHLH têm sido descritas em plantas economicamente importantes, como na espécie-modelo *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. (Lorenzo et al., 2010), no arroz (Li et al., 2006), milho (Zhang et al., 2018), trigo (Wang et al., 2019), soja (Hudson e Hudson, 2015), batata (Wang et al., 2018b), tomate (Hua et al., 2015), maçã (Mao et al., 2017), repolho (Shan et al., 2019), beringela (Tian et al., 2019), uva (Wang et al., 2018a), dentre outros.

A família Leguminosae Juss. compreende um grupo de plantas de distribuição cosmopolita e com representantes de grande importância socioeconômica mundial (Lewis et al., 2005; Gepts et al., 2005). *Vigna unguiculata* (L.) Walp. (feijão-caupi), pertencente ao gênero *Vigna* Savi, é uma leguminosa diploide ($2n = 2x = 22$), com tamanho do genoma estimado em ~ 640 Mb (Lonardi et al., 2019). Essa espécie, é amplamente cultivada na África, seu centro de origem, e no Brasil. Possui um alto conteúdo proteico nos seus grãos (cerca de 30% de proteínas), além de ser rica em carboidratos, ácido fólico e sais mineiras (Freire-Filho et al., 2001; Boukar et al., 2016; 2018). É considerada tolerante à seca e a temperaturas elevadas, o que permite o seu cultivo em regiões semiáridas e não irrigadas (Hall et al., 2004; Boukar et al., 2016). Segundo o Conselho em Pesquisa Agrícola Internacional, *V. unguiculata* é uma das oito leguminosas atualmente visadas para o melhoramento agrônomo vegetal (CGIAR, 2018).

Apesar da sua reconhecida importância, estudos envolvendo os TFs bHLH dentro do gênero *Vigna* são escassos na literatura. Trabalhos recentes do CpGC (*Cowpea Genomics Consortium*, liderado pelo nosso grupo de pesquisa), entretanto, têm sugerido o envolvimento desses FTs na resposta de feijão-caupi a estresses, principalmente à desidratação radicular, como observado por Ferreira-Neto et al. (em preparação). Tais autores identificaram elementos cis-regulatórios enriquecidos, associados à superfamília bHLH, em promotores de genes induzidos relacionados à tolerância ao estresse em questão em feijão-caupi. Borges et

al. (em preparação) também realizaram análise análoga com resultado semelhante em promotores gênicos de loci envolvidos no processo de resposta de defesa precoce aos vírus CABMV (Vírus-do-mosaico-do-feijão-caupi transmitido por afídeo) e CPSMV (Vírus do Mosaico Severo do feijão-caupi) na mesma espécie. Tal dado sugere que uma importante parcela dos genes acima mencionados é regulada pela família em questão nas condições analisadas.

Com o exposto, a fim de dar continuidade a esses estudos e aprofundar os conhecimentos em ômicas para esse importante grupo proteico, o presente trabalho objetivou analisar, a partir de diferentes ômicas (genômica estrutural e transcriptômica), a família gênica bHLH em feijão-caupi. Para tal, seus genes foram minerados, identificados e caracterizados no genoma da referida espécie. Adicionalmente, os mecanismos envolvidos na expansão genômica dessa família também foram estudados, bem como sua conservação (ortologia) em relação ao genoma de outras Viridiplantae. Por fim, analisou-se a expressão gênica da referida família em feijão-caupi sob três condições estressantes de importância econômica para a espécie em questão: desidratação radicular; e injúria mecânica seguida de inoculação viral por Vírus-do-mosaico-do-feijão-caupi transmitido por afídeo (CABMV) ou Vírus do Mosaico Severo do feijão-caupi (CPSMV). A partir dessas abordagens, o presente trabalho oferece um significativo avanço na temática escrutinada e estabelece importante marco para futuras pesquisas experimentais com esses alvos em feijão-caupi.

2. Material e Métodos

2.1 Abordagem Genômica

2.1.1 Identificação e mineração de loci dos genes *VubHLH*

Para minerar os membros da família bHLH no genoma de referência do feijão-caupi (Lonardi *et al.*, 2019), três diferentes métodos de triagem foram usados:

- a) O software HMMER foi empregado, usando-se o método Hidden Markov Model (Eddy, 1998), com base nos domínios HLH (PF00010) (hmmsearch, e-value cut-off $< 1,0e^{-5}$).
- b) Realizou-se um BLASTP (e-value cut-off $< 1,0e^{-5}$), usando-se como sondas todos os genes *AtbHLH* do genoma de *Arabidopsis thaliana* (www.arabidopsis.org).
- c) Por fim, as sequências bHLH descritas no arquivo de anotação (Vunguiculata_469_v1.1.annotation_info) do banco de dados Phytozome (V12) para *V. unguiculata* foram selecionadas e comparadas com os resultados obtidos por meio do HMMER e BLASTP.

Após tal etapa, retirou-se a redundância do conjunto de sequências obtidas. Em seguida, para verificar a presença do domínio bHLH conservado nas sequências de aminoácidos das proteínas candidatas e validar sua identificação (*bona fide* bHLHs), o banco de dados Pfam (<http://pfam.janelia.org/>), a ferramenta SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) e o banco de dados ‘Conserved Domain database’ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) foram utilizados. Apenas os genes bHLH candidatos que atenderam a dois destes três critérios foram considerados como *bona-fide VubHLH* (*Vigna unguiculata* bHLH):

- a) domínio bHLH descrito pelo Pfam;
- b) domínio bHLH descrito pelo SMART;
- c) domínio bHLH completo identificado pelo CD-search.

Todas as etapas mencionadas acima foram realizadas contra o proteoma putativo do feijão-caupi (Vunguiculata_469_v1.1.protein_primaryTranscriptOnly.fa; banco de dados Phytozome V12). Somente a isoforma de maior extensão foi escrutinada.

Posteriormente, as sequências proteicas dos *bona fide* VubHLH identificadas e caracterizadas no genoma de *V. unguiculata* foram usadas como sondas, em buscas BLASTP (e-value cut-off $< 1,0e^{-5}$), para a identificação de *VubHLHs* nas bibliotecas de RNA-Seq traduzidas de feijão-caupi disponíveis no CpGC. Os critérios usados para definir um *bona fide* *VubHLH* das bibliotecas CpGC, foram os mesmos estabelecidos para a análise realizada no genoma, conforme descrito acima.

2.1.2 Propriedades proteicas e previsão de localização subcelular

O peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI), para todas as proteínas VubHLHs codificadas no genoma de referência do feijão-caupi, foram preditos por meio da ferramenta online JVirGel (Hiller *et al.*, 2006). A localização subcelular dessas proteínas foram previstas pela ferramenta online CELLO tool (Yu *et al.*, 2006).

2.1.3 Alinhamento múltiplo de sequências, análise fenética, classificação e agrupamento das subfamílias dos genes *VubHLH*

A nomenclatura dos genes confirmados como *bona fide* VubHLH foi atribuída com base na sua localização nos cromossomos de *V. unguiculata*. As sequências proteicas de VubHLH e 141 sequências AtbHLH foram usadas para gerar um alinhamento múltiplo, mediante ClustalW. Posteriormente, a árvore fenética foi construída com base no método *neighbor-joining* (NJ), pelo software MEGAX (Kumar *et al.*, 2018), com as seguintes configurações de parâmetros: método *p-distance*, opção *partial deletion* e bootstrap de 1.000 repetições. De acordo com a topologia da árvore fenética, os VubHLHs foram classificados em subfamílias a partir da classificação dos AtbHLHs intimamente relacionados e valores de suporte de bootstrap em nós relevantes.

Para identificar as regiões de conservação dessas sequências, um segundo alinhamento ClustalW foi conduzido apenas utilizando sequências VubHLH previamente nomeadas e classificadas. O logotipo do motivo bHLH foi obtido submetendo essas sequências à ferramenta WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>) (Crooks *et al.*, 2004).

2.1.4 Características, estrutura gênica e análise dos motivos conservados dos *VubHLH*

As características dos genes *VubHLHs* foram determinadas via Genestats script (<https://gist.github.com/darencard/fcb32168c243b92734e85c5f8b59a1c3>). Os seguintes parâmetros foram examinados: a) comprimento da sequência transcrita; b) número de éxons; c) comprimento total da sequência do éxons; d) número de íntrons; e) comprimento total da sequência do íntron; f) número de blocos CDS; g) comprimento total da sequência CDS; h) número de sequências 5' UTR; i) comprimento total da sequência 5' UTR; j) número de sequências 3' UTR; l) comprimento total da sequência 3' UTR.

O site *Gene Structure Display Server* (GSDS 2.0) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) (Hu *et al.*, 2015) foi usado para representar graficamente as características estruturais dos VubHLH, com base em cada CDS e sua sequência genômica correspondente. Para confirmar os motivos conservados, as proteínas VubHLH identificadas foram analisadas pela ferramenta MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/intro.html>) (Bailey *et al.*, 2009), com as seguintes configurações dos parâmetros: zero ou um, ocorrência de um único motivo por sequência; 10, número máximo de motivos encontrados. Todos os outros parâmetros foram definidos para os valores padrão.

2.1.5 Mecanismos de expansão dos genes *VubHLH*

Para classificar as origens de duplicação dos genes *VubHLH* no genoma do feijão-caupi, o modo de análise *downstream* ‘duplicate_gene_classifier’ da ferramenta Multiple Collinearity Scan (MCScanX; Wang *et al.*, 2012) foi utilizado. A partir desse, os seguintes mecanismos de duplicação foram escrutinados: a) duplicação do genoma completo / segmental (por exemplo, genes colineares presentes em blocos colineares); b) duplicação em tandem (loci adjacentes em regiões genômicas); c) duplicação proximal (pares de genes em regiões cromossômicas próximas, mas não adjacentes); e d) duplicação dispersa.

O seguinte procedimento foi usado pelo MCScanX para atribuir os mecanismos de duplicação: a) todos os genes foram inicialmente classificados como ‘singletons’ (ou seja, sem duplicatas no genoma) e designados de acordo com a ordem de aparição ao longo dos cromossomos; b) os resultados de BLASTP foram avaliados e os genes com hits com outros genes foram reutilizados como sondas denominadas “duplicatas dispersas”; c) em qualquer hit BLASTP, os dois genes foram reutilizados como sondas denominadas “duplicatas proximais”, se existisse uma diferença de *gene rank* < 20 (configurável); d) em qualquer hit BLASTP, os dois genes foram reutilizados como sondas denominadas “duplicatas em tandem” se existisse uma diferença de *gene rank* = 1; e) o MCScanX foi executado. Os genes de ancoragem em blocos colineares foram reutilizados como sondas denominadas ‘duplicação do genoma completo / segmental (WGD/segmental)’; f) por fim, se um gene aparece em múltiplos hits BLAST, ele foi denominado como uma única classe de acordo com a seguinte ordem de prioridade: genoma completo / segmental > em tandem > proximal > disperso.

2.1.6 Taxa de substituições sinônimas (Ks) e não-sinônimas (Ka) para genes duplicados em tandem

A razão entre Ka e Ks (Ka/Ks) foi usada para determinar a pressão de seleção entre os eventos de duplicação em tandem. Inicialmente, o software ClustalW 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) foi utilizado para alinhar as sequências de tamanho completo de genes codificadores dos *bona fide VubHLHs* duplicados em tandem. Em seguida, a razão Ka/Ks foi calculada com a tabela de código genético padrão pelo método Nei–Gojobori (modelo Jukes-Cantor; Nei e Gojobori, 1986) implementado no MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

A razão Ka/Ks é um indicador da história de seleção em genes ou regiões gênicas: a) se esse valor for menor que ‘1’, os pares de genes duplicados podem estar envolvidos na seleção purificadora (também chamada de seleção negativa; resulta na conservação das sequências de aminoácidos); b) se esse valor for igual a ‘1’, significa que a seleção é neutra (sem limitações para a divergência de sequências); c) se esse valor for maior que ‘1’, significa que a seleção é positiva (levando a diferentes peptídeos).

2.1.7 Análise de ortologia dos genes *VubHLH*

Para a detecção de ortologia, informações previamente depositadas na base de dados do Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>) foram utilizadas. Na seção PhytoMine (uma interface InterMine para os dados do Phytozome), foi criada uma query em forma de lista com as identidades dos genes a serem analisados. Noventa e três genomas montados e anotados de 82 espécies de Viridiplantae foram explorados.

Esse resultado foi oriundo de ações do software InParanoid (Sonnhammer e Östlund, 2015), que usa scores de similaridade *pairwise* calculados utilizando o NCBI-BLAST, entre dois proteomas completos para a construção de grupos ortólogos, seguindo os critérios de similaridade de Östlund *et al.* (2010).

2.1.8 Mineração e identificação de elementos cis-reguladores candidatos (CCREs)

Sequências de regiões promotoras (1,0 kb) de genes que codificam *bona fide* VubHLHs foram obtidas no banco de dados Phytozome v.12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), via API (*Application Programming Interface*). Os motivos (elementos cis-reguladores candidatos, ou CCREs) em cada promotor, foram minerados via software MEME v5.0.3 (Bailey e Elkan 1994; <http://meme-suite.org/tools/meme>). Para cada motivo identificado, foi adotado o *e-value* $< 10^{-2}$ como um ponto de corte para a caracterização de *bona fide* CCREs. O número máximo de motivos analisados foi de 10, sendo cada motivo composto por seis a 50 nucleotídeos de extensão.

Posteriormente, o software TomTom v4.11.2 (Gupta *et al.* 2007; <http://meme-suite.org/tools/tomtom>), acoplado ao banco de dados JASPAR (file: JASPAR2018_CORE_plants_non-redundant), foi usado para atribuir um determinado fator de transcrição aos *bona fide* CCREs ainda anônimos. Os alinhamentos foram avaliados por meio dos seguintes critérios estatísticos: *p-value* (cut-off $< 10^{-2}$) e *q-value* (*false discovery rate*, FDR cut-off $< 10^{-2}$). As identidades associadas aos CCREs *bona fide* foram relacionadas ao melhor alinhamento obtido (*best hit*).

2.2 Abordagem transcriptômica

2.2.1 Material vegetal, desenho experimental e aplicação do estresse

2.2.1.1 Ensaio de Desidratação Radicular

Sementes de *Vigna unguiculata* cv. Pingo de Ouro (tolerante ao déficit hídrico e a seca; Rodrigues *et al.*, 2017; Bastos *et al.*, 2011) foram tratadas com Thiram (*tetramethylthiuram disulfide*) a 0,05 % (w/w) e germinadas durante dois dias à temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $65\% \pm 5\%$. Posteriormente, as mudas foram transferidas para um sistema hidropônico (Rodrigues *et al.*, 2012) com solução nutritiva aerada e balanceada com pH 6,6 (Hoagland e Arnon, 1950), em um delineamento experimental em blocos casualizados, com três réplicas biológicas (RBs) (**Figuras Suplementares S1A e S1B**).

Cada réplica biológica (RB) foi composta de dois indivíduos. As plântulas foram colocadas em suportes, de modo que as raízes das mudas ficassem completamente imersas na solução (**Figura Suplementar S1A**). As plântulas foram cultivadas por três semanas (estágio de desenvolvimento V3) em casa de vegetação sob um fotoperíodo natural de aproximadamente 13/11 h ciclo claro/escuro, temperatura de $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $60 \pm 10\%$. Após esse período, o tratamento de desidratação radicular foi iniciado retirando a solução nutritiva das plantas tratadas (**Figura Suplementar S1A**). Raízes e folhas foram coletados após 25 min (RD25), 75 min (RD75) e 150 min (RD150) após a remoção da solução (**Figura Suplementar S1B**). Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C , até a extração do RNA. Para cada tratamento, as respectivas plantas-controle (**Figura Suplementar S1B**) foram mantidas na solução nutritiva em ambiente separado e posteriormente coletadas.

A partir de análises fisiológicas (dados não publicados), os contrastes de expressão ‘RD25 vs Cont.25’ (T25) e ‘RD150 vs Cont.150’ (T150) foram selecionados para a construção das bibliotecas de RNA-Seq.

As sementes do genótipo de feijão-caupi ‘Pingo de Ouro’ (ID: Pingo_de_Ouro_1_2) foram obtidas do ‘Banco Ativo de Germoplasma do Feijão-caupi’ pertencente ao Instituto

Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife – Pernambuco – Brasil). O Prof. Dr. Antônio Félix da Costa (IPA) conduziu, gentilmente, a identificação do genótipo/espécie.

2.2.1.2 Ensaios de injúria mecânica e inoculação dos vírus

Nos ensaios envolvendo vírus, múltiplos estresses (injúria mecânica e inoculação viral) foram utilizados. Os experimentos de injúria mecânica e inoculação com CABMV (Vírus-do-mosaico-do-feijão-caupi transmitido por afídeo) ou CPSMV (Vírus do Mosaico Severo do feijão-caupi) foram realizados sob condições controladas, em casa de vegetação no IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) (**Figura Suplementar S2A**). Para o ensaio com CABMV, utilizou-se o genótipo resistente IT85F-2687 (Rocha *et al.*, 1996; Oliveira *et al.*, 2011) e para CPSMV, utilizou-se o genótipo BR-14 Mulato (Cardoso *et al.*, 1990).

O procedimento experimental foi conduzido de maneira semelhante e independente. Ambos os genótipos foram semeados por três semanas (estágio de desenvolvimento V3), sob fotoperíodo natural e temperatura variando entre 28 e 32°C (**Figura Suplementar S2A**). Para permitir a penetração do vírus no interior do vegetal, as folhas componentes dos trifólios mais jovens foram, previamente, injuriadas mecanicamente com carborundum (carbeto de silício). Posteriormente, ocorreu a aplicação do inóculo viral (**Figura Suplementar S2A**).

Para cada ensaio, foram executados dois tempos de coleta após injúria | inoculação (**Figura Suplementar S2B**): 60 minutos e 16 horas, sendo um respectivo controle absoluto para cada tratamento (**Figura Suplementar S2B**). Os tecidos foliares foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80 °C, até posterior extração do RNA.

Para cada controle e tratamento implementados, o desenho experimental foi fatorial 2x2 (cultivar vs extensão do período pós inoculação), com três RBs (**Figura Suplementar S2B**), sendo cada RB composta por cinco plantas. A fim de evitar o impacto de compostos voláteis usados pelas plantas para sua comunicação, cada tratamento foi realizado em área isolada.

A expressão gênica diferencial dos dois ensaios envolvendo vírus foi composta por uma combinação de dois estresses: injúria mecânica e inoculação viral. Os vírus vegetais são incapazes de iniciar um processo infeccioso sem assistência (de um organismo vetor ou devido a certas práticas agrícolas, por exemplo), uma vez que tais organismos são incapazes de penetrar na parede celular da planta. Segundo Barna e Király (2004) os vírus vegetais não possuem receptores celulares específicos, ao contrário dos bacteriófagos e vírus que infectam animais. Assim, o conjunto 'injúria mecânica e inoculação viral' visa simular o processo infeccioso em um ambiente natural. Adicionalmente, ao analisar tempos iniciais após aplicação do estresse (1 e 16h), é possível investigar a modulação da expressão gênica na resposta precoce e, assim, captar a percepção e sinalização iniciais, relacionadas à uma defesa vegetal frente a vírus.

2.2.2 Bibliotecas RNA-Seq: síntese e sequenciamento

O RNA total foi isolado via kit 'SV Total RNA Isolation System' (Promega, US), de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade e a concentração do RNA total extraído foram analisadas em gel de agarose (1,5 %) e Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, EUA). Apenas as amostras de RNA com integridade (RIN) $\geq 8,0$ foram sequenciadas.

Para a purificação do RNA mensageiro (mRNA) e a construção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA), foi utilizado o kit 'RNAm TruSeq® Stranded LT-Set A' (RS-122-2101) (Illumina, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Reads

paired-end com 100 pb de comprimento foram obtidas via Illumina HiSeq 2500, usando os seguintes kits: ‘HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2’ (PE-402-4002); ‘SBS Kit v2’ (200 Cycle; FC-402-4021); e ‘TruSeq® Stranded mRNA LT Set A’ (RS-122-2101). O sequenciamento dos transcriptomas dos três genótipos de feijão-caupi foi realizado no Centro de Genômica Funcional da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

2.2.3 Montagem e análise de expressão diferencial das bibliotecas de RNA-Seq

As 12 bibliotecas de RNA-Seq sequenciadas para o ensaio de desidratação radicular foram montadas, em conjunto, com as 24 bibliotecas oriundas dos ensaios de ‘injúria mecânica e inoculação viral’, sendo 12 do ensaio com o vírus CABMV e 12 do ensaio com o vírus CPSMV. Essa montagem conjunta permitiu a obtenção de transcritos maiores e mais robustos. Setenta e duas réplicas (12 réplicas biológicas para desidratação radicular + 12 réplicas biológicas para CABMV + 12 réplicas biológicas para CPSMV, com duas réplicas técnicas cada) foram submetidas ao seguinte pipeline: as reads brutas foram montadas por meio do projeto GenPipes (Bourgey et al., 2019) - ‘RNA-Seq *de novo* pipeline’ versão 3.1.3 - da Universidade McGill e Génome Québec Innovation Centre (C3G). Todas as análises de expressão gênica foram realizadas, independentemente para cada ensaio, pela ferramenta edgeR (Robinson et al., 2010), implementada no pipeline GenPipes. Os transcritos com $1 > \text{Log2FC} > 1$, $p < 0,05$ e $\text{FDR} < 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos.

3. Resultados

3.1 Genômica de VubHLHs

3.1.1 Identificação, classificação e propriedades proteicas de VubHLHs

Cento e setenta e cinco genes *VubHLH bona fide* (ou seja, apresentadores de domínio bHLH completo) foram identificados. De acordo com sua localização cromossômica, esses genes foram denominados de *VubHLH1* a *VubHLH175*. As informações específicas para esses genes, incluindo seus IDs, classificação, extensão em nucleotídeos, localização cromossômica, extensão da cadeia polipeptídica, bem como pontos isoelétricos (pI), peso molecular (MW) e localização subcelular estão apresentadas na **Tabela Suplementar S1**.

As 175 proteínas VubHLH apresentaram diversidade estrutural entre si. Os seus respectivos tamanhos variaram de 89 (VubHLH74) a 949 resíduos de aminoácidos (VubHLH169). Já os MW divergiram de 20,0 a 104,09 kDa; enquanto que os valores preditos dos pI variaram de 4,4 até 9,85 (**Tabela Suplementar S1**).

A localização subcelular das 175 proteínas VubHLH foi prevista pela ferramenta CELLO. Os resultados mostraram que a maioria (168) das proteínas preditas se localizam no núcleo. Quatro, uma e duas proteínas VubHLH localizaram-se no citoplasma, cloroplasto e mitocôndria, respectivamente (**Tabela Suplementar S1**).

De acordo com a árvore fenética, incluindo as sequências das 175 proteínas VubHLH e 141 proteínas AtbHLH (**Figura 1**), os membros *VubHLH* foram agrupados em 26 subfamílias, seguindo-se a nomenclatura e classificação da superfamília bHLH em *A. thaliana* (Li et al., 2006; Pires e Dolan, 2010). Essas 26 subfamílias foram designadas como: **1.** Ia, **2.** Ib (1); **3.** Ib (2); **4.** II; **5.** III (a + c); **6.** IIIb; **7.** III (d + e); **8.** IIIf; **9.** Iva; **10.** Ivb; **11.** Ivc; **12.** Ivd; **13.** Va; **14.** Vb; **15.** VII (a + b); **16.** VIIa; **17.** VIIb; **18.** VIIc (1); **19.** VIIc (2); **20.** IX; **21.** X; **22.** XI; **23.** XII; **24.** XIII; **25.** XIV; e **26.** XV (**Figura 1**). Os genes *VubHLH49*, *VubHLH95*, *VubHLH106* e *VubHLH119* diferiram dos demais membros das subfamílias, sendo denominados elementos ‘órfãos’ já que não foram agrupados em nenhuma subfamília (**Figura 1**). *Arabidopsis thaliana* e feijão-caupi apresentaram diferenças no número de genes

para a maioria das subfamílias. O número de *VubHLH* dentro de cada subfamília variou de 1 a 17, sendo as subfamílias XIV e IVa com menor e maior número de membros, respectivamente (**Figura 1**).

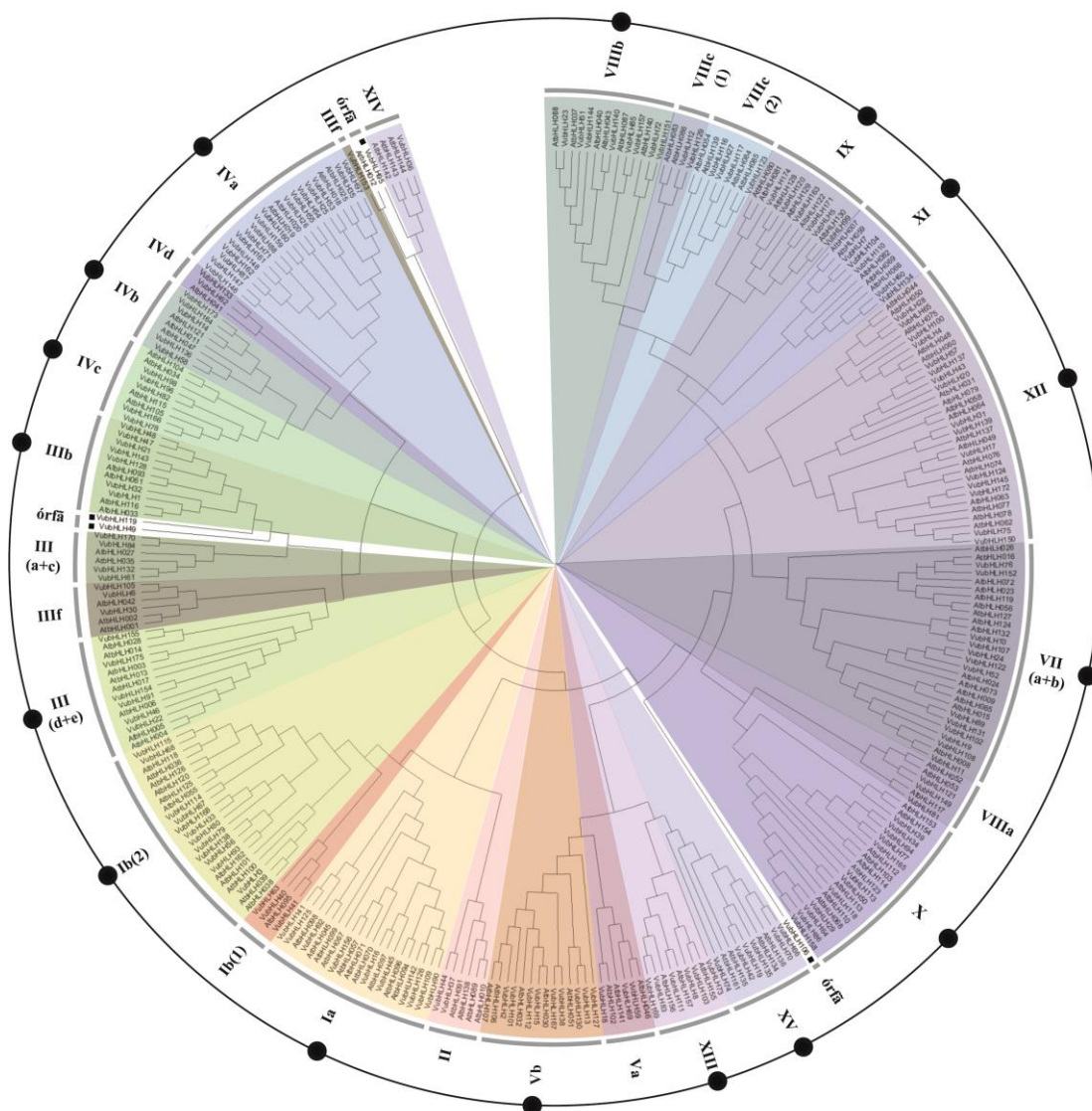


Figura 1. Árvore fenética construída a partir das seqüências de proteínas bHLH de *Arabidopsis thaliana* (AtbHLH) e *Vigna unguiculata* (*bona fide* VubHLH), gerada pelo MEGAX via método *neighbor-joining* (bootstrap = 1000 replicações). Todos os genes *VubHLH*, com exceção de quatro considerados órfãos (indicados por quadrados pretos), foram agrupados em subfamílias seguindo a classificação dos genes AtbHLH. Cada subfamília (Li et al., 2006; Pires e Dolan, 2010) é identificada por um algarismo romano e estão destacadas em cores diferentes. Esferas pretas localizadas no alo externo indicam as subfamílias com ao menos cinco membros VubHLH.

Os genes *VubHLHs* identificados foram ancorados em todos os 11 cromossomos do feijão-caupi, sendo distribuídos de maneira heterogênea. O cromossomo ‘3’ de feijão-caupi (Vu03) apresentou o maior número (36) de loci *VubHLHs* ancorados (**Figura 2**). Esses estão associados a 19 diferentes subfamílias. Apenas um locus (*VubHLH175*) localizou-se em *scaffold* (**Figura 2**).

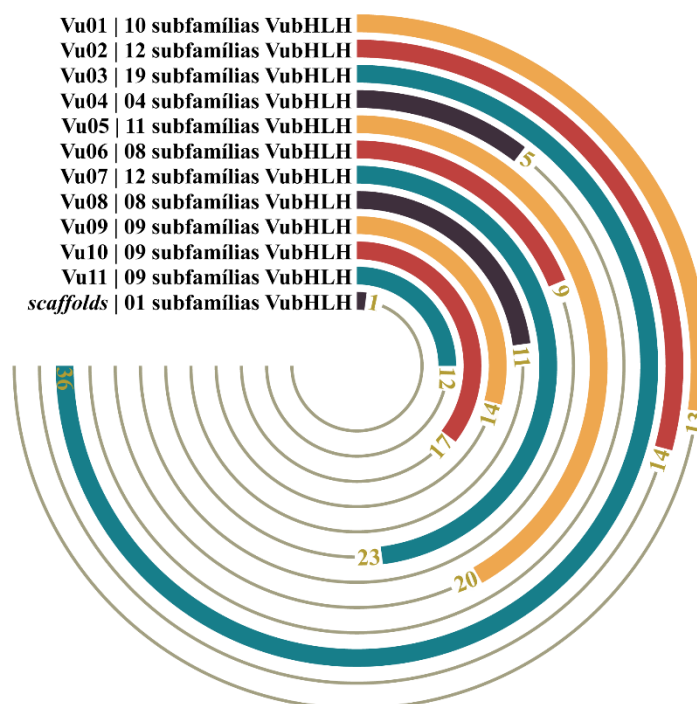


Figura 2. Distribuição cromossômica de loci *VubHLHs* no genoma de feijão-caupi, apresentando o respectivo número de subfamílias ancoradas.

3.1.2 Estrutura dos genes *VubHLH* e caracterização de motivos conservados

Para uma melhor compreensão das características estruturais dos genes *VubHLH*, 12 parâmetros descritivos foram utilizados (**Tabela Suplementar S2**). As estruturas gênicas (íntrons, CDS e regiões UTR) dos 175 *VubHLHs* estão representadas esquematicamente na Figura 3. Esta seção abordará o número de éxons e íntrons, os quais são considerados mais informativos biologicamente.

Os genes *VubHLH* apresentam diferentes números de éxons, variando de um a 11 (**Tabela Suplementar S2; Figura 3**). Dez genes (dos 175) *VubHLH* não apresentaram íntrons. Esses estão distribuídos entre as subfamílias III (d+e), VIIla, VIIlb e XIV. Algumas subfamílias apresentaram todos os genes contendo o mesmo número de éxons, como as subfamílias VIIlc (1), VIIlc (2) e Ivc que apresentaram cinco éxons (**Tabela Suplementar S2; Figura 3**). O mesmo padrão de constância foi observado para as subfamílias XIV, XV, Ib (1) e IIIb, cujos genes representantes apresentam um, dois, três e quatro éxons, respectivamente (**Tabela Suplementar S2; Figura 3**). De maneira geral, as estruturas gênicas analisadas foram conservadas entre os genes agrupados na mesma subfamília (**Figura 3, Tabela Suplementar S2**).

No que tange ao número de motivos conservados, dez foram escrutinados em proteínas *VubHLH*, com o auxílio do software MEME. Os logotipos desses motivos estão apresentados na **Figura Suplementar S3**. Diferentes quantitativos foram observados, variando de um (*VubHLH19*) a 5 (*VubHLH6*, *VubHLH22*, *VubHLH30*, *VubHLH46*, *VubHLH91*, *VubHLH105*, *VubHLH154*, *VubHLH175*) (**Figura Suplementar S4**). Os motivos '2' e '1' foram amplamente presentes nos membros *VubHLH* (**Figura 3, Figura Suplementar S4**). Esses dois motivos correspondem às regiões básica, hélice '1', loop e hélice '2' (abreviadamente bHLH), que são determinantes para essa família de TFs. O motivo '2', presente em todas as 175 *VubHLHs*, representa os últimos sete resíduos da região básica e a hélice '1'. O motivo '1', por sua vez, representa a região do loop e a hélice '2', estando

presente em 171 proteínas VubHLH. Os logotipos da sequência do motivo ‘1’ (em vermelho) e do motivo ‘2’ (em azul claro) são demonstrados na **Figura 3**.

Proteínas dentro de uma mesma subfamília bHLH estão inclinadas a compartilhar composições de motivos semelhantes. Por exemplo: os motivos ‘1’, ‘2’ e ‘3’ foram identificados em todos os membros das subfamílias Ia, Ib (1), II, III (a+c), IIIb, Ivb e Vb. O motivo ‘4’, por sua vez, estava presente em todos os membros das subfamílias IX, XII e XI. Já os motivos ‘7’ e ‘10’, foram identificados, exclusivamente, em IVc e XII, respectivamente (**Figura 3**).

Os motivos ‘8’ e ‘9’, que compõem as partes inicial do domínio JID (*JAZ interaction domain*) e terminal do domínio TAD (*putative transcriptional activation domain*), respectivamente, compõem o domínio bHLH-MYC_N e estão diretamente relacionados com respostas mediadas por ácido jasmônico (JA). Esses motivos estão estruturalmente presentes em nove genes *VubHLH* distribuídos nas subfamílias IIIf e III (d+e) (**Figura 3** e **Figura Suplementar S5**).

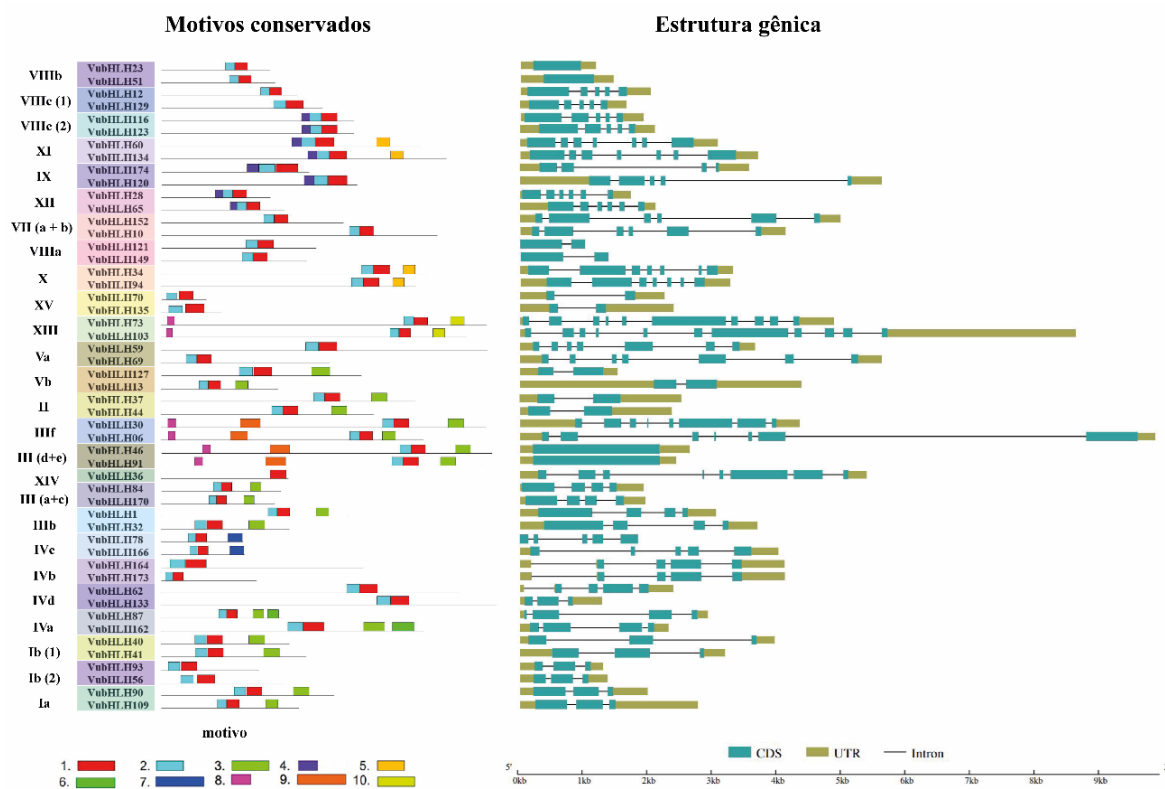


Figura 3. Distribuição dos motivos proteicos de uma amostra[‡] de 51 genes *VubHLHs* representantes das subfamílias bHLH e suas respectivas estruturas gênicas. (A) Motivos conservados das proteínas VubHLH previstos pelo MEME. Os blocos coloridos correspondem a 10 diferentes motivos identificados nessas proteínas. Em vermelho, destaca-se o motivo ‘1’; em azul claro, destaca-se o motivo ‘2’. Tais motivos são característicos de bHLHs. (B) Estruturas dos genes *VubHLH*, utilizando GSDS 2.0. Éxons e íntrons estão representados por retângulos verdes e linhas pretas, respectivamente. Na parte inferior, a escala representa os comprimentos desses genes, em Kb. [‡]A amostra de genes plotada foi deliberadamente escolhida para representar todas as subfamílias bHLH encontradas no genoma de *V. unguiculata*.

3.1.3 Resíduos de aminoácidos conservados nas proteínas VubHLHs

Uma vez que os motivos conservados foram identificados, analisou-se a composição dos resíduos de aminoácidos que constituem o domínio VubHLH, composto pelos motivos '2' e '1'. Vinte e um aminoácidos mostraram mais de 50% de identidade nas sequências proteicas (azul claro, **Figura 4, Figura Suplementar S6**), sendo sete com identidade maior que 75% (azul escuro, **Figura 4, Figura Suplementar S6**). A região básica, entre as duas hélices, foi altamente conservada na maioria das VubHLHs, com cinco resíduos conservados (His-9, Glu-13, Arg-14, Arg-16 e Arg-17). A hélice '1' também apresentou cinco resíduos conservados (Arg-23, Leu-27, Leu-30, Val-31, Pro-32). Nove resíduos (Ala-49, Ser-50, Leu-52, Glu-54, Ala-55, Ile-56, Tyr-58, Lys-60 e Leu-65) foram conservados na hélice '2', enquanto a região do *loop* apresentou dois resíduos conservados (Lys-38 e Asp-47).

A região básica do domínio bHLH determina a ligação dos genes-alvo ao DNA (Massari e Murre, 2000). Com base nos critérios estabelecidos por Toledo-Ortiz *et al.* (2003), foi possível identificar dois tipos de proteínas VubHLH: 65 proteínas não ligantes ao DNA e 110 proteínas de ligação ao DNA. Essas 65 proteínas incluíram principalmente membros das subfamílias Ia, II, III (a+b), III (d+e), IIIf, Ivc, VIIla, VIIlb, VIIlc (1), VIIlc (2), X, XIV e XV, havendo menos de seis resíduos básicos dentre os 17 aminoácidos que compõem sua região básica. As VubHLH de ligação ao DNA foram, ainda, divididas em duas subcategorias, sendo encontradas 99 proteínas ligantes E-box (que possuem os resíduos Glu-13 e Arg-16) e 11 proteínas de ligação não-E-box, que não possuem esses resíduos. As proteínas ligantes E-box foram classificadas, por sua vez, em 74 proteínas ligantes G-box (com resíduos His / Lys-9, Glu-13 e Arg-17 presentes na região básica) e 25 proteínas ligantes não-G-box (resíduos ausentes). A descrição detalhada dessa classificação encontra-se na **Tabela Suplementar S3**.

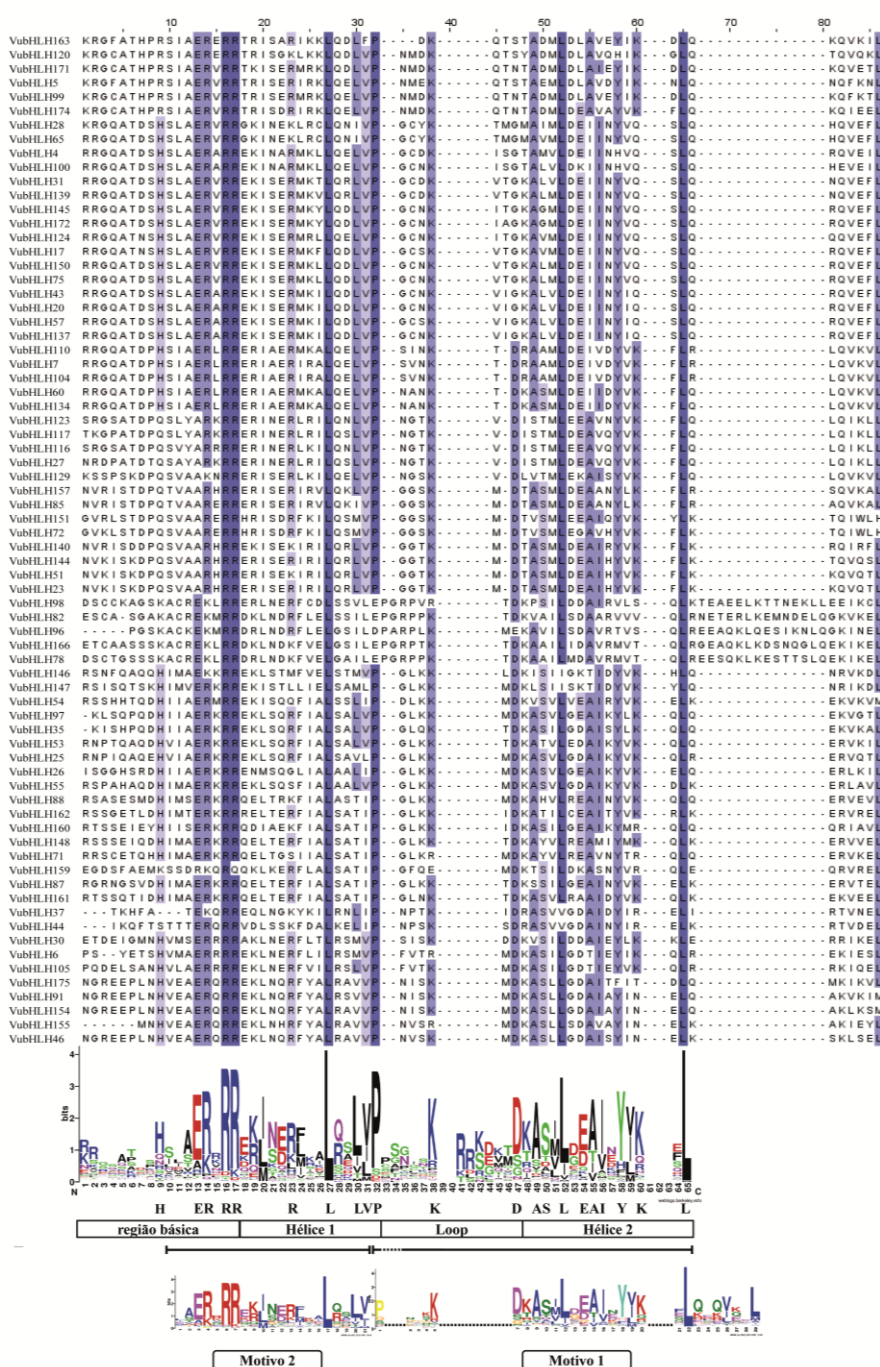


Figura 4. Alinhamento da região dos motivos ‘1’ e ‘2’ (domínio bHLH) e identificação dos resíduos de aminoácidos conservados de uma amostra[‡] de 72 proteínas VubHLH identificadas no genoma do feijão-caupi. (A) Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos conservados do domínio bHLH das proteínas VubHLH. Os aminoácidos que apresentaram mais de 50 e 75% de identidade nas sequências proteicas estão destacados em azul claro e azul escuro, respectivamente (B) Sequências consenso do logotipo das proteínas VubHLH (parte superior). Sequências de logotipo dos motivos ‘1’ e ‘2’ constituem o domínio bHLH em *V. unguiculata* (parte inferior). A altura de cada pilha indica a conservação da sequência em uma determinada posição. As letras maiúsculas indicam aminoácidos com mais de 50% de identidade dentro dos domínios. [‡]A amostra plotada foi deliberadamente escolhida para representar as regiões conservadas do alinhamento.

3.1.4 Panorama dos mecanismos de duplicação dos genes *VubHLH* no genoma de feijão-caupi

De acordo com a análise dos mecanismos de duplicação, 43 *VubHLH* foram duplicados por mecanismos de duplicação dispersa, sendo representados principalmente por membros das subfamílias Ia, II, III (d+e), IVb, Vb, VIIa e X (**Figura 5**). Apenas quatro genes, pertencentes às subfamílias Ib (1), Ib (2), XIV e XV, foram considerados singletons (**Figura 5**). Nove eventos de duplicação em tandem envolvendo 13 genes *VubHLHs* foram observados no genoma do feijão-caupi (**Tabela Suplementar S4**). Esses genes foram identificados nas subfamílias Ib (1), Ib (2), IIIb, IVa e VIIIc (2) (**Figura 5**). Por fim, o mecanismo de duplicação WGD/segmental (observado em 115 genes analisados) foi o principal evento responsável pela expansão dos *VubHLHs*, sendo encontrado na maioria das subfamílias analisadas (**Figura 5**). Esse mecanismo de duplicação é o único responsável pela expansão de seis das 26 subfamílias bHLH presentes em *V. unguiculata* (**Figura 5**). As subfamílias IIIb e IVa destacaram-se por apresentarem os três mecanismos de duplicação (WGD/segmental, em tandem e duplicação dispersa).

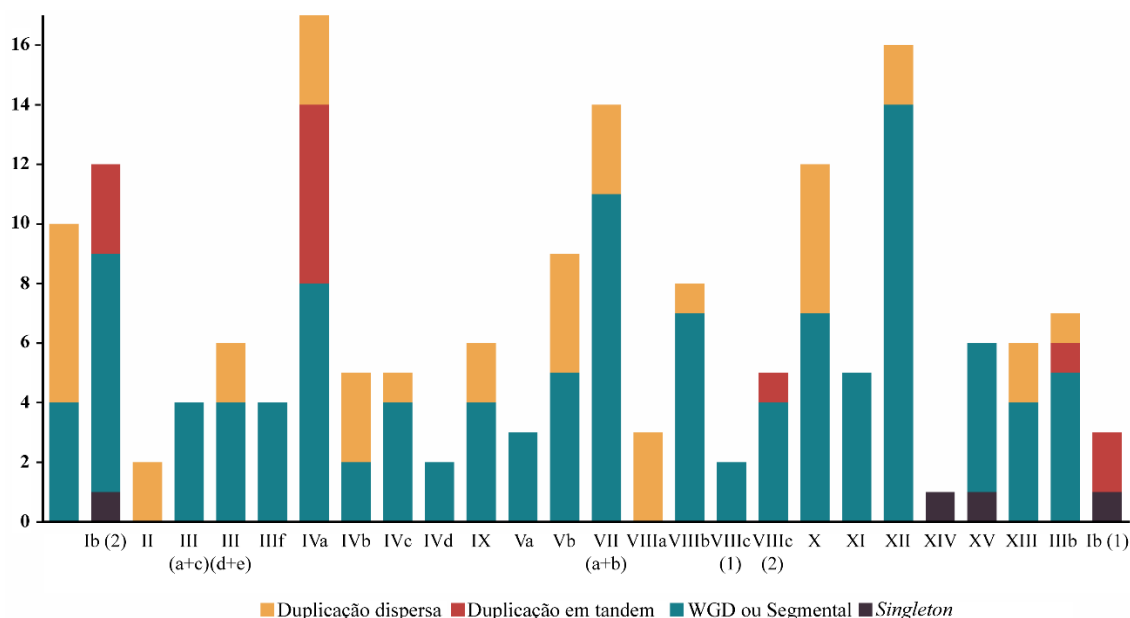


Figura 5. Apresentação e quantificação* dos principais mecanismos responsáveis pela expansão das 26 subfamílias de *VubHLH* identificadas no genoma de feijão-caupi.

3.1.5 Análise da evolução das sequências de *VubHLH* duplicados em tandem

A razão entre a taxa Ka (taxa de mutação de sentido trocado) e Ks (taxa de mutação sinônima) foi analisada para os nove pares de genes *VubHLH* duplicados em tandem. Os valores de Ka/Ks variaram de 0,33 a 1,07 (**Tabela Suplementar S5**), com média de 0,64 (**Tabela Suplementar S5**). Para um par analisado, não foi possível calcular a taxa Ka/Ks, pois o valor das variáveis foi muito próximo a zero. Dentre os pares que apresentaram a razão Ka/Ks contabilizada, apenas um par apresentou Ka/Ks > 1, implicando em a seleção positiva. Sete pares de genes apresentaram Ka/Ks < 1, sugerindo que a seleção purificadora desempenhou um importante papel evolutivo nesses genes.

3.1.6 Genômica comparativa dos genes *VubHLH*

A análise de ortologia demonstrou conservação dos genes *VubHLH* no genoma de várias espécies de Viridiplantae. Sessenta e três dos 93 genomas alocados na base de dados Phytozome apresentaram ortologia gênica com *VubHLH* (**Tabela Suplementar S6**). As leguminosas *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max* destacaram-se por apresentar maiores índices de ortologia de sequências, com 96 e 93,7 %, respectivamente (**Figura 6**).

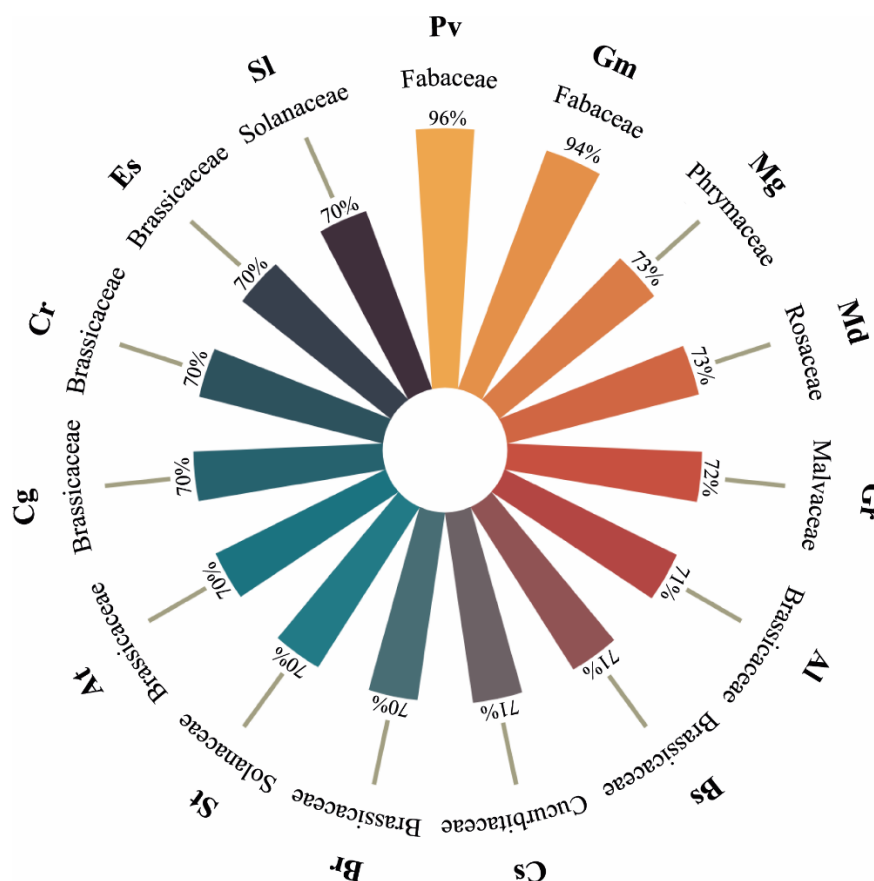


Figura 6. Gráfico de barras polar com as 15 espécies que apresentaram maiores índices de ortologia mais altos para os *VubHLHs* *bona fide* identificados no genoma do feijão-caupi. **Legenda:** Pv (*Phaseolus vulgaris*); Gm (*Glycine max*); Mg (*Mimulus guttatus*); Md (*Malus domestica*); Gr (*Gossypium raimondii*); Al (*Arabidopsis lyrata*); Bs (*Boechera stricta*); Cs (*Cucumis sativus*); Br (*Brassica rapa*); St (*Solanum tuberosum*); At (*Arabidopsis thaliana*); Cg (*Capsella grandiflora*); Cr (*Capsella rubella*); Es (*Eutrema salsugineum*); Sl (*Solanum lycopersicum*). As respectivas famílias das espécies analisadas em questão estão lateralmente indicadas.

3.1.7 Mineração de CCRES nos promotores dos genes *VubHLH*

Todos os CCRES identificados nos promotores dos genes *VubHLH* estão representados na **Figura 7** e **Tabela Suplementar S7**. Foram identificados cinco CCRES *bona fide* enriquecidos. Desses, quatro foram associados às seguintes famílias de TFs (CCRES | TFs com a adição da esfera negra em seus boxes; **Figura 7**): BBR-BPC, C2H2 (Dof-type), AP2/ERF e MADS box. Entre os CCRES *bona fide*, também foi observado um cuja associação a um TF específico ainda não foi determinada ('no match'; **Figura 7**).

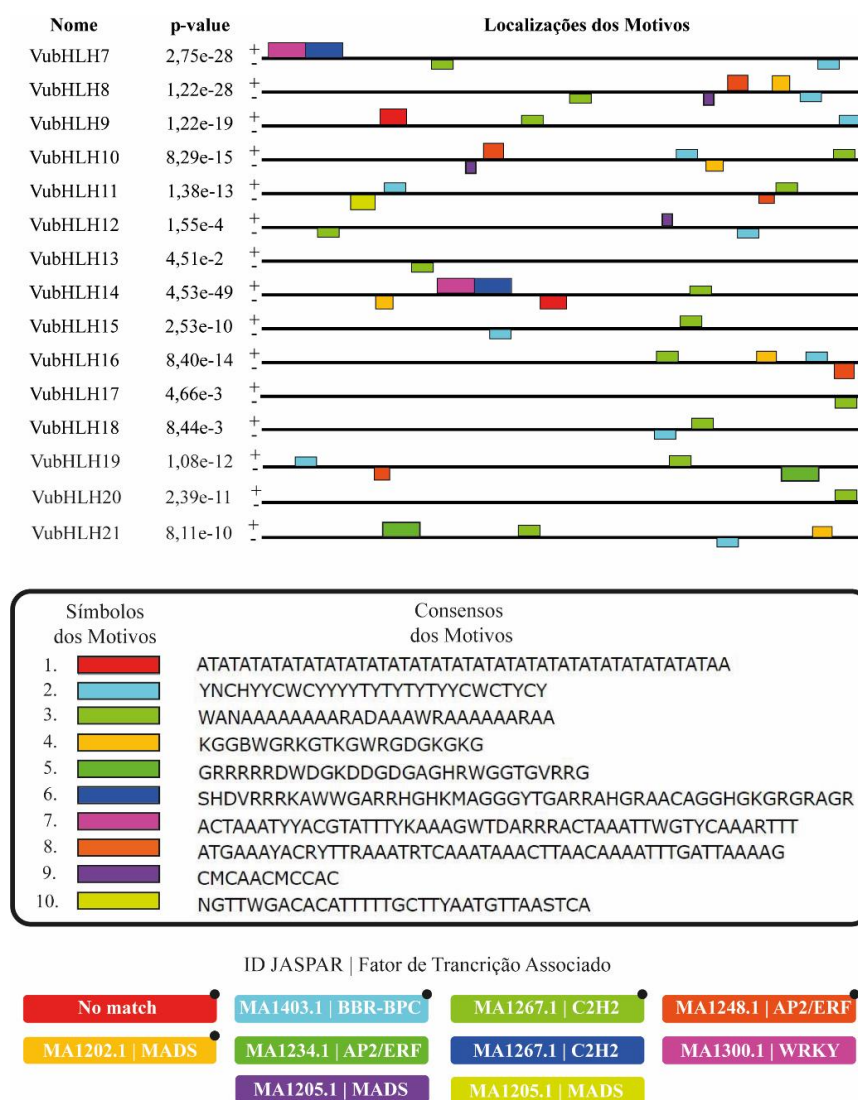


Figura 7. Localização e identificação de 10 CCREs, seus motivos consenso e TFs associados nos promotores de uma amostra[‡] contendo 15 genes *VubHLHs*. [‡]A amostra de genes plotada foi deliberadamente escolhida para apresentar todos os CCREs encontrados no conjunto total de promotores analisados. Os 10 CCREs estão representados por retângulos de diferentes cores e os CCREs *bona fide* (CCREs validados estatisticamente) estão identificados por círculos pretos.

3.2 Transcriptômica dos *VubHLHs* em feijão-caupi submetido a estresses bióticos e abiótico

Para analisar a expressão dos genes *VubHLHs*, foram utilizadas bibliotecas de RNA-Seq de feijão-caupi submetido a três condições desfavoráveis distintas, sendo: (a) injúria mecânica seguida de inoculação com o vírus CABMV; (b) injúria mecânica seguida de inoculação com o vírus CPSMV; e (c) desidratação radicular. Todas as métricas das bibliotecas RNA-Seq estão disponíveis no **Apêndice Suplementar S1**.

Setenta e quatro transcritos *VubHLH* candidatos apresentaram expressão diferencial em pelo menos um dos três tratamentos analisados, sendo distribuídos em 21 subfamílias: **1.** Ia; **2.** Ib (2); **3.** IIb; **4.** III (a+b); **5.** III (d+e); **6.** IIIf; **7.** IVa; **8.** IVb; **9.** IVc; **10.** IVd; **11.** Va;

12. Vb; 13. VIIIc (a+b); 14. VIIIc (2); 15. VIIIb; 16. IX; 17. X; 18. XI; 19. XII; 20. XIII; e 21. XIV (Tabela Suplementar S8, Figura Suplementar S7).

Os resultados quantitativos dos transcritos *VubHLHs* induzidos também indicam que essa família de TFs está majoritariamente envolvida na resposta ao estresse de desidratação radicular, quando comparada a sua participação na resposta precoce de defesa vegetal frente a vírus (**Figuras 8 e 9**).

3.2.1 Perfil de expressão dos *VubHLHs* no ensaio de desidratação radicular

A expressão dos transcritos *VubHLHs* foi observada nos dois tratamentos analisados: 25' (RD25) e 150' (RD150) após aplicação do estresse de desidratação radicular. Em RD25, 28 *VubHLHs* foram diferencialmente expressos, sendo 12 induzidos e 16 reprimidos. Já em RD150, 44 *VubHLHs* foram diferencialmente expressos, sendo 26 induzidos e 18 reprimidos. Dois *VubHLHs* induzidos foram compartilhados em ambos os tempos investigados. O quantitativo de transcritos induzidos foi superior em RD150 (**Figura 8**), sugerindo uma maior atuação dessa família de TFs em momentos onde a desidratação radicular se torna mais intensa (vide 'Discussão').

No contexto das subfamílias bHLH, observou-se que treze apresentaram transcritos induzidos em resposta ao estresse de desidratação radicular, sendo elas: **1. IVa; 2. XII; 3. IIIb; 4. III (d+e); 5. XIII; 6. VIIIc (2); 7. Ib (2); 8. VII (a+b); 9. X; 10. Vb; 11. Ia; 12. Va; e 13. IX.** Dessas, três subfamílias [IVa, III (d+e) e VIIc (2)] apresentaram transcritos *VubHLH* distintos induzidos em ambos os tempos analisados (**Figura 8, Tabela Suplementar S8**).

Algumas subfamílias de bHLH apresentam uma resposta temporal específica, sendo observados diferentes padrões de expressão em ambos os tempos analisados. Os *VubHLHs* pertencentes às subfamílias XIII, IIIb, XII, Ib (2), VII (a+b), X, Vb foram exclusivamente induzidos em RD150. Já os *VubHLHs* pertencentes às subfamílias Ia, Va e IX foram exclusivamente induzidos em RD25 (**Figura 8, Tabela Suplementar S8**).

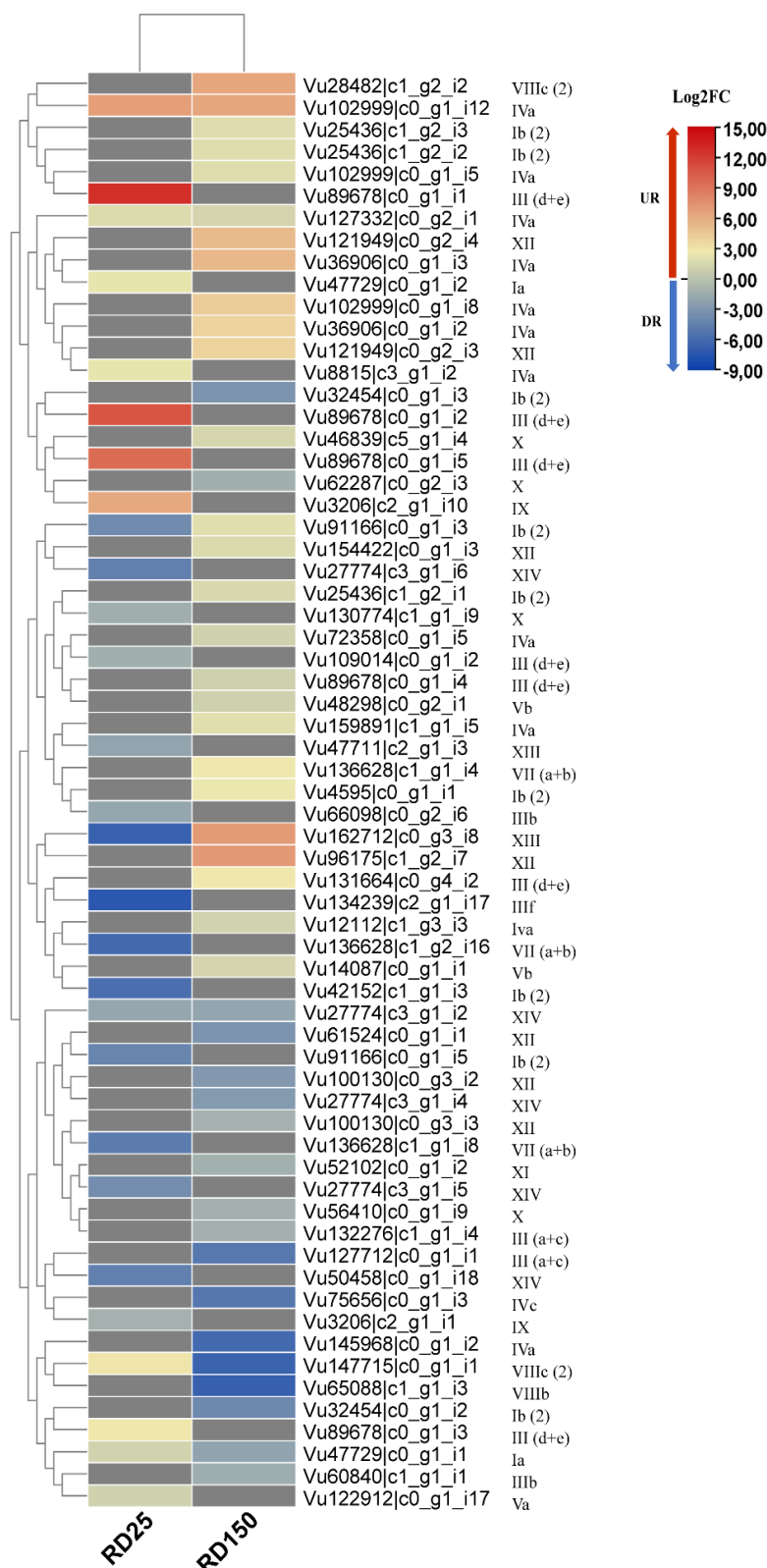


Figura 8. Heat-Map ilustrando a modulação transcricional de 65 transcritos que codificam *VubHLH* diferencialmente expressos em ao menos um tratamento (RD25 ou RD150), após aplicação do estresse de desidratação radicular. Números romanos laterais a cada transcrito referem-se a sua respectiva subfamília *VubHLH*. As cores no Heat-Map representam a modulação transcricional em termos de Log2FC, vermelho: transcritos *up-regulated*; azul: transcritos *down-regulated*; cinza: transcritos não expressos.

3.2.2 Perfis de expressão dos *VubHLHs* no ensaio de injúria seguida de inoculação viral

Nenhum transcrito foi diferencialmente expresso para o tempo de 16 h em ambos os ensaios de injúria mecânica seguida de inoculação viral. Para o tratamento de 1 h após aplicação do estresse de injúria mecânica e inoculação de CABMV, 16 *VubHLHs* apresentaram expressão diferencial, sendo três reprimidos e 13 induzidos (**Figura 9, Tabela Suplementar S8**). Para o referido tratamento, três foram diferencialmente expressos no ensaio de injúria mecânica e inoculação de CPSMV, sendo dois induzidos e um reprimido. Os resultados indicam que essa família de TFs pode estar mais relacionada à resposta precoce de defesa do feijão-caupi ao CABMV do que ao CPSMV.

Os 13 *VubHLHs* induzidos (ensaio de injúria mecânica seguida de inoculação viral) foram distribuídos em sete subfamílias bHLH, sendo Ib (2), III (d+e) e IVa com um maior quantitativo de *VubHLHs* (**Figura 9**), sugerindo uma relação direta dessas subfamílias de *VubHLHs* com a resposta precoce de defesa do feijão-caupi aos vírus analisados.

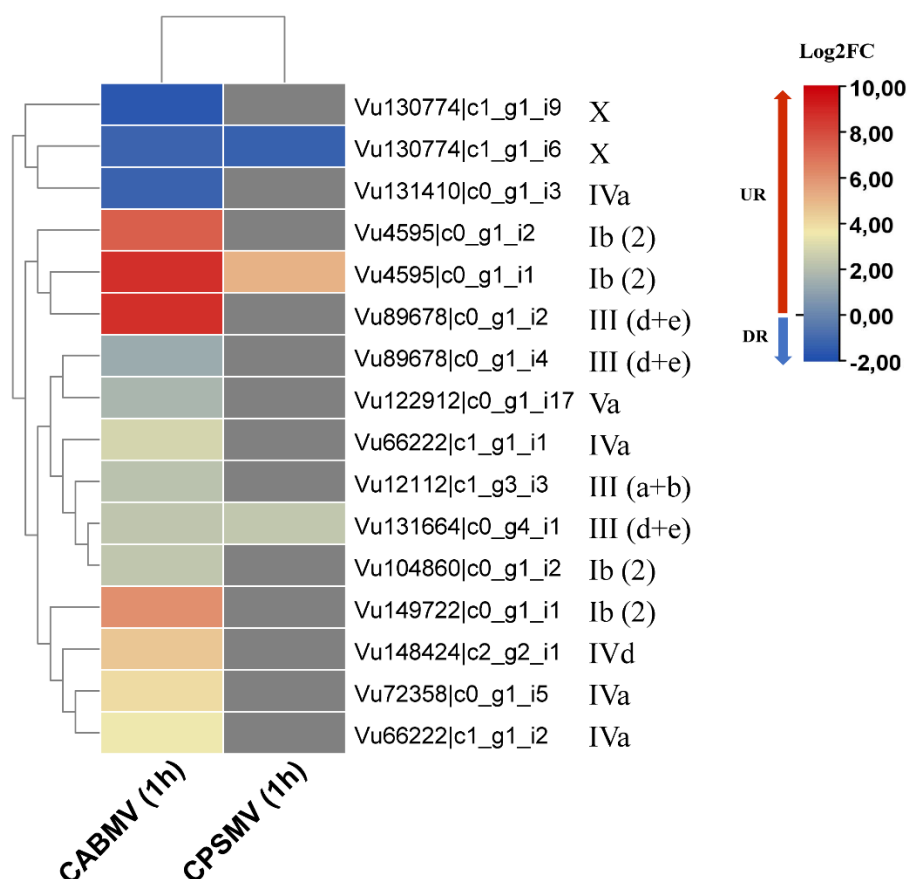


Figura 9. Heat-Map ilustrando a modulação transcricional de 16 transcritos que codificam *VubHLH* em feijão-caupi sob estresse de injúria mecânica seguida de inoculação viral com CABMV ou CPSMV, no tratamento de 1h após imposição da condição não favorável. Números romanos laterais a cada transcrito referem-se à sua respectiva subfamília bHLH. As cores no Heat-Map representam a modulação transcricional em termos de Log2FC, vermelho: transcritos *up-regulated*; azul: transcritos *down-regulated*; cinza: transcritos não expressos.

3.2.3 Crosstalk entre os estresses de desidratação radicular e resposta precoce de defesa a CABMV e CPSMV

O número de *VubHLHs* induzidos exclusivos para cada ensaio ou compartilhados (crosstalk) está apresentado na **Figura 10**. Um transcrito *VubHLH*, pertencente à subfamília Ib (2), foi induzido e compartilhado entre todos os ensaios, sugerindo sua possível participação na resposta a múltiplos estresses em feijão-caupi. Nesse contexto, também se destacam cinco transcritos *VubHLH* (pertencentes às subfamílias III (a+b), III (e+d), IVa e Va) compartilhados entre os ensaios ‘injúria mecânica e CABMV’ e desidratação radicular. Adicionalmente, um transcrito *VubHLH* [subfamília Ib (2)] foi induzido nos dois ensaios de ‘injúria mecânica e inoculação viral’, sugerindo seu possível papel na resposta precoce de defesa a vírus em feijão-caupi. Estudos adicionais, entretanto, são necessários para confirmar a funcionalidades dos alvos em questão.

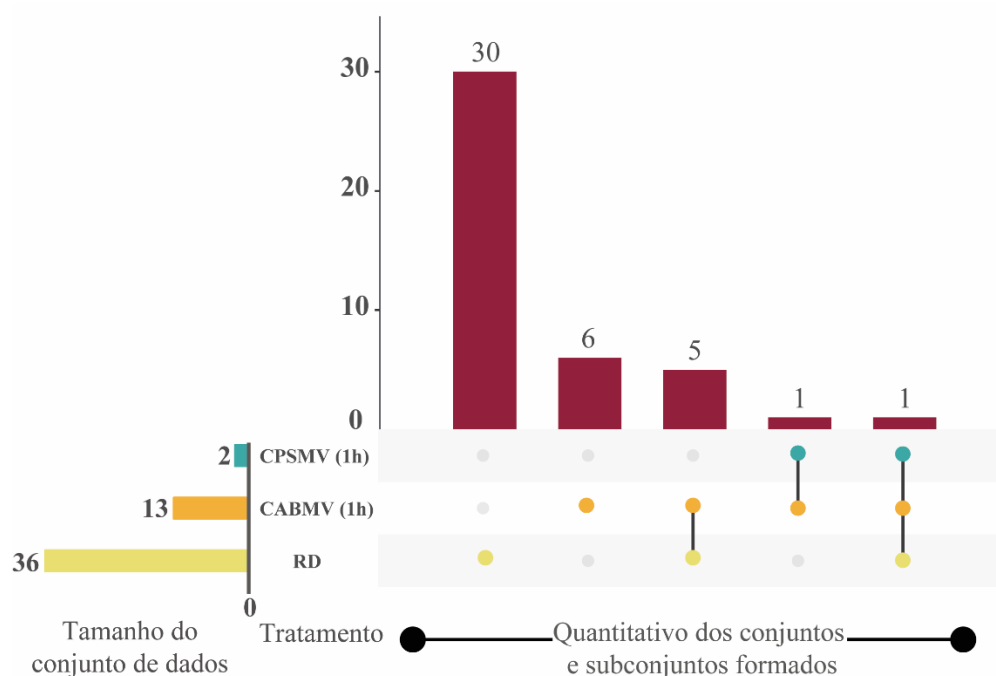


Figura 10. Quantitativo dos transcritos *VubHLH* induzidos (exclusivos e compartilhados) nas bibliotecas do CpCG (*Cowpea Genomics Consortium*) para os ensaios de injúria seguida de inoculação com CABMV, injúria seguida de inoculação com CPSMV e desidratação radicular (RD).

4. Discussão

Os avanços das plataformas de sequenciamento nas últimas décadas têm propiciado a identificação e a classificação de famílias gênicas específicas no genoma de plantas, permitindo inferências sobre suas características estruturais e papel funcional. A família de TFs bHLH vem sendo apresentada como participante de uma ampla gama de funções biológicas em vegetais, estando envolvida no desenvolvimento (Yang et al., 2017), na modulação das vias do metabolismo secundário (Chezem e Clay, 2016; Li et al., 2020), em respostas a diferentes fatores ambientais (Sun et al., 2015), bem como sinalização por fitormônios (Qi et al., 2015; Lu et al., 2018), dentre outros.

Em feijão-caupi, estudos recentes apontam que os TFs da família bHLH podem atuar como reguladores dos mecanismos de percepção e indução de resposta a diferentes condições estressantes abióticas (Ferreira-Neto et al., em preparação) e bióticas (Borges et al., em preparação), bem como na acumulação de antocianina e flavonoides (Li et al., 2020). Apesar disso, estudos adicionais de caracterização dessa família de TFs em feijão-caupi e demais espécies do gênero *Vigna* ainda são limitados.

No presente estudo, foi realizada uma análise pioneira e abrangente de todos os genes bHLH de *V. unguiculata* (*VubHLH*), a partir da sua mineração e identificação genômica e caracterização. Uma vez que *VubHLHs* apresentam elementos que indicam sua participação na regulação da resposta a estresses bióticos (resposta precoce conservada de defesa a vírus; Borges et al., em preparação) e abiótico (desidratação radicular; Ferreira-Neto et al., em preparação), via análises de enriquecimento de CCRES em promotores de genes envolvidos na resposta a esses estresses em feijão-caupi, estudou-se, adicionalmente, o padrão de expressão dos *VubHLHs* durante as mesmas condições. Tais ações fornecem informações valiosas para indicar o possível envolvimento de *VubHLHs* em processos moleculares e fisiológicos na espécie analisada.

A família de TFs bHLH vêm sendo amplamente descrita em várias espécies vegetais, como *Arabidopsis thaliana* (162 genes *AtbHLH*; Bailey et al., 2003), arroz (167 genes *OsbHLH*; Li et al., 2006), tomate (159 *SlbHLH*; Sun et al., 2015), cenoura (146 *DcbHLH*, Chen et al., 2015), maçã (188 *MdbHLH*; Mao et al., 2017), batata (124 *StbHLH*; Wang et al., 2018), banana (259 *MpbHLH*; Wang et al., 2020), pepino (142 *CsbHLH*; Li et al., 2020), pimenta (122 *CabHLH*; Zhang et al., 2020), mamão (73 *CpbHLH*; CYang et al., 2020), *Cannabis sativa* L. (89 *CsbHLH*; Bassolino et al., 2020); *Fagopyrum tataricum* (164 *FtbHLH*; Sun et al., 2020) e *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (136 *XsbHLH*; Lang e Liu, 2020). Atualmente, cerca de 35 espécies de leguminosas apresentam o genoma sequenciado e disponível (Bauchet et al., 2019). Entre as leguminosas sequenciadas e com dados para bHLHs, o número de genes dessa superfamília gênica é bastante variável. Tal fato pode estar associado à ampla variação do tamanho do genoma de leguminosas estudadas na temática em questão até o momento. No presente trabalho, identificou-se e caracterizou-se 175 genes *VubHLH* no genoma de feijão-caupi (640 Mb; Lonardi et al., 2019). Para sua espécie-irmã, feijão-comum [*P. vulgaris*; tamanho genômico de 587 Mb (Schmutz et al., 2014)], foram relatados 155 genes *PvbHLH* (Kavas et al., 2016). Para leguminosas poliploides, como amendoim (*Arachis hypogaea* L.) e soja (*Glycine max* L.), com genomas de, respectivamente, 2,7 e 1,15 Gb, 319 genes *GmbHLH* (Hudson e Hudson, 2015) e 261 genes *AhbHLH9* (Gao et al., 2017) foram minerados.

Os *VubHLHs* descritos para o feijão-caupi foram caracterizados quanto à sua localização subcelular, ponto isoelétrico e peso molecular, corroborando com os resultados previamente reportados em outras espécies vegetais (Tian et al., 2020; Li et al., 2020; Wang e Liu, 2020, Sun et al., 2020, Lang e Liu, 2020). As proteínas *VubHLH* identificadas no presente trabalho apresentaram uma localização majoritariamente nuclear (96%), onde desempenham seu papel funcional. Por outro lado, um menor número de proteínas *VubHLH* estava distribuído no citoplasma, cloroplasto e mitocôndrias, também corroborando com os dados previamente descritos da literatura (Lang e Liu, 2020; Sun et al., 2020).

As proteínas *VubHLH* foram classificadas em 26 subfamílias reportadas anteriormente para *A. thaliana* (Pires e Dolan, 2010), tomate (Wang et al., 2015) e *Xanthoceras sorbifolia* Bunge (Lang e Liu, 2020). Quando esse quantitativo é comparado a espécies filogeneticamente mais próximas do feijão-caupi, como a soja e o feijão-comum, um menor número de subfamílias bHLH foi identificado (Hudson e Hudson, 2015; Kavas et al., 2016). Essa similaridade de conservação entre feijão-caupi e *Arabidopsis*, contrastando com espécies

filogeneticamente mais próximas carece de maiores estudos, podendo ser atribuída a uma caracterização mais detalhada dessa espécie modelo.

O domínio altamente conservado das proteínas bHLH contém uma região básica de ligação ao DNA e uma região HLH (hélix-loop-hélix), responsável pela formação de homo e heterodímeros entre essas proteínas (Li et al., 2006; Toledo-Ortiz et al., 2003; Pires e Dolan, 2010). A estrutura e conservação do domínio bHLH das proteínas VubHLH de feijão-caupi pode ser observada a partir dos motivos 1 e 2 (Figura 3) e alinhamento do domínio bHLH (Figura 4). Em feijão-caupi, esse domínio mostrou-se altamente conservado, com destaque para os resíduos de aminoácidos HER (His-9; Glu13; Arg-17; responsáveis pela ligação ao DNA-alvo), Arg-14, Arg-16 na região básica; e Leu-27 (hélice 1) e Leu-65 (na hélice 2), sendo ambos os resíduos responsáveis pela estabilização dos dímeros (Toledo-Ortiz et al., 2003; Pires e Dolan, 2010). A elevada conservação desses resíduos é uma característica das proteínas bHLH (Pires e Dolan, 2010), sendo observadas nas mais diversas espécies vegetais, como *Arabidopsis* (Toledo-Ortiz et al., 2003), amendoim (Gao et al., 2017), banana (Wang et al., 2020) e *Cannabis sativa* L. (Bassolino et al., 2020).

Os TFs da família bHLHs possuem a capacidade de se ligar diretamente ao DNA-alvo ou formar homo ou heterodímeros com outras proteínas bHLH (Toledo-Ortiz et al., 2003). A maioria das proteínas VubHLH (99; 56,6 %) apresentaram potencial de ligação às regiões E-box do DNA, sendo 74 específicas às regiões G-box. Vários genes bHLH envolvidos na resposta a estresses, bem como na biossíntese de metabólitos secundários, possuem elementos E-box ou G-box em suas regiões promotoras, como os genes envolvidos nas vias biossintéticas de flavonoides e antocianinas (Wang et al., 2018) e proteínas relacionadas à patogênese (PR) (Miyamoto et al., 2012). Sessenta e cinco proteínas VubHLH atípicas, por não possuírem a capacidade de ligar-se ao DNA, foram encontradas em feijão-caupi. Essas proteínas podem atuar em uma ampla gama de vias regulatórias por meio da formação de heterodímeros com proteínas bHLH típicas, inibindo a sua ligação ao DNA-alvo. Há relatos de que tais bHLH atípicas podem estar envolvidas na regulação da sinalização de diversos fitormônios, incluindo ABA, giberelina, brassinosteróide e auxina (Castelain et al., 2012; Zheng et al., 2017; Zheng et al., 2019), bem como resposta de evitamento da sombra, ou seja, um conjunto de respostas que as plantas exibem quando são submetidas à sombra de outra planta (Hornitschek et al., 2009).

A análise do MEME identificou 10 motivos altamente conservados nas 175 proteínas VubHLH. A influência desses motivos na categorização das diferentes subfamílias bHLH ficou evidente na análise fenética (**Figura 1**), uma vez que diferentes proteínas VubHLH, classificadas nas mesmas subfamílias, apresentam composição de motivos semelhantes. Com isso, é possível estabelecer uma relação entre as diferentes subfamílias e os motivos que as compõem. Os motivos '1' e '2' estavam majoritariamente presentes nas proteínas VubHLH e representaram a posição do domínio bHLH, que é altamente conservado entre as diferentes espécies vegetais (Yang et al., 2017; Li et al., 2020; Yang et al., 2020; Wang et al., 2020; Zhou et al., 2020).

Adicionalmente, os motivos '7' e '10' foram exclusivos das subfamílias IVc e XIII, respectivamente. Em maçã, arroz e *Arabidopsis*, a subfamília IVc está envolvida na resposta à deficiência de ferro (Zhao et al., 2016; Kobayashi et al., 2019; Lei et al., 2020; Zhang et al., 2015). Estudos adicionais são, contudo, necessários para confirmar a relação do motivo '7' (subfamília IVc) na resposta à deficiência desse mineral no feijão-caupi. Já os motivos '8' e '9' foram associados ao domínio bHLH-MYC_N (PF142115), presente nas subfamílias IIIf e III (d+e). Esse domínio é formado por dois subdomínios: JID, necessário para interagir com as proteínas JAZ; e TAD, domínio de ativação transcricional putativo (Kazan e Manners, 2013). Os membros das subfamílias IIIf e III (d+e), denominados MYCs, estão envolvidos em várias vias de sinalização hormonal (Song et al., 2014; Wang et al., 2017), em especial, do

ácido jasmônico (JA) (Dombrecht et al., 2007; Cheng et al., 2011; Bai et al., 2019). As proteínas JAZ bloqueiam a atividade MYC por meio da ligação ao domínio JID (Fernández-Calvo et al., 2011; Niu et al., 2011). Mediante percepção hormonal, os repressores JAZ são degradados pelo proteossoma SCF^{COI1}, liberando MYC e permitindo a ativação das respostas JA (Kazan e Manners, 2013). Em *V. unguiculata*, o motivo '8' compõe parte do domínio JID e o motivo '9' compõe a região terminal do domínio TAD. Assim, esses motivos estão diretamente associados à funcionalidade dessas subfamílias, sendo também importantes para identificar genes MYCs em feijão-caupi.

As estruturas éxon-íntron dos genes *VubHLH* tenderam à conservação dentro de uma mesma subfamília de bHLH, como previamente observado em outras espécies vegetais (Hudson e Hudson, 2015; Wang e Liu, 2020; Li et al., 2020). Nesse estudo, o número de íntrons dos *VubHLH* variou de 0 a 10. Dez genes (~ 6 %) não apresentaram nenhum íntron em sua composição, enquanto que 165 genes apresentam pelo menos um íntron. Isso sugere que essas divergências das estruturas intrônicas podem ter possibilitado o amplo leque de subfamílias bHLH encontrado em feijão-caupi, a exemplo de outras plantas.

A duplicação gênica é um importante mecanismo para a evolução e expansão das famílias de genes (Taylor e Raes, 2004; Moore e Purugganan, 2005). O mecanismo de duplicação dispersa representou a segunda maior força de expansão dos *VubHLH*. Esse mecanismo pode ser diretamente influenciado por elementos transponíveis (TEs), sendo os principais condutores para a expansão e evolução genômica (Wang et al., 2012, Kang et al., 2014; 2015). O genoma de vegetais superiores é comumente composto por uma grande quantidade de TEs. Espécies de *Vigna* com genoma sequenciado e disponível, como *V. angularis*, *V. radiata* e *V. unguiculata*, apresentam 43, 50 e 50,1 % de sequências repetitivas presentes em seu genoma, sendo cerca de 32, 39 e 39 %, respectivamente, relativas a TEs, especialmente retrotransposons LTR dos tipos *Gypsy* e *Copia* (Kang et al., 2014; 2015; Lonardi et al., 2019).

Duplicação segmental e em tandem são os principais mecanismos evolutivos que resultam na expansão da família bHLH em plantas (Li et al., 2006; Sun et al., 2020; Lang e Liu, 2020; Wang et al., 2020). Em feijão-caupi, a duplicação WGD / segmental foi a principal responsável pela expansão dessa superfamília (~66 %). A duplicação em tandem, por sua vez, foi responsável por ~7,4 % dos *VubHLH* e envolveu cinco diferentes subfamílias: Ib (1); Ib (2); IIb; IVa e VIIc (2). Resultados similares foram previamente reportados em outras espécies vegetais, como a pimenta (~9%; Zhang et al., 2020), o pepino (~6%; Li et al., 2020) e a banana (~7%; Wang et al., 2020), indicando que as duplicações em tandem desempenham um papel de importância menos significativa na expansão da família bHLH em *V. unguiculata* e em outras espécies vegetais.

A razão da taxa de substituição Ka/Ks, indicador do histórico de seleção de genes ou regiões gênicas, foi analisada para *VubHLHs* duplicados em tandem. A maioria dos pares de genes analisados, estão sob seleção purificadora (Ka/Ks <1). Esse tipo de seleção preserva as sequências de aminoácidos, indicando que esses pares podem ter redundância funcional. Esse mecanismo potencialmente compensa a perda de função estocástica em membros específicos da família de genes no curso da evolução.

Sessenta e três dos 93 genomas analisados no nosso trabalho apresentaram ortologia gênica em relação aos alvos analisados, demonstrando uma ampla conservação dos bHLHs entre esses genomas. Tal dado abre novas perspectivas de estudos em relação a funcionalidade dessa família gênica entre as espécies vegetais investigadas. Como esperado, as leguminosas apresentaram maior ortologia com o feijão-caupi, com destaque para o feijão comum (96 %) e a soja (93,7 %), espécies que apresentam 10,4 e 22 milhões de anos de divergência com relação ao feijão-caupi, respectivamente (Delgado-Salinas et al., 2011; Li et al., 2013).

Em plantas, estudos anteriores demonstraram que as proteínas bHLH estão envolvidas em diversas vias metabólicas, biossintéticas e redes regulatórias principalmente relacionadas a estresses abióticos (Qi et al., 2015; Sun et al., 2015; Chezem e Clay, 2016; Yang et al., 2017). Assim, para identificar os agentes reguladores dessa superfamília gênica em feijão-caupi, identificou-se os elementos cis-regulatórios (CCREs) presentes nas regiões promotoras dos *VubHLHs*. Os CCREs identificados estão associados a diferentes famílias de TFs, como DREB, C2H2, CPC e AGL estão relacionadas ao desenvolvimento, vias de sinalização hormonal (Krishnaswamy et al., 2011) e resposta a diferentes estresses, como seca (Zhang et al., 2016), viroses (Kang et al. 2016), oxidativo (Liu et al., 2017) e alta salinidade (Ma et al., 2015), entre outros. No conjunto essa associação sugere potenciais papéis dos *VubHLH* nessas diferentes condições fisiológicas.

Por fim, minerou-se os transcritos *VubHLH* que estão diretamente associados à resposta ao déficit hídrico e à resposta precoce de defesa a diferentes vírus. Tal análise revelou uma grande variedade de padrões de expressão. Identificou-se que os transcritos diferencialmente expressos em resposta ao déficit hídrico são pertencentes a treze subfamílias, sendo a maioria com diferentes perfis de transcrição nos dois diferentes tempos analisados. Ferreira-Neto et al. (dados não publicados) indicaram que os dois diferentes tempos analisados correspondem a momentos fisiológicos distintos, caracterizando assim, o transcriptoma de feijão-caupi submetido ao déficit hídrico como: RD25 - ‘transcriptoma de percepção, sinalização e reação’ e RD150 - ‘transcriptoma de sinalização, reação e ajuste’. Em feijão-caupi, os resultados do ensaio de desidratação radicular indicam uma especialização funcional das subfamílias de bHLH durante a resposta ao déficit hídrico. Um grupo de genes *VubHLH*, pertencentes às subfamílias Ia, Va e IX estão mais relacionadas com a percepção e sinalização do estresse, enquanto as subfamílias XIII, IIIb, XII, Ib (2), VII (a+b), X e Vb atuam na sinalização e respostas de defesa propriamente ditas.

Diversos estudos ratificam o importante papel dos genes bHLH na tolerância à seca em diferentes espécies de plantas (Wang et al., 2018b; Qiu et al., 2020a; Zhao et al., 2020, Yang et al., 2021). Tais respostas de tolerância a seca mediadas por bHLH foram atribuídas à sua influência em diversos processos fisiológicos, como acúmulo metabólitos secundários e indução de osmoprotetores, controle da atividade de enzimas antioxidantes, sinalização hormonal, modulação do fechamento estomático, regulação da fotossíntese e desenvolvimento radicular (Dong et al., 2014; Wang et al., 2016; Li et al., 2019; Qiu et al., 2020b).

Apesar da sua reconhecida importância na resposta a estresses, as funções biológicas dessa família de TFs na defesa vegetal a vírus são limitadas a determinadas espécies vegetais economicamente importantes, como tabaco (Lukhovitskaya et al., 2013), *Arabidopsis* (Aparicio e Pallás, 2017), tomate (Wang et al., 2015) e cana-de-açúcar (Akbar et al., 2020). Em leguminosas, esses estudos são incipientes e/ou escassos. Em feijão-caupi, os dados de RNA-Seq mostraram que 13 (ensaio com CABMV) e dois (ensaio com CPSMV) transcritos foram induzidos após 1 h de aplicação dos estresses. Porém, nenhum transcrito foi induzido após 16 h para ambos os ensaios. Esses resultados indicam que os *VubHLHs* atuam na resposta de defesa precoce a vírus e que diferentes *VubHLHs* e/ou subfamílias dessa classe de TFs podem estar associados de modo específico na resposta a diferentes viroses, considerando que ambos os experimentos tiveram o mesmo desenho experimental. Além disso, nossos resultados ampliam o leque de alvos a serem estudados para um maior entendimento das funções da família bHLH em plantas em resposta a patógenos.

Sete transcritos foram induzidos em resposta a mais de um dos estresses, sendo o Vu4595|c0_g1_i1 induzido em resposta a todos os estresses investigados. Esse *crosstalk* sugere um possível envolvimento desses transcritos em resposta a múltiplos estresses. Muitos estudos têm mostrado que os TFs bHLH podem responder a uma variedade de condições não favoráveis (Sun et al., 2015; Mao et al., 2017; Zhao et al., 2020, Yang et al., 2021),

corroborando com os nossos dados da análise dos elementos cis-regulatórios e de expressão (RNA-Seq).

As subfamílias Ib (2), III (d+e) e IVa destacaram-se por apresentarem membros induzidos tanto em resposta ao estresse de desidratação radicular quanto à resposta precoce de defesa a viral. A subfamília Ib (2) foi previamente relatada por participar da resistência a vírus (Wang et al., 2015). As subfamílias III (d+e) e IVa, por sua vez, estão envolvidas na regulação modulada por JA (ácido jasmônico; Mertens et al., 2016; Goossens et al., 2017). Vários estudos têm descrito que a sinalização mediada por JA e seus derivados, os jasmonatos (JAs), desempenha importantes papéis na tolerância à seca (Seo et al., 2011; Mohamed e Latif, 2017) e resistência a viroses (Yang et al., 2016; Zhao et al., 2019). Por exemplo, em *V. mungo*, a aplicação exógena de MeJA (*methyl jasmonate*) em plantas susceptíveis proporcionou o desenvolvimento da tolerância ao MYMIV (*Mungbean yellow mosaic India virus*), além de reduzir a ação de proteínas virais e induzir a expressão de enzimas antioxidantes (Chakraborty e Basak, 2018). Sugere-se, portanto, que os *VubHLHs* envolvidos na sinalização mediada por JA podem atuar como conectores importantes em vias de resposta aos estresses biótico e abiótico em feijão-caupi. Entretanto, maiores análises serão necessárias para averiguação dessa sugestiva hipótese.

5. Conclusão

A identificação e caracterização de 175 genes da família de TFs bHLH em todo o genoma de *V. unguiculata* (*VubHLH*) foi conduzida no presente estudo. Esses *VubHLH* estão distribuídos de forma heterogênea ao longo dos 11 cromossomos do feijão-caupi e podem ser agrupados em 26 subfamílias apoiadas pela topologia da árvore fenética, estrutura gênica (éxons / íntrons) e motivos proteicos conservados. Uma ampla variação na estrutura intrônica dos *VubHLHs* foi observada, com 94% dos genes apresentando um ou mais íntrons, fato que pode estar relacionado à diversificação e classificação das suas subfamílias. Entretanto, o número de éxons/íntrons tende a se manter constante em uma dada subfamília. Os mecanismos de duplicação gênicas WGD / segmental, dispersa e em tandem demonstram participação na expansão dos *VubHLHs* no genoma do feijão-caupi. A identificação dos elementos cis-regulatórios e a análise de transcriptômica dos *VubHLHs* revelaram, por sua vez, que esses genes podem estar envolvidos na resposta vegetal a diversos estresses bióticos e abióticos, além daqueles aqui estudados. A observação detalhada dos *VubHLHs* induzidos revelou que, em feijão-caupi, a família bHLH é responsiva tanto ao estresse de desidratação radicular quanto à resposta precoce à inoculação viral, com alguns genes *VubHLH* envolvidos na resposta a mais de um desses estresses, indicando um possível *crosstalk* nessas respostas. Com o exposto, nosso estudo indica importantes candidatos para pesquisas funcionais adicionais da família bHLH em feijão-caupi. Adicionalmente, pela carência de estudos relacionados à atuação de bHLH em resposta a vírus, esses resultados fornecem novas evidências sobre as prováveis funções e mecanismos regulatórios dos *VubHLH* em feijão-caupi frente à resposta precoce de defesa contra vírus.

Referências

- Akbar, S., Wei, Y., Yuan, Y., Khan, M. T., Qin, L., Powell, C. A., ... & Zhang, M. (2020). Gene expression profiling of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant defense system following *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) infection. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-12.
- Alvarez-Buylla, E. R., García-Ponce, B., Sánchez, M. D. L. P., Espinosa-Soto, C., García-Gómez, M. L., Piñeyro-Nelson, A., & Garay-Arroyo, A. (2019). MADS-box

- genes underground becoming mainstream: plant root developmental mechanisms. *New Phytologist*, 223(3), 1143-1158.
- Aparicio, F., & Pallás, V. (2017). The coat protein of Alfalfa mosaic virus interacts and interferes with the transcriptional activity of the bHLH transcription factor ILR3 promoting salicylic acid-dependent defence signalling response. *Molecular Plant Pathology*, 18(2), 173-186.
- Atchley, W. R., Wollenberg, K. R., Fitch, W. M., Terhalle, W., & Dress, A. W. (2000). Correlations among amino acid sites in bHLH protein domains: an information theoretic analysis. *Molecular Biology and Evolution*, 17(1), 164-178.
- Bai, J. F., Wang, Y. K., Guo, L. P., Guo, X. M., Guo, H. Y., Yuan, S. H., ... & Zhang, L. P. (2019). Genomic identification and characterization of MYC family genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 20(1), 1-15.
- Bailey, T. L., & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol*, 2, 28-36.
- Bailey, P. C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P. H., Huq, E., Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., & Weisshaar, B. (2003) Update on the basic helix-loop-helix transcription factor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 15, 2497-2502.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., ... & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic Acids Research*, 37(suppl_2), W202-W208.
- Barna, B., & Király, L. (2004). Host-pathogen relations: diseases caused by viruses, subviral organisms, and phytoplasmas. *Plant Toxicology*, 533-568.
- Bassolino, L., Buti, M., Fulvio, F., Pennesi, A., Mandolino, G., Milc, J., ... & Paris, R. (2020). In Silico identification of MYB and bHLH families reveals candidate transcription factors for secondary metabolic pathways in *Cannabis sativa* L. *Plants*, 9(11), 1540.
- Bastos, E. A., Nascimento, S. P. D., Silva, E. M. D., Freire Filho, F. R., & Gomide, R. L. (2011). Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. *Revista Ciência Agronômica*, 42(1), 100-107.
- Bauchet, G. J., Bett, K. E., Cameron, C. T., Campbell, J. D., Cannon, E. K., Cannon, S. B., ... & Zhao, P. X. (2019). The future of legume genetic data resources: Challenges, opportunities, and priorities. *Legume Science*, 1(1), e16.
- Biscotti, M. A., Olmo, E., & Heslop-Harrison, J. P. (2015). Repetitive DNA in eukaryotic genomes. *Chromosome Res*, 23(3), 415-420.
- Bouaziz, D., Pirrello, J., Charfeddine, M., Hammami, A., Jbir, R., Dhieb, A., ... & Gargouri-Bouazid, R. (2013). Overexpression of StDREB1 transcription factor increases tolerance to salt in transgenic potato plants. *Molecular Biotechnology*, 54(3), 803-817.
- Boukar, O., Belko, N., Chamarthi, S., Togola, A., Batieno, J., Owusu, E., ... & Fatokun, C. (2019). Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. *Plant Breeding*, 138(4), 415-424.
- Boukar, O., Fatokun, C. A., Huynh, B. L., Roberts, P. A., & Close, T. J. (2016). Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. *Frontiers in Plant Science*, 7, 757.
- Bourgey, M., Dali, R., Eveleigh, R., Chen, K. C., Letourneau, L., Fillon, J., ... & Bourque, G. (2019). GenPipes: an open-source framework for distributed and scalable genomic analyses. *GigaScience*, 8(6), giz037.
- Callens, C., Tucker, M. R., Zhang, D., & Wilson, Z. A. (2018). Dissecting the role of MADS-box genes in monocot floral development and diversity. *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2435-2459.
- Cardoso, M. J., Freire Filho, F. R., & Athayde Sobrinho, C. (1990). BR 14 MULATO: nova cultivar de feijão macassar para o Estado do Piauí. *Embrapa-UEPAE de Teresina*.

- Carretero-Paulet, L., Galstyan, A., Roig-Villanova, I., Martínez-García, J. F., Bilbao-Castro, J. R., & Robertson, D. L. (2010). Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiology*, 153(3), 1398-1412.
- Castelain, M., Le Hir, R., & Bellini, C. (2012). The non-DNA-binding bHLH transcription factor PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7 is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 145(3), 450-460.
- Chakraborty, N., & Basak, J. (2019). Exogenous application of methyl jasmonate induces defense response and develops tolerance against *Mungbean yellow mosaic India virus* in *Vigna mungo*. *Functional Plant Biology*, 46(1), 69-81.
- Chen, Y. Y., Li, M. Y., Wu, X. J., Huang, Y., Ma, J., & Xiong, A. S. (2015). Genome-wide analysis of basic helix–loop–helix family transcription factors and their role in responses to abiotic stress in carrot. *Molecular Breeding*, 35(5), 1-12.
- Cheng, Z., Sun, L., Qi, T., Zhang, B., Peng, W., Liu, Y., & Xie, D. (2011). The bHLH transcription factor MYC3 interacts with the Jasmonate ZIM-domain proteins to mediate jasmonate response in *Arabidopsis*. *Molecular plant*, 4(2), 279-288.
- Chezem, W. R., & Clay, N. K. (2016). Regulation of plant secondary metabolism and associated specialized cell development by MYBs and bHLHs. *Phytochemistry*, 131, 26-43.
- Chu, Y., Zhang, W., Wu, B., Huang, Q., Zhang, B., & Su, X. (2016). Overexpression of the novel *Zygophyllum xanthoxylum* C2H2-type zinc finger gene ZxZF improves drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* and poplar. *Biologia*, 71(7), 769-776.
- Clark, J. W., & Donoghue, P. C. (2017). Constraining the timing of whole genome duplication in plant evolutionary history. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284(1858), 20170912.
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., & Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome research*, 14(6), 1188-1190.
- Dombrecht, B., Xue, G. P., Sprague, S. J., Kirkegaard, J. A., Ross, J. J., Reid, J. B., ... & Kazan, K. (2007). MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19(7), 2225-2245.
- Dong, Y., Wang, C., Han, X., Tang, S., Liu, S., Xia, X., & Yin, W. (2014). A novel bHLH transcription factor PebHLH35 from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating stomatal development, photosynthesis and growth in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 450(1), 453-458.
- Eddy, S. R. (1998). BIOINFORMATICS REVIEW. *Bioinformatics*, 14(9), 755-763.
- Fan, M., Bai, M. Y., Kim, J. G., Wang, T., Oh, E., Chen, L., ... & Wang, Z. Y. (2014). The bHLH transcription factor HBI1 mediates the trade-off between growth and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(2), 828-841.
- Feller, A., Hernandez, J. M., & Grotewold, E. (2006). An ACT-like domain participates in the dimerization of several plant basic-helix-loop-helix transcription factors. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 28964-28974.
- Fernández-Calvo, P., Chini, A., Fernández-Barbero, G., Chico, J. M., Gimenez-Ibanez, S., Geerinck, J., ... & Solano, R. (2011). The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell*, 23(2), 701-715.
- Freire Filho, F. R. (2011). Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. *Embrapa Meio-Norte-Livro científico (ALICE)*.

- Fujisawa, M., Nakano, T., Shima, Y., & Ito, Y. (2013). A large-scale identification of direct targets of the tomato MADS box transcription factor RIPENING INHIBITOR reveals the regulation of fruit ripening. *The Plant Cell*, 25(2), 371-386.
- Gao, C., Sun, J., Wang, C., Dong, Y., Xiao, S., Wang, X., & Jiao, Z. (2017). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix gene family in peanut and assessment of its roles in pod development. *PloS One*, 12(7), e0181843.
- Gepts, P., Beavis, W. D., Brummer, E. C., Shoemaker, R. C., Stalker, H. T., Weeden, N. F., & Young, N. D. (2005). Legumes as a model plant family. Genomics for food and feed report of the cross-legume advances through genomics conference. *Plant physiology*, 137(4), 1228-1235.
- Goossens, J., Fernández-Calvo, P., Schweizer, F., & Goossens, A. (2016). Jasmonates: signal transduction components and their roles in environmental stress responses. *Plant Molecular Biology*, 91(6), 673-689.
- Gupta, S., Malviya, N., Kushwaha, H., Nasim, J., Bisht, N. C., Singh, V. K., & Yadav, D. (2015). Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor. *Planta*, 241(3), 549-562.
- Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L., & Noble, W. S. (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome biology*, 8(2), 1-9.
- Gutha, L. R., & Reddy, A. R. (2008). Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance. *Plant Molecular Biology*, 68(6), 533.
- Han, G., Lu, C., Guo, J., Qiao, Z., Sui, N., Qiu, N., & Wang, B. (2020). C2H2 zinc finger proteins: master regulators of abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science*, 11, 115.
- Heim, M. A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P. C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 20(5), 735-747.
- Hiller, K., Grote, A., Maneck, M., Münch, R., & Jahn, D. (2006). JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics*, 22(19), 2441-2443.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California Agricultural Experiment Station*, 347(2nd edit).
- Hong, J. C. (2016). General aspects of plant transcription factor families. In *Plant transcription factors* (pp. 35-56). Academic Press.
- Hornitschek, P., Lorrain, S., Zoete, V., Michielin, O., & Fankhauser, C. (2009). Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *The EMBO Journal*, 28(24), 3893-3902.
- Hu, B., Jin, J., Guo, A-Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: um servidor de visualização de recurso de gene atualizado. *Bioinformatics*, 31(8): 1296-1297.
- Hudson, K. A., & Hudson, M. E. (2015). A classification of basic helix-loop-helix transcription factors of soybean. *International Journal of Genomics*, 2015.
- Kang, W. H., Kim, S., Lee, H. A., Choi, D., & Yeom, S. I. (2016). Genome-wide analysis of Dof transcription factors reveals functional characteristics during development and response to biotic stresses in pepper. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- Kang, Y. J., Satyawat, D., Shim, S., Lee, T., Lee, J., Hwang, W. J., ... & Lee, S. H. (2015). Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. *Scientific Reports*, 5(1), 1-8.
- Kavas, M., Baloglu, M. C., Atabay, E. S., Ziplar, U. T., Daşgan, H. Y., & Ünver, T. (2016). Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH

- transcription factors in response to excess salt concentration. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(1), 129-143.
- Kazama, D., Itakura, M., Kurusu, T., Mitsuda, N., Ohme-Takagi, M., & Tada, Y. (2013). Identification of chimeric repressors that confer salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plants*, 2(4), 769-785.
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2013). MYC2: the master in action. *Molecular Plant*, 6(3), 686-703.
- Kobayashi, T., Ozu, A., Kobayashi, S., An, G., Jeon, J. S., & Nishizawa, N. K. (2019). OsbHLH058 and OsbHLH059 transcription factors positively regulate iron deficiency responses in rice. *Plant Molecular Biology*, 101(4), 471-486.
- Kochert, G., Stalker, H. T., Gimenes, M., Galgaro, L., Lopes, C. R., & Moore, K. (1996). RFLP and cytogenetic evidence on the origin and evolution of allotetraploid domesticated peanut, *Arachis hypogaea* (Leguminosae). *American Journal of Botany*, 83(10), 1282-1291.
- Krishnaswamy, S., Verma, S., Rahman, M. H., & Kav, N. N. (2011). Functional characterization of four APETALA2-family genes (RAP2. 6, RAP2. 6L, DREB19 and DREB26) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 75(1), 107-127.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lang, Y., & Liu, Z. (2020). Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in Yellow horn (*Xanthoceras sorbifolia* Bunge): Genome-wide characterization, chromosome location, phylogeny, structures and expression patterns. *International Journal of Biological Macromolecules*, 160, 711-723.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- Lei, R., Li, Y., Cai, Y., Li, C., Pu, M., Lu, C., ... & Liang, G. (2020). bHLH121 functions as a direct link that facilitates the activation of FIT by bHLH IVc transcription factors for maintaining Fe homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 13(4), 634-649.
- Li, H., Wang, W., Lin, L., Zhu, X., Zhu, X., Li, J., & Chen, Z. (2013). Diversification of the phaseoloid legumes: effects of climate change, range expansion and habit shift. *Frontiers in Plant Science*, 4, 386.
- Li, J., Wang, T., Han, J., & Ren, Z. (2020). Genome-wide identification and characterization of cucumber bHLH family genes and the functional characterization of CsbHLH041 in NaCl and ABA tolerance in *Arabidopsis* and cucumber. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-20.
- Li, X., Duan, X., Jiang, H., Sun, Y., Tang, Y., Yuan, Z., ... & Zhang, D. (2006). Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 141(4), 1167-1184.
- Li, Z., Liu, C., Zhang, Y., Wang, B., Ran, Q., & Zhang, J. (2019). The bHLH family member ZmPTF1 regulates drought tolerance in maize by promoting root development and abscisic acid synthesis. *Journal of Experimental Botany*, 70(19), 5471-5486.
- Liu, D., Yang, L., Luo, M., Wu, Q., Liu, S., & Liu, Y. (2017). Molecular cloning and characterization of PtrZPT2-1, a ZPT2 family gene encoding a Cys2/His2-type zinc finger protein from trifoliate orange (*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.) that enhances plant tolerance to multiple abiotic stresses. *Plant Science*, 263, 66-78.

- Lu, R., Zhang, J., Liu, D., Wei, Y. L., Wang, Y., & Li, X. B. (2018). Characterization of bHLH/HLH genes that are involved in brassinosteroid (BR) signaling in fiber development of cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC Plant Biology*, 18(1), 1-13.
- Lukhovitskaya, N. I., Solovieva, A. D., Boddeti, S. K., Thaduri, S., Solovyev, A. G., & Savenkov, E. I. (2013). An RNA virus-encoded zinc-finger protein acts as a plant transcription factor and induces a regulator of cell size and proliferation in two tobacco species. *The Plant Cell*, 25(3), 960-973.
- Ma, J., Li, M. Y., Wang, F., Tang, J., & Xiong, A. S. (2015). Genome-wide analysis of Dof family transcription factors and their responses to abiotic stresses in Chinese cabbage. *BMC Genomics*, 16(1), 1-15.
- Mao, K., Dong, Q., Li, C., Liu, C., & Ma, F. (2017). Genome wide identification and characterization of apple bHLH transcription factors and expression analysis in response to drought and salt stress. *Frontiers in Plant Science*, 8, 480.
- Massari, M. E., & Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Molecular and Cellular Biology*, 20(2), 429-440.
- Medford, J. I., Horgan, R., El-Sawi, Z., & Klee, H. J. (1989). Alterations of endogenous cytokinins in transgenic plants using a chimeric isopentenyl transferase gene. *The Plant Cell*, 1(4), 403-413.
- Mehrotra, S., & Goyal, V. (2014). Repetitive sequences in plant nuclear DNA: types, distribution, evolution and function. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 12(4), 164-171.
- Mertens, J., Van Moerkercke, A., Vanden Bossche, R., Pollier, J., & Goossens, A. (2016). Clade IVa basic helix-loop-helix transcription factors form part of a conserved jasmonate signaling circuit for the regulation of bioactive plant terpenoid biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 57(12), 2564-2575.
- Miyamoto, K., Shimizu, T., Lin, F., Sainsbury, F., Thuenemann, E., Lomonossoff, G., ... & Okada, K. (2012). Identification of an E-box motif responsible for the expression of jasmonic acid-induced chitinase gene OsChia4a in rice. *Journal of Plant Physiology*, 169(6), 621-627.
- Mohamed, H. I., & Latif, H. H. (2017). Improvement of drought tolerance of soybean plants by using methyl jasmonate. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 545-556.
- Monfared, M. M., Simon, M. K., Meister, R. J., Roig-Villanova, I., Kooiker, M., Colombo, L., ... & Gasser, C. S. (2011). Overlapping and antagonistic activities of BASIC PENTACYSTEINE genes affect a range of developmental processes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 66(6), 1020-1031.
- Moore, R. C., & Purugganan, M. D. (2005). The evolutionary dynamics of plant duplicate genes. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(2), 122-128.
- Moretzsohn, M. C., Gouvea, E. G., Inglis, P. W., Leal-Bertioli, S. C., Valls, J. F., & Bertioli, D. J. (2013). A study of the relationships of cultivated peanut (*Arachis hypogaea*) and its most closely related wild species using intron sequences and microsatellite markers. *Annals of Botany*, 111(1), 113-126.
- Morran, S., Eini, O., Pyvovarenko, T., Parent, B., Singh, R., Ismagul, A., ... & Lopato, S. (2011). Improvement of stress tolerance of wheat and barley by modulation of expression of DREB/CBF factors. *Plant Biotechnology Journal*, 9(2), 230-249.
- Nei, M., & Gojobori, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3(5), 418-426.

- Niu, Y., Figueroa, P., & Browse, J. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 62(6), 2143-2154.
- Oliveira, C. R. R. D., Freire Filho, F. R., Nogueira, M. D. S. D. R., Barros, G. B., Eiras, M., Ribeiro, V. Q., & Lopes, Â. C. D. A. (2012). Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo *Cucumber mosaic virus*, *Cowpea aphid-borne mosaic virus* e *Cowpea severe mosaic virus*. *Bragantia*, 71(1), 59-66.
- Östlund, G., Schmitt, T., Forslund, K., Köstler, T., Messina, D. N., Roopra, S., ... & Sonnhammer, E. L. (2010). InParanoid 7: new algorithms and tools for eukaryotic orthology analysis. *Nucleic Acids Research*, 38(suppl_1), D196-D203.
- Pires, N., & Dolan, L. (2010). Early evolution of bHLH proteins in plants. *Plant Signaling & Behavior*, 5(7), 911-912.
- Qi, T., Wang, J., Huang, H., Liu, B., Gao, H., Liu, Y., ... & Xie, D. (2015). Regulation of jasmonate-induced leaf senescence by antagonism between bHLH subgroup IIIe and IIId factors in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(6), 1634-1649.
- Qiu, J. R., Huang, Z., Xiang, X. Y., Xu, W. X., Wang, J. T., Chen, J., ... & Jiang, C. Z. (2020). MfbHLH38, a *Myrothamnus flabellifolia* bHLH transcription factor, confers tolerance to drought and salinity stresses in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 20(1), 1-14.
- Qiu, J. R., Xiang, X. Y., Wang, J. T., Xu, W. X., Chen, J., Xiao, Y., ... & Huang, Z. (2020). MfPIF1 of resurrection plant *Myrothamnus flabellifolia* plays a positive regulatory role in responding to drought and salinity stresses in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8), 3011.
- Rocha, M. M., Lima, J. A. A., FREIRE FILHO, F. R., & LIMA, V. (1996). Resistencia de caupi de tegumento branco a algumas estirpes de comovirus, potyvirus e cucumovirus. In *Embrapa Meio-Norte-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 4., 1996, Teresina. Resumos. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1996. p. 100-101..
- Rodrigues, E. V., Damasceno-Silva, K. J., Rocha, M. D. M., Bastos, E. A., & Teodoro, P. E. (2017). Selection of cowpea populations tolerant to water deficit by selection index. *Revista Ciência Agronômica*, 48(5SPE), 889-896.
- Rodrigues, F. A., Marcolino-Gomes, J., Carvalho, J. D. F. C., Nascimento, L. C. D., Neumaier, N., Farias, J. R. B., ... & Nepomuceno, A. L. (2012). Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genetics and Molecular Biology*, 35(1), 304-314.
- Salman-Minkov, A., Sabath, N., & Mayrose, I. (2016). Whole-genome duplication as a key factor in crop domestication. *Nature Plants*, 2(8), 1-4.
- Sarkar, T., Thankappan, R., Kumar, A., Mishra, G. P., & Dobaria, J. R. (2014). Heterologous expression of the AtDREB1A gene in transgenic peanut-conferred tolerance to drought and salinity stresses. *PLoS One*, 9(12), e110507.
- Schmutz, J., McClean, P. E., Mamidi, S., Wu, G. A., Cannon, S. B., Grimwood, J., ... & Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), 707-713.
- Seo, J. S., Joo, J., Kim, M. J., Kim, Y. K., Nahm, B. H., Song, S. I., ... & Choi, Y. D. (2011). OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. *The Plant Journal*, 65(6), 907-921.
- Shan, X., Zhang, W., Yu, F., Wang, S., Li, J., Tang, J., & Dai, Z. (2019). Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix superfamily members reveals organization and

- chilling-responsive patterns in cabbage (*Brassica oleracea* var. capitata L.). *Genes*, 10(11), 914.
- Simonini, S., Roig-Villanova, I., Gregis, V., Colombo, B., Colombo, L., & Kater, M. M. (2012). Basic pentacysteine proteins mediate MADS domain complex binding to the DNA for tissue-specific expression of target genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 24(10), 4163-4172.
- Song, S., Huang, H., Gao, H., Wang, J., Wu, D., Liu, X., ... & Xie, D. (2014). Interaction between MYC2 and ETHYLENE INSENSITIVE3 modulates antagonism between jasmonate and ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 26(1), 263-279.
- Sonnhammer, E. L., & Östlund, G. (2015). InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Research*, 43(D1), D234-D239.
- Sun, H., Fan, H. J., & Ling, H. Q. (2015). Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. *BMC Genomics*, 16(1), 1-12.
- Sun, H., Fan, H. J., & Ling, H. Q. (2015). Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. *BMC Genomics*, 16(1), 1-12.
- Sun, W., Jin, X., Ma, Z., Chen, H., & Liu, M. (2020). Basic helix-loop-helix (bHLH) gene family in Tartary buckwheat (*Fagopyrum tataricum*): Genome-wide identification, phylogeny, evolutionary expansion and expression analyses. *International Journal of Biological Macromolecules*, 155, 1478-1490.
- Taylor, J. S., & Raes, J. (2004). Duplication and divergence: the evolution of new genes and old ideas. *Annu. Rev. Genet.*, 38, 615-643.
- Tian, Y., Pu, X., Yu, H., Ji, A., Gao, R., Hu, Y., ... & Wang, H. (2020). Genome-wide characterization and analysis of bhlh transcription factors related to crocin biosynthesis in *Gardenia jasminoides* Ellis (Rubiaceae). *BioMed Research International*, 2020.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P. H. (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *The Plant Cell*, 15(8), 1749-1770.
- Wang, C. T., Yang, Q., & Wang, C. T. (2011). Isolation and functional characterization of ZmDBP2 encoding a dehydration-responsive element-binding protein in *Zea mays*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29(1), 60-68.
- Wang, F., Zhu, H., Chen, D., Li, Z., Peng, R., & Yao, Q. (2016). A grape bHLH transcription factor gene, VvbHLH1, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 125(2), 387-398.
- Wang, L., Xiang, L., Hong, J., Xie, Z., & Li, B. (2019). Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). *3 Biotech*, 9(6), 1-12.
- Wang, P., Su, L., Gao, H., Jiang, X., Wu, X., Li, Y., ... & Ren, F. (2018). Genome-wide characterization of bHLH genes in grape and analysis of their potential relevance to abiotic stress tolerance and secondary metabolite biosynthesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 64.
- Wang, Q., Guan, Y., Wu, Y., Chen, H., Chen, F., & Chu, C. (2008). Overexpression of a rice OsDREB1F gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice. *Plant Molecular Biology*, 67(6), 589-602.
- Wang, R., Zhao, P., Kong, N., Lu, R., Pei, Y., Huang, C., ... & Chen, Q. (2018). Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes*, 9(1), 54.
- Wang, R., Zhao, P., Kong, N., Lu, R., Pei, Y., Huang, C., ... & Chen, Q. (2018). Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes*, 9(1), 54.

- Wang, Y., & Liu, A. (2020). Genomic characterization and expression analysis of basic helix-loop-helix (bhlh) family genes in traditional chinese herb *Dendrobium officinale*. *Plants*, 9(8), 1044.
- Wang, Y., Qiao, L., Bai, J., Wang, P., Duan, W., Yuan, S., ... & Zhao, C. (2017). Genome-wide characterization of JASMONATE-ZIM DOMAIN transcription repressors in wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Genomics*, 18(1), 1-19.
- Wang, Y., Tang, H., DeBarry, J. D., Tan, X., Li, J., Wang, X., ... & Paterson, A. H. (2012). MScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Research*, 40(7), e49-e49.
- Wang, Z., Jia, C., Wang, J. Y., Miao, H. X., Liu, J. H., Chen, C., ... & Jin, Z. (2020). Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factors to elucidate candidate genes related to fruit ripening and stress in banana (*Musa acuminata* L. AAA Group, cv. Cavendish). *Frontiers in Plant Science*, 11, 650.
- Wang, Z., Zhang, J., Jia, C., Liu, J., Li, Y., Yin, X., ... & Jin, Z. (2012). De novo characterization of the banana root transcriptome and analysis of gene expression under *Fusarium oxysporum* f. sp. Cubense tropical race 4 infection. *BMC Genomics*, 13(1), 1-9.
- Xu, G., Guo, C., Shan, H., & Kong, H. (2012). Divergence of duplicate genes in exon-intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(4), 1187-1192.
- Yang, J., Gao, M., Huang, L., Wang, Y., van Nocker, S., Wan, R., ... & Gao, H. (2017). Identification and expression analysis of the apple (*Malus × domestica*) basic helix-loop-helix transcription factor family. *Scientific Reports*, 7(1), 1-14.
- Yang, L., Zhao, G. H., Liu, H., Wang, X., Guo, X., & Lammi, M. J. (2016). Field synopsis and meta-analyses of genetic epidemiological evidence for Kashin-Beck disease, an endemic osteoarthropathy in China. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(5), 1823-1833.
- Yang, M., Zhou, C., Yang, H., Kuang, R., Huang, B., & Wei, Y. (2020). Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factors in papaya (*Carica papaya* L.). *PeerJ*, 8, e9319.
- Yang, T., Meng, Y., Chen, L. J., Lin, H. H., & Xi, D. H. (2016). The roles of alpha-momorcharin and jasmonic acid in modulating the response of momordica charantia to cucumber mosaic virus. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1796.
- Yang, Y. Y., Zheng, P. F., Ren, Y. R., Yao, Y. X., You, C. X., Wang, X. F., & Hao, Y. J. (2021). Apple MdSAT1 encodes a bHLHm1 transcription factor involved in salinity and drought responses. *Planta*, 253(2), 1-13.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- Zhang, H. B., Bokowiec, M. T., Rushton, P. J., Han, S. C., & Timko, M. P. (2012). Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis. *Molecular Plant*, 5(1), 73-84.
- Zhang, J., Liu, B., Li, M., Feng, D., Jin, H., Wang, P., ... & Wang, H. B. (2015). The bHLH transcription factor bHLH104 interacts with IAA-LEUCINE RESISTANT3 and modulates iron homeostasis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 27(3), 787-805.
- Zhang, J., Long, Y., Wang, L., Dang, Z., Zhang, T., Song, X., ... & Pei, X. (2018). Consensus genetic linkage map construction and QTL mapping for plant height-related traits in linseed flax (*Linum usitatissimum* L.). *BMC Plant Biology*, 18(1), 1-12.
- Zhang, Z., Chen, J., Liang, C., Liu, F., Hou, X., & Zou, X. (2020). Genome-Wide Identification and Characterization of the bHLH Transcription Factor Family in Pepper (*Capsicum annuum* L.). *Front Genet.* 25(11), 570156.

- Zhang, T., Lv, W., Zhang, H., Ma, L., Li, P., Ge, L., & Li, G. (2018). Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize. *BMC Plant Biology*, 18(1), 1-14.
- Zhang, X., Zhang, B., Li, M. J., Yin, X. M., Huang, L. F., Cui, Y. C., ... & Xia, X. (2016). OsMSR15 encoding a rice C2H2-type zinc finger protein confers enhanced drought tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Journal of Plant Biology*, 59(3), 271-281.
- Zhao, L., Hu, Z., Li, S., Zhou, X., Li, J., Su, X., ... & Dong, J. (2019). Diterpenoid compounds from *Wedelia trilobata* induce resistance to *Tomato spotted wilt virus* via the JA signal pathway in tobacco plants. *Scientific Reports*, 9(1), 1-12.
- Zhao, Q., Fan, Z., Qiu, L., Che, Q., Li, Y., & Wang, Y. (2020). MdbHLH130, an apple bHLH transcription factor, confers water stress resistance by regulating stomatal closure and ROS homeostasis in transgenic tobacco. *Frontiers in Plant Science*, 11, 1436.
- Zhao, Q., Ren, Y. R., Wang, Q. J., Yao, Y. X., You, C. X., & Hao, Y. J. (2016). Overexpression of Mdb HLH 104 gene enhances the tolerance to iron deficiency in apple. *Plant Biotechnology Journal*, 14(7), 1633-1645.
- Zheng, K., Wang, Y., & Wang, S. (2019). The non-DNA binding bHLH transcription factor Paclobutrazol Resistances are involved in the regulation of ABA and salt responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 239-245.
- Zheng, K., Wang, Y., Zhang, N., Jia, Q., Wang, X., Hou, C., ... & Wang, S. (2017). Involvement of PACLOBUTRAZOL RESISTANCE6/KIDARI, an atypical bHLH transcription factor, in auxin responses in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1813.
- Zhou, X., Liao, Y., Kim, S. U., Chen, Z., Nie, G., Cheng, S., ... & Xu, F. (2020). Genome-wide identification and characterization of bHLH family genes from *Ginkgo biloba*. *Scientific Reports*, 10(1), 1-15.
- Zhu, E., You, C., Wang, S., Cui, J., Niu, B., Wang, Y., ... & Chang, F. (2015). The DYT 1-interacting proteins bHLH010, bHLH089 and bHLH091 are redundantly required for *Arabidopsis* anther development and transcriptome. *The Plant Journal*, 83(6), 976-990.
- Zong, J. M., Li, X. W., Zhou, Y. H., Wang, F. W., Wang, N., Dong, Y. Y., ... & Li, H. Y. (2016). The AaDREB1 transcription factor from the cold-tolerant plant *Adonis amurensis* enhances abiotic stress tolerance in transgenic plant. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 611.

Materiais Suplementares

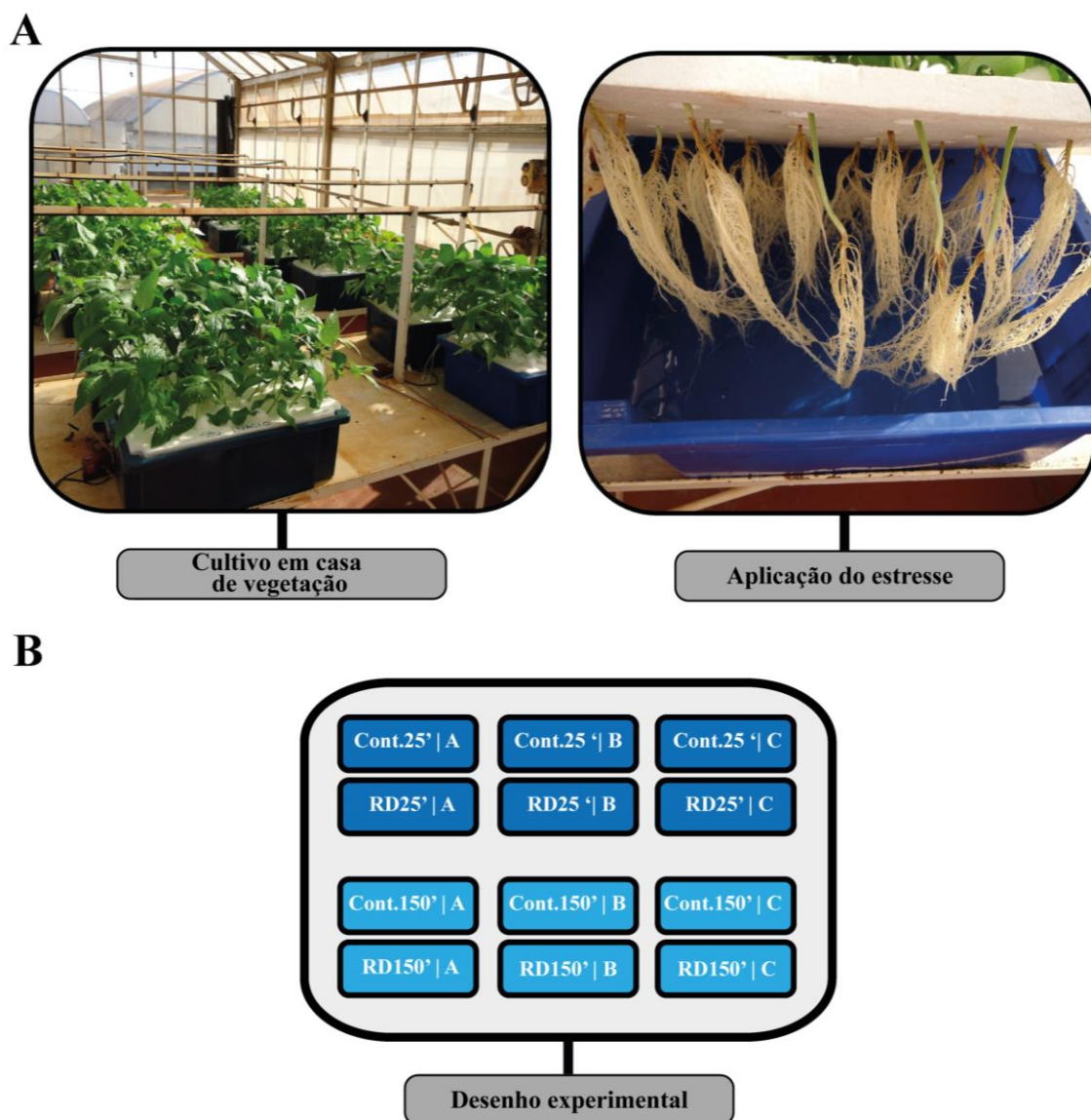


Figura Suplementar S1. Procedimentos implementados e desenho experimental para ensaio de desidratação radicular. (A) Condições de crescimento e aplicação de estresse em tanques com solução hidropônica, em ambiente controlado, antes da aplicação do tratamento de desidratação radicular (esquerda) pela retirada da solução nutritiva das raízes das plantas tratadas (direita); (B) Desenho experimental com três réplicas 'A, B, C'. Tempos de tratamento: 25 e 150 minutos após a remoção da solução hidropônica (RD25' e RD150', respectivamente) e seus respectivos controles não estressados [Cont.25' e Cont.150', respectivamente] Abreviações: RD (Desidratação radicular); Cont. (Controle) " ' "(minutos).

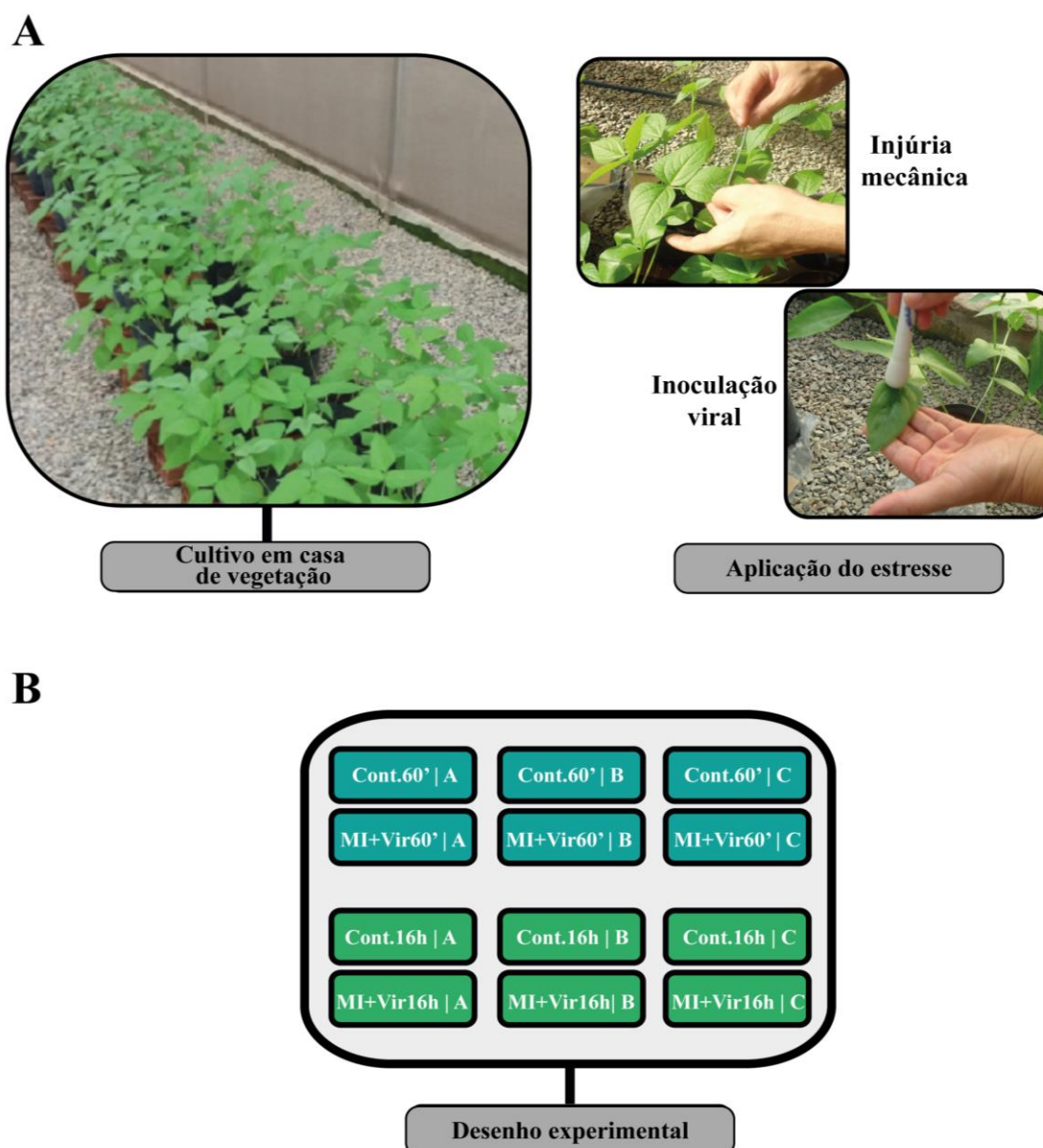


Figura Suplementar S2. Procedimentos implementados e desenho experimental para os ensaios de ‘injúria mecânica + inoculação de CABMV’ e ‘injúria mecânica + inoculação de CPSMV’. (A) Condições de crescimento e aplicação de estresse em um ambiente controlado (direita) e os procedimentos para aplicação de estresse (esquerda); (B) Desenho experimental com três réplicas ‘A, B, C’. Tempos de tratamento: 60 min e 16 h após aplicação do estresse (‘MI + Vir60’ e MI + Vir16h’, respectivamente) e seus respectivos controles não estressados [Cont.60’ e Cont.16h, respectivamente] Abreviações: MI (injúria mecânica); Vir (vírus: CABMV ou CPSMV); Cont. (controle); ‘ ’ ’ (minutos); ‘h’ (horas).

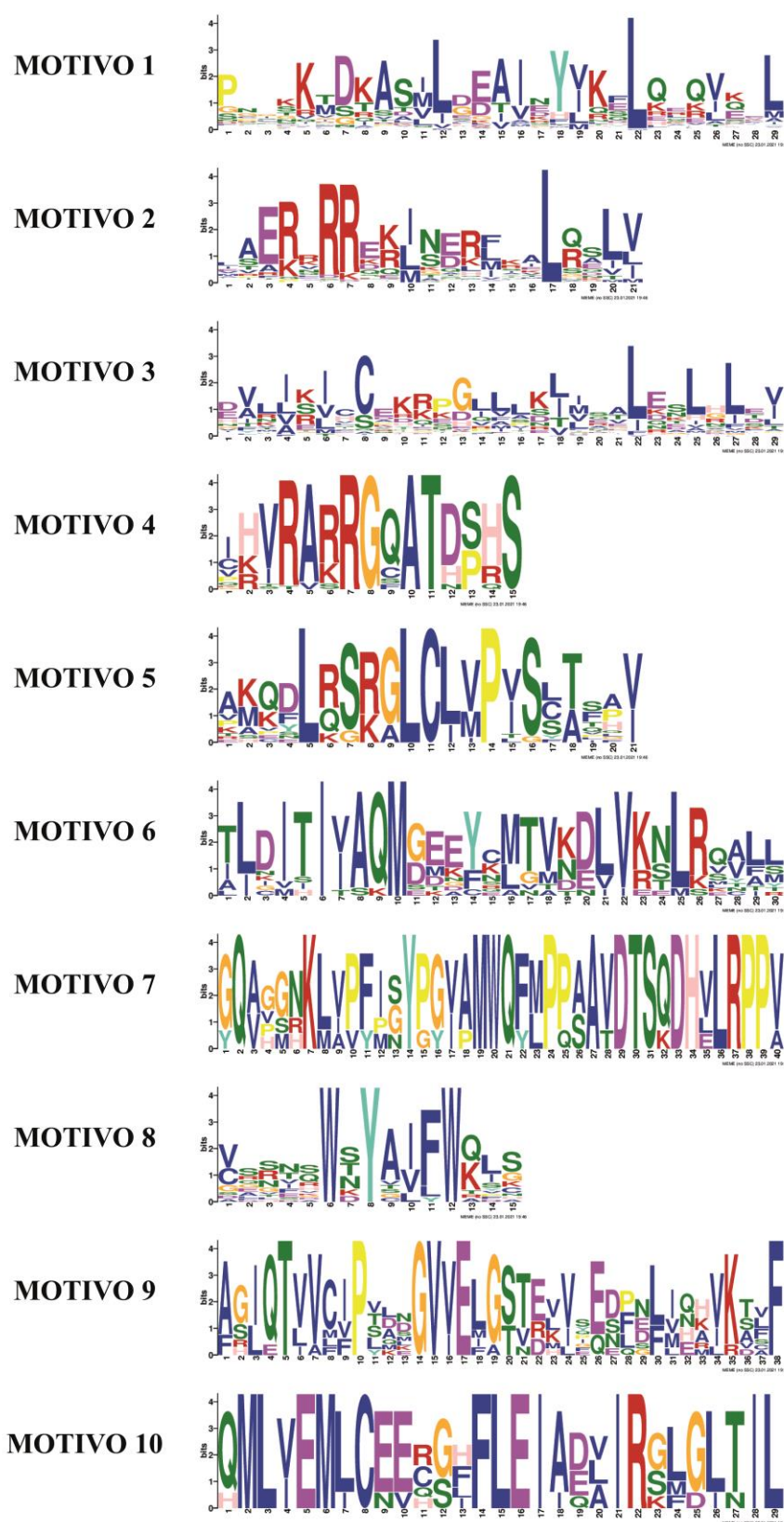


Figura Suplementar S3. Sequências consenso do logotipo dos 10 motivos pesquisados pelo software MEME nas sequências das proteínas VubHLH. A altura de cada letra representativa do aminoácido indica a sua conservação na sequência em uma determinada posição.

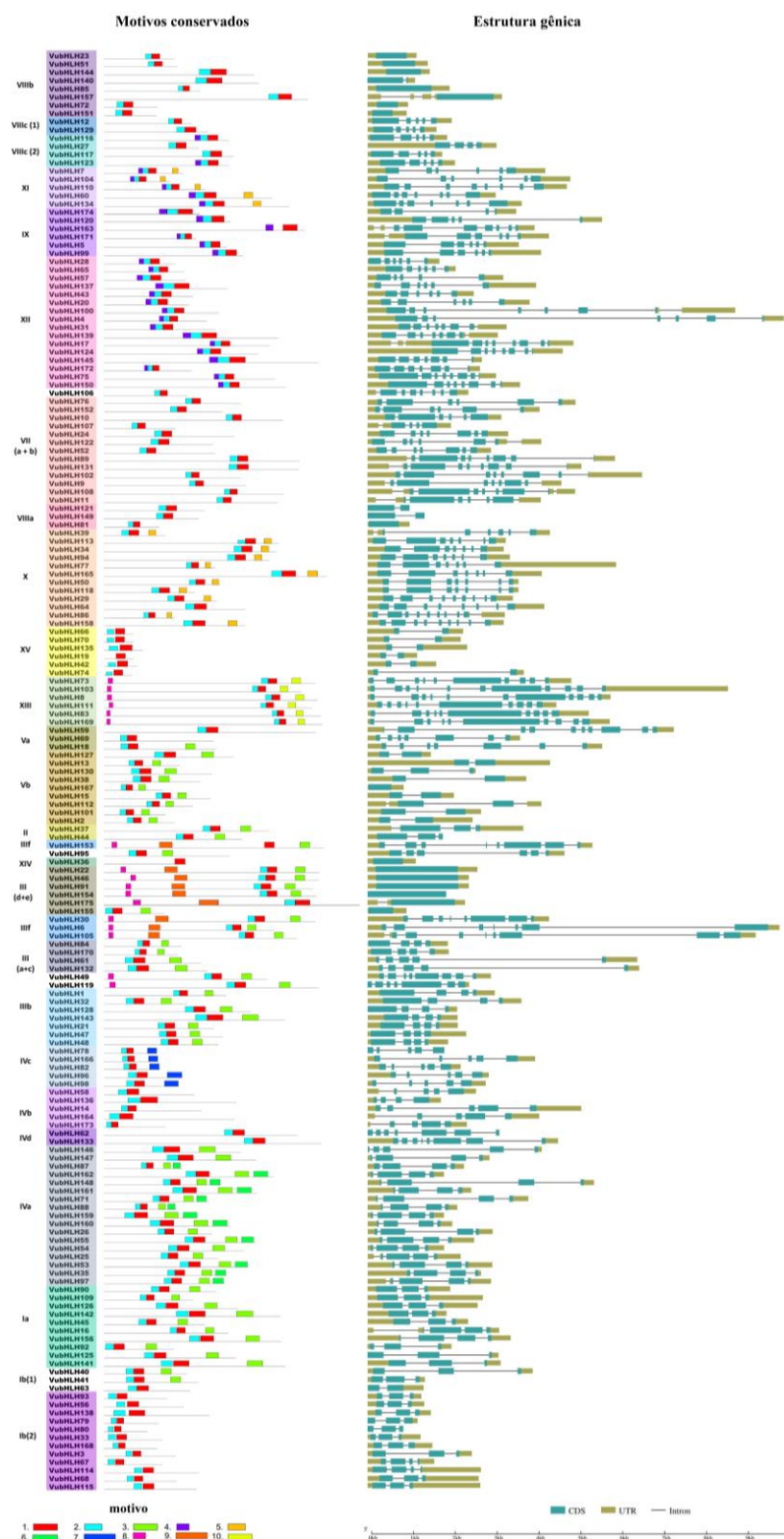


Figura Suplementar S4. Distribuição dos motivos proteicos dos 175 genes *VubHLHs* e suas respectivas estruturas gênicas. (A) Motivos conservados das proteínas *VubHLH* previstos pelo MEME. Os blocos coloridos correspondem a 10 diferentes motivos identificados nessas proteínas. Em vermelho, destaca-se o motivo ‘1’; em azul claro, destaca-se o motivo ‘2’. Tais motivos são característicos de bHLHs. (B) Estruturas dos genes *VubHLH*, utilizando GSDS 2.0. Éxons e íntrons estão representados por retângulos verdes e linhas pretas, respectivamente. Na parte inferior, a escala representa os comprimentos desses genes, em Kb.



Figura Suplementar S5. Alinhamento múltiplo e identificação dos domínios conservados *JAZ interaction domain* (JID) e *putative transcriptional activation domain* (TAD) conservados nas 9 proteínas VubHLH classificadas nas subfamílias IIIf e III (d+e), possuindo o motivos bHLH-MYC_N. As sequências consenso do logotipo dos motivos 8 e 9 constituem parte dos domínios domínio conservados *JAZ interaction domain* (JID) e *putative transcriptional activation domain* (TAD). A altura de cada pilha indica a conservação da sequência em uma determinada posição.

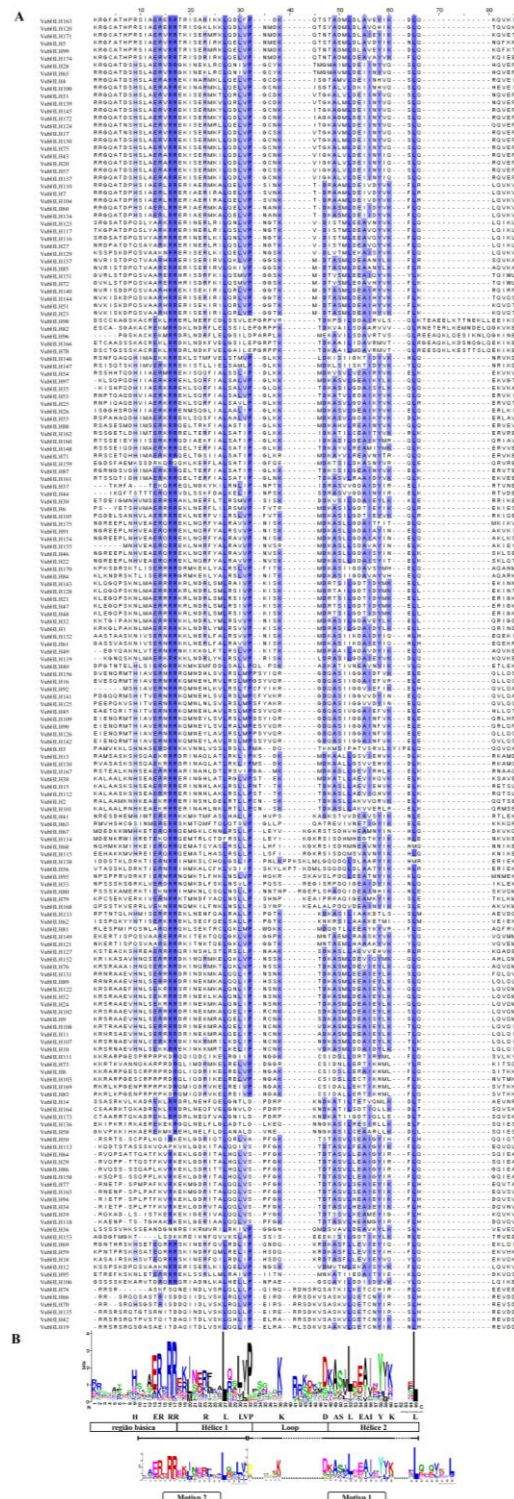


Figura Suplementar S6. Alinhamento da região dos motivos ‘1’ e ‘2’ (domínio bHLH) e identificação dos resíduos de aminoácidos conservados das 175 proteínas VubHLH identificadas no genoma do feijão-caupi. (A) Alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos conservados do domínio bHLH das proteínas VubHLH. Os aminoácidos que apresentaram mais de 50 e 75% de identidade nas sequências proteicas estão destacados em azul claro e azul escuro, respectivamente (B) Sequências consenso do logotipo das proteínas VubHLH (parte superior). Sequências de logotipo dos motivos ‘1’ e ‘2’ constituem o domínio bHLH em *V. unguiculata* (parte inferior). A altura de cada pilha indica a conservação da

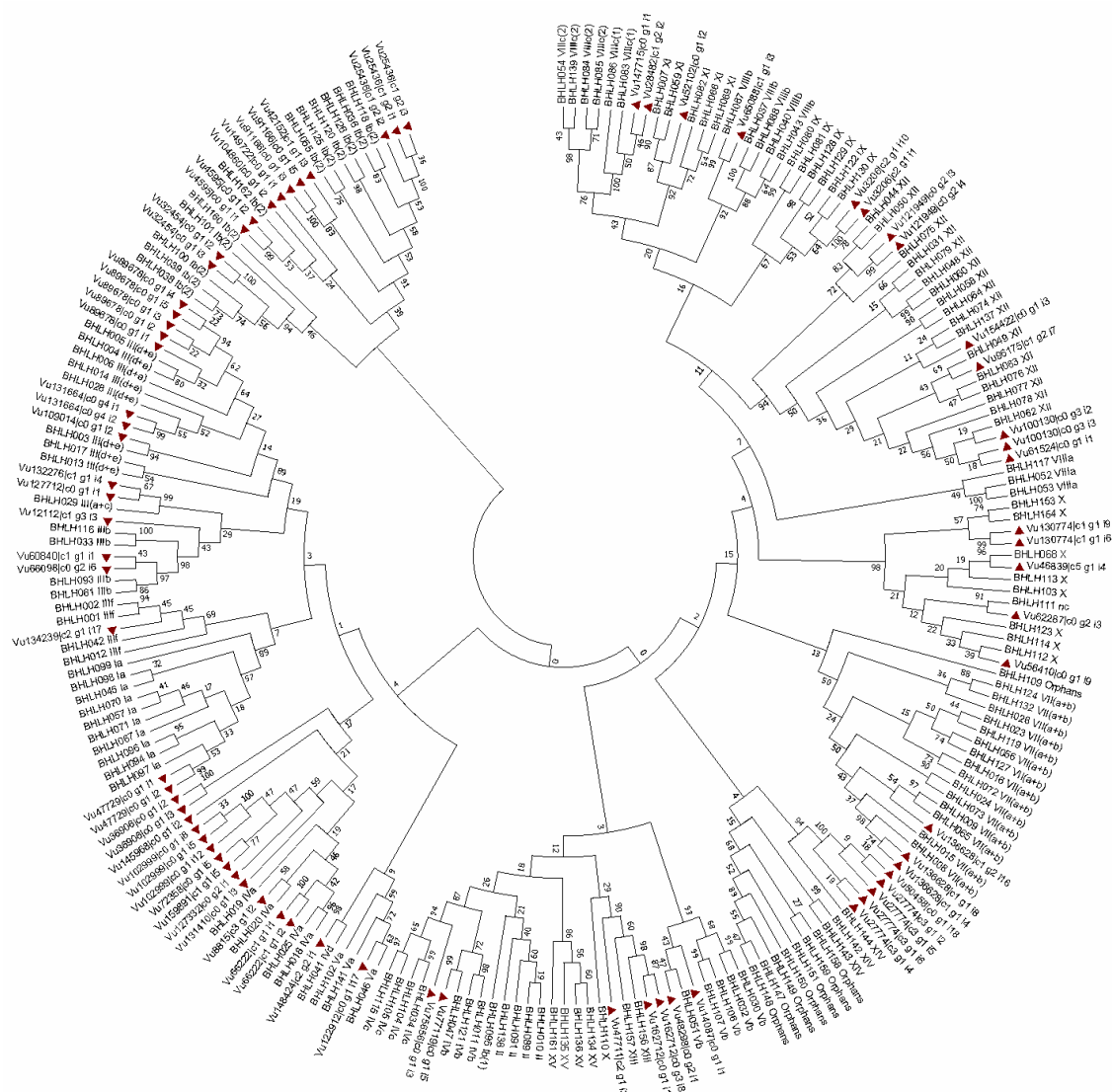


Figura Suplementar S7. Árvore fenética construída a partir das sequências de proteínas bHLH de *Arabidopsis thaliana* (AtbHLH) e de VubHLH identificados nas bibliotecas de RNA-Seq do CpGC, gerada pelo MEGAX via método *neighbor-joining* (*bootstrap* = 1000). Cada subfamília (Li et al., 2006; Pires e Dolan, 2010) é identificada por um algarismo romano, onde os membros VubHLHs identificados nas bibliotecas de RNA-Seq do CpGC estão indicados por triângulos.

Para acessar o Apêndice Suplementar S1 e Tabelas Suplementares S1 a S8 deste trabalho, acesse o link: <https://bityli.com/h7Whx>.

Apêndice Suplementar S1. Métricas das bibliotecas de RNA-Seq de feijão-caupi: injúria mecânica seguida de inoculação com o vírus CABMV, injúria mecânica seguida de inoculação com o vírus CPSMV e desidratação radicular.

Tabela Suplementar S1. Características específicas dos 175 genes *VubHLHs bona fide*, incluindo seus IDs, classificação, extensão em nucleotídeos, localização cromossômica, extensão da cadeia polipeptídica, bem como pontos isoelétricos (pI), peso molecular (MW) e localização subcelular.

Tabela Suplementar S2. Caracterização individual dos 175 *VubHLHs bona fide* pesquisados no genoma do feijão-caupi, indicando seus respectivos loci codificadores, bem como 12 parâmetros que definem sua estrutura gênica.

Tabela Suplementar S3. Classificação das *VubHLHs* de acordo com a região básica do domínio bHLH, conforme proposto por Massari e Murre (2000).

Tabela Suplementar S4. Mecanismos de duplicação envolvidos na expansão dos 175 loci que codificam *VubHLHs bona fide* no genoma do feijão-caupi.

Tabela Suplementar S5. Valores de Ka, Ks, e da razão Ka/Ks e número de íntrons para os nove pares de *VubHLHs bona fide* originados por duplicação em tandem.

Tabela Suplementar S6. Espécies com genoma depositado no banco de dados Phytozome, apresentando sua respectiva família vegetal e o número de loci ortólogos com os *VubHLHs bona fide* identificados no genoma do feijão-caupi

Tabela Suplementar S7. Elementos cis-reguladores candidatos *bona fide* (CCREs) ancorados nas regiões promotoras dos genes que codificam *VubHLHs*, com informações sobre seu motivo de consenso e fatores de transcrição associados (Matriz JASPAR ID).

Tabela Suplementar S8. Regulação transcricional dos *VubHLHs* diferencialmente expressos identificados em pelo menos uma das bibliotecas de RNA-Seq do CpGC.

APÊNDICE D – THE COWPEA KINOME: GENOMIC AND TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS UNDER BIOTIC AND ABIOTIC STRESSES ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA FRONTIERS

The Cowpea Kinome: Genomic and Transcriptomic Analysis under Biotic and Abiotic Stresses

1 José Ribamar Costa Ferreira-Neto¹, Artemisa Nazaré da Costa Borges², Manassés Daniel da
2 Silva¹, David Anderson de Lima Moraes³, João Pacifico Bezerra-Neto², Guillaume Bourque⁴,
3 Ederson Akio Kido¹, Ana Maria Benko-Iseppon^{2*}

4 ¹ Laboratory of Molecular Genetics, Genetics Department, Federal University of Pernambuco,
5 Recife, Brazil.

6 ² Laboratory of Plant Genetics and Biotechnology, Genetics Department, Federal University of
7 Pernambuco, Recife, Brazil.

8 ³ Centre de Calcul Scientifique, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Canada

9 ⁴ McGill University and Genome Québec Innovation Center, Montréal, Canada

10 * **Correspondence:**

11 Corresponding Author

12 ana.iseppon@gmail.com

13 **Keywords:** kinase, virus, root dehydration, plants, mechanical injury

14 Abstract

15 The present work represents a pioneer effort, being the first to analyze genomic and transcriptomic
16 data from *Vigna unguiculata* (cowpea) kinases. We evaluated the cowpea kinome considering its
17 genome-wide distribution and structural characteristics (at gene and protein levels), form of sequence
18 evolution, conservation among Viridiplantae species, and gene expression in three cowpea genotypes
19 under different stress situations, including biotic (injury followed by virus inoculation – CABMV or
20 CPSMV) and abiotic (root dehydration). Structural features of cowpea kinases (VuPKs) indicated that
21 1293 *bona fide* VuPKs cover 20 groups and 119 different families. The RLK-Pelle was the largest
22 group, with 908 members. Insights on the mechanisms of VuPKs genomic expansion and conservation
23 among Viridiplantae species indicated dispersed and tandem duplications as major forces for VuPKs
24 distribution pattern and high orthology indexes and synteny with other legume species, respectively.
25 Ka/Ks ratios showed that almost all (91%) of the tandem duplication events were under purifying
26 selection. Candidate cis-regulatory elements (CCREs) were associated with different transcription
27 factors (TFs) in promoters regions of the RLK-Pelle group VuPKs. C2H2 TFs were closely associated
28 with the promoting regions of almost all scrutinized families for the RLK-Pelle group. At the
29 transcriptional level, it was suggested that VuPKs up-regulation was stress-, genotype-, or tissue-
30 dependent (or a combination of them). The most prominent families in responding (up-regulation) to
31 the all analyzed stresses were RLK-Pelle_DLSV and CAMK_CAMKL-CHK1. In relation to root
32 dehydration, it was suggested that the up-regulated VuPKs are associated with ABA hormone
33 signaling, auxin hormone transport and potassium ion metabolism. Additionally, up-regulated VuPKs
34 under root dehydration potentially assist in an important physiological strategy of the studied cowpea
35 genotype in this assay, with activation of defense mechanisms against biotic stress, while responding
36 to root dehydration. This study provides the foundation for further studies on the evolution and
37 molecular function of VuPKs.

**APÊNDICE E - VIROSES EM FEIJÃO-CAUPI: FONTES DE RESISTÊNCIA,
MARCADORES MOLECULARES, ÔMICAS E BIOTECNOLOGIA - CAPÍTULO DE
LIVRO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**

8

CAPÍTULO 8

VIROSES EM FEIJÃO-CAUPI: FONTES DE RESISTÊNCIA, MARCADORES MOLECULARES, ÔMICAS E BIOTECNOLOGIA

Lidiane L. Barbosa Amorim

Alessandro Nicoli

José Ribamar Costa Ferreira-Neto

José Diogo Cavalcanti Ferreira

Artemisa Nazare Costa Borges

Carolline de Jesús-Pires

Flávia Czekalski de Araújo

Mitalle Karen da Silva Mattos

Wilson Dias de Oliveira

Antonio Félix da Costa

Ana M. Benko-Iseppon

Resumo

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp., subsp. *unguiculata*] compreende a principal fonte de proteína vegetal de várias regiões tropicais de clima semiárido, incluindo o Nordeste brasileiro. Representa fonte proteica de considerável importância para a nutrição humana em regiões semiáridas e tropicais do planeta. Vários fatores afetam a produtividade do feijão-caupi, incluindo a incidência de doenças infecciosas. Dentre essas, doenças causadas por vírus têm sido responsáveis por prejuízos e perdas significativas na produção agrícola. No Brasil, as doenças virais figuram entre os problemas sanitários mais importantes do feijão-caupi, com ênfase para a região Nordeste. O presente capítulo aborda e revisa diferentes aspectos das pesquisas envolvendo viroses e feijão-caupi, com ênfase para as principais viroses identificadas, recursos genéticos testados e fontes de resistência identificadas. A aplicação de marcadores moleculares em associação com viroses merece destaque, especialmente no tópico mapeamento genético. Finalmente, o estado da arte envolvendo ciências ômicas e biotecnologia é reportado, bem como os cenários futuros envolvendo tais abordagens.

Palavras-chave: Cowpea severe mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus, Potyviridae, Bromoviridae, Herança, Biotecnologia.

1. Introdução

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), também conhecido como feijão-macassar, feijão-de-corda, feijão-da-colônia, feijão-da-praia, feijão-miúdo e feijão-fra-

APÊNDICE F – CURRÍCULO VITAE (LATTES) ARTEMISA NAZARÉ COSTA BORGES

Formação acadêmica/titulação

- 2016 -** Doutorado em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Múltiplos estresses em feijão-caupi: análise da resposta transcrricional a injúria, viroses ou desidratação radicular
Orientador: Ana Maria Benko Iseppon
Coorientador: Jose Ribamar Costa Ferreira Neto
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Projeto Biologia Computacional
- 2013 - 2015** Mestrado em Genética e Melhoramento.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
Título: Caracterização genética em germoplasma de cajuí (*Anacardium spp.*) por meio de marcadores morfoagronômicos e moleculares ISSR, Ano de obtenção: 2015
Orientador: PAULO SARMANHO DA COSTA LIMA
Coorientador: ANGELA CELIS DE ALMEIDA LOPES
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2008 - 2011** Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas.
Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Brasil
Título: "Genética em Cruzadinhas": uma proposta pedagógica para o ensino de genética
Orientador: Dr. Adalberto Socorro Da Silva

Formação complementar

- 2019 - 2019** Curso de curta duração em I Workshop em Biossegurança de Transgênicos. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Data Science with Python I. (Carga horária: 45h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2018 - 2018** Curso de curta duração em Python for Biologists. (Carga horária: 75h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Banco de dados biológicos e Conceitos básicos de Linux. (Carga horária: 8h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em II CURSO DE BIOINFORMÁTICA: ANÁLISE DE DADOS NGS. (Carga horária: 90h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2017 - 2017** Extensão universitária em Bioestatística: um enfoque prático. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2016 - 2016** Extensão universitária em Visualization of Biological Data. (Carga horária: 45h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

2016 - 2016	Extensão universitária em Computational biology for the analysis of biological networks. (Carga horária: 45h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2016 - 2016	Extensão universitária em Introduction to High Performance Computing in Bioinformatics Analysis.. (Carga horária: 60h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2016 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Doutoranda, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva
Outras informações: Doutoranda do Laboratório de Genética Vegetal e Biotecnologia, vinculada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, desenvolvendo o projeto intitulado "Estresses em feijão-caupi: análise da resposta transcricional a injúria, viroses ou desidratação radicular". Órgão de fomento: CAPES

Atividades

06/2017 - 12/2017 Graduação, Ciências Biológicas
Disciplinas ministradas: Genética Mendeliana durante o Estágio Voluntário a Docência (30h). Supervisão Dra. Neide Santos

2. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão – IFMA

Vínculo institucional

2020 - Atual Vínculo: Servidor Público, Enquadramento funcional: Professora – EBTT / BIOLOGIA, Carga horária: 40, Regime: Dedicção exclusiva. Campus Buriticupu.

Atividades

06/2020 – 01/2021 Graduação, Ciências Biológicas
Disciplinas ministradas: Fundamentos de Genética; Evolução

01/2021 – 02/2021 Atividade Administrativa
Coordenadora do Curso de Licenciatura em Biologia.

Projetos

Projetos de pesquisa

2016 – Atual Rede InterSys: Biologia Sistêmica no Estudo de Função Gênica em Interações Bióticas
 Descrição: O projeto envolve nove instituições e 17 subprojetos. Pretende estabelecer a rede INTERSYS, voltada para a formação de pessoal e geração de conhecimento científico de alto nível envolvendo interações bióticas a partir de abordagens multidisciplinares de biologia sistêmica (ômicas, biologia celular e bioinformática) através da integração de grupos nacionais e internacionais experientes.
 Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Projetos de extensão

2019 – Atual Adote um Gene
 Descrição: Atividade envolvendo discussões, aulas teóricas de bioinformática e biologia molecular no Colégio de Aplicação (CAP) da UFPE.
 Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

2017 – 2018 Adote um Gene
 Descrição: O referido projeto de extensão envolve aulas teóricas e práticas de Bioinformática com alunos do Ensino Médio do Colégio Militar do Recife (CMR)
 Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

2017 – 2017 I Curso de Inverno em Bioinformática da UFPE
 Descrição: Realização de atividades teóricas e práticas de bioinformática - 120 horas de atividades.
 Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Revisor de periódico

1. Revista Caatinga

Vínculo

2020 - Atual

Prêmios e títulos

2018 Menção honrosa com o trabalho intitulado “ORQUESTRAÇÃO TRANSCRICIONAL EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*) SOB INFECÇÃO POR CPSMV”, XXII Encontro de Genética do Nordeste

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BEZERRA, K.N.C; CORDEIRO, R.S.S, SOUSA, E.S; **BORGES, A.N.C**; CAJAIBA, CAJAÍBA, R.L.; MARTINS, J.S.C. Qual a compreensão dos discentes de Ensino Médio sobre o processo evolutivo? Uma análise realizada em uma escola pública da rede federal. RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT, v.9, p.e5579109025, 2020.

2. **BORGES, A.N.C.**; LOPES, A. C. A.; BRITTO, F.B.; VASCONCELOS, L. F. L.; LIMA, P.S.C.

Genetic diversity in a cajuí (*Anacardium* spp.) germplasm bank as determined by ISSR markers. GENETICS AND MOLECULAR RESEARCH., v.17, p.1 - 14, 2018.

Capítulos de livros publicados

1. BEZERRA NETO, J. P.; ARAUJO, F. T.; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; SILVA, R. L. O.; **BORGES, A.N.C.**; MATOS, M. K. S.; SILVA, J. B.; SILVA, M. D.; KIDO, E. A.; BENKO-ISEPPON, A. M. NBS-LRR genes—Plant health sentinels: Structure, roles, evolution and biotechnological applications In: **Applied Plant Biotechnology for Improving Resistance to Biotic Stress**. Vol. 1, 2020, p. 63-120.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. SILVA, R. G. P.; PIRES, C. J.; **BORGES, A.N.C.**; ARAUJO, F. T.; MATOS, M. K. S.; BEZERRA NETO, J. P.; BENKO-ISEPPON, A. M.; ABURJAILE, F. F. IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS PEROXIDASES NO TRANSCRIPTOMA DE VITIS SPP. In: **III SIMPÓSIO NORTE E NORDESTE DE BIOINFORMÁTICA**, 2018, Recife. 2018. p.137

2. **BORGES, A.N.C** FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON. IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DA SUPERFAMÍLIA CITOCROMO P450S NO GENOMA DE FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*). In: **III SIMPÓSIO NORTE E NORDESTE DE BIOINFORMÁTICA**, 2018, Recife. 2018. p.39

3. BEZERRA NETO, J. P.; **BORGES, A. N. C.**; PIRES, C. J.; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON, A. M. ABUNDÂNCIA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA FAMÍLIA AREB/ABF EM FEIJÃO-CAUPI SOB DESIDRATAÇÃO RADICULAR In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.**, 2016.

4. PIERECK, B.; PIRES, C. J.; ARAUJO, F. T.; **BORGES, A. N. C.**; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON, A. M. ANÁLISE DE SINTENIA DA FAMÍLIA GÊNICA PR - 10 DE VIGNA UNGUICULATA NOS GENOMAS DE VIGNA RADIATA E PHASEOLUS VULGARIS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.**, 2016.

5. FERREIRA NETO, JOSÉ RC; PIRES, C. J.; **BORGES, A. N. C.**; LUZ, G. A.; GOMES, M. F. C.; BENKO-ISEPPON, A. M.; KIDO, E. A. ANÁLISE DE TRANSCRITOS HIPERMODULADOS EM SEMENTES DE ACESSOS CONTRASTANTES DE MILHO SUBMETIDAS À INFECÇÃO POR FUSARIUM VERTICILLIOIDES. In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.**, 2016.

6. **BORGES, A. N. C.**; MARTINS, L. V.; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON, A. M. CARACTERIZAÇÃO IN SILICO DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO DA SUBFAMÍLIA HD - ZIP CLASSE I EM TRANSCRIPTOMA DE FEIJÃO - CAUPI SUBMETIDO À DESIDRATAÇÃO RADICULAR In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.**, 2016.

7. PIERECK, B.; BENKO-ISEPPON, A. M.; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; **BORGES, A. N. C.**; PIRES, C. J.; ARAUJO, F. T.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C. HD-zip classification in Vigna unguiculata and comparative synteny with Phaseolus vulgaris In: X-Meeting 2016 - 12th International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C), 2016, Belo Horizonte. **X-Meeting 2016 - 12th International Conference of the Brazilian Association of Bioinformatics and Computational Biology (AB3C).**, 2016.

8. FERREIRA NETO, JOSÉ RC; SILVA, M. D.; PIRES, C. J.; **BORGES, A. N. C.**; VIANA, J. B. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; KIDO, E. A. IMPORTÂNCIA DA REANÁLISE DE DADOS DISPONÍVEIS DE TRANSCRITÔMICA: EXEMPLO DE SOJA (*Glycine max*) SOB ESTRESSES ABIÓTICOS In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016, Recife. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.**, 2016.

9. **BORGES, A. N. C.**; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON, A. M. SOJA VS MAMPS (MICROBE ASSOCIATED MOLECULAR PATTERNS): TRANSCRITÔMICA DE QUINASES EM BANCO DE DADOS DE VALOR AGREGADO In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016,

Recife. **XXI Encontro de Genética do Nordeste.**, 2016.

Apresentação de trabalho e palestra

BORGES, A.N.C.; BEZERRA NETO, J. P.; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON, A. M. Orquestração transcricional em feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) sob infecção por CpSMV. XXII Encontro de Genética do Nordeste 2018. (Apresentação de Trabalho modalidade pôster)

1. **BORGES, A. N. C. Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants**, 2017. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
2. **BORGES, A. N. C. A seca em Leguminosas: Análise comparativa da resposta transcricional interespecífica por meio de assinaturas de indução**, 2016. (Seminário, Apresentação de Trabalho)
3. **BORGES, A. N. C.; MARTINS, L. V.; FERREIRA NETO, JOSÉ RC; BENKO-ISEPPON, A. M. Caracterização in silico de fatores de transcrição da subfamília HD-Zip Classe I em transcriptoma de feijão-caupi submetido à desidratação radicular**, 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **BORGES, A.N.C. Identificação e Genotipagem de Marcadores Microssatélites**, 2019. (Aperfeiçoamento, Curso de curta duração ministrado)
2. **BORGES, A. N. C.; SANTOS, R. F.; ABURJAILE, F. F.; BENKO-ISEPPON, A. M. Extração de DNA e eletroforese caseira da banana**, 2017. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)
3. **BORGES, A. N. C. Adote um Gene – viajando nos genomas com a bioinformática**, 2016. (Outro, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas - Iniciação científica júnior

1. Matheus Barney Mara Galindo. **Análise e caracterização genômica de *Vitis* ssp.** 2019. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
2. Raphael Gomes Paiva Silva. **Identificação e caracterização da família PR-9 em *Vitis* spp.** 2018. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco

Eventos - Participação em eventos

1. Apresentação (Outras Formas) no(a) **EXPO UFPE 2017**, 2017. (Exposição) - Projeto Adote um Gene (Monitora).
2. **Feira de Ciências do Colégio Militar do Recife**, 2017. (Feira) - Extração de DNA e eletroforese caseira.
3. **I Curso de Inverno em Bioinformática da UFPE**, 2017. (Outra) - Curso de Inverno em Bioinformática (Monitora).
4. Moderador no(a) **VIII CICLO DE SEMINÁRIOS GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL**, 2017.

(Seminário)- Identificação de genes diferencialmente expressos e associados à resistência ao mosaico severo em feijão-caupi.

5. Moderador no(a) **VIII CICLO DE SEMINÁRIOS GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL**, 2017. (Seminário) Seleção in silico e validação da expressão diferencial de genes de defesa em uva (*Vitis vinifera* L.) sob condições de estresse biótico.

6. **VIII CICLO DE SEMINÁRIOS GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA VEGETAL**, 2016. (Seminário)

7. **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)
Caracterização in silico de fatores de transcrição da subfamília HD-Zip Classe I em transcriptoma de feijão-caupi submetido à desidratação radicular.

8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)
Soja vs MAMPs (Microbe Associated Molecular Patterns): transcriptômica de quinases em banco de dados de valor agregado.

Organização de evento

1. **BORGES, A.N.C.** III Simpósio Norte e Nordeste de Bioinformática, 2018. (Outro, Organização de evento)

2. **BENKO-ISEPPON, A. M.; BORGES, A. N. C.** XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016. (Congresso, Organização de evento)

Bancas - Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **BORGES, A.N.C.** Participação em banca de Kaydys Natiely Conceição Bezerra. **QUAL A COMPREENSÃO DOS DISCENTES DE ENSINO MÉDIO SOBRE O PROCESSO EVOLUTIVO? UMA ANÁLISE REALIZADA EM UMA ESCOLA PÚBLICA DA REDE FEDERAL**, 2020 (Ciências Biológicas) Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão, Campus Buriticupu.

2. **BORGES, A.N.C.** Participação em banca de Wilson Dias de Oliveira. **DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES TIPO MICROSSATÉLITES A PARTIR DO TRANSCRIPTOMA DE *Vigna unguiculata* (L.) Walp**, 2019 (Ciências Biológicas) Universidade Federal Rural de Pernambuco

3. **BORGES, A.N.C.** Participação em banca de Raquel Silva Gonçalves. **Identificação De Genes Responsivos Ao Déficit Hídrico Em *Stylosanthes Scabra* Vogel**, 2019 (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

4. **BORGES, A.N.C.** Participação em banca de Ricardo José de Andrade Lima Filho. **Seleção de marcas polimórficas e teste molecular de reprodução clonal em *Encholirium magalhaesii*, Bromeliaceae**, 2018 (Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco