



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

Joelson Germano Crispim

**EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DE GENES *VuWRKY* DO FEIJÃO-CAUPI EM
Arabidopsis SOB ESTRESSES ABIÓTICOS**

Recife
2022

Joelson Germano Crispim

**EFEITOS DA SUPEREXPRESSION DE GENES *VuWRKY* DO FEIJÃO-CAUPI EM
Arabidopsis SOB ESTRESSES ABIÓTICOS**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas da Universidade Federal
de Pernambuco, como requisito
parcial para obtenção do título de
doutor em Ciências Biológicas

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Dr.^a Ana Christina Brasileiro-Vidal

Coorientadoras: Dr.^a Ana Maria Benko-Iseppon

Dr.^a Valesca Padolfi

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Crispim, Joelson Germano

Efeitos da superexpressão de genes *VuWRKY* do Feijão-Caupi em *Arabidopsis* sob estresses abióticos / Joelson Germano Crispim– 2022.

105 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Ana Christina Brasileiro Vidal

Coorientadoras: Ana Maria Benko-Iseppon e Valesca Pandolfi

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

Inclui referências.

1. Expressão gênica 2. Feijão-caupi 3. Salinidade I. Vidal, Ana Christina Brasileiro (orient.) II. Benko-Iseppon, Ana Maria (coorient.) III. Pandolfi, Valesca (coorient.) IV. Título

572.865

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022 -303

Joelson Germano Crispim

**EFEITOS DA SUPEREXPRESSION DE GENES *VuWRKY* DO FEIJÃO-CAUPI EM
Arabidopsis SOB ESTRESSES ABIÓTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre/doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/05/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Christina Brasileiro-Vidal (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. João Pacifico Bezerra Neto (Examinador Externo)

Universidade Estadual de Pernambuco

Prof. Dr. Marcus Vinicius Loss Sperandio (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Mitalle Karen da Silva Matos (Examinadora Externa)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Nataniel Franklin de Melo (Examinador Externo)

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

As minhas Marias,
Maria Aparecida Crispim e Maria Crispim dos Santos (*in memoriam*).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus meu criador, por se fazer presente em minha vida até mesmo nos momentos que não o merecia. Em todos os momentos que as dificuldades trouxeram a vontade de desistir, Ele me deu forças para continuar.

À minha avó, Maria Crispim dos Santos (*in memoriam*), o maior presente que Deus poderia me dar ele já me deu, foi a honra de ter vivido parte de minha vida junto a ela. Embora não tenha tido oportunidade de ser alfabetizada, sempre acreditou que eu fosse capaz de conquistar meus objetivos, por meio da educação, e mesmo na sua batalha contra a leucemia, ela se mostrava forte e disposta a me incentivar, sorria e dizia “vá estudar meu filho”. A cada conquista lembrarei dos seus esforços e sua contribuição em minha vida.

À minha mãe Maria Aparecida Crispim (*in memoriam*), por todo amor, dedicação, confiança e paciência. Mesmo com todas as dificuldades que já enfrentamos não poderia ter uma mãe melhor, a senhora me ensinou a ser cada dia mais forte e perseverante. Nunca passou por minha cabeça que esse agradecido seria *in memoriam*, dois anos depois, ainda pego meu celular para ligar para ela e saber “como estão as coisas aí”. Infelizmente ela não poderá ler esses agradecimentos, mas se você ainda tiver como ligar para sua mãe faça isso, sempre que possível.

À minha Irmã Alice, que apesar das dificuldades, foi muito importante para que pudesse me ausentar durante estes anos de estudo. Espero muito um dia ler os agradecimentos na tese de doutorado de Lara, minha sobrinha e amor de minha vida.

À minha tia Raquel e minha prima Gildeane por todo o amor e incentivo. Obrigado por todo empenho na minha criação e pelo apoio que me deram nesta caminhada, vocês sempre terão um lugar especial em minha vida.

À minha orientadora Ana Christina B. Vidal, por toda confiança, incentivo, paciência e presença constante em todos os aspectos. Apesar dos leves surtos de reclamações, reconheço todo o crescimento acadêmico que tive durante nossa jornada, desde o mestrado.

Às minhas coorientadoras Ana M. Benko-Iseppon e Valesca Pandolfi, muito obrigado por todas contribuições, elas foram fundamentais. Mesmo com tantos compromissos sempre estiveram presentes nos momentos em que precisei de ajuda e esclarecimentos. Eu não tenho como expressar o quanto Vale faz parte desse

trabalho, e da minha vida, em resumo, sem o seu incentivo e acolhimento contínuo essa tese não existiria.

Ao Elenilson minha dupla de trabalho e amigo, serei eternamente grato por todo companheirismo. Que todos tenham o privilégio de poder trabalhar e conviver com alguém como você. Sem sua grande ajuda tudo seria mais difícil.

Aos meus amigos Railson Rafael, Bruna Rafaele, Sammara, Elton, Gilberto (Dr. Teles), Uanderson, Will, Zé neto, Bruna Brito, Lucas, Jéssica, Fidelis, Naysa e Priscila o meu mais sincero obrigado. Alguns desses nem sabem qual o tema da minha tese, mas me fazem ser humano e me conhecer a cada dia.

Ao anjo e irmã que escolhi ter Vanessa Emanuelle, minha dupla que veio no mestrado e levo para a vida, muito obrigado por todo incentivo e ajuda. Por sempre estar disposta a fazer qualquer coisa para eu não desistir de algo importante para mim.

Ao programa de Pós-Graduação Ciências Biológicas, pela oportunidade.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco pelo financiamento do projeto e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela concessão da bolsa e suporte financeiro.

Aos colegas e amigos que fiz no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal da UFPE, em especial, Silvany (*in memoriam*) Will, Flávia, Fernanda, Lívia Martins, Artemísia, Jéssica Barbara e Marina.

À equipe toda a Laboratório de Fisiologia e Cultivo in vitro de Plantas, da UFRPE, em especial, a professora Cláudia, Well (o melhor técnico de Laboratório que já conheci em toda minha jornada acadêmica), Marciana e Lari, foi uma satisfação trabalhar com vocês, obrigado por toda ajuda e companheirismo

Aos pesquisadores do Departamento de Biologia, Universidade da Virginia, Charlottesville Michel Timko e Hai Liu, por toda ajuda estrutural e intelectual na execução deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho caracterizou os efeitos da superexpressão de dois genes WRKY de *Vigna unguiculata*, *VuWRKY21* e *VuWRKY87*, sob condições de estresse salino em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, e os efeitos da superexpressão do gene *VuWRKY21* em *Arabidopsis* após déficit hídrico (DH). Após estresse salino, as linhagens *VuWRKY21-OE* ou *VuWRKY87-OE* apresentaram modulação positiva por qPCR de seis genes envolvidos nas vias de sinalização, *AtP5CS1*, *AtNHX1* e *AtSOS1*, e resposta *AtRD29A*, *AtSOS3*, *AtSOS2* ao estresse em *Arabidopsis*. Adicionalmente, as linhagens transgênicas apresentaram menor conteúdo de H₂O₂ e maiores conteúdos de SOD e CAT nos tempos iniciais do estresse. Plantas *VuWRKY21-OE* e plantas selvagens (WT), foram submetidas ao estresse por DH, considerando-se três grupos: i) controle, ii) reidratado, ii) tratado. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e bioquímicos. As plantas transformadas apresentaram maiores médias de número de folhas, diâmetro da roseta e peso da roseta, assim como maior atividade de CAT (60 % e 120%, nos grupos DH e reidratado, respectivamente) e da SOD (70%, após reidratação) em relação às plantas WT. Plantas transformadas também mostraram um conteúdo de proteínas totais duas vezes maior na condição DH. Por outro lado, os conteúdos de H₂O₂ foram 20% superiores nas plantas WT em ambas as condições. Esses resultados sugerem que a superexpressão de ambos os genes *VuWRKY* em *Arabidopsis* ativou a expressão de genes envolvidos em mecanismos de tolerância à salinidade. Além disso, os resultados demonstraram uma melhoria nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos de *Arabidopsis* superexpressando o gene *VuWRKY21*, constatando a importância desse gene nos mecanismos de tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Expressão gênica; Deficiência hídrica; Salinidade; Transgenia.

ABSTRACT

The present work characterized the effects of two WRKY genes from *Vigna unguiculata*, *VuWRKY21* and *VuWRKY87*, under salt stress conditions in transgenic *Arabidopsis* plants, and the effects of overexpression of the *VuWRKY21* gene in *Arabidopsis* after water deficit (WD). After salt stress treatments, *Arabidopsis VuWRKY21-OE* or *VuWRKY87-OE* lines exhibited positive modulation by qPCR of six genes were studied by qPCR in signaling pathways in *Arabidopsis* stress response, including *AtP5CS1*, *AtNHX1*, *AtRD29A*, *AtSOS3*, *AtSOS2* and *AtSOS1*. Additionally, the transgenic lines had lower H₂O₂ content and higher levels of SOD and CAT in the initial stress times. *VuWRKY21-OE* and wild-type plants (WT) were subjected to WD stress, considering three groups: i) control, ii) rehydrated, ii) treated. Physiological and biochemical parameters were evaluated. Transformed plants showed higher averages of NF, DR and PR, as well as higher CAT (60%) and SOD (70%) activities compared to WT plants. Transformed plants showed two times mores protein total content in the WD condition. On the other hand, H₂O₂ contents were 20% higher in WT plants in both conditions. These results suggest that the overexpression of both *VuWRKY* genes in *Arabidopsis* activated the expression of genes involved in salt tolerance mechanisms. In addition, the results showed an improvement in the physiological and biochemical parameters of *Arabidopsis* overexpressing the *VuWRKY21* gene, confirming the importance of this gene also for water deficit tolerance mechanisms.

Keywords: Gene expression; Water deficiency; Salinity; Transgenic.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 - Principais motivos de ligação dos fatores de transcrição ao DNA. (A). HOMEODOMÍNIO; (B) Motivo dedo de Zinco e (C) Zíper de leucina formado por duas alfa-hélices Fonte: adaptado de Alberts e Lewis (2010).....30

Figura 2 - diferentes estádios do ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*, acesso columbia (COL). (A) estádios da germinação até formação de plântulas (11 dias), crescimento vegetativo (39 dias) e estágio reprodutivo (45 dias); (B) imagem da flor; (c) do grão de pólen e (D) fruto maduro. Fonte: Krämer (2015).....33

Artigo 1

Figura 1 - Efeito do estresse salino no conteúdo de MDA (A), H₂O₂ (B), SOD (C), CAT (D) e proteínas totais (E), em linhagens de *Arabidopsis Thaliana* superexpressando os genes *VuWRKY21* (azul) E *VuWRKY87* (vermelho) (L1, L2, L3) e na linhagem selvagem (WT), sob condições de salinidade nos tempos de 1, 2, 4, e 8 h. letras minúsculas iguais não mostram diferença estatística entre as linhagens, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, enquanto as mesmas letras maiúsculas não mostram diferença estatística entre os tempos observados.....45

Figura 2- Sumário da resposta bioquímica para a média das plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas e WT, sob os tempos de imposição do estresse salino avaliados. A direção da seta indica a tendência do resultado para cada variável, seta para cima maior e para baixo menor.....47

Figura 3 - expressão diferencial dos genes *vuvrky21* e *vuvrky87* e seis genes alvo em linhagens de *Arabidopsis thaliana* (L1, L2, L3) e na linhagem selvagem (WT), após estresse salino (200 mM DE NaCl), nos tempos de 1, 2, 4 e 8 H. genes identificados na cor azul foram avaliados sob a expressão do gene *VuWRKY21-oe*, genes identificados na cor vermelha foram avaliados sob a expressão do gene *VUWRKY287*
*Upregulated, em relação ao grupo controle *downregulated, em relação ao grupo controle.....48

Artigo 2

Figura 1 -desenvolvimento de plântulas de linhagens de *arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT), germinadas sob diferentes concentrações de manitol (0, 100, 200, 300 E 500 mM), após 15 dias de cultivo.....71

Figura 2 - Conteúdo de mda (A), H_2O^2 (B), SOD (C), CAT (D) e proteínas totais (E), em linhagens de *arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e na linhagem selvagem (WT), sob condições controle, de déficit hídrico e reidratada.....74

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Tabela 1 - Índice de germinação de linhagens de *Arabidopsis* superexpressando os genes *VuWRKY21* and *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob diferentes concentrações de NaCl: 0 mM, 100 mM E 200 mM.....43

Tabela 2 - valores médios para o comprimento da parte raiz de linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob diferentes concentrações de NaCl: 0, 100 E 200 mM.....43

Artigo 2

Tabela 1 - taxa de germinação de linhagens de *Arabidopsis* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob diferentes concentrações de manitol (0, 100, 200, 300 E 500 mM).....70

Tabela 2 - valores médios para o número de folhas, diâmetro da roseta, peso da roseta, conteúdo de massa seca, peso e comprimento da raiz e linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob três diferentes condições: controle (CONT.) tratado (TRAT.) e reidratado (REID.).....75

LISTA DE SIGLAS

- ABA** - Ácido abscísico
- ABRE** - Elemento responsivo ao ABA
- AFLP** - Amplified fragment length polymorphism
- APX** - Ascorbato peroxidase
- CAT** - Catalase
- CDNA** - DNA complementar
- CE** - Condutividade elétrica
- CEES** - Condutividade elétrica do extrato de saturação
- CNPAF** - Centro nacional de pesquisa de arroz e feijão
- CONAB** - Companhia nacional do abastecimento
- EROS** - Espécies reativas de oxigênio
- FBN** - Fixação biológica de nitrogênio
- FC** - Fold change
- FT** - Fator de transcrição
- GA** - Ácido giberélico
- GRF** - Fator regulatório g-box/ fator geral de regulação
- MDA** - Malondialdeído
- NGS** - Sequenciamento de nova geração
- PB** - pares de bases
- PEG** - Polietilenoglicol
- QPCR** - PCR quantitativa em tempo real
- RNAM** - RNA mensageiro
- ROS** - Espécies reativas de oxigênio
- RPM** - *Reads* por milhão
- RT** - Transcriptase reversa
- SOD** - Superóxido dismutase
- SOS** - *Salt overly sensitive* – sensível ao excesso de sal

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	17
2.1	GERAL	17
2.2	ESPECÍFICOS	17
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1.	FEIJÃO-CAUPI: ORIGEM, ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA	18
3.2	ASPECTOS GENÉTICOS GENÔMICOS E DE TRANSCRIPTOMA DO FEIJÃO-CAUPI.....	19
3.3	ESTRESSES ABIÓTICOS	21
3.4.	Estresse salino nas plantas.....	22
3.4.1	Estresse por déficit hídrico nas plantas	24
3.4.2	Mecanismos de resposta a estresses de déficit Hídrico e salinidade	24
3.5	FATORES DE TRANSCRIÇÃO	29
3.5.1	Família WRKY.....	31
3.6	MODELO VEGETAL PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA - ARABIDOPSIS THALIANA	32
3.6.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> na análise da expressão de genes WRKY.....	34
4	ARTIGO 1 - EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DOS GENES <i>VuWRKY21</i> E <i>VuWRKY87</i> DO FEIJÃO-CAUPI EM <i>Arabidopsis thaliana</i> SOB ESTRESSE SALINO	35
5	ARTIGO 2 - EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DO GENE <i>VuWRKY21</i> DO FEIJÃO-CAUPI EM <i>Arabidopsis thaliana</i> SOB DÉFICIT HÍDRICO	62
6	CONCLUSÕES.....	87
7	SÚMULA CURRICULAR.....	88
	REFERÊNCIAS	91
	APÊNDICE A	99

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma das leguminosas mais cultivadas e consumidas no mundo, como grãos imaturos (feijão-verde), farinha para acarajé e principalmente na forma de grãos secos (SILVA *et al.*, 2018; FERREIRA *et al.*, 2017). É uma cultura de grande interesse para o Norte e Nordeste do Brasil, por sua importância socioeconômica. Em 2018, foram colhidas cerca de 740 mil toneladas de uma área de 1,5 milhão de hectares, com uma produtividade de 497 kg/ha. Na safra 2019/2020, o Brasil ocupou o terceiro lugar na produção mundial com cerca de 848,3 mil toneladas (CONAB, 2021), produção essa, associada a uma grande geração de empregos e renda. A maior produção concentra-se na Região Nordeste, com cerca de 84% da área plantada e 66% da produção nacional (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019).

Algumas cultivares do feijão-caupi são capazes de sobreviver em ambientes quentes, secos e salinos, podendo auxiliar na recuperação de áreas degradadas, sendo excelentes candidatas para uso em biorremediação, com capacidade de fertilizar solos pobres, mesmo sob condições desfavoráveis (DIOUF *et al.*, 2011; GUZZETTI *et al.*, 2020). Apesar de suas características favoráveis, essa leguminosa ainda não produz de acordo com o seu potencial genético sob condições de estresses, como salinidade e déficit hídrico, as quais podem desencadear alterações nas propriedades das membranas, aumento da respiração, inibição da fotossíntese e diminuição da produção de matéria seca, uma vez que causa senescência prematura (MEIRA *et al.*, 2017; MERWAD *et al.*, 2018).

Estresses abióticos podem representar perdas médias anuais de biomassa acima de 50%, limitando o crescimento e o desenvolvimento de diversas culturas de interesse econômico, até mesmo em espécies que possuem cultivares consideradas tolerantes, como *V. unguiculata* (FURTADO *et al.*, 2014; RAVELOMBOLA *et al.*, 2018b). De modo geral, fatores abióticos adversos apresentam grande impacto sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (CRAMER *et al.*, 2011). Desta forma, a busca pela compreensão de mecanismos de aclimação/adaptação para obtenção de plantas tolerantes a ambientes salinizados torna-se importante (AZEVEDO *et al.*, 2011; SREE *et al.*, 2015).

Com o advento de vários projetos de sequenciamento e de genômica funcional, os perfis de expressão gênica se tornaram importantes para a prospecção

de genes, em especial aqueles responsivos a estresses, como os envolvidos na regulação e transdução de sinais (ABDELRAHMAN *et al.*, 2018). Dentre esses genes, destacam-se os codificantes de: (1) osmoprotetores, como proteínas LEA e prolina; (2) enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione transferase (GST) e glutathione peroxidase (GPx); (3) proteínas envolvidas na captura e transporte seletivo de água e íons, como aquaporinas, trocadores de íons e transportadores, e (4) fatores de transcrição (*Transcription Factors*, TFs). Estes últimos são considerados peças fundamentais nos mecanismos de regulação da expressão gênica, tanto em procariotos quanto em eucariotos (JOSHI *et al.*, 2018), desempenhando papéis importantes nas etapas iniciais da regulação de outros grupos de genes e/ou vias metabólicas, e disparando a transdução de sinais em resposta ao estresse (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011; GASPAR, 2011).

A superexpressão desses TFs tem sido associada à maior tolerância a fatores ambientais, como seca, salinidade ou frio (Shinozaki e Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Sharoni *et al.*, 2011). Esta característica torna os TFs alvos interessantes para pesquisas em engenharia genética, a fim de alterar os mecanismos de defesa a nível molecular, visando desencadear alterações fisiológicas, bioquímicas e respostas agrônômicas da cultura à seca e salinização dos solos (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011).

Os membros da família WRKY desempenham papel fundamental na sinalização de vias de tolerância a estresses abióticos, incluindo as respostas dependentes ou não do ácido abscísico (ABA), que é um fitohormônio de grande importância para a regulação da resposta a condições desfavoráveis (DONG *et al.*, 2003). Adicionalmente, observa-se a interação de genes, *cross-talk*, regulados por diferentes rotas de transdução de sinais em resposta ao estresse. Como exemplos, citam-se os genes *RD29A* e *RD29B* (responsivos à desidratação), que são expressos em plantas submetidas ao estresse, os quais, codificam proteínas hidrofílicas de função desconhecida capazes de responderem de diferentes formas ao estresse abiótico, em especial nas Brassicaceae (MSANNE *et al.*, 2011; HOQUE *et al.*, 2012; ULLAH *et al.*, 2018).

O gene *AtP5CS1*, pertencente ao grupo de osmoprotetores, também está envolvido na tolerância ao estresse abiótico, desempenhando um papel importante na síntese de prolina. O aumento na expressão do gene *P5CS1* pode levar ao acúmulo

de osmólitos e conseqüentemente manter a capacidade osmótica, mantendo o teor de água nas plantas. *AtP5CS1* foi altamente induzido em plantas transgênicas de *Arabidopsis*, supreexpressando o gene da família WRKY *TaWRKY46*, do trigo, indicando uma possível regulação (LI *et al.*, 2020).

Os genes pertencentes a via SOS, por sua vez, estão entre os mais importantes na resposta à salinidade, uma vez que, após o aumento inicial de Na⁺ na raiz da planta, a diminuição do Na⁺ citosólico é, provavelmente, mediada pela ação da via sensível ao sal (SOS). O complexo SOS3/SOS2 ativa o suposto trocador Na⁺/H⁺ (NHX/SOS1), que remove o Na⁺ do citosol para o apoplasto do córtex, da raiz e da epiderme (BRADY *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2002). Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo analisar os efeitos fisiológicos, bioquímicos e a regulação de genes alvos em plantas de *A. thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* e *VuWRKY87*. E analisar os efeitos fisiológicos e bioquímicos da superexpressão do gene *VuWRKY21* de feijão-caupi em *A. thaliana* em resposta ao déficit hídrico., visando à utilização deste gene na obtenção de tolerância a estresse salino e de déficit hídrico em outras leguminosas.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Analisar os efeitos da superexpressão dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* do feijão-caupi em plantas de *Arabidopsis thaliana*, sob condições de estresse salino e déficit hídrico, visando à tolerância a estes estresses e seleção de um gene *VuWRKY* para a transformação do feijão-caupi e de outras leguminosas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil transcricional via qPCR dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* em *A. thaliana* após estresse salino, identificando e validando seus níveis de expressão e seu papel na regulação de genes alvo, envolvidos no processo de tolerância ao estresse salino.
- Investigar os efeitos da superexpressão dos genes supracitados nas plantas estressadas quanto às modificações relacionadas ao conteúdo de proteínas e atividade enzimática envolvidas nos mecanismos de tolerância a salinidade
- Analisar os efeitos bioquímicos e fisiológicos da superexpressão dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* em *Arabidopsis thaliana* após estresse salino (200 mM de NaCl).
- Analisar os efeitos bioquímicos e fisiológicos da superexpressão do gene *VuWRKY21* em *Arabidopsis thaliana* sob déficit hídrico e após a reidratação.
- Selecionar o gene de melhor desempenho nos ensaios com *Arabidopsis* para construção de um vetor e transformação do feijão-caupi e outras leguminosas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. FEIJÃO-CAUPI: ORIGEM, ASPECTOS BOTÂNICOS E IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA

O feijão-caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.], importante membro da família Fabaceae, é originário da África e domesticado nas regiões semiáridas africanas, onde se encontram as áreas de maior produção. Apresenta ampla distribuição geográfica (40° N a 30° S), adaptando-se tanto a terras altas como baixas, no oeste da África, na Ásia, na América Latina e na América do Norte (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). Há indícios de que a introdução do feijão-caupi no Brasil tenha ocorrido pelo Estado da Bahia, sendo levado pelos colonizadores para outros Estados da região Nordeste e outras regiões do país (WATT, 1978). Por outro lado, existem relatos de que sua introdução no país ocorreu simultaneamente em diversos Estados, partindo de diferentes regiões do continente africano, devido ao grande número de escravos africanos vindos para Brasil (SIMON *et al.*, 2007).

O feijão-caupi é uma leguminosa anual, herbácea, que produz frutos secos e deiscentes, do tipo legume vagem. Suas flores são hermafroditas, com reprodução preferencialmente por autofecundação (aproximadamente 95%), caracterizando-se como uma espécie autógama (FERREIRA *et al.*, 2017). Apresenta eficiência na fixação biológica de nitrogênio, em simbiose com rizóbios, gerando um incremento na produtividade, podendo assim ser utilizada para estimular a fertilidade do solo, evitando custos com adubos nitrogenados solúveis (DIOUF, 2011).

Algumas cultivares do feijão-caupi apresentam reconhecida capacidade de desenvolver-se em condições ambientais adversas e solos com baixos conteúdos de nutrientes e/ou salinos (WANG *et al.*, 2003). Essa tolerância a condições adversas, associadas às características de interesse mencionadas anteriormente, torna o feijão-caupi uma espécie de grande interesse para os programas de melhoramento genético vegetal, podendo ser utilizada como fonte de genes (BENKO-ISEPPON, 2001).

A colheita do feijão-caupi ocorre em dois estágios de desenvolvimento: vagem verde, para comercialização de vagem fresca, e; madura para comercialização de sementes secas (DESOKY *et al.*, 2020). A produção e o consumo do feijão-caupi estão diretamente associados a mais de 100 países, em especial os pertencentes a regiões do Oriente Médio, sul da Europa, América Central, América do Sul, Estados Unidos e África, (FATOKUN *et al.*, 2002; FREIRE-FILHO, 2011). Segundo a FAO

(FAOSTAT, 2018), em 2018, o continente africano foi responsável por 96% de toda a produção mundial, o que corresponde a 6 milhões de toneladas. Na safra de 2019/2020 (CONAB, 2021), o Brasil ocupou o terceiro lugar na produção mundial com cerca de 848,3 mil toneladas e 1,4 milhão de hectares plantados em três safras: 1ª “safra das águas”, 2ª “safra da seca” e 3ª “safra de outono/ inverno (SEAB, 2021).

Os grãos do feijão-caupi apresentam alto valor nutricional, com aproximadamente 60% de carboidratos, 1,3% de gorduras, 3,9% de fibras e conteúdo proteico acima de 20% (EHLERS; HALL, 1997; CAMPANARO *et al.*, 2019; GUZZETTI *et al.*, 2020). Tais propriedades refletem o importante papel que o feijão-caupi apresenta na nutrição humana, ou como forragem verde e feno para alimentação animal nos períodos de estiagem, em diversos países, a exemplo das regiões áridas e semiáridas do Nordeste brasileiro (EMBRAPA MEIO NORTE, 2017; CHEN *et al.*, 2017; MERWAD *et al.*, 2018).

Na região Nordeste do Brasil, o feijão-caupi destaca-se como um dos principais componentes da dieta alimentar. Além disso, a cultura representa uma importante fonte de renda para agricultores e comerciantes de grãos (DIOUF *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2015), contribui para a geração de empregos e renda, devido à necessidade de mão de obra, principalmente onde a produção ainda não é mecanizada, viabilizando a fixação dos agricultores no campo, contribuindo para o aumento da expansão da área cultivada e agregando importância socioeconômica em sua cadeia produtiva e comercial.

3.2 ASPECTOS GENÉTICOS GENÔMICOS E DE TRANSCRIPTOMA DO FEIJÃO-CAUPI

O feijão-caupi destaca-se dentre as leguminosas com menores genomas (estimado em $1C = 640,6$ Mb, LONARDI *et al.*, 2019), com $2n = 2x = 22$ cromossomos (BORTOLETI *et al.*, 2012). É uma espécie autógama, com ciclo reprodutivo curto (aproximadamente dois meses), reduzindo o tempo do avanço das gerações em programas de melhoramento genéticos (ISHIYAKU *et al.*, 2005). Essas características tornam o feijão-caupi um “perfil ideal” para um modelo experimental lucrativo (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011), tanto em estudos desta cultura, como de outras leguminosas de interesse econômico como soja e feijão-comum, que ainda sofrem perdas significativas, devido aos danos causados por estresses bióticos, como ataque de

patógenos (fungos, bactérias) e abióticos, como déficit hídrico e salinidade (DALCHIAVON *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2017; BOSHKOVSKI *et al.*, 2021).

Em programas de melhoramento do feijão-caupi, ciclo de maturação precoce, porte da planta, grãos mais adequados às exigências do mercado (cor, textura, tempo de cozimento e etc.), tolerância aos estresses abióticos, resistência a doenças (Vírus do Mosaico Severo do caupi – CPSMV; Vírus do Mosaico do caupi transmitido por afídeos – CABMV e o Vírus do Mosaico Dourado do caupi-CGMV), maior produtividade, adaptabilidade e a estabilidade da produção, estão entre as características de maior interesse dos pesquisadores (FREIRE-FILHO, 2011; ROCHA *et al.*, 2013). Condições ambientais adversas, como a salinidade, por exemplo, têm gerado perdas de produção, que deverão ser ainda mais drásticas nas próximas décadas (SHRIVASTAVA *et al.*, 2013).

Um mapa genético consenso para o feijão-caupi encontra-se disponível em <http://harvest.ucr.edu> (HarVEST: Cowpea) (MENÉNDEZ *et al.*, 1997; OUÉDRAOGO *et al.*, 2002; MUCHERO *et al.*, 2009; LUCAS *et al.*, 2011; MUÑOZ-AMATRIAÍN *et al.*, 2017), incluindo cerca de 26 mil Polimorfismos de Nucleotídeo Único (do inglês: SNPs - *Simple Nucleotide Polymorphisms*), informação de conteúdo gênico para mais de quatro mil Cromossomos Artificiais de Bactérias (do inglês: BACs, *Bacterial Artificial Chromosome*), e mais de 180 mil transcritos a partir de 17 bibliotecas de etiquetas de sequências expressas (do inglês: ESTs - *Expressed Sequence Tags*) Muñoz-AMATRIAÍN *et al.*, 2017).

O genoma de *V. unguiculata* (IT97K-499-35), mediante sequenciamento de terceira geração PacBio de SMRT e cobertura de 91x, foi estiado em ~586 Mb (LONARDI *et al.*, 2019). Dois mapas ópticos (Bionano Genomics) e 10 mapas genéticos contendo SNPs únicos (MUÑOZ-AMATRIAÍN *et al.*, 2017), juntamente com análises de transcriptoma, dados prévios de sequências Illumina, WGS (Sequenciamento do Genoma Total) e sequências BACs, foram usados para a ancoragem, orientação e qualidade de montagem das 11 pseudomoléculas cromossômicas. Quatro outras espécies de *Vigna* possuem seus genomas sequenciados e montados em 11 pseudomoléculas cromossômicas, *V. radiata* (KANG *et al.*, 2014), *V. angularis* (KANG *et al.*, 2015), *V. subterranea* (CHANG *et al.*, 2019) e *V. mungo* (SOUFRAMANIEN *et al.*, *online first*), com comparações genéticas/genômicas restritas a informações de mapas genéticos para a maior parte das demais espécies de *Vigna*.

No Brasil, o Consórcio de Genômica do Feijão-caupi (CpGC – Cowpea Genomics Consortium (antiga Rede NordEST; <http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/vigna/>) foi estabelecido em 2007, envolvendo mais de 10 grupos de pesquisa de diferentes Estados, com objetivo de gerar dados de genômica funcional úteis para o melhoramento da cultura e programas de biotecnologia. O Consórcio inclui dados de perfis de expressão de acessos sob estresse biótico, provocado pelo vírus mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV, Cowpea Severe Mosaic Vírus) e pelo vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por afídeos (CABMV, Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus), e abióticos como injúria foliar, desidratação radicular e salinidade (SOARES-CAVALCANTI *et al.*, 2010; KIDO *et al.*, 2011).

Esse banco possui 18 bibliotecas de RNA-Seq sob distintas condições de estresse, incluindo mais de 800 milhões de *reads* (RNAseq, 100 bp, Illumina Hi-Seq pair-end); mais de 45 milhões de HTSuperSAGE tags (26 bp, Solexa-Illumina); cerca de 300 mil SuperSAGE tags (26 bp, 454 Life Sciences/Roche); mais de 30 mil LongSAGE tags (19-21 bp), e mais de 300 mil ESTs (Expressed Sequence Tags). Os *reads* gerados encontram-se montados e contam com ferramentas que permitem a anotação de diversos genes importantes para o melhoramento e biotecnologia da cultura (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2013).

3.3 ESTRESSES ABIÓTICOS

As plantas são frequentemente expostas a diversos estresses abióticos, que causam vários danos ao longo de seu ciclo de vida (GIMENEZ-IBANEZ; SOLANO, 2013), e representam grandes desafios para o crescimento e produção agrícola, com perdas anuais estimadas em bilhões de dólares (PEREIRA, 2016; JOSHI *et al.*, 2018). Dentre os fatores abióticos, a seca (déficit hídrico), temperaturas extremas, radiação ultravioleta, deficiência de nutrientes, e a salinidade são os mais impactantes na agricultura (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011).

A adaptação das plantas frente ao estresse abiótico é uma resposta complexa e coordenada envolvendo grupos de genes e suas interações com o ambiente, em todos os períodos de crescimento e fases de desenvolvimento da planta (SHARAN *et al.*, 2017; LAKRA *et al.*, 2017). Essas condições desfavoráveis geralmente desencadeiam uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares, que podem resultar em danos à maquinaria celular (RAI *et al.*, 2011), afetando o

crescimento e o desenvolvimento das plantas. No feijão-caupi, por exemplo, sabe-se que o estresse por deficiência hídrica tem efeito direto e/ou indireto sobre o crescimento e a produção. Altura da planta, número de folhas e área foliar, peso seco por planta, número de vagens por planta, peso seco da semente por planta e diminuição dos pigmentos fotossintéticos são alguns exemplos de caracteres afetados pelo déficit hídrico (MERWAD *et al.*, 2018).

3.4. Estresse salino nas plantas

O estresse salino tem severo impacto na produção e produtividade das culturas. São considerados solos salinos aqueles cuja condutividade elétrica (CE) do extrato de saturação (eCE) na zona da raiz excede 4 dS m^{-1} (~40 mM de NaCl) a 25 °C e possui sódio permutável de 15%, nessa condição, o rendimento da maioria das culturas é reduzido (MUNNS, 2005; JAMIL *et al.*, 2011). Embora as práticas de irrigação tenham papel fundamental no aumento da produtividade mundial (RECHCIGL, 1982; SHANNON, 1987), os sais contidos na água tendem a acumular-se no solo, contribuindo para o processo de salinização e, conseqüentemente, inviabilizando novos cultivos agrícolas.

De fato, a incidência de baixas precipitações, alta evaporação superficial, uso inapropriado de irrigação com água salina, práticas culturais precárias, dentre outros fatores, têm contribuído para o aumento das áreas salinizadas (CHEHAB *et al.*, 2018). Estima-se que cerca de 20% do total das terras agrícolas e 33% das terras irrigadas no mundo sejam afetadas pela salinidade (RAVELOMBOLA *et al.*, 2018), o que corresponde a cerca de 830 milhões de hectares (MINHAS *et al.* 2020). Estimativas apontam que até o ano de 2050, mais de 50% das terras aráveis serão afetadas pela salinização (JAMIL *et al.*, 2011; SHRIVASTAVA; KUMAR, 2013).

As propriedades físico-químicas dos solos salinos podem variar de acordo com o local. No entanto, de modo geral, as respostas fisiológicas das plantas cultivadas sob salinidade são complexas, induzindo processos de toxicidade iônica, estresse osmótico e estresse oxidativo (CASSELLS; CURYY, 2001; KARUPPANAPANDIAN; KIM, 2013). Por consequência, ocorre redução da produção por deficiência dos principais componentes nutricionais da planta, afetando quase todas as fases do seu desenvolvimento como: germinação, crescimento vegetativo e desenvolvimento reprodutivo (BANO; FATIMA, 2009).

O acúmulo excessivo de sódio nas paredes celulares pode levar rapidamente ao estresse osmótico, tal processo ocorre em decorrência da elevada concentração de solutos na solução do solo, que gera um déficit hídrico na planta por meio da redução do potencial osmótico. Em altos níveis de estresse osmótico, a planta pode alcançar o estado de seca fisiológica, não conseguindo absorver água mesmo na presença de umidade e promovendo um conjunto de alterações metabólicas, semelhantes às provocadas pelo déficit hídrico (MUNNS, 2002; BRITTO *et al.*, 2010).

A homeostase dos íons desempenha um papel importante na manutenção das funções fisiológicas celulares normais necessárias para a absorção dos nutrientes. O desequilíbrio iônico, como o aumento da razão Na^+/K^+ gera, por consequência, um desequilíbrio nutritivo na célula, que é provocado pela interferência na absorção de nutrientes (NASCIMENTO *et al.*, 2015; ARIF *et al.*, 2020). Adicionalmente, o aumento da concentração de íons tóxicos na célula (ARIF *et al.*, 2020), por sua vez, é responsável pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que, se não equilibradas, provocam distúrbios metabólicos graves, como alterações no sistema redox e danos a macromoléculas (GIL; TUJEDA, 2010). As EROs são produzidas naturalmente pelo metabolismo vegetal, como por exemplo, durante a respiração aeróbia, em decorrência da redução do oxigênio molecular O_2 a H_2O , essa reação pode envolver a transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 , e formar radicais como superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), e também os não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) (DEMIDCHIK, 2015).

Embora considerada uma cultura moderadamente tolerante à irrigação com água salina (a um limiar de 3,3 dS m^{-1}), o aumento da salinidade do solo tende a inibir o desenvolvimento do feijão-caupi (BEZERRA *et al.*, 2010). Estudos conduzidos com diferentes cultivares de feijão-caupi em solos salinos, demonstraram que o aumento das concentrações de NaCl induziu aumento da inibição da germinação em todas as cultivares analisadas, embora observado em maior proporção nas cultivares sensíveis (ZAHEDI *et al.*, 2012; RAVELOMBOLA *et al.*, 2018a). De modo semelhante, também foram observados retardo na floração e aumento da taxa de abortamento de flores (FURTADO *et al.*, 2014), além de diminuição significativa no comprimento da parte aérea (THIAM *et al.*, 2013), proporcionais ao aumento da salinidade.

3.4.1 Estresse por déficit hídrico nas plantas

O déficit hídrico (DH) é caracterizado pela baixa disponibilidade de água por um período de tempo (ABDELRAHEEM *et al.*, 2019). Quando submetidas a tal condição, as plantas reduzem a transpiração e desenvolvem sistemas radiculares profundos e vigorosos para aumentar a absorção de água e conseqüentemente manter o equilíbrio na homeostase celular (SHAVRUKOV *et al.*, 2017).

Plantas expostas às condições de déficit hídrico desencadeiam uma ampla variedade de respostas, envolvendo níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares (KAUR; ASHIR, 2017). Dentre essas respostas, o transporte normal de solutos é inviabilizado, ocasionando o vazamento de elétrons, além de promover a produção, em excesso, de espécies reativas de oxigênio (EROs), desencadeando o processo de estresse oxidativo (HUSSAIN *et al.*, 2019). Além disso, o DH estimula várias vias de sinalização de estresse (EROS, proteína quinase ativada por mitógeno, Ca²⁺ e sinalização mediada por hormônio) (MAHMOOD *et al.*, 2020).

Elevados conteúdo de EROs são controlados por um sistema antioxidante versátil e cooperativo que modula o conteúdo das EROs no interior da célula. A sinalização de EROS sob condições de déficit hídrico está diretamente relacionada ao fluxo de ácido abscísico (ABA) e Ca²⁺ (KAUR; ASTHIR, 2017). O nível de tolerância ao estresse é definido pelo tempo que a planta leva para superar os déficits de produção ocasionados pelo estresse. A tolerância compreende duas etapas: detecção e sinalização do estresse e; ativação de respostas paralelas ao estresse (MAHMOOD *et al.*, 2020).

3.4.2 Mecanismos de resposta a estresses de déficit Hídrico e salinidade

Boa parte das plantas superiores, por serem organismos sésseis, adquiriram robustez adaptativa aos estresses ambientais, bióticos e abióticos (MA *et al.*, 2020). As condições adversas tendem a desencadear minuciosas alterações celulares nas plantas, as quais podem ocorrer em questão de segundos. Por conseqüência, tais condições promovem uma série de mudanças bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (OSAKABE; OSAKABE; SHINOZAKI, 2013).

As principais respostas da planta aos estresses por déficit hídrico e salinidade são: o fechamento estomático; desenvolvimento radicular; alterações na fotossíntese e produção hormonal e; aumento da captação de água por meio do desenvolvimento

de raízes profundas e prolíficas (HEINÁK *et al.*, 2015). Além destes, a atividade de muitas enzimas é influenciada, em especial aquelas envolvidas na síntese de ATP, osmólitos, (incluindo glicinabetaína e prolina) e substâncias de crescimento como ácido abscísico, os quais desempenham papéis vitais na manutenção das funções celulares durante condições de seca, por exemplo (FAROOQ *et al.*, 2012).

Diante de condições adversas, a resposta precoce nas plantas envolve mecanismos, como a ativação de receptores mecanossensíveis quinase ciclase, que resultam em um rápido acúmulo (<5”) de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), inibindo o influxo de sódio pela desativação dos canais de cátions não seletivos (NSCC) (MAATHUIS, 2014). Este processo está relacionado com a detecção precoce de mudanças na pressão de turgor (MAATHUIS e SANDERS, 2001). O acúmulo de cGMP também é considerado a base para a resposta inicial de sinalização de Ca^{2+} , por meio da ativação de canais cíclicos de nucleotídeos (CNGC) (DONALDSON *et al.*, 2004), permitindo o influxo de Ca^{2+} apoplástico no citosol. Outro mecanismo de sensor osmótico envolve a indução da redução por hiperosmolalidade (Ca^{2+}), a partir do aumento da OSCA1, proteína localizada na membrana plasmática, responsável por aumentar o influxo de Ca^{2+} , em resposta ao estresse osmótico (YUAN *et al.*, 2014).

O influxo de Ca^{++} tem forte efeito para a estimulação da NADPH oxidase da MP e produção da O_2^- e outras EROs importantes para processos de sinalização. A formação de EROs induzida pela toxidez do Na^+ que mais impacta a planta é proveniente da cadeia transportadora de elétrons do cloroplasto, que fica sem acceptor de elétrons ($NADP^+$), visto que o fechamento estomático promovido pelo Na^+ acarreta na limitação de CO_2 para o ciclo de C3 (MILLER *et al.*, 2009; GIL e TUJEDA 2010; DUBIELLA *et al.*, 2013).

O sistema de defesa antioxidante enzimático é um dos mecanismos de defesas que as plantas possuem para estimular sua tolerância as condições adversas e proteger seu sistema celular dos efeitos citotóxicos da superprodução das EROS (RADY *et al.*, 2017; MAHDI *et al.*, 2021). Existe uma lista de enzimas antioxidantes que atuam na eliminação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por exemplo, as catalases (CAT), ascorbato de peroxidase (APX), vários tipos de peroxirredoxinas (PRX), glutathione/tiorredoxina peroxidases (GPX) e glutathione S-transferases (GST) (MHAMDI *et al.*, 2010; MAATHUIS, 2014; CORPAS; GONZÁLEZ-GORDO, 2020).

Dentre as principais enzimas de resposta, a Superóxido Dismutase (SOD) é considerada a primeira linha de defesa contra a ação das EROS. Essa enzima dismuta

o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ocasionando a formação de outra EROS, o H_2O_2 . Tais enzimas participam na modulação dos conteúdos de H_2O_2 em cloroplastos, mitocôndrias, citosol e peroxissomos (BHATTACHARJEE, 2010).

A propagação do sinal de EROs depende da ativação do homólogo da oxidase de explosão respiratória F (RbohF), que é controlada por etileno (JIANG *et al.*, 2013), e proteína quinases relacionadas a sacarose não fermentadora, como a quinase 2,6 (SnRK 2,6) (SIRICHANDRA *et al.*, 2009), proteína quinase dependente de ABA, e ligação do ácido fosfatídico (PA) (ZHANG *et al.*, 2009). Ambos EROs e Ca^{2+} modulam a liberação de ABA, levando ao início das respostas transcricionais (ISMAIL; TAKEDA; NICK, 2014).

O ácido abscísico (ABA) é um hormônio associado na resposta às condições adversas, principalmente na atenuação de estresses abióticos, como a salinidade (CRAMER *et al.*, 2011; VISHWAKARMA *et al.*, 2017). O ABA é um hormônio vital para as plantas e está envolvido em redes de regulação dos genes por uma via dependente ou independente de ABA (NEGRÃO *et al.*, 2013; PRAK *et al.*, 2008).

A via de sinalização dependente de ABA sinaliza genes de defesa e auxilia na tolerância/resistência às situações desfavoráveis, por meio de reprogramação transcricional do metabolismo das células vegetais (BALI *et al.*, 2017; VISHWAKARMA *et al.*, 2017). A exposição ao estresse salino induz o aumento dos níveis de ABA, o qual é alcançado através da clivagem de precursores de carotenoides por dioxigenases, como 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase-3 (NCED3), principal enzima regulatória (BARRERO *et al.*, 2006), e detectado pela resistência à pirabactina (PYR), que posteriormente liga-se à proteína fosfatase 2C (PP2C), após a ativação, liberando a inibição de proteínas quinases a jusante, como a classe 3-SnRK2. Os SnRK2s dependentes de ABA, OST1/SnRK2.6, SnRK2.3 e SnRK2.2, fatores de transcrição alvo, proteínas de ligação a elementos responsivos a ABA (AREB1) e não responsivos ao ABA (ABI5), ativam genes envolvidos nas respostas de aclimatação, como um elemento de ação cis conservado, denominado ABRE (elemento responsivo a ABA) (CHOI *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2002), as sequências ABREs podem ser reconhecidas por proteínas de ligação ABRE (AREBs) ou fatores de ligação ABRE (ABFs), que pertence ao grupo A do zíper de leucina básico (bZIP) TFs (UNO *et al.*, 2000). E nos canais iônicos da membrana plasmática, como o canal aniônico lento associado 1-SLAC1, canal de potássio $KAT1$, e NADPH oxidase RbohF (UMEZAWA *et al.*, 2013).

O aumento dos níveis de ABA, que ocorre horas após a aplicação do estresse (GENG *et al.*, 2013), resulta na estabilização dependente de ABI1 das proteínas DELLA (ACHARD *et al.*, 2006), enquanto a repressão da sinalização de brassinosteróide aumenta ainda mais a quiescência do crescimento (GENG *et al.*, 2013). A repressão induzida por estresse das vias de sinalização da giberelina e dos brassinosteróides proporciona menor atividade do ciclo celular e pode ser a base de uma redução no tamanho do meristema durante a fase quiescente (WEST; BEEMSTER, 2017). A ativação da sinalização dependente de ABA está subjacente ao fechamento estomático e tem um papel importante na regulação do crescimento e das respostas de aclimatação das plantas, mediante estresse (JULKOWSKA; TESTERINK, 2015).

Adicionalmente, observa-se a interação de genes, *cross-talk*, regulados por diferentes rotas de transdução de sinais em resposta ao estresse. Como exemplos, citam-se os genes RD (responsivos à desidratação) que são expressos em plantas submetidas ao estresse, como os genes RD, *RD29A* e *RD29B*, que codificam proteínas hidrofílicas de função desconhecida que respondem de forma diferente ao estresse abiótico, em especial nas Brassicaceae (MSANNE *et al.*, 2011; HOQUE *et al.*, 2012; ULLAH *et al.*, 2018). A região promotora do gene *RD29A* é composta por vários DREs (*Dehydration-responsive element*, elemento responsivo à desidratação) e um ABRE (*Abscisic acid-responsive element*, elemento responsivo ao ácido abscísico), a qual é induzida principalmente através da via independente de ABA, enquanto a região promotora de *RD29B* carregando várias sequências ABRE é controlada principalmente por ABA (KOORNNEEF *et al.*, 1992, FUJITA *et al.*, 2005, MSANNE, *et al.*, 2011).

De acordo com Li *et al.* (2020), a expressão dos genes *AtABF3* e *AtRD29B* (dependente de ABA) e *AtDREB2A*, *AtCBF2* e *AtCBF3* (independente de ABA) foi maior em plantas de *Arabidopsis* transgênicas que superexpressaram o gene de trigo da família WRKY *TaWRKY46*, sob condições de estresse osmótico, indicando que *TaWRKY46* regulou genes envolvidos nas vias ABA-dependente e ABA-independente. Achados semelhantes também foram encontrados nas caracterizações funcionais dos fatores de transcrição *TaWRKY2*, *TaMYB73* e *TaWRKY93* (BARRERO *et al.*, 2006; BAXTER *et al.*, 2009).

A enzima P5CS1 é uma das principais envolvidas na biossíntese de prolina, osmólito amplamente distribuído que regula o equilíbrio osmótico (XU *et al.*, 2010). O

aumento na expressão de *P5CS1* pode levar ao acúmulo de osmólitos e consequentemente manter a capacidade osmótica, mantendo o conteúdo de água nas plantas (LI *et al.*, 2020). O gene *AtP5CS1*, por exemplo, foi altamente induzido em plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *TaWRKY46*, indicando uma possível regulação (LI *et al.*, 2020).

Outra estratégia de defesa é a regulação negativa da expressão de aquaporinas após o tratamento com sal, o que limita a manutenção do turgor e, portanto, a expansão celular (CHAUMONT e TYERMAN, 2014). A diminuição da condutância da água, junto com o fechamento estomático, reduz a taxa de transpiração e, consequentemente, pode reduzir o acúmulo de sódio nos tecidos da parte aérea (BOURSIAC *et al.*, 2005).

Após o aumento inicial de Na^+ na raiz da planta, a diminuição do Na^+ citosólico é, provavelmente, mediada pela ação da via sensível ao sal (SOS). O estresse salino reduz a interação entre a proteína quinase SOS2 e as proteínas 14-3-3 (ZHOU *et al.*, 2014), permitindo a interação de SOS2 com a proteína da família semelhante à calcineurina B induzida por cálcio SOS3/CBL4 (HALFTER; ISHITANI; ZHU, 2000). O complexo SOS3/SOS2 ativa o suposto trocador Na^+/H^+ (NHX7/SOS1), que remove o Na^+ do citosol para o apoplasto do córtex, da raiz e da epiderme (BRADY *et al.*, 2007; SHI *et al.*, 2002). Além disso, a compartimentação do sódio no vacúolo por transportadores NHX reduz as concentrações de Na^+ citosólico e mantém a pressão de turgor do potencial osmótico do vacúolo negativo (BASSIL *et al.*, 2011).

A regulação de longo prazo da condutividade hidráulica é atribuída a adaptações morfológicas, como o aumento da espessura da faixa de casparian, ou uma redução no desenvolvimento estomático. O ABA pode induzir a NADPH oxidase radicular e formar O_2^- no apoplasto, substrato para a SOD junto com H^+ (pH 5,5) formar H_2O_2 , que por sua vez, pode diminuir o crescimento radicular, no entanto, se houver catálise pela peroxidase apoplástica com formação de OH^- (radical hidroxila), este processo pode contribuir para o crescimento radicular (Romero *et al.*, 2001; BAXTER *et al.*, 2009). Os fatores-chave nesse processo são as peroxidases presentes no apoplasto, que usam as EROs como co-substrato. Durante os estágios iniciais do estresse, níveis elevados de EROs apoplásticos induzem a atividade da peroxidase que, em seguida, realizam ligações cruzadas com compostos fenólicos e glicoproteínas presentes na parede celular, resultando na redução da extensibilidade da parede e na limitação da expansão celular (TENHAKEN, 2015).

A exposição ao estresse salino resulta no início de um estado quiescente, que é seguido pela recuperação do crescimento, embora muitas vezes em taxas de crescimento mais baixas do que as observadas sob condições de controle (JULKOWSKA; TESTERINK, 2015). O início da quiescência é considerado independente do acúmulo de sódio nos tecidos fotossintéticos e, portanto, é atribuído aos efeitos “osmóticos” do estresse salino, no entanto, apesar da redução do crescimento inicial em condições de estresse salino ser independente do acúmulo de sódio nos tecidos da parte aérea, ela é regulada por mecanismos que podem ser distintos do estresse osmótico (ROY; NEGRÃO; TESTER, 2014).

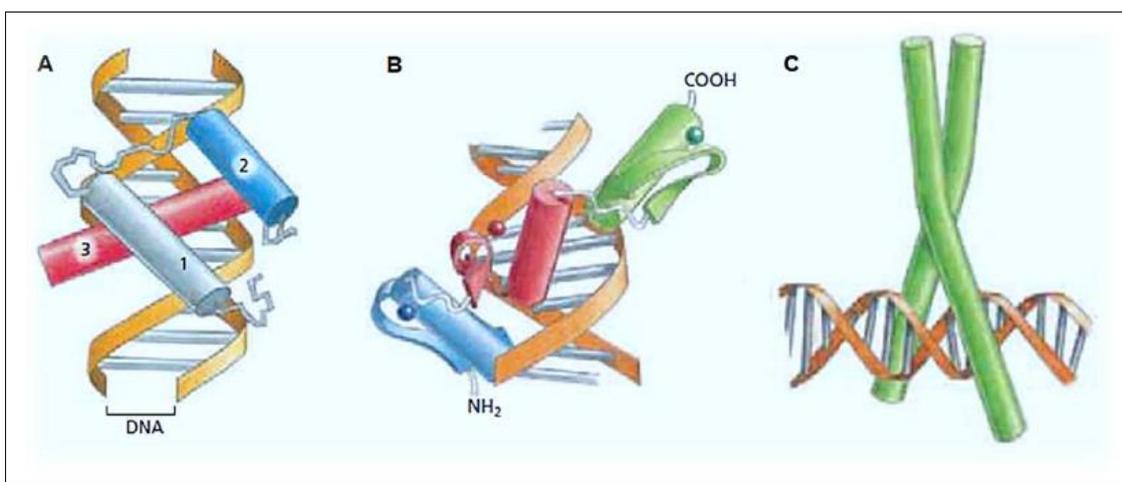
Embora muitas das vias de sinalização que levam à alteração do crescimento sejam compartilhadas entre diferentes órgãos da planta, o impacto sobre a taxa de crescimento de órgãos individuais e processos de desenvolvimento é diferente. Por exemplo, a germinação de sementes de *Arabidopsis* é inibida por concentrações que excedem 150 mM de NaCl, enquanto o crescimento da parte aérea e da raiz são reduzidos com 50 e 100 mM de NaCl, respectivamente (CLAEYS *et al.*, 2014). Há muito se supõe que um aumento na razão raiz/parte aérea contribui para a tolerância à salinidade, porque limitaria a perda de água pelos estômatos e aumentaria a absorção de água ao estender o tamanho do sistema radicular (MUNNS e TESTER, 2008).

Além disso, na zona de alongamento da raiz, a pressão de turgescência dentro da célula diminui, à medida que o estresse salino aumenta o potencial osmótico do solo, levando à perda de água das células. A manutenção da pressão de turgor pode ser facilitada pela compartimentação do Na⁺ nos vacúolos, o que aumenta o potencial osmótico do vacúolo de maneira custo-efetiva (BASSIL *et al.*, 2011).

3.5 FATORES DE TRANSCRIÇÃO

Os fatores de transcrição (*Transcription Factors*, TFs) são proteínas fundamentais para regulação gênica procariota e eucariota (PULVERER, 2005), incluindo processos fisiológicos atuando diretamente no crescimento e desenvolvimento (RUSHTON *et al.*, 2010). Os TFs podem ser classificados de acordo com a estrutura tridimensional de suas proteínas, como: hélice-volta-hélice (*Helix-Turn-Helix*) básico, hélice-alça-hélice (*Helix-Loop-Helix*) e proteínas dedo de zinco (*Zinc Finger Protein*) (Figura 1; WATSON, 2006).

Figura 1 - Principais motivos de ligação dos fatores de transcrição ao DNA. (A). Homeodomínio; (B) Motivo Dedo de Zinco e (C) Zíper de Leucina formado por duas alfa-hélices.



Fonte: ALBERTS e LEWIS, 2010 (com adaptações).

Os TFs influenciam a expressão de genes responsivos ao estresse ao interagir com elementos *cis* conservados na região promotora (KARKUTE *et al.*, 2018), sendo considerados as mais importantes moléculas em mecanismos de regulação gênica (WEI *et al.*, 2016). Em *Arabidopsis*, cerca de 428 TFs são regulados sob condições de estresse salino (ARIF *et al.*, 2020). Os TFs possuem maior afinidade (~106 vezes maior) ao seu sítio de ligação na molécula do DNA, do que com qualquer outra região da cadeia. Essas regiões são altamente conservadas e têm sido utilizadas para categorizar os TFs em famílias, com destaque algumas de relevância para a regulação de genes responsivos a condições de estresse abiótico como por exemplo: NAC (No Apical Meristem, ATAF1/2), AP2/ERF (Apetala2/ethylene response factor), MYB (*Myeloblastosis*), C₂H₂:dedo de zinco e a família WRKY (HIRAYAMA *et al.*, 2010; AKASHIMA *et al.*, 2014; OSAKABE *et al.*, 2014; KRANNICH *et al.*, 2015).

Nas vias de tolerância ao estresse, um dos mecanismos de sinalização da planta envolve a interação de estímulos de receptores e a cascata de sinalização a jusante que leva à expressão de FTs e à expressão de genes-alvo e das respostas correspondentes (Joshi *et al.*, 2016; Wani *et al.*, 2021). O conjunto de todas as interações entre os TFs e seus genes-alvo em uma célula pode ser representado

como uma rede (CHEN; ZHU, 2004). Para entender a regulação e os mecanismos de adaptação aos estresses ambientais, é essencial a identificação dos componentes que participam desses sistemas regulatórios, incluindo tanto os genes codificantes de TFs, como aqueles codificantes de seus efetores. O conhecimento destas interações viabiliza a criação de modelos computacionais, que auxiliem na compreensão e elucidação da arquitetura de uma determinada rede em células, quando expostas a condições de estresse (LAI *et al.*, 2011). Esses modelos podem auxiliar em programas de melhoramento genético de plantas, uma vez que os métodos convencionais apresentam baixa eficiência, quando executados sem o uso de ferramentas biotecnológicas.

3.5.1 Família WRKY

Fatores de transcrição WRKY constituem uma das maiores famílias de reguladores transcricionais nas plantas (BAKSHI; OELMÜLLER, 2014). Ambas as regiões terminais dos domínios WRKY (WRKYGQK; CX4-7-CX23-28-HX1-2-[H/C]) podem se ligar especificamente a elementos *cis* do tipo *W-box* (TTGACT/C) em regiões promotoras de genes alvos, e conseqüentemente, inibir ou ativar sua transcrição (LI *et al.*, 2020). Os FTs WRKY desempenham um papel essencial na adaptação de plantas cultivadas a estresses abióticos, resultante de uma interação entre diversos genes, inclusive outros FTs, e uma variedade de hormônios vegetais. Evidências sugerem que a aplicação exógena de diferentes hormônios regula a expressão de genes WRKY após exposição a múltiplos estresses abióticos, incluindo déficit hídrico e a salinidade (YAN *et al.*, 2014).

Um grande número de genes codificantes para fatores de transcrição regulados de forma positiva ou negativa reafirma a ação de uma rede de transdução de sinal complexa subjacente à resposta ao estresse salino (WANG *et al.*, 2019). As proteínas WRKY atuam em diversos processos fisiológicos relacionados diretamente ao crescimento e ao desenvolvimento dos vegetais, como senescência, dormência, metabolismo, morfogênese de tricomas e embriões (RUSHTON *et al.*, 2010). Adicionalmente, diversos e numerosos estudos apontam os TFs WRKY com um papel funcional na tolerância a estresses bióticos e abióticos, como seca e salinidade, podendo atuar em paralelo aos dois tipos de estresse.

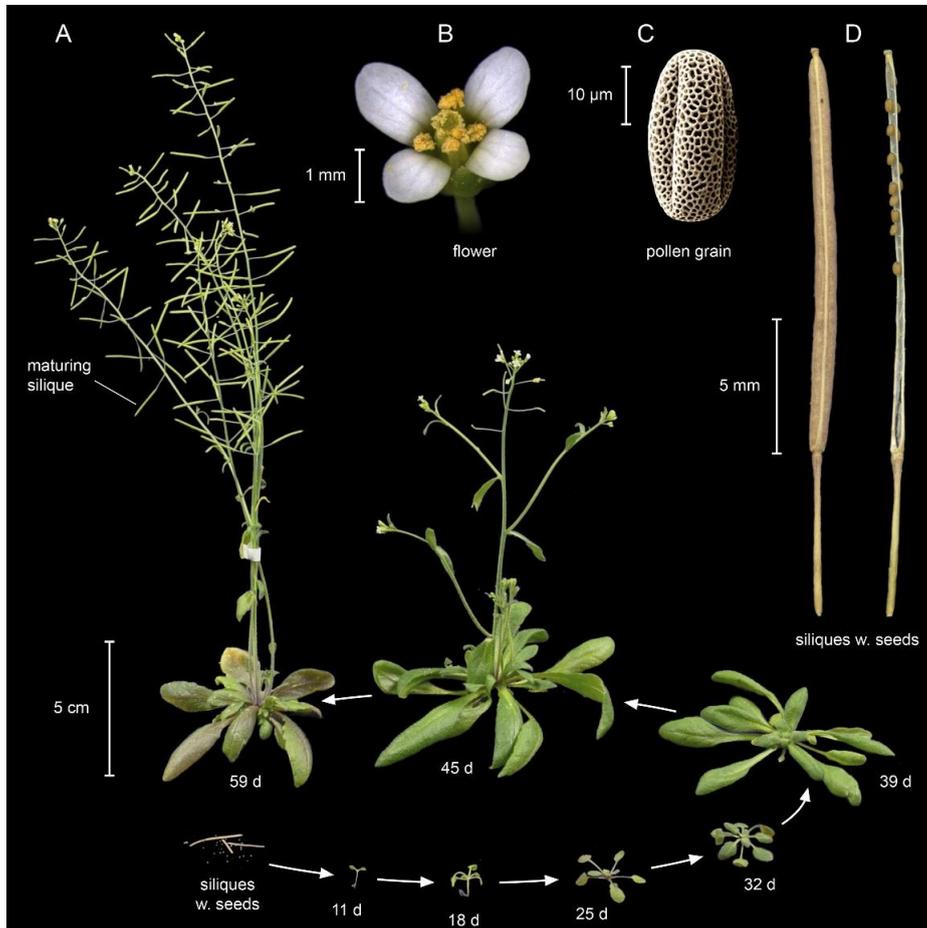
Em *Arabidopsis*, por exemplo, os TFs *AtWRKY18*, *AtWRKY40* e *AtWRKY60*

regulam a expressão dos genes ABI4 e ABI5, na via de sinalização de ABA (SHANG *et al.*, 2010). No feijão-caupi, 20 genes *VuWRKY* foram associados a genes ortólogos de outras espécies reportados previamente por sua importância na tolerância a estresses abióticos, como os genes *VuWRKY18* e *VuWRKY21*, ortólogos de *AtWRKY40* anteriormente mencionado (MATOS *et al.*, em preparação).

3.6 MODELO VEGETAL PARA ESTUDOS DE EXPRESSÃO GÊNICA - ARABIDOPSIS THALIANA

Pesquisas em organismos modelos, sejam animais ou vegetais, são de grande importância para a compreensão de numerosos processos biológicos, em especial: bioquímicos, fisiológicos, metabólicos e genéticos. Dentre os vegetais, *Arabidopsis thaliana* (L.), uma crucífera da família Brassicaceae, é amplamente utilizada em estudos da biologia e genética vegetal. Dentre as principais vantagens em relação as demais espécies vasculares, destacam-se: ciclo de vida curto, em aproximadamente seis semanas, da germinação até formação de sementes; pequeno tamanho da planta e genoma pequeno com cerca de 135 Mb (SOMERVILLE e KOORNNEEF, 2002; KRÄMER, 2015) (Figura 2).

Figura 2. Diferentes estádios do ciclo de vida de *Arabidopsis thaliana*, acesso Columbia (Col). (A) Estádios da germinação até formação de plântulas (11 dias), crescimento vegetativo (39 dias) e estágio reprodutivo (45 dias); (B) Imagem da flor; (C) do grão de pólen e (D) fruto maduro. Fonte: Krämer (2015).



O uso de *A. thaliana* como modelo se intensificou a partir da década de 80, sendo esta, a primeira angiosperma com genoma nuclear sequenciado, em 2000 (SOMERVILLE; KOORNNEEF, 2002; KOORNNEEF; MEINKE, 2010). A rapidez com que experimentos podem ser conduzidos em *A. thaliana* viabilizou um enorme progresso sobre o conhecimento acerca dos princípios moleculares de desenvolvimento de plantas, biologia celular, metabolismo, fisiologia, genética e epigenética. A ampla utilização de *A. thaliana* como planta de referência universal continuam a se expandir (BRADY *et al.*, 2007; KRÄMER, 2015). As associações de função gênica para *A. thaliana*, engloba 32.451 genes e 10.245 termos GO, e tem possibilitado o melhor entendimento e elucidação de como ocorrem os processos metabólicos em plantas são ativados frente aos principais fatores de estresse (LIU, 2020).

3.6.1 *Arabidopsis thaliana* na análise da expressão de genes WRKY

Com o avanço da engenharia genética, em especial a transgenia, diversos trabalhos têm sido realizados visando compreender a funções de genes WRKY frente às condições de estresse, em organismos modelos, sendo uma das famílias de TFs mais estudadas nas duas últimas décadas (KARKUTE *et al.*, 2018). Em plantas de *Arabidopsis* sob salinidade, vários TFs da família WRKY foram regulados positivamente, por exemplo *WRKY17*, *WRKY25* e *WRKY33*. *WRKY29*, *WRKY40* e *WRKY75* (JITHESH *et al.*, 2018).

Adicionalmente, plantas transformadas de *Arabidopsis* superexpressando genes WRKY de outras espécies têm sido frequentemente analisadas, visando compreender o papel dos genes WRKY na tolerância aos estresses. A superexpressão do gene *MdWRKY30*, proveniente da maçã (*Malus domestica* Borkh), em *Arabidopsis*, por exemplo, proporcionou tolerância aos estresses de déficit hídrico e salino, desde a germinação das sementes (DONG *et al.*, 2020). Outro gene WRKY, *CdWRKY50*, oriundo de *Cynodon dactylon* (L). Pers., foi superexpresso em *Arabidopsis*, sendo considerado um regulador negativo na resposta das plantas ao estresse salino, o que fornece base científica para o desenvolvimento de plantas tolerantes ao sal por meio da engenharia genética. (HUANG; AMEE; CHEN, 2021).

A superexpressão do gene *HbWRKY82*, proveniente de *Hevea brasiliensis*, em *Arabidopsis*, por sua vez, melhorou a tolerância à desidratação e salinidade e diminuiu a sensibilidade ao ABA exógeno. Além disso, regulou a expressão transcricional de vários genes responsivos ao estresse, dentre eles, *P5CS*, *RD22* e *RD29B* (KANG *et al.*, 2021). Adicionalmente, *GhWRKY6-like*, oriundo do algodão (*Gossypium hirsutum* L.), ao ser superexpresso em *Arabidopsis* mostrou-se eficiente no aumento da tolerância aos estresses salino e osmótico. Por outro lado, o silenciamento desse gene nas plantas de algodão tornaram-nas sensíveis a esses mesmos estresses, sendo o *GhWRKY6-like* apontado como participante das vias de sinalização destes estresses (ULLAH *et al.*, 2018).

4 ARTIGO 1 - EFEITOS DA SUPEREXPRESSIONE DOS GENES *VuWRKY21* E *VuWRKY87* DO FEIJÃO-CAUPI EM *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE SALINO

Joelson Germano Crispim¹; Elenilson dos Santos Souza¹; Marina Ferreira Antunes¹; Hai Liu²; Valesca Pandolfi¹; Ana Maria Benko-Iseppon¹; Marciana Bizerra de Moraes³; Roel Collamat Rabara²; Lili Sun²; Cláudia Ulisses^{3,4}; José Ribamar Costa Ferreira-Neto¹; Michael Timko^{2*}; Ana Christina Brasileiro-Vidal^{1*}

¹Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Biologia, Universidade da Virginia, Charlottesville, EUA.

³Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁴Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

* Corresponding author: ana.vidal@ufpe.br; mpt9g@virginia.edu

Resumo: Fatores de transcrição WRKY são importantes reguladores das vias de sinalização, incluindo genes envolvidos na resposta ao estresse salino. O presente trabalho caracterizou os efeitos de dois genes WRKY de *Vigna unguiculata*, *VuWRKY21* e *VuWRKY87*, sob condições de estresse salino, em plantas transgênicas de *Arabidopsis*. Após tratamentos de estresse salino, as linhagens de *Arabidopsis* que superexpressam *VuWRKY21* ou *VuWRKY87* apresentaram elevada expressão de genes envolvidos nas vias de sinalização e resposta ao estresse salino, bem como menor estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio (EROs). Entre os genes responsivos ao estresse salino em *Arabidopsis*, seis (*AtP5CS1*, *AtNHX1*, *AtRD29A*, *AtSOS3*, *AtSOS2* e *AtSOS1*) foram estudados por qPCR. Ao contrário das plantas selvagens, as linhagens transgênicas apresentaram menor conteúdo de H₂O₂ e maiores conteúdos de SOD e CAT no estágio inicial do estresse salino. Esses resultados sugerem que a superexpressão de ambos os genes *VuWRKY* em *Arabidopsis* ativou genes envolvidos na tolerância à salinidade.

Abstract: WRKY transcription factors are important regulators of signaling pathways, including genes involved in salt stress response. The present work characterized the effects of two *WRKY* genes from *Vigna unguiculata*, *VuWRKY21* and *VuWRKY87*, on plant salinity tolerance. Upon salt stress treatments, *Arabidopsis* lines overexpressing *VuWRKY21* or *VuWRKY87* showed elevated expression of genes involved in signaling and saline stress response pathways, as well as less biochemical stress caused by reactive oxygen species (ROS). Among genes responsive to salt stress in *Arabidopsis*, six (*AtP5CS1*, *AtNHX1*, *AtRD29A*, *AtSOS3*, *AtSOS2*, and *AtSOS1*) were studied by RT-qPCR. In contrast to wild-type plants, the transgenic lines presented lower H₂O₂ content and higher SOD and CAT contents at early stage of salt stress. These results suggest that the overexpression of both *VuWRKY* genes in *Arabidopsis* activated genes involved in salinity tolerance

Introdução

Aproximadamente, um terço dos solos agrícolas do mundo encontram-se degradados devido ao aumento da salinidade dos solos. Os solos salinizados representam um dos principais fatores que acometem o crescimento e a produtividade das culturas (Abiala et al., 2018). Seus efeitos incluem redução da germinação, crescimento e vigor das plântulas, que conseqüentemente limitam o rendimento vegetal, resultando em perdas médias anuais de biomassa acima de 50% (Brozynska et al., 2016; Ravelombola et al., 2018). Tais estresses podem desencadear alterações em propriedades das membranas, aumento da respiração, inibição da fotossíntese e diminuição da produção de matéria seca, entre outros (Merwad et al., 2018).

As plantas respondem às situações de estresse com o acúmulo de osmoprotetores, mediante o aumento da síntese de reguladores de crescimento, da expressão de genes específicos, assim como promovendo maior atividade de antioxidantes. Entre os genes alvos, destacam-se aqueles codificantes de proteínas LEA; enzimas envolvidas na biossíntese de prolina; enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT); proteínas envolvidas no transporte seletivo de água e íons, além dos fatores de transcrição (TFs), com destaque para a família WRKY (Joshi et al., 2016; Maruyama et al., 2014).

Neste contexto, os FTs da família WRKY apresentam papel fundamental na sinalização de vias de resposta a estresses abióticos (Dong et al., 2003; 2020). Diversos estudos evidenciaram que plantas transgênicas superexpressando genes *WRKY* atuaram na regulação positiva de genes envolvidas em vias de sinalização e defesa frente à estresses abióticos, a exemplo citam-se os genes *RD29A* e *RD29B* que codificam proteínas hidrofílicas capazes de responderem, de diferentes formas (Msanne et al., 2011; Ullah et al., 2018), como observado pela superexpressão do gene *GhWRKY6-like* (*Gossypium hirsutum* L.; Ullah et al., 2018), em *Arabidopsis* sob estresse salino.

O gene *AtP5CS1*, pertencente ao grupo de osmoprotetores, também está envolvido na tolerância ao estresse abiótico. Codifica um $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5CS), que desempenha um papel importante na síntese de prolina. O aumento na expressão do gene *P5CS1* pode levar ao aumento de osmorreguladores e conseqüentemente manter a capacidade osmótica, mantendo o conteúdo de água nas plantas (Li et al., 2020). Sua ativação foi regulada positivamente como consequência da superexpressão de *TaWRKY46* (*Triticum aestivum* (L.) em *A. thaliana thaliana* (L.) Heynh sob estresse osmótico (Li et al., 2020).

Adicionalmente, a regulação dos genes pertencentes a via SOS já foi estudada sob a superexpressão de genes WRKY (Dai et al., 2018; Amin et al., 2021), os genes da via SOS estão entre os mais importantes na resposta à salinidade, uma vez que, após o aumento inicial de Na^+ na raiz da planta, a diminuição do Na^+ citosólico provavelmente é mediada pela ação da via sensível ao sal (SOS). O complexo SOS3/SOS2 ativa o suposto trocador Na^+/H^+ (NHX/SOS1), que remove o Na^+ do citosol para o apoplasto do córtex, da raiz e da epiderme (Brady et al., 2007). O aumento da expressão de genes

pertencentes à via SOS foi associado ao aumento da tolerância em plantas, sob estresse salino em diferentes estudos (Tang et al., 2014; Dai et al., 2018). Em *Fortunella crassifolia* Swingle, por exemplo, os genes da via SOS foram regulados positivamente por *FcWRKY40* (Dai et al., 2018). Em estudos semelhantes, Lv et al. (2020) identificaram regiões W-box nos genes *AtSOS1*, *AtSOS2*, *AtSOS3*, que foram regulados positivamente por *FtWRKY46* (*Fagopyrum tataricum* (L.) Gaertn) superexpressos em *Arabidopsis*.

Muitos genes WRKY têm sido superexpressos em *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, a fim de avaliar seus efeitos na regulação de genes responsivos a estresses abióticos, incluindo o estresse salino, como por exemplo observado para *TaWRKY93* (*T. aestivum*; Qin et al., 2015), *CIWRKY20* (*Citrullus lanatus* (Thunb.); Zhu, et al., 2022) e *PheWRKY86* (*Phyllostachys edulis* (Carr.) J. Houz; Wu et al., 2022). Vale ressaltar que a regulação da expressão gênica em mecanismos de tolerância à desidratação em geral e à salinidade são muito similares, como pôde ser confirmado para *GhWRKY6-like* (*G. hirsutum*; Ullah et al., 2018) e para *HbWRKY82* (*Hevea brasiliensis* (L.); Kang et al., 2021). A constatação da importância dos genes WRKY nas vias de regulação da expressão de genes responsivos a estresses por desidratação e salinidade tem sugerido a manipulação desses genes, via engenharia genética em importantes cultivares, visando ao aumento da tolerância a estresses abióticos. A exemplo, o gene *AhWRKY75* que ao ser superexpresso em plantas de *Arachis hypogaea* (L.), conferiu tolerância à salinidade (Zhu et al., 2021)

Dentre as leguminosas de importância socioeconômica, destaca-se o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], uma leguminosa amplamente cultivada e consumida em todo o mundo na forma de grãos imaturos (feijão-verde), e como grãos secos (Baptista et al., 2017). Além dos benefícios nutricionais, o feijão-caupi, assim como outras leguminosas, é uma opção atraente para solos pobres e degradados, uma vez que libera matéria orgânica de alta qualidade e facilita a circulação dos nutrientes do solo, bem como a retenção de água, além de possuir a capacidade de restaurar nutrientes em solos salinos, com potencial de remover íons tóxicos (Abiala et al., 2018; Amorim et al., 2022; Opoku et al., 2022; Stagnari et al., 2017).

O avanço nas tecnologias de sequenciamento (NGS) de dados genômicos e transcriptômicos tem sido fundamental na identificação de genes funcionais e regulatórios envolvidos na adaptação a fatores ambientais, muitas vezes perdidos durante a domesticação das espécies (Abdelrahman et al., 2018). No feijão-caupi, 25 genes diferencialmente expressos sob estresse por desidratação radicular, foram analisados. Dentre eles, *VuWRKY21* e *VuWRKY87* apresentaram elevados níveis de indução logo nos primeiros tempos do estresse abiótico (25 min) (Matos et al., 2022).

Tendo em vista do importante papel regulatório de genes WRKY sobre a expressão de genes responsivos a estresses abióticos como seca e salinidade, a análise de membros da família WRKY via transgenia da espécie modelo *A. thaliana* apresenta-se como excelente alternativa para a prospecção de genes de importância nas vias de regulação dos mecanismos de tolerância a estresses abióticos. O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos bioquímicos e a expressão diferencial de genes

responsivos ao estresse salino em *A. thaliana* superexpressando os genes de feijão-caupi *VuWRKY21* e *VuWRKY87*.

Metodologia

Clonagem gênica e transformação de *Agrobacterium tumefaciens*

Dois genes WRKY de feijão-caupi (*VuWRKY21* e *VuWRKY87*) foram selecionados com base no trabalho de Matos et al. (2022), por terem sido previamente induzidos no feijão-caupi sob desidratação radicular. Regiões codificantes de ambos os genes foram amplificadas por PCR a partir de uma mistura de cDNA (1:1) do acesso de feijão-caupi ‘Pingo de ouro’, considerado tolerante à desidratação radicular, provenientes dos tempos de 50 e 75 min após imposição do estresse em Matos et al. (2022). A reação de PCR foi constituída por: 4 µL de tampão da enzima (5 x); 0,4 µL de dNTPs (10 mM); 1,0 µL de cada primer (10 µM) para o cDNA de *VuWRKY21* (807 pb) *forward* (ATGGAACCAACATGCTT) e *reverse* (TTACCATTTGGCCTCTAG), e de *VuWRKY87* (1062 pb) *forward* (ATGGACAACATGGGAGAC) e *reverse* (TCATGGGTTATCGAATCTGA), 0,5 µL de cDNA (T50 + T75); 0,8 µL de Phusion DNA polimerase, e água destilada para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada por 5 min a 94°C, 30s a 94°C, 30 s a 55°C, e 1 min e 40 s a 72°C, por 25 ciclos, seguidos de 7 min finais a 72°C. As amostras totais de ambos os genes foram corridas em géis de agarose 1,5%, seguido por recuperação dos fragmentos usando Zymoclean™ Gel DNA recovery Kit, (Zymo ResearchCatalog).

Os fragmentos de DNA recuperados foram mobilizados no vetor intermediário pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Grand Island, NY) sendo o constructo (pENTR/D-TOPO-*VuWRKY*) recombinado com pGWB6 (Nakagawa et al., 2007) por reação de recombinação LR (Gateway LR Clonase Enzyme mix; Invitrogen, Grand Island, NY). Os plasmídeos resultantes foram nomeados de pGWB-*VuWRKY21* e pGWB-*VuWRKY87*, com os genes *VuWRKY* sob o controle do promotor constitutivo 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV). As porções gênicas de pENTR/D-TOPO-*VuWRKY* foram sequenciadas por Genewiz para confirmar a integração do gene.

Os plasmídeos foram transformados em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (LB4404) por eletroporação e as colônias transformadas foram selecionadas em meio sólido YEB contendo 50 mg/L de canamicina, 67,5 mg/L rifampicina e 50 mg/L de estreptomicina. Colônias recombinantes resistentes ao antibiótico foram isoladas e crescidas em meio líquido YEB contendo antibióticos canamicina e estreptomicina (50 mg/L) e a 28°C até a saturação. O DNA plasmidial foi extraído de acordo com o protocolo do GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific, Glen Burnie, MD). A presença dos genes *VuWRKY21* e 87 introduzidos foi verificada por PCR. Colônias positivas para as duas construções foram selecionadas, crescidas em meio líquido e armazenadas a -80°C em solução de 15% de glicerol até seu uso.

O DNA plasmidial das células recombinantes foi extraído utilizando o kit GeneJET Plasmid

Miniprep (Thermo Scientific, Glen Burnie, MD) e a presença dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* foi confirmada por PCR, em uma reação contendo: 2 µL de tampão da enzima (10 x); 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 1,0 µL de cada primer (10 µM) para o cDNA de *VuWRKY21* (807 pb) *forward* (ATGGAACCAACATGCTT) e *reverse* (TTACCATTTGGCCTCTAG), e de *VuWRKY87* (1062 pb) *forward* (ATGGACAACATGGGAGAC) e *reverse* (TCATGGGTTATCGAATCTGA), 1-2 µL de *A. tumefaciens*; 0,5 µL de Taq-polimerase, e água destilada para um volume final de 20 µL. A reação foi realizada por 4 min a 94°C, 30s a 94°C, 30 s a 55°C e 30 s a 72°C, por 35 ciclos, seguidos de 5 min finais a 72°C.

Plantas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia, Col-0) foram transformadas pelo método de imersão floral como descrito por Bechtold and Bouchez (1995) e modificado por Clough and Bent (1998), usando as duas construções supracitadas.

Estabelecimento das gerações de *Arabidopsis thaliana* transformadas

Sementes (geração T₁) das plantas potencialmente transgênicas (da geração T₀) para os genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* foram coletadas e armazenadas a 4°C até a utilização. As sementes foram desinfestadas em solução contendo hipoclorito de sódio (2,0%) e Tween-20 (0,1%), seguido por cinco lavagens em água destilada autoclavada. Em seguida, procedeu-se o processo de vernalização, em que as sementes foram transferidas para microtubos de 1,5 mL contendo 0,5 mL de água estéril e mantidas por 48 h a 4°C. Posteriormente, as sementes foram semeadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) contendo: tiamina (1,0 mg/L), sacarose (3,0%), ágar (6,0 g/L), pH 5,8, contendo kanamicina e higromicina (50 mg/L cada), como agentes seletivos.

Decorridos 15 dias da inoculação as plântulas desenvolvidas, com no mínimo quatro folhas foram aclimatadas individualmente em vasos (capacidade 80 mL) contendo uma mistura de substrato comercial (condicionador floreira -Forth®) e vermiculita (1:1) e cobertas por sacos plásticos, para aclimação. Durante o período de cultivo, as plantas foram mantidas em sala de crescimento, sob condições controladas de fotoperíodo (12 h) e temperatura (21 °C) e irrigadas a cada três dias. Após duas semanas de cultivo, as regas foram intercaladas com adição de solução de NPK 20-20-20 (1,0 g/L). Cada plântula T₁ foi considerada um evento transgênico e numerada sequencialmente a cada geração.

Análise de segregação e confirmação da transformação

Antes de prosseguir com o avanço das gerações, potenciais plantas superexpressando os genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (denominadas *VuWRKY21-OE* e *VuWRKY87-OE*) em geração T₁, cultivadas na presença de antibióticos e com quatro folhas definitivas, foram analisadas por PCR convencional para confirmar a inserção do transgene. Em seguida, 150 sementes em geração T₃ foram inoculadas em meio MS seletivo, em placas de Petri e cultivadas de acordo com a metodologia supracitada. Eventos com no mínimo 90% das sementes germinadas e com quatro folhas na roseta, após 15 dias de cultivo,

foram considerados em homozigose. Os controles positivo e negativo consistiram de 150 sementes do tipo selvagem (WT), cultivadas nas mesmas condições das linhagens transgênicas, variando apenas quanto à ausência e presença dos agentes seletivos (canamicina e higromicina, 50 mg/L cada) no meio de cultura.

Teste de germinação e alongamento radicular sob estresse salino

Para o teste de germinação foram utilizadas sementes oriundas de plantas WT e de três linhagens transgênicas em homozigose para os genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87*. As sementes foram inoculadas de acordo com os passos supracitados, variando apenas em relação a concentração de NaCl (0, 100 mM e 200 mM). Durante sete dias, foi observado o número diário de sementes germinadas, com auxílio do microscópio estereoscópio. O experimento foi realizado em triplicata, cada uma delas composta por 40 sementes das três linhagens em homozigose para os genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (L1, L2 e L3) e WT.

Para testar os efeitos da salinidade no alongamento da raiz, sementes cultivadas em meio MS com o comprimento de 0,5 cm foram transferidas para as condições de teste (NaCl: 0, 100 e 200 mM). Após sete dias, o comprimento da raiz foi medido com um paquímetro digital. Este teste foi realizado com três réplicas biológicas, cada réplica composta por 20 sementes para cada linhagem transgênica (*VuWRKY21-OE* e *VuWRKY87-OE*) e WT.

Exposição ao estresse salino

Para os ensaios de salinidade foram utilizadas plantas de três eventos transgênicos em homozigose para ambos os genes *VuWRKY21*, *VuWRKY87*, e para a linhagem WT, as quais foram inoculadas, aclimatadas e cultivadas seguindo passos descritos no item “Estabelecimento das gerações de *Arabidopsis thaliana* transformadas”.

Decorridos 28 dias da aclimação, as plantas foram divididas em dois grupos: tratado e controle. As plantas do grupo tratado foram irrigadas com solução de NPK 20-20-20 (1,0 g/L) suplementada com 200 mM de NaCl, e o grupo controle irrigado apenas com solução de NPK 20-20-20 (1,0 g/L). Após 1, 2, 4 e 8 h, folhas das rosetas nos dois grupos foram coletadas congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80°C. Para as análises de expressão via qPCR, foram estabelecidas triplicatas biológicas, sendo uma réplica correspondente a uma planta. Para as análises bioquímicas foram reservadas 20 plantas/réplica biológica. Em todas as análises foram utilizados o tecido foliar. Os experimentos foram realizados em sala de crescimento sob condições controladas de fotoperíodo (16 h de luz) e temperatura de 21°C.

Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e de malondialdeído (MDA)

O conteúdo de peróxido de hidrogênio foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al.

(2001) e a peroxidação lipídica determinada de acordo com Heath and Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada por meio da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

Testes enzimáticos e quantificação de proteína solúvel

A quantificação das proteínas solúveis totais (PST) foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Bradford (1976). Para a determinação da atividade da catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram utilizadas as metodologias propostas por Havir and Mchale (1987), e Giannopolitis and Ries (1977), respectivamente.

Extração de RNA, síntese de cDNA e análise de expressão diferencial por qPCR

O RNA total foi extraído de acordo com o protocolo estabelecido por Zhao et al. (2012) e tratadas com DNase (DNA-free, Ambiom). O RNA foi quantificado por fluorimetria, usando Qubit (Invitrogen). Alíquotas de 0,5 µg de RNA de cada amostra foram reversamente transcritas usando o kit Improm-II Reverse Transcriptional System (Promega), conforme as especificações do fabricante.

A análise de expressão diferencial foi realizada via PCR quantitativa em tempo Real (qPCR). As reações de qPCR foram realizadas com amostras de cDNA, utilizando três réplicas biológicas e três réplicas técnicas. As reações de qPCR foram preparadas com o Kit iTaq Universal SYBR Green Supermix (BioRad), conforme especificações do fabricante, no equipamento Cfx96 (BioRad). Todos os *primers* utilizados neste estudo (Tabela S1) foram previamente testados por PCR convencional. Os ciclos de quantificação (*Cqs - quantification cycle*), foram normalizados com os valores de *Cqs* do gene referência Ubiquitina. Adicionalmente, as sequências dos *primers* utilizados para as análises de qPCR dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (Tabela S2) foram alinhadas via BLASTn contra o genoma de referência de *Arabidopsis*, pela ferramenta Primer Blast, incorporada no *NCBI*, a fim de detectar possíveis anelamentos cruzados.

A eficiência de amplificação para cada primer foi calculada por meio de uma curva padrão gerada por diluições seriadas de cDNA (1/10, 1/100 e 1/1000) em triplicata técnica usando a equação $E = 10^{(-1/\text{slop da curva padrão})-1}$. As inclinações da curva padrão na faixa de -3,58 a -3,10 foram consideradas aceitáveis para o ensaio (Raso & Biassoni 2014). Esses valores de inclinação equivalem a eficiências de amplificação de 90% ($E = 1,9$) e 110% ($E = 2,1$), de acordo com as diretrizes do MIQE para qPCR (Bustin et al. 2009).

Análises estatísticas

Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Lilliefors e homogeneidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA), em um arranjo fatorial 4 x 3 (linhagens x concentrações de NaCl) para cada gene *VuWRKY*, seguido pelo teste

a posteriori de Tukey ($p < 0,05$). Para a análise estatística do índice de germinação, os valores foram transformados usando a fórmula $\arcseno \sqrt{x}$ (%). Todos os dados foram analisados pelo programa estatístico Genes (Cruz, 2013).

A expressão relativa dos transcritos alvos foi determinada pelo Software de Expressão Relativa Rest2009, no modo padrão. A análise foi baseada em comparações pareadas usando randomização e *bootstrapping* com o Teste de Randomização de Realocação Fixa Par-wise (Pfaffl et al. 2002). O teste de hipóteses ($P < 0,05$) foi usado na determinação de diferenças na expressão de transcritos alvo sob as condições de controle e tratadas.

Resultados

Teste de germinação e alongamento da raiz

Para analisar o papel de *VuWRKY21* e *VuWRKY87* na tolerância ao sal do feijão-caupi, três linhagens *VuWRKY-OE* (L1, L2 e L3) foram geradas e analisadas. Linhagens *VuWRKY21-OE* apresentam uma redução na taxa de germinação proporcional ao aumento da concentração de NaCl, observando-se uma germinação de 100% (WT, L1, L2) e de 99,17% (L3) na ausência de sal para sementes de *VuWRKY21-OE*, e uma germinação de 100% (WT) e variando de 97,50 a 99,17% para as linhagens *VuWRKY87-OE* (Tabela 1). Para as linhagens *VuWRKY21-OE* na concentração de 200 Mm, a redução da germinação foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) tanto para as linhagens transgênicas L2 (27%), L3 (30%) quanto para WT (38%), observando-se também uma grande redução para L2 (54,58%). De modo semelhante, para *VuWRKY87-OE*, notou-se redução significativa para as linhagens L1 (39,17%) e WT (25,83%), enquanto uma diminuição não significativa da germinação foi encontrada para L2 (59,17%) e L3 (61,67%). O fenótipo das plantas após 15 dias de cultivo foi semelhante para *VuWRKY21-OE* (Figura S1) ou *VuWRKY87-OE* (Figura S2), variando apenas entre as concentrações de NaCl.

Tabela 1. Índice de germinação de linhagens de *Arabidopsis* superexpressando os genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob diferentes concentrações de NaCl: 0 mM, 100 mM e 200 mM.

Linhagem	Concentração de NaCl (mM)					
	<i>VuWRKY21</i>			<i>VuWRKY87</i>		
	0	100	200	0	100	200
WT	100 aA	83,33 aA	38,13 bB	100 aA	76,67 aA	25,83 bB
L1	100 aA	81,67 aA	54,58 aA	97,50 aA	79,00 aA	39,17 aB
L2	100 aA	62,50 aA	27,32 bcB	98,83 aA	86,67 aA	59,17 aA
L3	99,17 aA	69,75 aA	30,00 cB	99,17 aA	87,50 aA	61,67 aA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas em um mesma coluna não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem, de acordo como teste de Tukey ($p < 0.05$) *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas em um mesma linha não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem, de acordo como teste de Tukey ($p < 0.05$).

No ensaio de alongamento das raízes, houve uma redução significativa do tamanho das raízes com o aumento da concentração de sal considerando cada linhagem individualmente. Contudo, as linhagens transgênicas (L1, L2 e L3) portadoras dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87*, e a linhagem WT não apresentaram diferenças significativas no comprimento da raiz entre si para cada concentração de sal utilizada (Tabela 2). Embora não tenham sido observadas diferenças significativas entre as linhagens dentro de uma mesma concentração, os valores médios obtidos para o comprimento das raízes nas linhagens transgênicas foram superiores aos da linhagem WT em ambas as concentrações de NaCl (Tabela 2; Figs. S3 e S4).

Tabela 2. Valores médios para o comprimento da parte raiz (cm) de linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob diferentes concentrações de NaCl: 0, 100 e 200 mM.

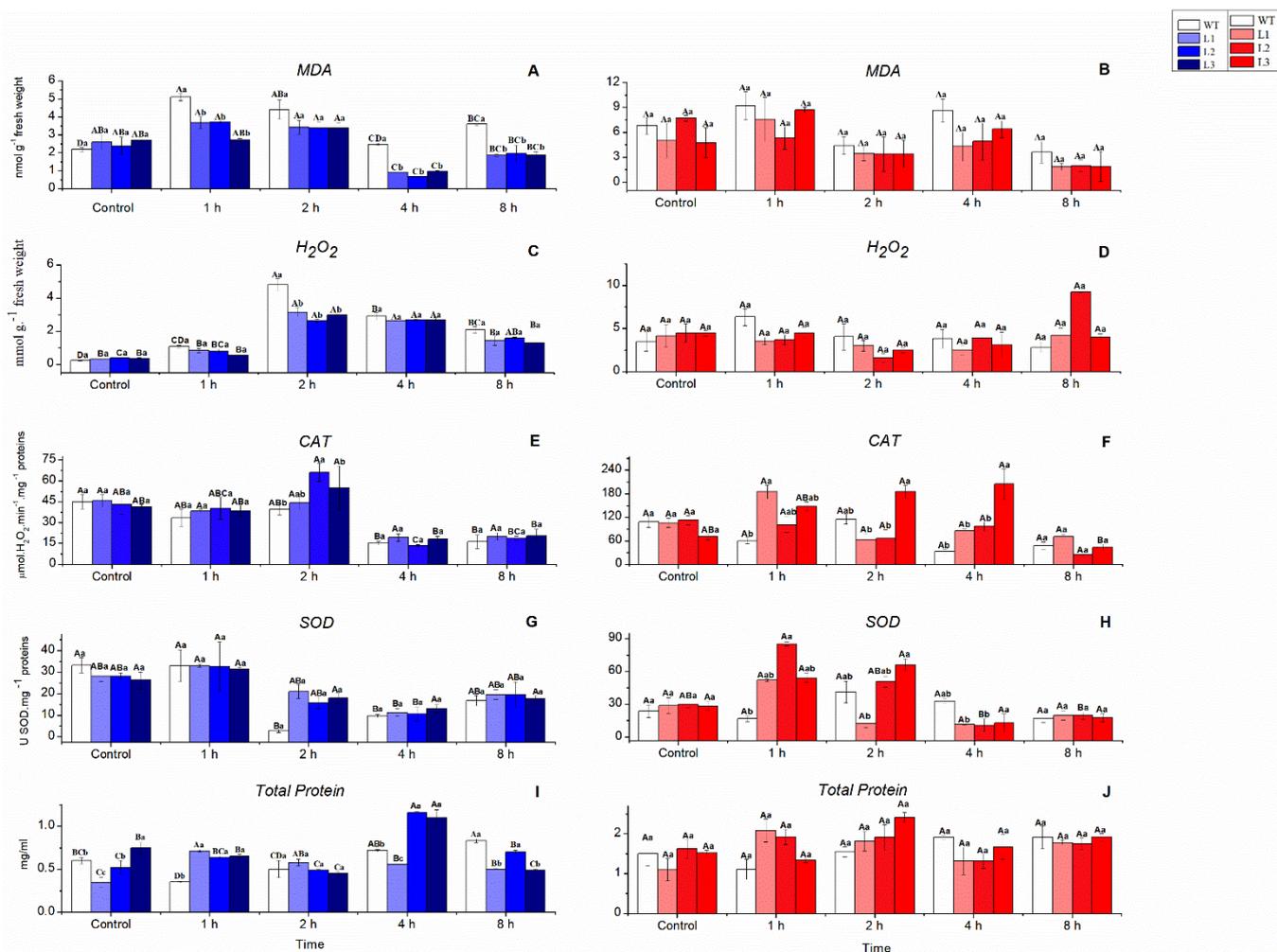
Linhagem	Concentração de NaCl (mM)					
	<i>VuWRKY21</i>			<i>VuWRKY87</i>		
	0	100	200	0	100	200
WT	2,00 aA	0,93 aB	0,17 aC	0,96 aA	0,74 aB	0,13 aC
L1	1,90 aA	1,07 aB	0,20 aC	0,93 aA	0,76 aB	0,16 aC
L2	1,97 aA	1,07 aB	0,20 aC	0,96 aA	0,76 aB	0,17 aC
L3	1,70 aA	1,00 aB	0,23 aC	0,96 aA	0,78 aB	0,18 aC

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas em um mesma coluna não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem, de acordo como teste de Tukey ($p < 0.05$) *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas em um mesma linha não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem, de acordo como teste de Tukey ($p < 0.05$).

Respostas bioquímicas

Para compreender as possíveis alterações bioquímicas que acompanham as modificações observadas acima, uma série de variáveis bioquímicas foram avaliadas nas linhagens transgênicas. Ao avaliar a resposta das linhagens *VuWRKY21-OE*, foi constatado que as plantas WT apresentou o maior conteúdo de MDA, em comparação a todas as linhagens *VuWRKY21-OE*, em todos os tempos de estresse, observando-se diferenças significativas para os tempos de 1, 4 e 8 h (Figura 1A). Os maiores valores foram observados nas duas primeiras horas de estresse (1 e 2 h). No tempo de 1 h houve um aumento de MDA de 33,87% em relação a média das linhagens transgênicas, no mesmo horário. Além disso, pôde-se observar que o MDA nas plantas WT no tempo de 1 h apresentou conteúdo maior que o dobro em relação ao tempo controle (Figura 1A). Embora tenha sido observada uma redução ao longo do tempo para todas as linhagens testadas, o conteúdo de MDA na WT continuou superior às demais linhagens, chegando a 65,91 e 47,10% maior, respectivamente nos tempos 4 e 8 h, em relação à média observada para as três linhagens transgênicas. Apesar de não terem sido constatadas diferenças significativas entre as plantas WT e as linhagens *VuWRKY87-OE*, os maiores conteúdos de MDA foram observados nas plantas WT para todos os tempos avaliados. Os maiores conteúdos de MDA foram constatados nos tempos de 1 e 4 h, nos quais as plantas WT tiveram um aumento no conteúdo de MDA cerca de 22 e 40%, respectivamente, em relação a média das três linhagens *VuWRKY87-OE* (Figura 1B).

Figura 1. Efeito do estresse salino no conteúdo de MDA (A), H_2O_2 (B), SOD (C), CAT (D) e proteínas totais (E), em linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando os genes *VuWRKY21* (azul) e *VuWRKY87* (vermelho) (L1, L2, L3) e na linhagem selvagem (WT), sob condições de salinidade nos tempos de 1, 2, 4, e 8 h. Letras minúsculas iguais não mostram diferença estatística entre as linhagens, de acordo com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, enquanto as mesmas letras maiúsculas não mostram diferença estatística entre os tempos observados.



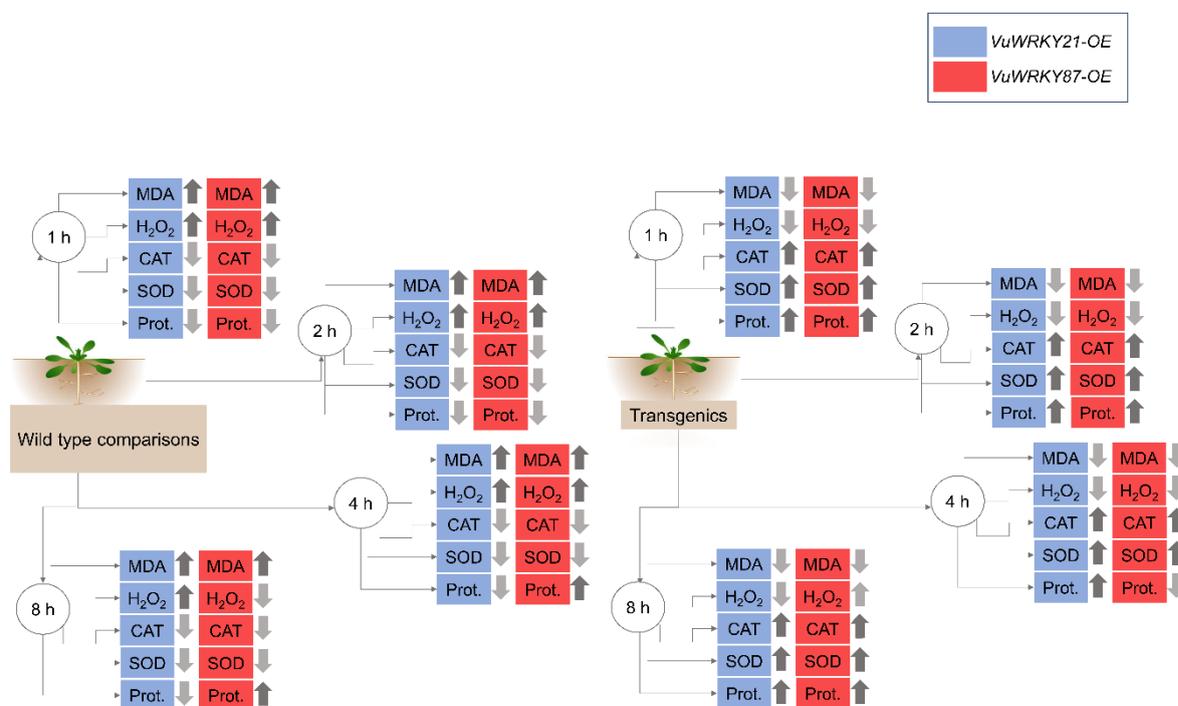
Os maiores conteúdos de H_2O_2 foram observados no tempo de 2 h, cerca de 30% maior nas plantas WT em relação às linhagens *VuWRKY21-OE*, sendo considerado um aumento significativo tanto entre os tempos quanto entre linhagens (Figura 1C). As plantas WT seguiram a tendência de aumento, porém não significativas, dos conteúdos de H_2O_2 nos tempos de 4 e 8 h, em cerca de 6,0% e 23,4% maiores, respectivamente, em relação ao conteúdo médio observado para as linhagens transgênicas. Para o conteúdo de H_2O_2 sob a influência do gene *VuWRKY87* não foram constatadas diferenças significativas entre as linhagens e os tempos avaliados. No entanto, nos tempos iniciais, 1 e 2 h, as plantas WT apresentaram um aumento nos conteúdos de H_2O_2 cerca de 28 e 31%, respectivamente, em relação à média das linhagens transgênicas nos referidos tempos (Figura 1D).

A maior atividade da catalase ocorreu nos tempos iniciais (1 e 2 h), tanto para a linhagem WT, quanto para as transgênicas *VuWRKY21-OE*, com destaque para o tempo de 2 h, no qual a atividade média da CAT nas linhagens transgênicas foi 39,80% maior que a observada nas plantas WT (Figura 1E). Após 4 e 8 h da imposição do estresse, a atividade específica da CAT para as linhagens *VuWRKY21-OE*, foram em média 10,36 e 21,42% maiores que a linhagem WT (Figura 1E). As plantas *VuWRKY87-OE* tiveram aumento significativo na atividade de CAT, em especial nos tempos de 1 e 4 h, nos quais ocorreram a maior atividade de CAT, ainda no tempo inicial (1 h) as plantas *VuWRKY87-OE* apresentaram um aumento médio de 140%, já no tempo de 4 h o aumento foi de mais de 290%, em comparação as plantas WT nos referidos tempos (Figura 1F).

Em *VuWRKY21-OE* e WT, a atividade da superóxido dismutase (SOD) diminuiu em 2 h (Figura 1G). Mesmo com a redução, as linhagens *VuWRKY21-OE* apresentaram atividade específica de SOD cinco vezes maior que as plantas WT em 2 h (Figura 1G). Em 4 e 8 h, as plantas WT mantiveram a tendência na redução (19,20 e 12,92%, respectivamente) da atividade da SOD, em relação à média das linhagens *VuWRKY21-OE*. Nas linhagens *VuWRKY87-OE*, a maior atividade de SOD ocorreu no estágio inicial (1 h e 2 h). Diferenças significativas na atividade média de SOD foram observadas entre plantas *VuWRKY87-OE* e WT em 1 h, com as linhagens transgênicas apresentando atividade SOD quase três vezes maior do que as plantas WT (Figura 1H).

Ao avaliar os efeitos do gene *VuWRKY21* nos primeiros três tempos de estresse (1, 2 e 4 h), o conteúdo de proteína total nas plantas WT foi menor que a média dos valores obtidos nas linhagens transformadas (Figura 1I), com destaque para a primeira hora de estresse, onde as plantas WT apresentaram 66,43% menor conteúdo de proteínas totais do que a média observada para as linhagens *VuWRKY21-OE* (Figura 1I). Não foram observadas diferenças significativas entre as plantas *VuWRKY87-OE* e WT considerando todos os tempos avaliados. No entanto, em 1 h após a imposição do estresse a média do conteúdo de proteínas nas plantas *VuWRK87-OE* foi cerca de 45% maior, em relação as plantas WT. De forma geral, as linhagens *VuWRKY21-OE* e *VuWRKY87-OE* apresentaram melhor desempenho em todos os parâmetros bioquímicos avaliados, em relação a WT, conforme sumarizado na Figura 2.

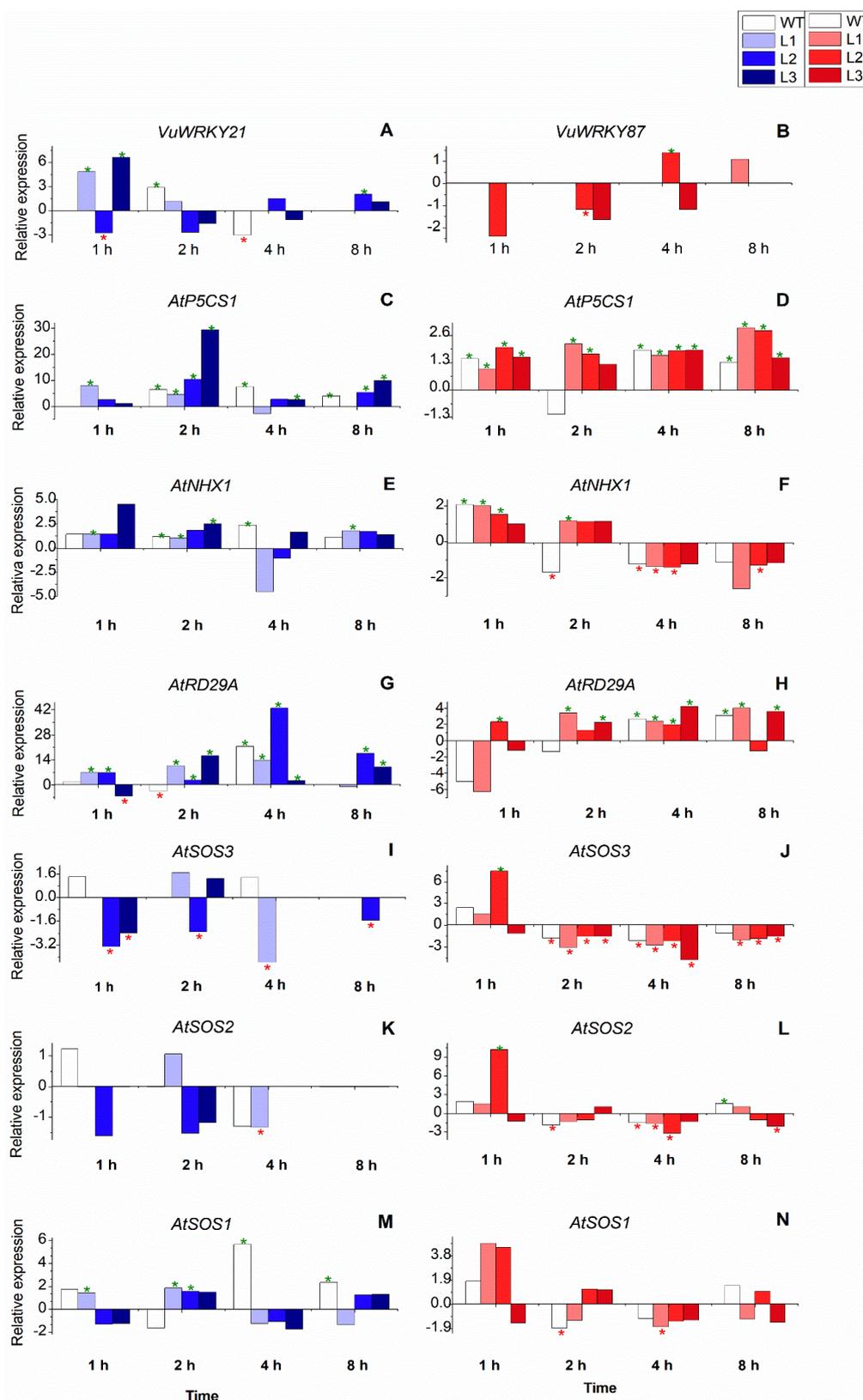
Figura 2. Sumário da resposta bioquímica para a média das plantas de *Arabidopsis thaliana* transgênicas e WT, sob os tempos de imposição do estresse salino avaliados. A direção da seta indica a tendência do resultado para cada variável, seta para cima maior e para baixo menor.



Efeitos da superexpressão do *VuWRKY21* e *VuWRKY87* em resposta ao estresse salino

Plantas transgênicas portadoras dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e não transformadas (WT) de *A. thaliana* foram avaliadas quanto à expressão diferencial (nos tempos de 1, 2, 4, e 8 h) dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* e de seis genes (*AtP5CS1*, *AtRB29A*, *AtNXH1*, *AtSOS1*, *AtSOS2* e *AtSOS3*) responsivos ao estresse salino e osmótico, atuantes em vias de sinalização e adaptação frente a condições de déficit hídrico e salinidade (Figura 3).

Figura 3. Expressão diferencial dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* e seis genes alvo em linhagens de *Arabidopsis thaliana* (L1, L2, L3) e na linhagem selvagem (WT), após estresse salino (200 mM de NaCl), nos tempos de 1, 2, 4 e 8 h. Genes identificados na cor azul foram avaliados sob a expressão do gene *VuWRKY21*-OE, Genes identificados na cor vermelha foram avaliados sob a expressão do gene *VuWRKY287* *Upregulated, em relação ao grupo controle *Downregulated, em relação ao grupo controle.



O gene *VuWRKY21* apresentou uma resposta diferencial precoce apenas nas linhagens transgênicas no tempo de 1 h, sendo *upregulated* nas linhagens L1 e L3, as quais obtiveram os maiores valores de expressão relativa desse gene, 4,65 e 6,62, respectivamente. Por outro lado, a L2 apresentou regulação negativa do gene *VuWRKY21* (-2,72) no tempo de 1 h e regulação positiva (2,05) apenas no tempo de 8 h. As plantas WT apresentaram modulação nos tempos de 1 e 8 h, porém observou-se uma modulação positiva (2,89) no tempo de 2 h e negativa (-3,03) 4 h após a imposição do estresse (Figura 3A). Com as plantas WT não são portadoras de genes *VuWRKY*, essa aparente modulação do gene *VuWRKY21* nas plantas de *Arabidopsis* não transformadas deve estar associada ao fato do *primer* utilizado nas análises de qPCR para o gene *VuWRKY21* ter anelado em um fragmento da sequência codificadora do gene *AtIG75810*, envolvido em diversas etapas do crescimento de *Arabidopsis*, em especial no crescimento foliar (Tabela S2) (Schmid et al., 2005). A possível modulação de *AtIG75810* não interfere em nossas análises, uma vez que o referido gene não está envolvido no processo de tolerância ao estresse salino. Por outro lado, o gene *VuWRKY87* foi modulado apenas na linhagem L2, sendo *downregulated* no tempo de 2 h, e *upregulated* em 4 h após a imposição do estresse (Figura 3B). Nas plantas WT, não houve expressão do transgene *VuWRKY87*, corroborando o fato dos primers utilizados para análise da expressão do gene *VuWRKY87* não terem anelado em nenhuma sequência do genoma de *A. thaliana* na análise *in silico* (Tabela S2).

A superexpressão dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* em *A. thaliana* sob condições de salinidade influenciou a expressão de todos os genes envolvidos em vias de mecanismos de tolerância a estresses abióticos analisados, os quais tiveram comportamentos distintos entre as linhagens e tempos analisados, conforme descrito a seguir.

O gene *AtP5CSI*, relacionado à biossíntese de prolina, apresentou resposta precoce para todas as linhagens transgênicas *VuWRKY21-OE*. L1 foi *upregulated* nos tempos de 1 h e de 2 h, enquanto L2 (10,49) e L3 (29,41) apresentaram os maiores níveis de expressão no tempo de 2 h, com valores correspondentes a expressões 1,63 e 4,58 vezes maiores em relação às plantas WT (6,42), cuja expressão diferencial também foi observada a partir de 2 h após a imposição do estresse (Figura 3C). Para plantas *VuWRKY87-OE*, *AtP5CSI* foi regulado positivamente em todas as linhagens e tempos, exceto para WT, L1 e L3, em 2 h. Em comparação com plantas WT, maiores níveis de expressão significativos foram observados nas linhas transgênicas L2 e L3 em (1 h), L2 em (2 h), L1, L2 e L3 em 8 h (Figura 3D). De forma semelhante, o gene *VuWRKY21* influenciou positivamente na regulação do gene *AtNXH1*, relacionado ao controle do potencial osmótico vacuolar nos tempos iniciais. L1 foi *upregulated* em 1, 2 e 8 h; L3 foi *upregulated* no tempo de 2 h, enquanto L2 apresentou uma tendência para ser *upregulated* em 1 e 2 h (Figura 3E). Para as linhagens *VuWRKY87-OE*, a regulação positiva do gene *AtNXH1* ocorreu principalmente no tempo de 1 h (WT, L1 e L2), sendo *upregulated* em 2 h apenas em L1. No entanto, apesar de não diferirem estatisticamente em relação ao grupo controle, os níveis de expressão relativa do gene *AtNXH1* no tempo de 2 h foi maior para as três linhagens transgênicas em comparação a WT. No tempo de 2 h, apenas as plantas WT foram *downregulated*. No tempo de 4 h, as linhagens L1, L2 e

WT foram *downregulated*, enquanto no tempo de 8 h os níveis de expressão seguiram a tendência do tempo anterior e L2 foi *downregulated* (Figura 3F).

O gene *AtRD29A*, responsivo ao estresse osmótico, considerando o transgene *VuWRKY21* também apresentou uma resposta precoce para as linhagens transgênicas. No tempo de 1 h, houve uma expressão relativa cerca de 4× maior para L1 e L2 quando comparado a WT, enquanto em L3 foi *downregulated*. No tempo de 2 h, as três linhagens foram *upregulated*, com destaque para L3, enquanto WT foi *downregulated*. No tempo de 4 h, foram observados os maiores níveis de expressão *upregulated* para WT, L1 e L2, embora L3 também tenha sido *upregulated* (Figura 3G). Para as plantas portadoras do gene *VuWRKY87*, o gene *AtRD29A* foi *upregulated* também de forma precoce, sendo L2 no tempo de 1 h, e L1 e L3 em 2 h, com ausência de expressão significativa para WT nestes tempos iniciais. No tempo de 4 h e de 8 h, todas as linhagens foram reguladas positivamente para o gene *AtRD29A* (Figura 3H), no quais apenas a L3 (8 h) não apresentou significância estatística em relação ao grupo controle.

As plantas portadoras do gene *VuWRKY21* apresentaram comportamento semelhante entre os genes presentes na via SOS (*Salt-Overly-Sensitive*). Para o gene *AtSOS3*, relativo à homeostase celular, as linhagens transgênicas não foram estatisticamente *upregulated*, observando-se uma tendência à regulação positiva apenas L1 e L2 no tempo de 2 h. Por outro lado, esse gene foi *downregulated* em L2 nos tempos de 1, 2 e 8 h; em L3 em 1 h, e em L1 em 4 h (Figura 3I). Para o gene *AtSOS2*, relacionado à fosforilação de proteínas quinase, houve uma tendência para uma regulação positiva apenas nas plantas WT (1 h) e na L1 (2 h), sendo *downregulated* nas linhagens transgênicas L1 (4 h) e uma tendência para regulação negativa para L2 (1 e 2 h), L3 (2 h) e WT (4 h), não havendo modulação da expressão após 8 h da imposição do estresse (Figura 3K). O gene *AtSOS1*, que gera um co-transportador de Na^+/H^+ da membrana plasmática, teve os maiores níveis de expressão nas linhagens transgênicas no tempo de 2 h, enquanto as plantas WT foram reguladas negativamente (-1,64). Em contrapartida, os maiores níveis de expressão para o gene *AtSOS1* nos tempos de 4 e 8 h, foram nas plantas WT, com valores de 5,64 e 2,34, respectivamente. No tempo de 4 h, todas as linhagens transgênicas apresentaram tendência para serem *downregulated* (Figura 3M).

A regulação da via SOS influenciada pelo gene *VuWRKY87* ocorreu especialmente nos tempos iniciais. O gene *AtSOS3* foi *upregulated* apenas no tempo de 1 h (L2 significativamente e L1 como tendência), sendo *downregulated* em todas as linhagens transgênicas nos tempos de 2, 4 e 8 h, assim como nas plantas WT nos tempos de 2 e 4 h. De forma semelhante ao *AtSOS3*, o maior nível de expressão do gene *AtSOS2* ocorreu significativamente no tempo de 1 h em L2, observando-se uma tendência para L1 (1 h) e L3 (2 h) (Figura 3J). *AtSOS2* foi *downregulated* em L1 e L2 (4 h), e em L3 (8 h). WT foi *downregulated* em 2 e 4 h e *upregulated* em 8 h (Figura 3L). Os maiores níveis de expressão de *AtSOS1* foram observados no tempo de 1 h para L1 e L2, apesar de não ter apresentado significância estatística, enquanto L3 apresentou uma tendência para modulação positiva no tempo de 2 h. WT (2 h) e L1 (4 h) foram *downregulated* (Figura 3N).

Discussão

Estresses abióticos, em especial o déficit hídrico e a salinidade, geralmente afetam a germinação, o crescimento e a produtividade dos vegetais, desencadeando uma série de alterações moleculares, fisiológicas e bioquímicas (Ullah et al., 2018). No presente estudo, foi analisada, pela primeira vez, a superexpressão de genes para fator de transcrição WRKY do feijão-caupi (*VuWRKY21* ou *VuWRKY87*) utilizando *A. thaliana* como modelo. Ambos os genes foram selecionados para o presente estudo por terem apresentado modulação positiva para o acesso tolerante de feijão-caupi sob estresse por desidratação radicular, contudo, portando comportamentos diferentes. O gene *VuWRKY21* apresentou uma forte modulação apresentando um *fold change* variando de 79,22 em T25 a 185,74 em T100 no acesso tolerante quando submetido ao estresse, enquanto *VuWRKY87* apresentou sua máxima modulação de 32,02 em T75 para o mesmo acesso e condições (Matos et al., 2022). No presente trabalho, foi observada em *A. thaliana* a ativação da modulação bioquímica e de genes relacionados à tolerância ao estresse salino, sob efeito da superexpressão dos genes *VuWRKY21* e *VWRKY87*, sugerindo sua contribuição para o aumento da eficiência dos mecanismos de tolerância ao estresse salino.

Sabe-se que o aumento da razão raiz/parte aérea contribui para a tolerância à salinidade por maximizar a absorção de água (Munns & Tester, 2008). No presente trabalho, a presença de NaCl desencadeou uma redução tanto da germinação quanto do desenvolvimento das plântulas. No entanto, de modo geral, na concentração mais alta de sal (200 mM), as linhagens *VuWRKY21-OE* e *VuWRKY87-OE* apresentaram uma tendência de aumento do comprimento da raiz e um índice de germinação significativamente maior, como observado para a linhagem L1 superexpressando o gene *VuWRKY21* e para as três linhagens de *VuWRKY87*. Resultados semelhantes foram observados por Ullah et al. (2018), no qual plantas de *Arabidopsis* superexpressando o gene *GhWRKY6-like* também apresentaram um melhor desempenho na taxa de germinação e no alongamento das raízes na concentração de 200 Mm de NaCl.

Elevados conteúdos de MDA possuem relação diretamente proporcional ao aumento dos danos na membrana, causados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) e, observando-se, por consequência, uma redução da tolerância à salinidade (Bandeoglu et al., 2004; Shafiq et al., 2019). Em nosso estudo foi possível constatar que a linhagem WT apresentou conteúdo de MDA mais elevado em todos os tempos de exposição ao sal em relação à média observada para as três linhagens transgênicas sob superexpressão do gene *VuWRKY21*, enquanto para as linhagens *VuWRKY87-OE*, houve também uma redução, porém não significativa. Os presentes resultados indicam que o menor conteúdo de MDA observado nas linhagens transgênicas parece estar relacionado à superexpressão dos genes *VuWRKY*, com destaque para *VuWRKY21*, semelhante ao reportado para outros WRKY, como *GhWRKY6* (Ullah et al., 2018), *TaWRKY46* (Li et al., 2020), *GmWKRY21* e *GmWRKY54* (Zhou et al., 2008) que, ao serem superexpressos em *Arabidopsis*, conferiram tolerância a estresses abióticos, regulando positivamente diversas vias de defesa, como as envolvidas na regulação da homeostase celular.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ERO moderadamente reativa, que tem a capacidade de difundir-se livremente através das membranas. É considerado um importante sinalizador intracelular para várias vias associadas a mecanismos de tolerância, como fechamento estomático, formação de ligações transversais na parede celular, entre outros (Anwar et al., 2021; Silva et al., 2021). Contudo, quando o conteúdo de H_2O_2 ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, seu acúmulo pode causar estresse oxidativo e gerar toxicidade para as plantas (Mansoor et al., 2022). No presente trabalho, de modo semelhante ao MDA, o conteúdo de H_2O_2 apresentou valores mais baixos nos tempos iniciais de 1 h e/ou 2 h, após a imposição do estresse salino, para *VuWRKY-OE*, com destaque para as linhagens *VuWRKY21*, que em 2 h apresentaram conteúdo de H_2O_2 cerca de 30% mais baixo em relação aos valores médios observados para a linhagem WT. Estes resultados indicam um melhor desempenho das linhagens transgênicas sob estresse salino.

Diversas estratégias são utilizadas por plantas para desintoxicar a célula das EROs (Foyer & Noctor, 2009), incluindo a síntese de compostos de baixo peso molecular e enzimas antioxidantes (Foyer & Noctor, 2005), como a catalase, por exemplo, que é considerada uma das enzimas mais importantes na regulação intracelular nos conteúdos de peróxido frente a estresses abióticos (Cavalcante et al., 2018). Nos tempos iniciais, foi constatada a maior atividade específica da catalase (CAT), sendo em média 40% maior nas linhagens portadoras do gene *VuWRKY21* que a observada na linhagem WT para o tempo de 2 h, e em média 140% maior no tempo de 1 h em relação a WT para as linhagens portadoras de *VuWRKY87*, ou seja, a atividade específica da CAT foi inversamente proporcional ao valor do conteúdo de H_2O_2 nas plantas transgênicas.

As superóxidos dismutases (SOD) também representam uma das primeiras formas de resposta contra EROs. O acúmulo de Na^+ e Cl^- em plantas tende a modular as atividades desta e de outras enzimas antioxidantes, uma vez que dismutam o $O_2^{\cdot-}$. Assim, é importante que a atividade específica da SOD esteja em sincronia com a atividade da CAT, uma vez que o produto da dismutação do $O_2^{\cdot-}$ pela SOD é o H_2O_2 , e o seu acúmulo é tão prejudicial quanto o do $O_2^{\cdot-}$. Tais efeitos do estresse oxidativo estão relacionados a diversos processos degenerativos, como fotoinibição, fotoxidação nos cloroplastos, inativação de enzimas, degradação de pigmentos fotossintéticos, peroxidação de lipídeos de membrana e danos ao DNA (Ahanger et al., 2017; Singh et al., 2022; Willadino et al., 2017; Zulfiqar & Ashraf, 2021). Essa sincronia pôde ser observada em nosso estudo, em especial para as plantas portadoras do gene *VuWRKY21* no tempo de 2 h, no qual foi observado maior atividade da SOD (valor médio, 557,43%) e da CAT (39,55%) e menor conteúdo de H_2O_2 (29,51%) nas plantas transgênicas em relação à WT. De forma semelhante a maior atividade de SOD nas plantas portadoras do gene *VuWRKY87* ocorreu nos tempos iniciais, uma hora após a imposição do estresse houve um aumento de 280% de SOD, na média das linhagens transgênicas em relação a WT.

A menor disponibilidade de nutrientes observada em especial nas plantas sensíveis aos estresses abióticos, como carboidratos, substratos necessários para o crescimento do vegetal pode gerar redução do conteúdo de proteínas, devido ao aumento da proteólise (Akbari et al., 2022). O aumento da expressão

das proteínas pode indicar um possível redirecionamento do metabolismo celular para a síntese de compostos envolvidos em processos biológicos diversos, como o acúmulo de reservas e/ou defesa (Carli et al., 2012). De forma semelhante à resposta enzimática, as linhagens *VuWRKY21-OE* apresentaram conteúdo de proteína total médio 66% maior em relação a WT no tempo de 1 h, observando-se também uma tendência de aumento *VuWRKY87-OE*, com aumento médio de 45% em 1 h após a imposição do estresse. Os presentes resultados reforçam a hipótese de atuação dos *VuWRKY21* e *VuWRKY87* no processo de tolerância às condições de salinidade. Quando cultivadas sob estresse salino, o excesso de NaCl tende a induzir aumento da proteólise e diminuição de síntese de proteínas nas plantas, contudo, no presente estudo, essa característica de redução na concentração de proteínas não foi observada para as plantas transgênicas, indicando que a superexpressão dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* está relacionada à proteção da planta contra o efeito nocivo da salinidade (Das & Majumder, 2019).

A identificação de genes estresse-responsivos e a análise de expressão são os primeiros passos para o entendimento dos mecanismos de tolerância a condições ambientais adversas, como a salinidade (Joshi et al., 2018), constituindo etapas importantes para a produção de plantas transgênicas, com melhor desempenho em ambientes adversos (Wani et al., 2021). Segundo Matos et al. (2022), diversos WRKY do feijão-caupi estão associados a genes ortólogos de diversas espécies, como soja e arroz, envolvidos em vias de sinalização relacionadas à tolerância a estresses abióticos, demonstrando a importância dessa família de genes nos mecanismos de tolerância (Yang et al., 2018). Dentre eles, destacam-se os *VuWRKY18* e 21 que são ortólogos do gene *AtWRKY40* envolvido na sinalização do ABA (Shang et al., 2010). Por outro lado, o *VuWRKY87*, também expresso diferencialmente sob estresse de desidratação radicular no feijão-caupi, não apresentou ortologia com genes de nenhuma das espécies utilizadas por Matos et al. (2022) em suas comparações, sendo sua atividade em vias de tolerância a estresse abiótico estudada no presente trabalho.

O *AtP5CS1* é um gene chave na biossíntese de prolina, por codificar a Δ 1-pirrolina-5-carboxilato (P5CS). A prolina é produzida a partir do ácido glutâmico, usando as enzimas P5CS e pirrolina-5-carboxilato redutase (Turchetto-Zole et al., 2009) e desempenha funções cruciais na tolerância das plantas às condições de estresse. Destaca-se por atuar na conservação do potencial osmótico sob condições de déficit hídrico (Chen et al., 2021a) e promover equilíbrio redox das células, eliminação de EROs (Mansoor et al., 2022) e regulação do pH citosólico, agindo, desta forma, como agente protetor para a função das enzimas (Garg & Neha, 2019; Furlan et al., 2020). A regulação positiva do gene *AtP5CS1* mediada pelos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* corrobora com estudos, nos quais, a superexpressão de genes WRKY oriundos de diversas espécies regularam positivamente a expressão do gene *AtP5CS1* em *A. thaliana* sob estresse abiótico, como é o caso de *VvWRKY30*, de *Vitis vinifera* (L.) (Zhu et al., 2019); *TaWRKY93* e *TaWRKY46*, de *Triticum aestivum* (L.) (Li et al., 2020; Qin et al., 2015), e *CsWRKY26* de *Camellia sinensis* (L.) (Chen et al., 2021a).

O gene *AtRD29A*, presente em vias independentes de ABA, é responsivo ao estresse osmótico (Thiery et al., 2004), porém codifica uma proteína hidrofílica, de função ainda desconhecida (Ullah et

al., 2018). No presente trabalho, *AtRD29A* também apresentou expressão positiva precoce nas linhagens transgênicas de ambos os genes quando comparados à WT, como relatado anteriormente para plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando genes WRKY sob condições de estresse salino. Como exemplos, citam-se *CmWRKY17* de *Chrysanthemum morifolium* (L.) (Li et al., 2015); *GhWRKY34* de *G. hirsutum* (Zhou et al., 2015); *GhWRKY6* de *G. hirsutum* (Ullah et al., 2018), e *VvWRKY30* de *V. vinifera* (Zhu et al., 2019).

Os genes *NHXs*, em especial *NHX1* e *NHX2*, são regulados positivamente em diversas espécies de plantas sob salinidade contribuindo para a tolerância a esta condição (Julkowska & Testerink, 2015). O gene *AtNHX1* codifica uma proteína envolvida no controle do potencial osmótico vacuolar em *Arabidopsis*, atuando no transporte de Na^+ para o vacúolo a partir do citosol e participando como uma “trocadora” de $\text{K}^+(\text{Na}^+)/\text{H}^+$ no tonoplasto celular (Ismail & Horie, 2017). Plantas de *Arabidopsis* superexpressando *AtNHX1* apresentaram melhor crescimento e desenvolvimento em condições de estresse salino, sendo relatado que tal situação ocorre, dentre outros fatores, pela codificação dos genes *AtNHX1* para vários transportadores de membrana no xilema e no floema (Hussain et al., 2021; Pabuayon et al., 2021). Em *Glycine max* a tolerância ao sal foi associada à superexpressão dos genes *NHX1* e *NHX2* (Köster et al., 2019; Yousefirad et al., 2020). No presente trabalho, também foi observada uma tendência de regulação positiva precoce do gene *AtNHX1* para as linhagens *VuWRKY21-OE* e *VuWRKY87-OE*.

Em *Arabidopsis* a homeostase de íons é mantida principalmente por mediação da via SOS (*Salt-Overly-Sensitive*), caracterizando-a como um importante sistema regulatório para a sobrevivência das plantas sob estresse salino. O excesso de Na^+ e a alta osmolaridade são detectados separadamente por sensores desconhecidos no nível da membrana plasmática, que induzem um aumento no Ca^{2+} citosólico (Procino et al., 2015; Zhu, 2002). O aumento de íons é detectado pela SOS3 (proteína de ligação ao cálcio), que após ligação ao Ca^{2+} ativa a SOS2 (proteína quinase serina/treonina) e, assim, o complexo proteico SOS3-SOS2 ativado fosforila a proteína SOS1, um co-transportador de Na^+/H^+ da membrana plasmática, resultando no efluxo de íons Na^+ em excesso (Goyal et al., 2021). No presente trabalho, a resposta dos três genes da via SOS foi heterogênea para as linhagens transgênicas sob superexpressão de ambos os genes *VuWRKY*. De modo geral, os genes apresentaram tendência de regulação positiva precoce nos tempos de 1 h e/ou 2 h, e de regulação negativa nos de 4 h e/ou 8 h, assim como por exemplo para *AtSOS3* (*VuWRKY87-OE*) no tempo de 2 h.

Embora o estresse hídrico e o estresse salino possam causar respostas bioquímicas e fisiológicas semelhantes, como estresse osmótico, acúmulo de ABA e de vários osmólitos, toxicidade iônica e estresse oxidativo, a maioria dos esforços tem se concentrado na análise da homeostase celular do íon durante o estresse salino, como o caminho mais direto para os mecanismos moleculares nas plantas (Chen et al., 2021b). Após a percepção do estresse salino, um pico de Ca^{2+} gerado no citoplasma de células radiculares ativa a cascata de transdução de sinais da via SOS para proteger as células de danos causados pelo acúmulo de excessivo de íons. Por meio da análise da expressão gênica em *Arabidopsis*

superexpressando os genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87*, foi possível constatar o aumento nos níveis de expressão relativa de genes envolvidos nas vias de sinalização e resposta ao estresse salino de forma precoce nas linhagens transgênicas, corroborando com os resultados obtidos por Ullah et al. (2018) e Kang et al. (2021), nos quais genes WRKY superexpressos em *Arabidopsis* atuaram na regulação positiva de genes responsivos à salinidade.

Com base em análises bioquímicas e moleculares, o presente estudo revelou que a superexpressão dos *VuWRKY87* e *VuWRKY21* contribuiu para a ativação de genes relacionados aos mecanismos de tolerância ao estresse salino, embora as linhagens superexpressando o gene *VuWRKY21* tenham apresentado melhor resposta bioquímica principalmente no que se refere à redução do conteúdo de MDA e de H₂O₂. Os presentes dados sugerem que ambos os genes participam da via de sinalização de estresse salino no feijão-caupi, com diferentes formas de atuação, corroborando a relação da expressão diferencial de *VuWRKY87* e *VuWRKY21* e o aumento da tolerância a estresse por desidratação radicular observada no feijão-caupi, reportada previamente por Matos *et al.* (2022). O desempenho satisfatório dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* em *Arabidopsis* sugere que o feijão-caupi é portador e pode ser considerado fonte de genes relacionados a mecanismos de tolerância a estresse abiótico.

Contribuições por autor

Joelson Germano Crispim, Elenilson dos Santos Souza, Marina Ferreira Antunes, Valesca Pandolfi, Marciana Bizerra de Moraes e Ana Christina Brasileiro-Vidal, idealizaram e planejaram os experimentos. Ana Maria Benko-Iseppon, Michael Timko, Valesca Pandolfi e Ana Christina Brasileiro-Vidal supervisionaram os ensaios. Joelson Germano Crispim, Elenilson dos Santos Souza e Marina Ferreira Antunes executaram os experimentos. Joelson Germano Crispim, Marciana Bizerra de Moraes e José Ribamar Costa Ferreira-Neto analisaram os dados. Joelson Germano Crispim escreveu o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito final.

Agradecimentos

Joelson Crispim e Elenilson Santos gostariam de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão das bolsas. Ana Christina Brasileiro-Vidal gostaria de agradecer à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo financiamento do projeto (APQ-0556-5.01/15). José Ribamar Costa Ferreira-Neto agradece a FACEPE pela bolsa de estudos (BFP). Ana Christina Brasileiro-Vidal e Ana Maria Benko-Iseppon agradecem ao CNPq pelas bolsas de produtividade em pesquisa.

Declaração de disponibilidade de dados

O compartilhamento de dados não é aplicável a este artigo, pois todos os novos dados criados já estão contidos neste artigo

Referências

- Abdelrahman, M., Jogaiah, S., Burritt, D.J. & Tran, L.S.P. (2018) Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. *Plant, Cell & Environment*, 41(9), 1972-1983.
- Abiala, M.A., Abdelrahman, M., Burritt, D. J. & Tran, L.S.P. (2018) Salt stress tolerance mechanisms and potential applications of legumes for sustainable reclamation of salt-degraded soils. *Land Degradation & Development*, 29(10), 3812-3822.
- Ahanger, M.A., Tomar, N.S., Tittal, M., Argal, S. & Agarwal, R. (2017) Plant growth under water/salt stress: ROS production; antioxidants and significance of added potassium under such conditions. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(4), 731-744.
- Akbari, B., Baghaei-Yazdi, N., Bahmaie, M. & Mahdavi Abhari, F. (2022) The role of plant-derived natural antioxidants in reduction of oxidative stress. *BioFactors*. <https://doi/10.1002/biof.1831>
- Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S. & Karanov, E. (2001) The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant, Cell & Environment*, 24(12), 1337-1344.
- Amin, I., Rasool, S., Mir, M.A., Wani, W., Masoodi, K.Z. & Ahmad, P. (2021) Ion homeostasis for salinity tolerance in plants: A molecular approach. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 578-594.
- Amorim, M R., Mendes, L.W., Antunes, J.E.L., de Souza Oliveira, L.M., Melo, V.M.M., Oliveira, F.A.S., Aquino, J., P., Rocha, S.M.B., Pereira, A.P.A., Costa, A.F., Oliveira, J.P., Araujo, F.F., Figueiredo, M.V.B. & Araujo, A.S.F. (2022) Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. *Applied Soil Ecology*, 172, 104354.
- Anwar, K., Joshi, R., Dhankher, O.P., Singla-Pareek, S.L. & Pareek, A. (2021) Elucidating the response of crop plants towards individual, combined and sequentially occurring abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 6119.
- Bakshi, M. & Oelmüller, R. (2014) WRKY transcription factors: Jack of many trades in plants. *Plant signaling & behavior*, 9(2), e27700.
- Bandeoğlu, E., Eyidoğan, F., Yücel, M. & Öktem, H.A. (2004) Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 69-77.
- Baptista, A., Pinho, O., Pinto, E., Casal, S., Mota, C. & Ferreira, I. M. (2017) Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 11(2), 442-450.
- Bechtold, N. & Bouchez, D. (1995) In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. In: Potrykus, I. & Spangenberg, G. (Eds.) Gene transfer to plants (pp. 19-23). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
- Brady, S.M., Orlando, D.A., Lee, J.Y., Wang, J.Y., Koch, J., Dinneny, J.R., Mace, D., Ohler, U. & Benfey, P.N. (2007) A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science*, 318(5851), 801-806.
- Brozynska, M., Furtado, A. & Henry, R.J. (2016) Genomics of crop wild relatives: expanding the gene

- pool for crop improvement. *Plant Biotechnology Journal*, 14(4), 1070-1085.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L. & Wittwer, C.T. (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cavalcante G.M.M., Lacerda M.M.J., Medeiros A.S.M., Camara, T., Willadino, L. & Ulisses, C. (2018) Response to in vitro salt stress in sugarcane is conditioned by concentration and condition of exposure to NaCl. *Acta Biológica Colombiana*, 23(1), 30-38.
- Chen, W., Zheng, C., Yao, M. & Chen, L. (2021) The tea plant *CsWRKY26* promotes drought tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. *Beverage Plant Research*, 1(1), 1-11.a
- Chen, X., Ding, Y., Yang, Y., Song, C., Wang, B., Yang, S., Guo, Y. & Gong, Z. (2021) Protein kinases in plant responses to drought, salt, and cold stress. *Journal of Integrative Plant Biology*, 63(1), 53-78.b
- Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743.
- Cruz, C.D. (2013). Genes: a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 35(3), 271-276.
- Dai, W., Wang, M., Gong, X. & Liu, J.H. (2018). The transcription factor *FcWRKY 40* of *Fortunella crassifolia* functions positively in salt tolerance through modulation of ion homeostasis and proline biosynthesis by directly regulating *SOS2* and *P5CS1* homologs. *New Phytologist*, 219(3), 972-989.
- Das, P. & Majumder, A.L. (2019) Transcriptome analysis of grapevine under salinity and identification of key genes responsible for salt tolerance. *Functional & integrative genomics*, 19(1), 61-73.
- Di Carli, M., Benvenuto, E. & Donini, M. (2012). Recent insights into plant–virus interactions through proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 11(10), 4765-4780.
- Dong, J., Chen, C. & Chen, Z. (2003) Expression profiles of the *Arabidopsis WRKY* gene superfamily during plant defense response. *Plant Molecular Biology*, 51(1), 21-37.
- Dong, Q., Zheng, W., Duan, D., Huang, D., Wang, Q., Liu, C., Li C., Gong, X., Li, C., Mao, K. & Ma, F. (2020) *MdWRKY30*, a group IIa WRKY gene from apple, confers tolerance to salinity and osmotic stresses in transgenic apple callus and *Arabidopsis* seedlings. *Plant Science*, 299, 110611.
- Foyer, C.H. & Noctor, G. (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *The Plant Cell*, 17(7), 1866-1875.
- Foyer, CH. & Noctor, G. (2009) Redox regulation in photosynthetic organisms: signaling, acclimation, and practical implications. *Antioxidants & Redox Signaling*, 11(4), 861-905.
- Furlan, A.L., Bianucci, E., Giordano, W., Castro, S. & Becker, D.F. (2020) Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 151, 566-578.
- Garg, G. & Neha, P. (2019). Plant transcription factors networking of pyrroline-5-carboxylate (p5c) enzyme under stress condition: A review. *Plant Archives*, 19(2), 562-569
- Giannopolitis, C.N. & Ries, S.K. (1977) Superoxide dismutases: I. Occurrence in higher plants. *Plant Physiology*, 59(2), 309-314.

- Goyal, V., Jhanghel, D. & Mehrotra, S. (2021) Emerging warriors against salinity in plants: Nitric oxide and hydrogen sulphide. *Physiologia Plantarum*, 171(4), 896-908.
- Han, D., Xu, T., Han, J., Liu, W., Wang, Y., Li, X., Sun, x., Wang, X., Li, T. & Yang, G. (2021) Overexpression of *MxWRKY53* increased iron and high salinity stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 1-13.
- Havir, E.A. & McHale, N. A. (1987) Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiology*, 84(2), 450-455.
- Heath, R.L. & Packer, L. (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of biochemistry and biophysics*, 125(1), 189-198.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z. & Verma, D.P.S. (2000) Removal of feedback inhibition of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology*, 122(4), 1129-1136.
- Hussain, S., Hussain, S., Ali, B., Ren, X., Chen, X., Li, Q., Saqib, M. & Ahmad, N. (2021) Recent progress in understanding salinity tolerance in plants: Story of Na^+/K^+ balance and beyond. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 239-256.
- Ismail, A.M. & Horie, T. (2017) Genomics, physiology, and molecular breeding approaches for improving salt tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 68, 405-434.
- Joshi, R., Singla-Pareek, S.L. & Pareek, A. (2018) Engineering abiotic stress response in plants for biomass production. *Journal of Biological Chemistry*, 293(14), 5035-5043.
- Joshi, R., Wani, S.H., Singh, B., Bohra, A., Dar, Z.A., Lone, A.A., Pareek, A. & Singla-Pareek, S.L. (2016) Transcription factors and plants response to drought stress: current understanding and future directions. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1029.
- Julkowska, M.M. & Testerink, C. (2015) Tuning plant signaling and growth to survive salt. *Trends in Plant Science*, 20(9), 586-594.
- Kang, G., Yan, D., Chen, X., Yang, L. & Zeng, R. (2021) *HbWRKY82*, a novel IIC WRKY transcription factor from *Hevea brasiliensis* associated with abiotic stress tolerance and leaf senescence in *Arabidopsis*. *Physiologia Plantarum*, 171(1), 151-160.
- Köster, P., Wallrad, L., Edel, K.H., Faisal, M., Alatar, A.A. & Kudla, J. (2019) The battle of two ions: Ca^{2+} signalling against Na^+ stress. *Plant Biology*, 21, 39-48.
- Li, X., Tang, Y., Zhou, C., Zhang, L. & Lv., J. (2020) A wheat WRKY transcription factor *TaWRKY46* enhances tolerance to osmotic stress in transgenic *Arabidopsis* plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4), 1321.
- Lv, B., Wu, Q., Wang, A., Li, Q., Dong, Q., Yang, J., Zhao, H., Wang, X., Chen, H. & Li, C. (2020). A WRKY transcription factor, *FtWRKY46*, from Tartary buckwheat improves salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 147, 43-53.
- Msanne, J., Lin, J., Stone, J.M. & Awada, T. (2022) Characterization of abiotic stress-responsive *Arabidopsis thaliana* *RD29A* and *RD29B* genes and evaluation of transgenes. *Planta*, 234, 97-107.
- Mansoor, S., Ali, W.O., Lone, J.K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A. & Ahmad, P. (2022) Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. *Antioxidants*, 11(2), 225.
- Maruyama, K., Urano, K., Yoshiwara, K., Morishita, Y., Sakurai, N., Suzuki, H., Kojima, M., Sakakibara, H., Shibata, D., Saito, K., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2014) Integrated

- analysis of the effects of cold and dehydration on rice metabolites, phytohormones, and gene transcripts. *Plant Physiology*, 164(4), 1759-1771.
- Matos, M.K., Benko-Iseppon, A.M., Bezerra-Neto, J.P., Ferreira-Neto, J.R.C., Wang, Y., Liu, H., Pandolfi, V., Amorim, L.L.B., Wiladino, L., Amorim, T.C.V., Kido, E.A., Vianello, P.R., Timko, M.P. & Brasileiro-Vidal, A.C. (2022) The WRKY transcription factor family in cowpea: Genomic characterization and transcriptomic profiling under root dehydration. *Gene*, 146377.
- Merwad, A.R.M., Desoky, E.S.M. & Rady, M.M. (2018) Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. *Scientia Horticulturae*, 228, 132-144.
- Murasnige, T. & Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tohaoco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15(3), 473-497.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. & Kimura, T. (2007) Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1), 34-41.
- Opoku, V.A., Yawson, D.O., Asare, P.A., Afutu, E., Kotochi, M.C., Amoah, K.K. & Adu, M.O. (2022) Root hair and rhizosphere traits contribute to genetic variation and phosphorus use efficiency in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Rhizosphere*, 21, 100463.
- Pabuayon, I.C.M., Jiang, J., Qian, H., Chung, J.S. & Shi, H. (2021) Gain-of-function mutations of *AtNHX1* suppress *sos1* salt sensitivity and improve salt tolerance in *Arabidopsis*. *Stress Biology*, 1(1), 1-19.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. & Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research*, 30(9), e36-e36.
- Procino, G., Gerbino, A., Milano, S., Nicoletti, M.C., Mastrofrancesco, L., Carosino, M. & Svelto, M. (2015) Rosiglitazone promotes AQP2 plasma membrane expression in renal cells via a Ca²⁺-dependent/cAMP-independent mechanism. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 35(3), 1070-1085.
- Qin, Y., Tian, Y. & Liu, X. (2015). A wheat salinity-induced WRKY transcription factor *TaWRKY93* confers multiple abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464(2), 428-433.
- Raso, A. & Biassoni, R. (2014). Twenty years of qPCR: a mature technology? In *Quantitative Real-Time PCR* (pp. 1-3). Humana Press, New York, NY.
- Ravelombola, W., Shi, A., Weng, Y., Mou, B., Motes, D., Clark, J., Chen, P., Srivastava, V., Qin, J., Dong, L., Yang, W., Bhattarai, G. & Sugihara, Y. (2018) Association analysis of salt tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) at germination and seedling stages. *Theoretical and Applied Genetics*, 131(1), 79-91.
- Shafiq, S., Akram, N.A. & Ashraf, M. (2019) Assessment of physio-biochemical indicators for drought tolerance in different cultivars of maize (*Zea mays* L.). *Pakistan Journal of Botany*, 51(4), 1241-1247.
- Shang, Y., Yan, L., Liu, Z.Q., Cao, Z., Mei, C., Xin, Q., Wu, F.Q., Wang, X.F., Du, S.Y., Jiang, T., Zhang, X.F., Zhao, R., Sun, H.L., Liu, R., Yu, Y.T. & Zhang, D.P. (2010) The Mg-chelatase H subunit of *Arabidopsis* antagonizes a group of WRKY transcription repressors to relieve ABA-

- responsive genes of inhibition. *The Plant Cell*, 22(6), 1909-1935.
- Silva, P.C.C., Azevedo-Neto, A.D., Gheyi, H.R., Ribas, R.F., Silva, C.R.R. & Cova, A.M.W. (2021) Seed priming with H₂O₂ improves photosynthetic efficiency and biomass production in sunflower plants under salt stress. *Arid Land Research and Management*, 1-15.
- Singh, R., Misra, A.N. & Sharma, P. (2022). Genome wide transcriptional response of contrasting genotypes of industrial crop castor to As (V) stress: Identification of genes and mechanisms associated with As (V) tolerance. *Industrial Crops and Products*, 179, 114678.
- Tang, R.J, Yang Y., Yang L., Liu h., Wang C.T., Yu M.M., Gao X.S. & Zhang H.X. (2014) Poplar calcineurin B-like proteins *PtCBL10A* and *PtCBL10B* regulate shoot salt tolerance through interaction with PtSOS2 in the vacuolar membrane. *Plant, cell & environment*, 37(3), 573-88.
- Thiery, L., Leprince, A.S., Lefebvre, D., Ghars, M.A., Debarbieux, E. & Savoré, A. (2004) Phospholipase D is a negative regulator of proline biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 14812-14818.
- Turchetto-Zolet, A.C., Margis-Pinheiro, M. & Margis, R. (2009) The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Molecular Genetics and Genomics*, 281(1), 87-97.
- Ullah, A., Sun, H., Yang, X. & Zhang, X. (2018) A novel cotton WRKY gene, *GhWRKY6*-like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum*, 162(4), 439-454.
- Wani, S.H., Anand, S., Singh, B., Bohra, A. & Joshi, R. (2021) WRKY transcription factors and plant defense responses: latest discoveries and future prospects. *Plant Cell Reports*, 40(7), 1071-1085.
- Willadino, L., Camara, T.R., Ribeiro, M.B., Amaral, D.O.J., Suassuna, F. & Silva, M.V.D. (2017) Mechanisms of tolerance to salinity in banana: Physiological, biochemical, and molecular aspects. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39.
- Wu, M., Zhang, K., Xu, Y., Wang, L., Liu, H., Qin, Z. & Xiang, Y. (2022) The moso bamboo WRKY transcription factor, *PheWRKY86*, regulates drought tolerance in transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 170, 180-191.
- Xiang, X.Y., Chen, J., Xu, W.X., Qiu, J.R., Song, L., Wang, J.T., Tang, R., Chen, D., Jiang C.Z. & Huang, Z. (2021) Dehydration-Induced WRKY Transcriptional Factor *MjWRKY70* of *Myrothamnus flabellifolia* Enhanced Drought and Salinity Tolerance in Arabidopsis. *Biomolecules*, 11(2), 327.
- Yan, H., Jia, H., Chen, X., Hao, L., An, H. & Guo, X. (2014) The cotton WRKY transcription factor *GhWRKY17* functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production. *Plant and Cell Physiology*, 55(12), 2060-2076.
- Yang, X., Li, H., Yang, Y., Wang, Y., Mo, Y., Zhang, R., Jianxiang, M., Wei, C. & Zhang, X. (2018) Identification and expression analyses of WRKY genes reveal their involvement in growth and abiotic stress response in watermelon (*Citrullus lanatus*). *Plos One*, 13(1), e0191308.
- Yousefirad, S., Soltanloo, H., Ramezanpour, S.S., Zaynali Nezhad, K. & Shariati, V. (2020) The RNA-seq transcriptomic analysis reveals genes mediating salt tolerance through rapid triggering of ion transporters in a mutant barley. *Plos One*, 15(3), e0229513.
- Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F.R., Zhang, J. & He, X.Q. (2012) An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 647-650.

- Zhou, L., Wang, N.N., Gong, S.Y., Lu, R., Li, Y. & Li, X.B. (2015) Overexpression of a cotton (*Gossypium hirsutum*) WRKY gene, *GhWRKY34*, in *Arabidopsis* enhances salt-tolerance of the transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 96, 311-320.
- Zhou, Q.Y., Tian, A.G., Zou, H.F., Xie, Z.M., Lei, G., Huang, J., Wang, C.M, Wang, H., W., Zhang, J.S. & Chen, S.Y. (2008) Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnology Journal*, 6(5), 486-503.
- Zhu, D., Hou, L., Xiao, P., Guo, Y., Deyholos, M.K. & Liu, X. (2019) *VvWRKY30*, a grape WRKY transcription factor, plays a positive regulatory role under salinity stress. *Plant Science*, 280, 132-142.
- Zhu, H., Jiang, Y., Guo, Y., Huang, J., Zhou, M., Tang, Y., Sui, J., Wang, J. & Qiao, L. (2021) A novel salt inducible WRKY transcription factor gene, *AhWRKY75*, confers salt tolerance in transgenic peanut. *Plant Physiology and Biochemistry*, 160, 175-183.
- Zhu, L., Li, S., Ouyang, M., Yang, L., Sun, S., Wang, Y., Cai, X., Wu, G. & Li, Y. (2022) Overexpression of watermelon *CIWRKY20* in transgenic *Arabidopsis* improves salt and low-temperature tolerance. *Scientia Horticulturae*, 295, 110848.
- Zulfiqar, F. & Ashraf, M. (2021) Bioregulators: unlocking their potential role in regulation of the plant oxidative defense system. *Plant Molecular Biology*, 105(1), 11-41

5 ARTIGO 2 - EFEITOS DA SUPEREXPRESSÃO DO GENE *VuWRKY21* DO FEIJÃO-CAUPI EM *Arabidopsis thaliana* SOB DÉFICIT HÍDRICO

Joelson Germano Crispim¹; Elenilson dos Santos Souza¹; Vanessa Emanuelle Pereira Santos¹; Victor Alves da Costa¹; Valesca Pandolfi¹; Cláudia Ulisses²; Marciana Bizerra de Moraes²; Ana Maria Benko-Iseppon¹; Ana Christina Brasileiro-Vidal^{1*}

¹Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Melhoramento Genético de Plantas, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

* Corresponding author: ana.vidal@ufpe.br

Resumo: Sob condições de deficiência hídrica (DH), as plantas utilizam uma rede regulatória de genes envolvidos na tolerância ao estresse, com destaque para a família WRKY. O objetivo do presente trabalho foi analisar os efeitos da superexpressão do gene *VuWRKY21* de feijão-caupi em *Arabidopsis thaliana* após DH, mediante análises fisiológicas e bioquímicas. Plantas de *Arabidopsis* transformadas com o gene *VuWRKY21* e plantas selvagens (WT), foram submetidas ao estresse por DH, considerando-se três grupos: i) grupo controle, incluindo plantas hidratadas a cada três dias, por 15 dias; ii) grupo reidratado, com irrigação suspensa por 15 dias, reidratadas e coletadas após dois dias, e iii) grupo tratado, com DH por 15 dias. Foram avaliados parâmetros fisiológicos e bioquímicos. De modo geral, as plantas transformadas apresentaram melhor performance no que se refere às médias de número de folhas, diâmetro da roseta e peso da roseta. Apresentaram maior atividade de CAT (60 % e 120%, nos grupos DH e reidratado, respectivamente) e da SOD (70%, após reidratação) em relação às plantas WT. Plantas transformadas também mostraram um conteúdo de proteínas totais duas vezes maior na condição DH. Por outro lado, os conteúdos de H₂O₂ foram 20% superiores nas plantas WT em ambas as condições. Os resultados demonstram uma melhoria nos parâmetros fisiológicos e bioquímicos de *Arabidopsis* superexpressando o gene *VuWRKY21*, constatando a importância desse gene para o aumento da tolerância ao déficit hídrico.

Palavras-chave: Bioquímica, fator de transcrição, fisiologia, *Vigna unguiculata*.

Abstract: Under water deficit (WD) conditions, plants have been used a regulatory gene network involved in stress tolerance, standing out the WRKY family. Our work aimed to analyze the effects of overexpression of the cowpea *VuWRKY21* gene in *Arabidopsis* after HD, using physiological and biochemical analyses. *Arabidopsis* plants transformed with the *VuWRKY21* gene and wild plants (WT) were subjected to WD stress, considering three groups: i) control group, including plants hydrated every three days for 15 days; ii) rehydrated group, with irrigation suspended for 15 days, rehydrated, and collected after two days, and iii) treated group, with WD for 15 days. Physiological parameters and biochemical parameters were evaluated. Overall, transformed plants showed better performance regarding the means of NF, DR and PR. They showed higher CAT (60% and 120%, in the WD and rehydrated, respectively) and SOD (70%, after rehydration) activities in relation to WT plants. Transformed plants also showed a two times more total protein content. On the other hand, H₂O₂ contents were 20% higher in WT plants for both conditions. The results showed an improvement in the physiological and biochemical parameters of *Arabidopsis* overexpressing the *VuWRKY21* gene, confirming the importance of this gene for increasing tolerance to water deficit.

Keywords: Biochemistry, physiology, transcription factor, *Vigna unguiculata*.

Introdução

As plantas são expostas a diversas condições de estresse bióticos e abióticos, as quais interferem de forma negativa no seu crescimento e desenvolvimento. Dentre os estresses abióticos, o déficit hídrico (DH) é um dos mais prejudiciais (Yadav et al., 2021). Tal condição, pode acarretar em perdas entre 50 a 70% na produtividade das culturas, podendo atingir cerca de 40% da população mundial (Mishra et al., 2020). Estimativas apontam que, até o ano de 2030, cerca de 700 milhões de pessoas sejam afetadas diretamente devido aos baixos índices pluviométricos (Jia et al., 2021).

Sob condições de deficiência hídrica, as plantas respondem mediante uma série de mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares (Haddoudi et al., 2021). Os aspectos morfológicos envolvem alterações no fenótipo da planta, tais como alterações no comprimento e número de brotos, de folhas e raízes, assim como na biomassa da planta. Fisiologicamente, ocorre uma diminuição nas taxas fotossintéticas e de transpiração, ocasionadas pelo fechamento estomático, culminando em um decréscimo do conteúdo relativo de água (TRA) nos tecidos foliares. Além disso, o DH influencia na fotossíntese mediante redução das taxas de assimilação de CO₂ nas folhas, nos conteúdos de clorofila, carotenoides e pigmentos acessórios (Yadav et al., 2021; Yang et al., 2021). A nível bioquímico, ocorre um alto nível de peroxidação lipídica, o que promove o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Lau et al., 2015; Singhal et al., 2021). A nível molecular, vários produtos de genes reguladores, como *MAPKs*, *HD-*zip*/bZIP*, *AP2/ERF*, *NAC*, e *WRKY*, atuam como fatores de transcrição (FTs) na regulação da expressão de genes responsivos ao déficit hídrico, podendo contribuir para a tolerância das plantas (Piao et al., 2019; Yang et al., 2021).

Fatores de transcrição atuam como proteínas reguladoras capazes de reconhecer especificamente elementos de ação *cis*, desempenhando um papel crucial na regulação da expressão de genes responsivos ao DH (Singhal et al., 2015). Diferentes tipos de FTs

apresentam papéis vitais na resposta das plantas ao estresse hídrico (Hong et al., 2016; Garcia et al., 2018; Piao et al., 2019). A família WRKY destaca-se com uma das maiores famílias de reguladores transcricionais em plantas (Bakshi e Oelmüller, 2014). É nomeada devido à presença do domínio “WRKYGQK”, altamente conservado, que interage especificamente com a sequência W-box de regiões promotoras dos genes alvos (Eulgem et al., 2000), incluindo genes de plantas responsivos a estresses. Os FTs WRKY apresentam papel fundamental na regulação de genes funcionais a jusante ou outros genes reguladores, participando do processo de regulação de várias atividades fisiológicas e bioquímicas em plantas (Yang et al., 2021).

Com o avanço dos estudos genômicos e transcriptômicos, a identificação e utilização de genes funcionais e regulatórios associados ao mecanismo de tolerância de plantas a condições ambientais desfavoráveis é cada vez mais presente em programas de melhoramento genético (Yang et al., 2022). A superexpressão dos genes *GhWRKY17* (Yan et al., 2014); *AhWRKY75* (Zhu et al., 2021); *ZmWRKY79* (Gulzar et al., 2021); *PheWRKY86* (WU et al., 2022); *ItfWRKY70* (Sun et al., 2022), por exemplo, conferiu tolerância ao déficit hídrico em *Arabidopsis*, reduzindo os níveis de ABA, assim como aumentou a expressão de genes envolvidos na eliminação de EROs, como por exemplo, *APX*, *CAT* e *SOD*.

Em feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], 25 genes WRKY foram diferencialmente expressos sob condição de deficiência hídrica, dos quais, *VuWRKY21* apresentou indução após 25 min de imposição do estresse (Matos et al., 2022). O feijão-caupi é uma das mais importantes leguminosas cultivadas. É considerada uma boa fonte de proteínas, carboidratos, fibras, ferro, zinco e quantidades substanciais de compostos bioativos (Oyeyinka et al., 2013; Rengadu et al., 2020; Adjei-Fremah et al., 2019; Oyeyinka et al., 2020).

Tendo em vista o importante papel dos genes WRKY na regulação de genes responsivos a estresse abióticos, o presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos fisiológicos e bioquímicos da superexpressão do gene *VuWRKY21* de feijão-caupi em *A. thaliana* em resposta

ao déficit hídrico.

Metodologia

Obtenção do vetor contendo o gene de interesse e transformação genética

Regiões codificantes do gene *VuWRKY21* foram mobilizadas no vetor de entrada pENTR/D-TOPO (Invitrogen, Grand Island, NY), sob o controle do promotor constitutivo 35S do Vírus do Mosaico da Couve-flor (CaMV). Essa construção (pENTR/D-TOPO-VuWRKY) foi recombinada com o plasmídeo pGWB6 (Nakagawa et al., 2007) por reação de recombinação LR (Gateway LR Clonase Enzyme mix; Invitrogen, Grand Island, NY) resultando no plasmídeo pGWB-VuWRKY21. As porções gênicas de pENTR/D-TOPO-VuWRKY foram sequenciadas para confirmar a integridade do gene introduzido.

O plasmídeo foi inserido, por eletroporação, em células competentes de *Agrobacterium tumefaciens* (LBA4404) e as colônias recombinantes foram selecionadas em meio sólido YEB contendo 50 mg/L de kanamicina, 67,5 mg/L rifampicina e 50 mg/L de streptomicina. Colônias positivas foram isoladas e crescidas em meio líquido YEB + antibióticos a 28°C até a saturação. O DNA plasmidial foi extraído de acordo com o protocolo do kit “GeneJET Plasmid Miniprep Kit” (Thermo Scientific, Glen Burnie, MD). A confirmação do gene *VuWRKY21* foi realizada por PCR. As colônias positivas foram selecionadas, crescidas em meio líquido e armazenadas a -80°C em solução de 15% de glicerol até seu uso.

O DNA plasmidial das células recombinantes foi extraído utilizando o kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Scientific, Glen Burnie, MD). A presença do gene *VuWRKY21* foi confirmada por PCR em uma reação contendo 2 µL de tampão da enzima 10x; 0,5 µL de dNTPs (10 mM); 1,0 µL de cada primer (10 µM) para RNAm do gene *VuWRKY21* (807 pb) *forward* (ATGGAACCAACATGCTT) e *reverse* (TTACCATTTGGCCTCTAG), 1-2 µL de *A. tumefaciens*; 0,5 µL de Taq-polimerase em um volume final de 20 µL de água destilada. A

reação foi programada para 94°C por 4 min, seguidos por 35 ciclos de: 94°C por 30 s; 55°C por 30 s e 72°C por 30 s , além de 72°C por 5 min finais. Plantas de *A. thaliana* (ecotipo Columbia; Col-0) foram transformadas pelo método de imersão floral como descrito por Clough and Bent (1998), modificado por Bechtold and Bouchez (1993), usando a construção supracitada.

Estabelecimento das gerações de *A. thaliana* transformadas

As sementes (geração T1) das plantas potencialmente transgênicas (da geração T0) para o gene *VuWRKY21* foram coletadas e armazenadas a 4°C até a utilização. As sementes foram desinfestadas em solução de hipoclorito de sódio 0,2% e Tween-20 0,1%, seguido por cinco lavagens em água destilada autoclavada. Em seguida, procedeu-se o processo de vernalização das sementes, realizado em microtubos de 1,5 mL contendo 0,5 mL de água estéril a 4°C por 48 h. Posteriormente, as sementes foram transferidas para o meio de cultura seletivo MS (Murashige & Skoog, 1962) sólido contendo: tiamina (1,0 mg/L), sacarose (3%), ágar (6,0 g/L), pH ajustado para 5,8 (antes da autoclavagem) e suplementado com kanamicina e higromicina (50 mg/L cada) como os agentes seletivos (adicionados após autoclavagem).

Decorridos 15 dias da inoculação no meio MS, as plântulas com no mínimo quatro folhas foram transferidas individualmente para vasos de 80 mL, contendo uma mistura de substrato comercial (condicionador floeiras -Forth®) e vermiculita (1:1), e cobertas por sacos plásticos, para aclimação. As plantas foram mantidas em sala de crescimento, sob condições controladas de fotoperíodo (12 h) e temperatura (21°C), com irrigação a cada três dias. Após duas semanas de cultivo, as regas foram intercaladas com adição de solução de NPK 20-20-20 (1,0 g/L). Cada planta foi considerada um evento transgênico.

Análise de segregação e confirmação da transformação

Plantas *VuWRKY21* na geração T1 potencialmente transgênicas foram cultivadas na presença de antibióticos e analisadas por PCR convencional, para confirmar a inserção do

transgene. Após confirmação das linhagens transgênicas, seguiu-se o avanço das gerações. Para cada evento transgênico, 150 sementes T3 foram germinadas em placas MS seletiva, conforme descrito acima. Eventos com pelo menos 90% das sementes germinadas e quatro folhas na roseta, após 15 dias de cultivo, foram considerados homozigotos. Os controles positivo e negativo consistiram de 150 sementes do tipo selvagem (WT), cultivadas nas mesmas condições das linhagens de eventos transgênicos, variando apenas quanto à ausência e presença dos agentes seletivos (canamicina e higromicina, 50 mg/L cada), respectivamente.

Teste de germinação

Sementes provenientes de plantas WT e de três linhagens transgênicas, em homozigose para o gene *VuWRKY21*, foram utilizadas no teste de germinação. As sementes foram inoculadas de acordo com os passos supracitados, variando apenas em relação a concentração de Manitol (0, 100, 200, 300 e 500 mM). Essa análise foi realizada com auxílio do microscópio estereoscópio, mediante contagem do número de sementes germinadas por dia, durante uma semana. O experimento foi realizado em triplicata, cada uma composta por 40 sementes das três linhagens em homozigose para o gene *VuWRKY21* (L1, L2 e L3) e das plantas WT.

Ensaio de déficit hídrico

Para os ensaios de déficit hídrico foram utilizadas plantas de três eventos transgênicos, em homozigose para o gene *VuWRKY21*, e WT, as quais foram inoculadas, aclimatadas e cultivadas seguindo passos descritos no item “Estabelecimento das gerações de *Arabidopsis thaliana* transformadas”.

Após 28 dias da aclimação, as plantas foram divididas em três grupos: i) grupo controle, com irrigação a cada três dias, durante 15 dias; ii) grupo tratado, com irrigação suspensa por 15 dias, e iii) grupo reidratado, com irrigação suspensa por 15 dias, reidratadas e

coletadas após dois dias. A coleta consistiu na retirada das folhas das rosetas, as quais foram submersas em nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas a -80°C . O experimento consistiu de 12 tratamentos (linhagens x grupos, 4 x 3), cada um com três réplicas biológicas, sendo cada réplica composta por 20 plantas para as análises bioquímicas. Em todos os ensaios as plantas foram cultivadas em sala de crescimento, sob condições controladas de fotoperíodo (16 h) e temperatura de 21°C .

Análises fisiológicas

No momento das coletas, foram avaliados os seguintes parâmetros: Número de Folhas (NF), Diâmetro da Roseta (DR, cm), Peso da Roseta (Pro, g), Peso da Raiz (PR, g), Comprimento da Raiz (CR, cm) e o conteúdo de Massa Seca da Roseta (TMS, g). Para essa análise, as rosetas foram coletadas e mantidas em estufa de ventilação a 60°C por 4 h ou até que não houvesse mais variação de peso por três coletas consecutivas. O conteúdo de massa seca foi avaliado utilizando a seguinte equação: $(100 * \text{PRO}_{\text{Final}} / \text{PRO}_{\text{Inicial}})$.

Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e de malondialdeído (MDA)

O conteúdo do peróxido de hidrogênio foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001) e a peroxidação lipídica determinada de acordo com Heath and Packer (1968), com modificações. A reação foi determinada por meio da produção de MDA, um metabólito reativo ao ácido 2-tiobarbitúrico (TBA).

Testes enzimáticos e quantificação de proteína solúvel

A quantificação das proteínas solúveis totais (PST) foi realizada empregando-se a metodologia descrita por Bradford (1976). Para a determinação da atividade da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD) foram utilizadas as metodologias propostas por Havir and Mchale (1987) e Giannopolitis & Ries (1977), respectivamente.

Análise Estatística

Os dados foram testados quanto à sua normalidade pelo teste de Lilliefors e homogeneidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Em seguida, foi realizada a análise de variância (ANOVA) em um arranjo fatorial 4 x 5 (linhagens x concentrações de Manitol), para os ensaios de alongamento e germinação, e 4 x 3 (linhagens x três grupos), para o ensaio de déficit hídrico, seguido pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Para a análise estatística do índice de germinação, os valores foram transformados usando a fórmula $\arcseno \sqrt{x}$ (%). Todos os dados foram analisados pelo programa estatístico Genes (Cruz, 2013).

Resultados

Testes de germinação

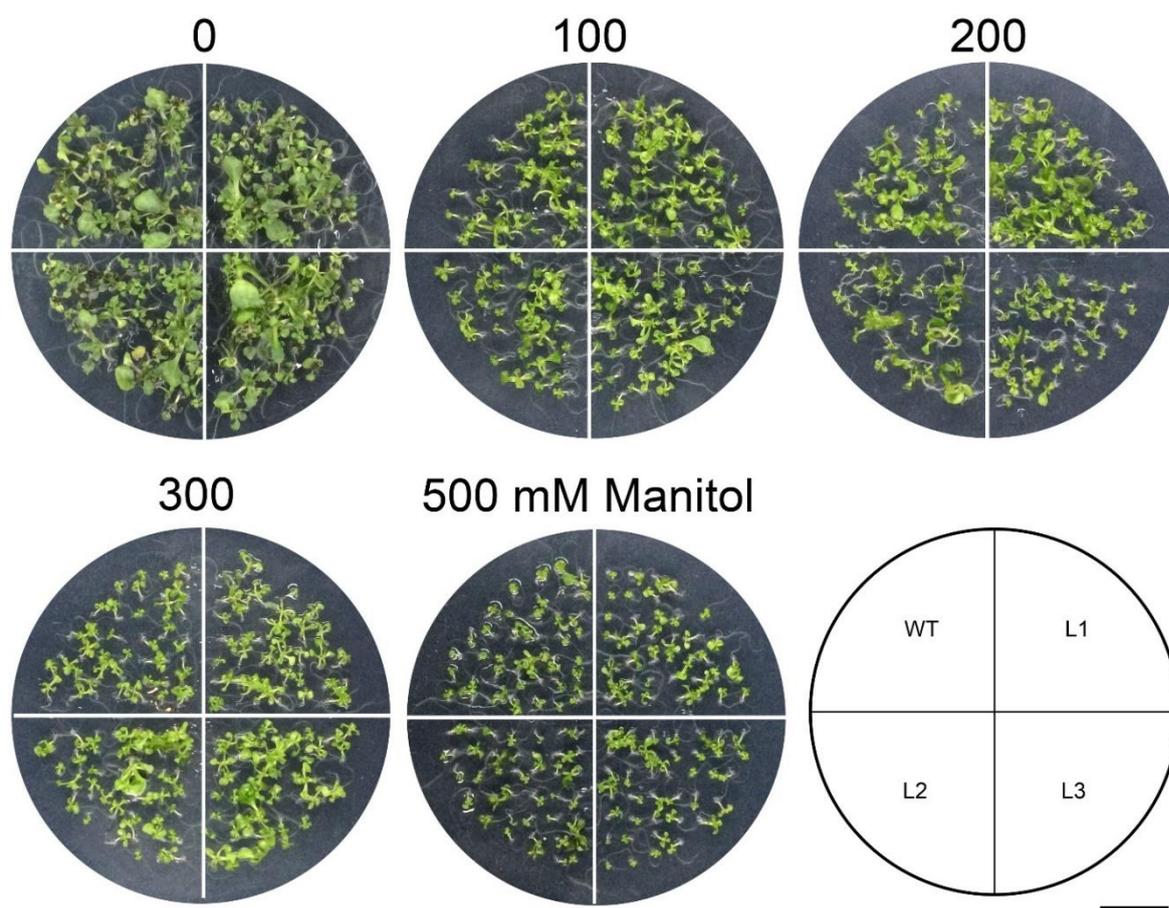
A taxa de germinação foi inversamente proporcional à concentração de manitol nas plantas WT, observando-se 100% de germinação na ausência de manitol e 79,16% e 82,50%, nas concentrações de 300 e 500 mM, respectivamente. Por outro lado, nas linhagens transgênicas não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações testadas (Tabela 1; Figura 1).

Tabela 1. Taxa de germinação de linhagens de *Arabidopsis* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob diferentes concentrações de Manitol (0, 100, 200, 300 e 500 mM).

Linhagem	Concentrações de Manitol				
	0	100	200	300	500
WT	100,0 aA	94,17 aAB	96,67 aAB	79,16 aB	82,50 aB
L1	99,17 aA	96,67 aA	95,00 aA	90,00 aA	92,50 aA
L2	99,17 aA	95,83 aA	98,33 aA	87,50 aA	93,33 aA
L3	100,0 aA	98,33 aA	95,83 aA	95,00 aA	97,50 aA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem. *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem.

Figura 1. Desenvolvimento de plântulas de linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT), germinadas sob diferentes concentrações de manitol (0, 100, 200, 300 e 500 mM), após 15 dias de cultivo.



Análises fisiológicas

Ao considerar as respostas fisiológicas das plantas transgênicas e WT sob déficit hídrico, foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) para número de folhas, tamanho e peso da roseta (Tabela 2). Com relação ao número de folhas, as linhagens transgênicas e selvagem foram semelhantes estatisticamente dentro de cada grupo, com exceção de L2 que apresentou um maior número de folhas após rehidratação. Contudo, observa-se que, em relação ao grupo controle, L1 e L3 foram semelhantes estatisticamente, enquanto WT e L2 apresentaram redução significativa do número de folhas sob déficit hídrico (suspensão de rega por 15 dias) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores médios para o número de folhas, diâmetro da roseta, peso da roseta, teor de massa seca, peso e comprimento da raiz e linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) sob três diferentes condições: controle (Cont.) Tratado (Trat.) e reidratado (Reid.).

	Número de Folhas (NF)			Diâmetro da Roseta (DR)			Peso da roseta (PRO)			Teor de Massa seca (TMS)			Peso da Raiz (PR)			Comprimento da raiz (CR)		
	Cont	Trat.	Reid.	Cont	Trat.	Reid.	Cont	Trat.	Reid.	Cont	Trat.	Reid.	Cont	Trat.	Reid.	Cont	Trat.	Reid.
WT	15,33	8,00	12,00	5,00	2,26	2,47	0,14	0,02	0,05	34,46	29,96	19,62	0,02	0,02	0,02	5,86	9,30	9,20
	aA	aB	bAB	aA	aB	aB	aA	aB	aB	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA
L1	11,33	10,67	12,33	3,77	2,83	3,07	0,08	0,041	0,07	15,15	16,08	10,51	0,01	0,01	0,01	7,93	9,766	12,13
	aA	aA	bA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	7 a A	aA
L2	14,33	11,00	20,00	5,53	2,97	3,90	0,13	0,057	0,14	14,40	13,25	10,35	0,01	0,01	0,02	7,30	6,80	8,90
	aA	aB	aA	aA	aB	aAB	aA	aB	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA
L3	12,33	9,00	14,33	4,40	1,87	3,23	0,12	0,05	0,08	23,03	26,37	13,69	0,016	0,01	0,01	8,27	8,17	9,73
	aA	aA	abA	aA	aB	aAB	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA	aA

*Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na vertical não diferem estatisticamente entre si para um mesmo grupo. *Médias seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na horizontal não diferem estatisticamente entre si para uma mesma linhagem.

No que diz respeito ao diâmetro da roseta (DR), também foi observada uma redução significativa tanto para WT quanto para L2 e L3 na condição de déficit hídrico e após reidratação. Por outro lado, L1 apresentou comportamento semelhante estatisticamente ao grupo controle para ambas as condições (Tabela 2). Para o peso da roseta (PR), houve uma redução significativa para WT sob ambas as condições de déficit hídrico em relação ao grupo controle, enquanto as linhagens transgênicas foram semelhantes estatisticamente ao controle, com exceção de L2, que apresentou um redução significativa após 15 dias de déficit hídrico (Tabela 2).

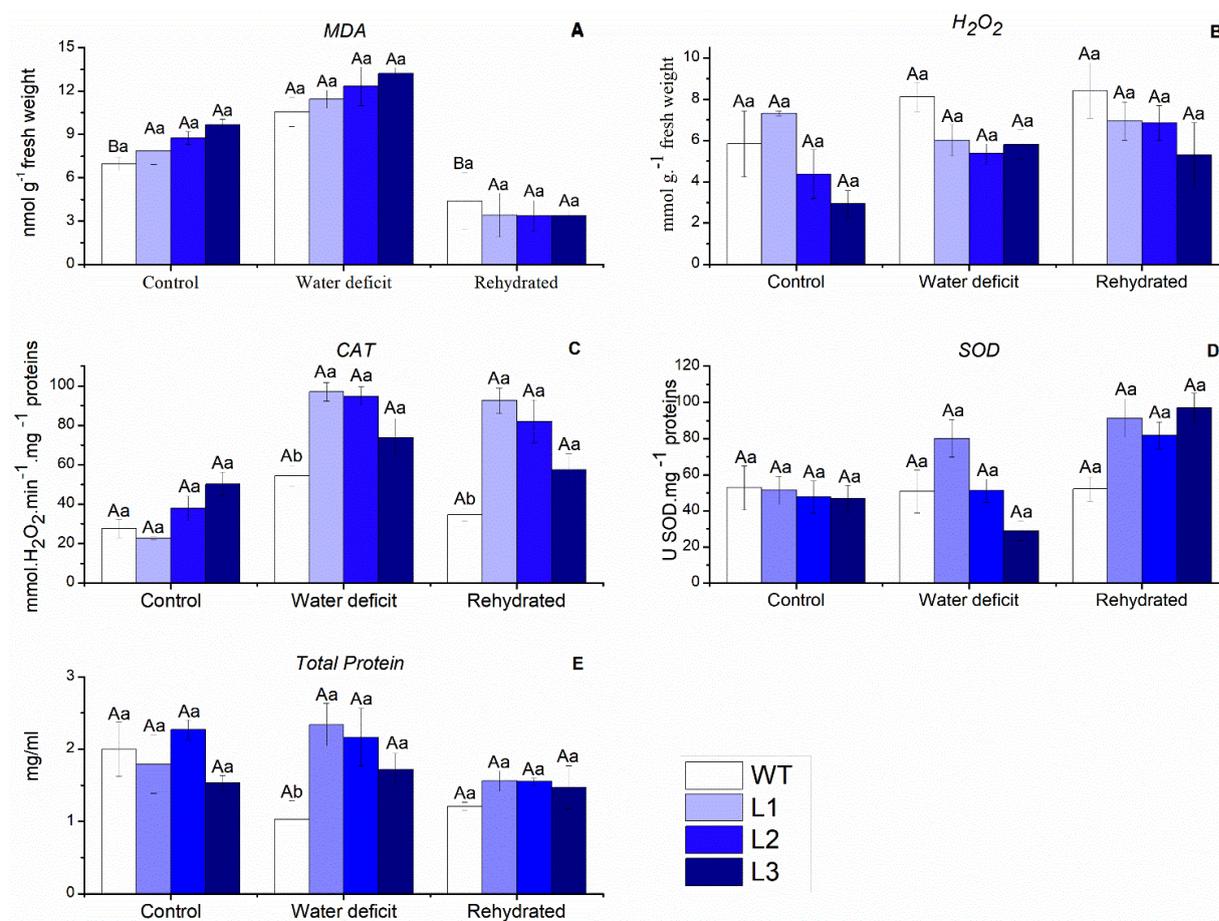
Para as variáveis de conteúdo de massa seca (TMS), peso da raiz (PR) e comprimento da raiz (CR), não foram constatadas diferenças significativas entre as médias obtidas para as linhagens transgênicas e WT, em nenhuma das condições impostas: controle, déficit hídrico e reidratação (Tabela 2).

Análises bioquímicas

Foram avaliados cinco parâmetros bioquímicos nas quatro linhagens nas três condições analisadas. Com relação ao conteúdo de MDA, não foram constatadas diferenças estatísticas para o conteúdo de MDA, entre as médias das plantas WT e das linhagens transgênicas portadoras do gene *VuWRKY21* em nenhuma das condições testadas, embora tenha sido observado um aumento significativo na WT após 15 dias de déficit hídrico. De modo geral, reassalta-se um aumento dos valores na condição de déficit hídrico e uma redução na reidratada, embora em ambos os casos não significativos. Nesse última condição, destaca-se uma redução média de 23% no conteúdo de MDA nas linhagens transgênicas em relação às plantas WT (Figura 2A). Para o conteúdo de H₂O₂, também não houve diferença significativa entre os tratamentos. Com exceção de L1, de modo geral, foi observado um aumento nos valores de H₂O₂ nas condições de déficit hídrico e reidratada, mas ressalta-se que, em ambas as condições,

o conteúdo de H_2O_2 foi cerca de 20% maior nas plantas WT em relação à média das linhagens transgênicas portadoras do gene *VuWRK21* (Figura 2B).

Figura 2. Conteúdo de MDA (A), H_2O_2 (B), SOD (C), CAT (D) e proteínas totais (E), em linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e na linhagem selvagem (WT), sob condições controle, de déficit hídrico e reidratada.



*Letras minúsculas iguais não mostram diferença estatística entre as linhagens, de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$), enquanto letras maiúsculas iguais não mostram diferença estatística entre as condições testadas.

No que diz respeito à catalase (CAT), houve um aumento de sua atividade nas linhagens transgênicas em relação à WT tanto na condição de déficit hídrico quanto na reidratada, em média cerca de 60% e 120% respectivamente (Figura 2C). Para a superóxido dismutase (SOD), embora não tenham sido constatadas diferenças significativas entre as linhagens transgênicas e as plantas WT em nenhuma das três condições, observou-se uma maior atividade média nas

linhagens transgênicas após a reidratação (cerca de 70%) em relação às plantas WT (Figura 2D).

Com relação ao conteúdo de proteínas totais, foi constatado um aumento significativo nas linhagens transgênicas em relação às plantas WT, com conteúdo cerca de duas vezes maior na condição de déficit hídrico (Figura 2E). Na condição de reidratação, de forma geral, o conteúdo de proteínas diminuiu. Entretanto, a média das linhagens transgênicas foi cerca de 26% maior em relação às plantas WT.

De forma geral, as linhagens transgênicas portadoras dos genes *VuWRKY21* apresentaram melhor desempenho nos parâmetros bioquímicos avaliados, em relação as plantas WT.

Discussão

Nas respostas de defesa das plantas contra estresses abióticos, ocorre uma reprogramação da expressão de diversos genes, incluindo ativadores e repressores transcricionais (Liu et al., 2019). Os genes pertencentes à família WRKY são bem conhecidos por seus papéis na regulação da tolerância a estresses abióticos (Wang et al., 2019). No presente estudo, foi analisada pela primeira vez a superexpressão de um gene codificante para fator de transcrição WRKY do feijão-caupi (*VuWRKY21*) em *A. thaliana* sob déficit hídrico. Esse gene foi selecionado para este estudo por ter apresentado modulação de expressão positiva no acesso tolerante de feijão-caupi sob estresse por desidratação radicular. Dentre os genes avaliados, o *VuWRKY21* apresentou uma forte modulação (FC, *fold change*) variando de 79,22 e 185,74 após 25 min e 100 min de desidratação, respectivamente, no acesso tolerante de caupi (Matos et al., 2022). No presente trabalho, os dados fisiológicos e bioquímicos sugeriram sua participação no aumento da tolerância ao déficit hídrico em plantas transgênicas de *A. thaliana* superexpressando *VuWRKY21* submetidas ao estresse.

As condições de déficit hídrico proporcionam acúmulo de solutos ao redor das raízes, dentre os quais, o manitol é amplamente utilizado para indução artificial de DH, dada sua capacidade de redução do potencial osmótico (Bohnert et al., 1999). Plantas transgênicas de *Arabidopsis* superexpressando diversos FTs da família WRKY sob condições de déficit hídrico revelaram maiores taxas de germinação, comprimento de raiz e biomassa sob estresse osmótico induzido por manitol, tais como: *GmWRKY16* (Ma et al., 2019); *TaWRKY46* (Li et al., 2020); *GhWRKY1-like* (Hu et al., 2021); *PheWRKY86* (Wu et al., 2022); *ClWRKY20* (Zhu et al., 2022). No teste de germinação utilizando manitol, em nosso estudo, todas as linhagens transgênicas não difeririam estatisticamente da condição controle nas maiores concentrações de manitol (300 e 500 mM), ao contrário das plantas WT, cujas taxas foram significativamente reduzidas, sugerindo uma melhor performance das linhagens transgênicas. Resultados semelhantes foram descritos por Hu et al. (2021), onde sementes de *Arabidopsis* superexpressando o gene WRKY de algodão (*GhWRKY1-like*) apresentaram taxas significativamente aumentadas com o tratamento com manitol. Esses resultados indicam a uma forte associação dos genes *WRKY* na tolerância de plantas ao DH.

Tanto a parte aérea (foliar) com a radícula das plantas desempenham um papel significativo frente ao estresse por DH (Lobet et al., 2013). No presente trabalho, sob condições de déficit hídrico, as plantas transgênicas portadoras do gene *VuWRK21* apresentaram as maiores médias de número de folhas (NF) em comparação às plantas WT, em adição ao um aumento do diâmetro da roseta (DR) após a reidratação. De forma semelhante ao DR, o peso da Roseta (PR) apresentou valores médios linhagens transgênicas superiores e estatisticamente diferentes de WT após a reidratação.

Baixos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) são importantes para a sinalização da condição de estresse, ao passo que níveis altos causam danos ao DNA, proteínas e carboidratos (Mittler et al., 2012). Por se tratar de um dos produtos da peroxidação lipídica

da membrana, o acúmulo de malonaldeído (MDA) pode refletir, de forma indireta, no grau de dano causado à membrana celular (Wei et al., 2012). Os níveis de MDA e de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) entre as linhagens transgênicas e as plantas WT não diferiram estatisticamente em ambas as condições, sob déficit hídrico e após a reidratação. Contudo, ressalta-se em ambas as condições um conteúdo de H_2O_2 cerca de 20% menor na média das linhagens transgênicas em relação às plantas WT. Estes dados sugerem um maior dano no sistema de membrana celular das plantas WT em relação às linhagens transgênicas. Dados semelhantes foram obtidos em plantas de *Arabidopsis* expressando os genes WRKY de soja: *GmWRKY16* (Ma, et al., 2019), *GmWRKY54* (Zhou et al., 2008) e *GmWRKY27* (Wang et al., 2015), cujas plantas transgênicas mostraram tolerância ao estresse osmótico, e menores conteúdos de MDA e H_2O_2 .

Uma das principais vias de reparo dos danos causados pelos elevados conteúdos de EROs é mediante o sistema de enzimas antioxidantes, das quais catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) apresentam destaque. Essas enzimas participam do processo de proteção das plantas sob condições de estresse, mantendo os níveis de EROs em concentrações não tóxicas e, portanto, consideradas enzimas “antiestresse” das plantas (Yadav et al., 2019; Ampofo et al., 2021; Zhong et al., 2020; XIANG, et al., 2021).

A superexpressão do gene *MfWRKY70* em *Arabidopsis*, além de reduzir o nível de EROs, sob déficit hídrico, aumentou de forma significativa os níveis de atividade específica de CAT (XIANG, et al., 2021). O gene *ZmWRKY40* também conferiu a tolerância à seca em *Arabidopsis* transgênica, com consequente redução no conteúdo de EROs e aumento da atividade de SOD e CAT (Wang et al., 2018). No presente trabalho, de forma semelhante, as plantas portadoras do *VuWRK21* tiveram um aumento de 60 % e 120% na atividade de CAT, nos grupos DH e reidratado, respectivamente, em relação as plantas WT.

A SOD atua como uma das primeiras barreiras na defesa ao dano oxidativo,

desempenhando papel direto no controle de EROs. Atua como catalizadora da conversão (ou dismutação) de radicais $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 e oxigênio molecular (Das et al., 2014; ALEEM et al., 2022; Kunos, et al., 2022). Os efeitos da superexpressão de genes WRKY e sua correlação com o conteúdo de SOD na redução dos danos do estresse oxidativo têm sido relatados em inúmeros estudos, utilizando *Arabidopsis* superexpressando WRKY de várias espécies vegetais, incluindo os genes *GhWRKY6* de *G. hirsutum* (Ullah et al., 2018); *ZmWRKY40* de *Zea mays* L. (Wang et al., 2018); *MfWRKY70* de *Myrothamnus flabellifolia* (Welw.) (XIANG et al., 2021). No presente estudo, as plantas de *Arabidopsis* portadoras do gene *VuWRKY21*, quando avaliadas após a reidratação, apresentaram aumento médio no conteúdo de SOD de mais de 70%, em relação a médias das linhagens transgênicas e as plantas WT.

O acúmulo de osmoprotetores em plantas está fortemente relacionado à tolerância ao déficit hídrico, uma vez que auxiliam na redução da toxicidade de EROs, na manutenção da integridade da membrana plasmática e na estabilização proteica, além de contribuir no ajuste do potencial osmótico das células (Yadav et al., 2019; Chinnusamy et al., 2005). O ajuste osmótico por meio da produção de metabólitos, ou estabilização de proteínas que auxiliam no reparo dos danos causados pelo déficit hídrico, é uma das alternativas das plantas tolerantes ao déficit hídrico, para compensar a diminuição do turgor celular (Kadri et al., 2017; Huihui et al., 2020; Wan et al., 2021).

Genes relacionados a regulação de osmoprotetores são altamente responsivos ao estresse abiótico (Jiang et al., 2006; Haddoudi et al., 2021). Alguns destes genes são regulados por FTs, que podem ser fortemente induzidos por déficit hídrico, e ativar cascatas gênicas de sinalização e resposta ao DH (Singh et al., 2021; Yang et al., 2021). Em nosso estudo, foi constatado um conteúdo de proteínas totais duas vezes maior nas linhagens transgênicas portadoras de *VuWRKY21* em relação a média das linhagens transgênicas e das plantas WT. Após a reidratação, as plantas portadoras do gene *VuWRKY21* apresentaram 26% mais proteínas que

as plantas WT.

Conclusão

As plantas portadoras do gene *VuWRKY21* parecem ter ativado vias de mecanismos de tolerância ao déficit hídrico, considerando os parâmetros fisiológicos e bioquímicos avaliadas, observando-se uma maior performance em comparação às plantas não transformadas (WT). Dessa forma, destaca-se uma influência positiva do fator de transcrição *VuWRKY21* frente à condição de estresse por déficit hídrico.

Referências

- Aleem M, Aleem S, ShariF I, et al. 2022. Characterization of SOD and GPX Gene Families in the Soybeans in Response to Drought and Salinity Stresses. *Antioxidants* 11: 460.
- Alves MF, Duarte MO, Oliveira PEAM, Sampaio DS. 2013. Self-sterility in the hexaploid *Handroanthus serratifolius* (Bignoniaceae), the national flower of Brazil. *Acta Botanica Brasilica* 27: 714-722.
- Ampofo JO, Ngadi M. 2021. Stimulation of the phenylpropanoid pathway and antioxidant capacities by biotic and abiotic elicitation strategies in common bean (*Phaseolus vulgaris*) sprouts. *Process Biochemistry*. 100: 98-106.
- Bakshi M, Oelmüller R. 2014. WRKY transcription factors: jack of many trades in plants. *Plant Signaling & Behavior* 9:e27700.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J. 2005. Understanding and Improving Salt Tolerance in Plants. *Crop Science* 45: 437–448.

Das K, Roychoudhury A. 2014. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* 2: 53.

Eulgem T, Rushton PJ, Robatzek S, Somssich IE. 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199–206.

Gulzar F, Fu J, Zhu C, *et al.* 2021. Maize WRKY transcription factor *ZmWRKY79* positively regulates drought tolerance through elevating ABA biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* 22: 10080.

Haddoudi L, Hdira S, Hanana M, *et al.* 2021. Evaluation of the Morpho-Physiological, Biochemical and molecular responses of contrasting *Medicago truncatula* lines under water deficit stress. *Plants* 10: 2114.

Hong Y, Zhang H, Huang L, Li D, Song F. 2016. Overexpression of a stress-responsive NAC transcription factor gene *ONAC022* improves drought and salt tolerance in rice. *Frontiers in Plant Science* 7: 4.

Hu Q, Ao C, Wang X, Wu Y, Du X. 2021. *GhWRKY1*-like, a WRKY transcription factor, mediates drought tolerance in *Arabidopsis* via modulating ABA biosynthesis. *BMC Plant Biology* 21: 1-13.

Huihui Z, Yuze H, Kaiwen G, Zisong X, Liu S, *et al.* 2021. Na⁺ accumulation alleviates drought stress induced photosynthesis inhibition of PSII and PSI in leaves of *Medicago sativa*. *Journal of Plant Interactions* 16: 1-11.

Jia X, Zeng Z, Lyu Y, Zhao S. 2022. Drought-responsive NAC transcription factor RcNAC72 is recognized by *RcABF4*, interacts with *RcDREB2A* to enhance drought tolerance in

Arabidopsis. International Journal of Molecular Sciences 23: 1755.

Jiang Y, Deyholos MK. 2006. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed *Arabidopsis* roots reveals novel classes of responsive genes. BMC Plant Biology 6: 25.

Kadri A, Julier B, Laouar M, et al. 2017. Genetic determinism of reproductive fitness traits under drought stress in the model legume *Medicago truncatula*. Acta Physiologiae Plantarum 39: 227.

Kunos V, Cséplő M, Seress D, et al. 2022. The stimulation of superoxide dismutase enzyme activity and its relation with the *Pyrenophora teres* f. *teres* infection in different barley genotypes. Sustainability 14: 2597.

Lau SE, Hamdan M, Pua TL, Saidi N, Tan B. 2021. Plant nitric oxide signaling under drought stress. Plants 10: 360.

Li X, Tang Y, Zhou C, Zhang L., Lv J. 2020. A wheat WRKY transcription factor *TaWRKY46* enhances tolerance to osmotic stress in transgenic *Arabidopsis* plants. International Journal of Molecular Sciences 21: 1321.

Liu JG, Han X, Yang T, et al. 2019. Genome-wide transcriptional adaptation to salt stress in *Populus*. BMC Plant Biology 19: 1-14.

Lobet G, Draye X. 2013. Novel scanning procedure enabling the vectorization of entire rhizotron-grown root systems. Plant Methods 9: 1-11.

Matos MK, Benko-Iseppon AM, Bezerra-Neto JP, Ferreira-Neto JRC, Wang Y, Liu H et al. 2022. The WRKY transcription factor family in cowpea: Genomic characterization and transcriptomic profiling under root dehydration. Gene 823: 146377.

Ma Q, Xia Z, Cai Z, Li L, Cheng Y, Liu J, Nian H. 2019. *GmWRKY16* enhances drought and salt tolerance through an ABA-mediated pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 9: 1979.

Mishra A, Bruno E, Zilberman D. 2020. Compound natural and human disasters: Managing drought and COVID-19 to sustain global agriculture and food sectors. *Science of the Total Environment* 754: 142210.

Mittler G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* 33: 453–467.

Muñiz-García MN, Cortelezzi JI, Fumagalli M, Capiati DA. 2018. Expression of the *Arabidopsis ABF4* gene in potato increases tuber yield, improves tuber quality and enhances salt and drought tolerance. *Plant Molecular Biology* 98:137-152.

MURASNIGE, Toshio; SKOOG, Folke. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, v. 15, n. 3, p. 473-497, 1962.

Oyeyinka S, Oyeyinka A, Karim O, Kayode RBM, Balogun O. 2013. Quality attributes of weevils (*Callosobruchus maculatus*) infested cowpea (*Vigna unguiculata*) products. *Nigeria Journal of Agriculture Food and Environment* 9: 16– 22.

Oyeyinka SA, Kayitesi E, Adebo OA, Oyedeji AB, Ogundele OM, Obilana AO, Njobeh PB. 2021. A review on the physicochemical properties and potential food applications of cowpea (*Vigna unguiculata*) starch. *International Journal of Food Science & technology* 56: 52-60.

Piao W, Sakuraba Y, Paek NC. 2019. Transgenic expression of rice *MYB102* (OsMYB102) delays leaf senescence and decreases abiotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *BMB Reports* 52: 653–658.

Rengadu D, Gerrano AS, Mellem J. 2020. Physicochemical and structural characterization of resistant starch isolated from *Vigna unguiculata*. *International Journal of Biological Macromolecules* 147: 268–275.

Shukla PR, Skeg J, Buendia EC, *et al.* 2019. Climate Change and Land: an IPCC special report on climate change, desertification, land degradation, sustainable land management, food security, and greenhouse gas fluxes in terrestrial ecosystems.

Singh S, Koyama H, Bhati KK, Alok A. 2021. The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement. *Journal of Plant Research* 134: 475-495.

Singhal P, Jan AT, Azam M, Haq QMR. 2016. Plant abiotic stress: a prospective strategy of exploiting promoters as alternative to overcome the escalating burden. *Frontiers in Life Science* 9: 52-63.

Sun S, Li X, Gao S, Nie N, *et al.* 2022. A Novel WRKY Transcription factor from *Ipomoea trifida*, *ItfWRKY70*, confers drought tolerance in sweet potato. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 686.

Thomas JC, Sepahi M, Arendall B, Bohnert HJ. 1995. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* 18: 801–806.

Ullah A, Sun H, Yang X, Zhang X. 2018. A novel cotton WRKY gene, *GhWRKY6*-like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species. *Physiologia Plantarum* 162: 439-454.

Wan T, Feng Y, Liang C, Pan L, He L, Cai Y. 2021. Metabolomics and transcriptomics analyses of two contrasting cherry rootstocks in response to drought stress. *Biology* 10: 201.

Wang CT, Ru JN, Liu YW, Yang JF, Li M, Xu ZS, Fu JD. 2018. The maize WRKY transcription factor *ZmWRKY40* confers drought resistance in transgenic *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences* 19: 2580.

Wang F, Chen HW, Li QT, *et al.* 2015. *GmWRKY27* interacts with *GmMYB174* to reduce expression of *GmNAC29* for stress tolerance in soybean plants. *The Plant Journal* 83: 224-236.

Wang NN, Xu SW, Sun YL, *et al.* 2019. The cotton WRKY transcription factor (*GhWRKY33*) reduces transgenic *Arabidopsis* resistance to drought stress *Scientific Reports* 9:724.

Wei KF, Chen J, Chen YF, Wu LJ, Xie DX. 2012. Molecular phylogenetic and expression analysis of the complete WRKY transcription factor family in maize. *DNA Research* 19: 153-164.

Wu M, Zhang K, Xu Y, Wang L, Liu H, Qin Z, Xiang Y. 2022. The moso bamboo WRKY transcription factor, *PheWRKY86*, regulates drought tolerance in transgenic plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 170: 180-191.

Xiang XY, Chen J, Xu WX, *et al.* 2021. Dehydration-induced WRKY transcriptional factor *MfWRKY70* of *Myrothamnus flabellifolia* enhanced drought and salinity tolerance in *Arabidopsis*. *Biomolecules* 11: 327.

Yadav B, Jogawat A, Rahman MS, Narayan O. 2021. Secondary metabolites in the drought stress tolerance of crop plants: A review. *Gene Reports* 23: 101040.

Yadav S, Gill SS, Passricha N, Gill R, Badhwar P, Anjum NA, Francisco JBJ, Tuteja N. 2019. Genome-wide analysis and transcriptional expression pattern-assessment of superoxide dismutase (SOD) in rice and *Arabidopsis* under abiotic stresses. *Plant Gene* 17: 100165.

Yan H, Jia H, Chen X, Hao L, An H, Guo X. 2014. The cotton WRKY transcription factor *GhWRKY17* functions in drought and salt stress in transgenic *Nicotiana benthamiana* through ABA signaling and the modulation of reactive oxygen species production. *Plant & Cell Physiology* 55: 2060–2076.

Yang H, Zhang D, Bozorov TA, Waheed A, Wang J, Li X, Daoyuan Z. 2022. Transgenic Technology can Accelerate Cotton Breeding: Transgenic *ScALDH21* Cotton Significantly Improve Drought Tolerance in Southern and Northern Xinjiang.

Yang H, Zhang D, Bozorov TA, Waheed A, Wang J, Li X, Daoyuan Z. 2022. Transgenic technology can accelerate cotton breeding: transgenic *ScALDH21* cotton significantly improve drought tolerance in Southern and Northern Xinjiang. In (Ed.), Cotton [Working Title]. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.103833>

Yang X, Lu M, Wang Y, Wang Y, Liu Z, Chen S. 2021. Response mechanism of plants to drought stress. *Horticulturae* 7: 50.

Zhao K, Zhang D, Lv K, *et al.* 2019. Functional characterization of poplar *WRKY75* in salt and osmotic tolerance. *Plant Science* 289: 110259.

Zhong M, Song R, Wang Y, Shu S, Sun J, Guo S. 2020. TGase regulates salt stress tolerance through enhancing bound polyamines-mediated antioxidant enzymes activity in tomato. *Environmental and Experimental Botany* 179: 104191.

Zhou QY, Tian AG, Zou HF, *et al.* 2008. Soybean WRKY-type transcription factor genes, *GmWRKY13*, *GmWRKY21*, and *GmWRKY54*, confer differential tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Biotechnology Journal* 6: 486-503.

Zhu H, Jiang Y, Guo Y, *et al.* 2021. A novel salt inducible WRKY transcription factor gene,

AhWRKY75, confers salt tolerance in transgenic peanut. *Plant Physiology and Biochemistry* 160: 175-183.

Zhu L, Li S, Ouyang M, *et al.* 2022. Overexpression of watermelon *CtWRKY20* in transgenic *Arabidopsis* improves salt and low-temperature tolerance. *Scientia Horticulturae* 295: 110848.

6 CONCLUSÕES

Os presentes dados indicam que ambos os genes participam da via de sinalização de estresse salino no feijão-caupi, com diferentes formas de atuação. Com base em análises bioquímicas e moleculares, os genes *VuWRKY87* e *VuWRKY21* parecem contribuir para a ativação de genes relacionados aos mecanismos de tolerância ao estresse salino, com destaque para *AtP5CS1*, *AtNHX1* e *AtRD29A*, observando-se ainda baixo conteúdo de H₂O₂ e altos conteúdos de SOD e CAT nos tempos iniciais de estresse salino.

O desempenho satisfatório dos genes *VuWRKY21* e *VuWRKY87* em *Arabidopsis* sugere que o feijão-caupi pode ser considerado fonte de genes relacionados a mecanismos de tolerância a estresse abiótico.

As plantas portadoras do gene *VuWRKY21* foram mais tolerantes frente à condição de estresse por déficit hídrico .

7 SÚMULA CURRICULAR

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Doutorado em Ciências Biológicas.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: EDIÇÃO DE GENES DE AQUAPORINA PELO SISTEMA CRISPR/Cas9 EM FEIJÃO-CAUPI (*Vigna unguiculata*)
Orientador: Ana Christina Brasileiro-Vidal
Co-orientador: Ana Maria Benko-Iseppon
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- 2016 - 2018** Mestrado em Agronomia (Melhoramento Genético de Plantas).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
Título: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENE WRKY DO FEIJÃO-CAUPI [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.] EM *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE SALINO na unguiculata (L.) Walp.] EM *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE SALINO, Ano de obtenção: 2018
Orientador: Ana Christina Brasileiro-Vidal
Co-orientador: Valesca Pandolfi
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

Formação complementar

- 2018 - 2018** Extensão universitária em Introdução às técnicas de RNAi e CRISPR. (Carga horária: 80h).
Universidade de São Paulo, USP, Sao Paulo, Brasil
- 2017 - 2017** Extensão universitária em Respostas Fisiológicas e Moleculares de Plantas sob Estresse Abiótico. (Carga horária: 60h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2017 - 2017** Extensão universitária em RT-qPCR: Bases e Aplicações na Análise da Expressão. (Carga horária: 40h).
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil

Projetos

Projetos de pesquisa

- 2018 - Atual** Genômica e transcriptômica do feijão-caupi e espécies relacionadas
Descrição: O gênero *Vigna* Savi compreende espécies de grande importância econômica e social, como o feijão-caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.], que faz parte da base alimentar humana como fonte de proteína no nordeste do Brasil e em vários países da África. Apesar da importância socioeconômica, sua produção tem diminuído devido ao cultivo em áreas de solos precários, pragas e doenças. Por esta razão, programas de melhoramento genético têm sido direcionados para a obtenção de genótipos superiores, muitas vezes demandando a identificação de genes potencialmente úteis em espécies aparentadas, com ênfase para as silvestres, para as quais, em geral, não há genomas sequenciados disponíveis. Dessa forma, o presente projeto visa fornecer subsídios para o entendimento da organização genômica e da sintenia do feijão-caupi e de espécies relacionadas, mediante análises comparativas in silico e in situ. Adicionalmente, busca-se ampliar a compreensão acerca da expressão diferencial de algumas famílias de genes no feijão-caupi, relacionadas a diferentes condições de estresses bióticos [vírus Mosaico Severo do Feijão-Caupi (CPSMV) e vírus do Mosaico Severo do Feijão-Caupi transmitido por Afídeos (CABMV)] e abióticos (seca e salinidade). Para tal, serão realizadas as seguintes etapas: (1) análise da macrossintenia entre *P. vulgaris* e quatro espécies de *Vigna* (*V. aconitifolia*, *V. angularis*, *V. radiata* e *V. umbellata*) e as subespécies *V. unguiculata* subsp. *cylindrica* e *V. unguiculata* subsp. *sesquipedalis* mediante BAC-FISH; (2) análise comparativa in silico dos genomas de *V. angularis* e *P. vulgaris*, utilizando sequências de genes para proteínas quinase como modelo (família gênica envolvida em diferentes vias de transdução de sinais nas células); (3) análises comparativas entre transposons relacionados a genes responsivos a estresses diferencialmente expressos em acessos contrastantes do feijão-caupi; (4) avaliação da correlação existente entre TEs diferencialmente expressos e seus genes alvos; (5) análise da evolução genômica e cariotípica entre os gêneros *Vigna* e *Phaseolus*, identificando possíveis mecanismos de alteração; (6) análise do papel de três genes para fatores de transcrição WRKY do feijão-caupi na expressão de genes downstream envolvidos nos mecanismos de tolerância à seca e à salinidade, usando

Arabidopsis thaliana como modelo genético; (7) geração de, ao menos, uma planta transgênica de feijão-caupi via biobalística, inserindo no seu genoma um gene *VuWRKY* de tolerância à seca previamente selecionado; (8) contribuição para a formação de pessoal em nível de graduação e pós-graduação; (9) divulgação dos resultados da pesquisa em congressos científicos e na forma de publicação de artigos científicos em revistas com bom fator de impacto

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa.

Revisor de periódico

1. Horticultura Brasileira -

Vínculo

2020 - Atual - Regime: Parcial

2. Journal of Experimental Agriculture International -

Vínculo

2020 - Atual - Regime: Parcial

3. AGRICULTURAL SCIENCES -

Vínculo

2019 - Atual - Regime: Parcial

4. ORNAMENTAL HORTICULTURE -

Vínculo

2017 - Atual - Regime: Parcial

Prêmios e títulos

2018

Prêmio Jovem Geneticista. Menção honrosa ao trabalho: SUPERXPRESSÃO DE GENE WRKY DO FEIJÃO-CAUPI EM *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE SALINO, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Sociedade Brasileira de Genética

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. BARROSO, PRISCILA ALVES; RÊGO, MAILSON MONTEIRO DO; **CRISPIM, JOELSON GERMANO**; COSTA, MARIA DO PERPÉTUO SOCORRO DAMASCENO; RÊGO, ELIZANILDA RAMALHO DO
How to shorten a plant breeding program? A case study with ornamental peppers. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, v.19, p.193 - 199, 2019.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. BARROSO, P. A.; REGO, M. M.; **CRISPIM, J. G.**; COSTA, M. P. S. D.; REGO, E. R.
IS POSSIBLE TO ADVANCE BREEDING PROGRAM OF ORNAMENTAL CHILI PEPPERS: BY IN VITRO CULTURE OF ZYGOTIC IMMATURE EMBRYOS? In: 24th International Pepper Conference, 2018, Florida.
24th International Pepper Conference - Abstract Compilation. Fort Myers: 24th International Pepper Conference, 2018. v.1. p.38 - 38

2. **CRISPIM, J. G.**; PANDOLFI, V.; ANTUNES, M.; SUN, L.; SANTOS, E. S.; BENKO-ISEPPON, A. M.; WILLADINO, L.; TIMKO, M.; VIDAL, A. C. B.
SUPERXPRESSÃO DE GENE WRKY DO FEIJÃO-CAUPI EM *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE SALINO In: XXII Encontro de Genética do Nordeste - ENGENE, 2018, Natal.
Anais do XXII Encontro de Genética do Nordeste. 2018. v.1.

Produção técnica

1. **CRISPIM, J. G.**; VIDAL, A. C. B.

TÉCNICAS DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL APLICADAS EM ESTUDOS DE SALINIDADE, 2018. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Orientações e Supervisões

Orientações e supervisões concluídas**Monografias de conclusão de curso de aperfeiçoamento/especialização**

1. BRUNA RAFAELLE BERNARDO DA SILVA. **MONITORAMENTO AMBIENTAL DOS RECURSOS HÍDRICOS POR MEIO DE ENSAIOS BIOGENÉTICOS**. 2019. Monografia (Gestão Ambiental) - FACULDADE FRASSINETTI DO RECIFE

Orientações e supervisões concluídas

1. Elenilson de Souza Santos. **EFEITOS FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS DA SUPEREXPRESSÃO DE GENE PARA FATOR DE TRANSCRIÇÃO WRKY DO FEIJÃO-CAUPI EM PLANTAS TRANSGÊNICAS DE *Arabidopsis thaliana* SOB ESTRESSE SALINO**. 2019. Iniciação científica (Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco
Inst. financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHMAN, Mostafa et al. Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. **Plant, cell & environment**, v. 41, n. 9, p. 1972-1983, 2018.
- ALBERTS, Bruce et al. **Biologia molecular da célula**. Artmed Editora, 2010.
- ARAÚJO, Edilene Daniel et al. Genotypic variation on the antioxidative response of cowpeacultivars exposed to osmotic stress. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2017.
- ARIF, Yamshi et al. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 64-77, 2020.
- ARUMUGANATHAN, Ka; EARLE, E. D. Nuclear DNA content of some important plant species. **Plant molecular biology reporter**, v. 9, n. 3, p. 208-218, 1991.
- Ayers, R. S.; Westcot, D.W. **A qualidade de água na agricultura**. 2.ed. Campina Grande: UFPB, 1999, 153p. FAO. Estudos Irrigação e Drenagem, 29 revisado 1.
- AZEVEDO, Ricardo A. et al. Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, v. 4, n. 1, p. 42-51, 2011.
- BANO, Asghari; FATIMA, Mussarat. Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with Rhizobium and Pseudomonas. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, n. 4, p. 405-413, 2009.
- BARTELS, Dorothea; SUNKAR, Ramanjulu. Drought and salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.
- BELANE, Alphonsus K.; DAKORA, Felix D. Measurement of N₂ fixation in 30 cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes under field conditions in Ghana, using the ¹⁵N natural abundance technique. **Symbiosis**, v. 48, n. 1, p. 47-56, 2009.
- Benko-Iseppon, A. M. et al. (2013) Brazilian Cowpea Genome Consortium: understanding responses against biotic and abiotic stresses. In: Annual Meeting of the West African Cowpea Consortium (WACC). Lomé, Togo, pp 12.
- BENKO-ISEPPON, Ana Maria et al. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112-1134, 2011.
- BEZERRA, Anna Karine Paiva et al. Rotação cultural feijão caupi/milho utilizando-se águas de salinidades diferentes. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1075-1082, 2010.
- BHATTACHARJEE, Soumen. Sites of generation and physicochemical basis of formation of reactive oxygen species in plant cell. **Reactive oxygen species and antioxidants in higher plants**, p. 1-30, 2010.
- BOHNERT, Hans J.; NELSON, Donald E.; JENSEN, Richard G. Adaptations to environmental stresses. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1099, 1995.

- BOSHKOVSKI, Blagoja et al. Relationship between physiological and biochemical measurements with spectral reflectance for two *Phaseolus vulgaris* L. genotypes under multiple stress. **International Journal of Remote Sensing**, v. 42, n. 4, p. 1230-1249, 2021.
- BRADY, Siobhan M. et al. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 801-806, 2007.
- BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm; JONES, Russell L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. John Wiley & Sons, 2015.
- CAMPANARO, Ausilia et al. DNA barcoding to promote social awareness and identity of neglected, underutilized plant species having valuable nutritional properties. **Food Research International**, v. 115, p. 1-9, 2019.
- CASSELLS, Alan C.; CURRY, Rosario F. Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. **Plant cell, tissue and organ culture**, v. 64, n. 2, p. 145-157, 2001.
- CASTELLETTI, Carlos Henrique Madeiros; DA COSTA, Antonio Félix. Feijão-caupi: alternativa sustentável para os sistemas produtivos. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 1-2, 2013.
- CHEN, Honglin et al. De novo transcriptomic analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for genic SSR marker development. **BMC genetics**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2017.
- CHEN, Wenqiong J.; ZHU, Tong. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. **Trends in plant science**, v. 9, n. 12, p. 591-596, 2004.
- CHEN, Xiaodong et al. Application of organic wastes to primary saline-alkali soil in Northeast China: effects on soil available nutrients and salt ions. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 51, n. 9, p. 1238-1252, 2020.
- CORPAS, Francisco J.; GONZÁLEZ-GORDO, Salvador; PALMA, José M. Plant peroxisomes: a factory of reactive species. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 853, 2020.
- CRAMER, Grant R. et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011.
- DAI, Wenhao (Ed.). **Stress Physiology of Woody Plants**. CRC Press, 2019.
- DALCHIAVON, Flávio C.; NEVES, Graciele; HAGA, Kuniko I. Efeito de stresse salino em sementes de *Phaseolus vulgaris*. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 3, p. 404-412, 2016.
- DESOKY, El-Sayed M. et al. Fennel and ammi seed extracts modulate antioxidant defence system and alleviate salinity stress in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Scientia Horticulturae**, v. 272, p. 109576, 2020.
- DIOUF, Diaga. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]“omics” research for genetic improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 15, p. 2803-2810, 2011.
- EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. walp.). **Field crops research**, v.

53, n. 1-3, p. 187-204, 1997.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2018): área, produção e rendimento. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2019. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>>. jan 2021.

Embrapa Meio-Norte (2017) Sistemas de Produção 2; versão eletrônica. Disponível: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Feijao/FeijaoCaupi>>.jan 2021.

Ferreira, C. T. et al. Crescimento absoluto de diferentes cultivares de feijoeiro *Vigna unguiculata* em sistema agroecológico. **Ciencia y Tecnología Agropecuaria**, V11. P. 15-19, 2017.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues et al. Produção, melhoramento genético e potencialidades do feijão-caupi no Brasil. In: **Embrapa Meio-Norte-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: REUNIÃO DE BIOFORTIFICAÇÃO NO BRASIL, 4., 2011. Teresina. Palestras e resumos. Rio de Janeiro: Embrapa Agroindústria de Alimentos; Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011., 2011.

GASPAR, Marília. Aquaporinas: de canais de água a transportadores multifuncionais em plantas. **Brazilian Journal of Botany**, v. 34, p. 481-491, 2011.

GIMENEZ-IBANEZ, Selena; SOLANO, Roberto. Nuclear jasmonate and salicylate signaling and crosstalk in defense against pathogens. **Frontiers in plant science**, v. 4, p. 72, 2013.

GUZZETTI, Lorenzo et al. Sustainability perspectives of *Vigna unguiculata* L. Walp. Cultivation under no tillage and water stress conditions. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 48, 2019.

HERMS, Daniel A.; MATTSON, William J. The dilemma of plants: to grow or defend. **The quarterly review of biology**, v. 67, n. 3, p. 283-335, 1992.

HUANG, Xuebing; AMEE, Maurice; CHEN, Liang. Bermudagrass *CdWRKY50* gene negatively regulates plants' response to salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 188, p. 104513, 2021.

ISHIYAKU, M. F.; SINGH, B. B.; CRAUFURD, Peter Q. Inheritance of time to flowering in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Euphytica**, v. 142, n. 3, p. 291-300, 2005.

JAMIL, A. et al. Gene expression profiling of plants under salt stress. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 30, n. 5, p. 435-458, 2011.

JITHESH, M. N. et al. Physiological and transcriptomics analyses reveal that *Ascophyllum nodosum* extracts induce salinity tolerance in *Arabidopsis* by regulating the expression of stress responsive genes. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 38, n. 2, p. 463-478, 2019.

JOSHI, Rohit; SINGLA-PAREEK, Sneha L.; PAREEK, Ashwani. Engineering abiotic stress response in plants for biomass production. **Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 14, p. 5035-5043, 2018.

KARKUTE, Suhas G. et al. Genome wide expression analysis of WRKY genes in tomato (*Solanum lycopersicum*) under drought stress. **Plant Gene**, v. 13, p. 8-17, 2018.

KARUPPANAPANDIAN, Thirupathi; KIM, Wook. Cobalt-induced oxidative stress causes growth inhibition associated with enhanced lipid peroxidation and activates antioxidant responses in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) leaves. **Acta physiologiae plantarum**, v. 35, n. 8, p. 2429-2443, 2013.

KAZAN, Kemal; LYONS, Rebecca. Intervention of phytohormone pathways by pathogen effectors. **The Plant Cell**, v. 26, n. 6, p. 2285-2309, 2014.

KOORNNEEF, Maarten; MEINKE, David. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 909-921, 2010.

KOORNNEEF, Maarten; MEINKE, David. The development of *Arabidopsis* as a model plant. **The Plant Journal**, v. 61, n. 6, p. 909-921, 2010.

KRISHNAMURTHY, Pannaga; QINGSONG, Lin; KUMAR, Prakash P. Proteomics perspectives in post-genomic era for producing salinity stress-tolerant crops. In: **Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 2**. Springer, Cham, 2018. p. 239-266.

KUMAR, Akhilesh et al. Salt-tolerant plant growth-promoting *Bacillus pumilus* strain JPVS11 to enhance plant growth attributes of rice and improve soil health under salinity stress. **Microbiological Research**, v. 242, p. 126616, 2021.

LAI, Zhibing et al. *Arabidopsis* sigma factor binding proteins are activators of the *WRKY33* transcription factor in plant defense. **The Plant Cell**, v. 23, n. 10, p. 3824-3841, 2011.

LAKRA, Nita et al. Proteomics of contrasting rice genotypes: identification of potential targets for raising crops for saline environment. **Plant, Cell & Environment**, v. 41, n. 5, p. 947-969, 2018.

LE GALL, Hyacinthe et al. Cell wall metabolism in response to abiotic stress. **Plants**, v. 4, n. 1, p. 112-166, 2015.

LI, Jing-bin; LUAN, Yu-shi; LIU, Zhen. Overexpression of *SpWRKY1* promotes resistance to *Phytophthora nicotianae* and tolerance to salt and drought stress in transgenic tobacco. **Physiologia plantarum**, v. 155, n. 3, p. 248-266, 2015.

LIU, Wei. SemanticGO: a tool for gene functional similarity analysis in *Arabidopsis thaliana* and rice. **Plant Science**, v. 297, p. 110527, 2020.

LO, Sassoum et al. A genome-wide association and meta-analysis reveal regions associated with seed size in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 132, n. 11, p. 3079-3087, 2019.

LONARDI, Stefano et al. The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **The Plant Journal**, v. 98, n. 5, p. 767-782, 2019.

LUCAS, Mitchell R. et al. Cowpea–soybean synteny clarified through an improved genetic map. **The Plant Genome**, v. 4, n. 3, 2011.

LUO, Xiao et al. Expression of wild soybean *WRKY20* in *Arabidopsis* enhances drought tolerance and regulates ABA signalling. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 8, p. 2155-2169, 2013.

- MBARKI, Sonia et al. Strategies to mitigate the salt stress effects on photosynthetic apparatus and productivity of crop plants. In: **Salinity responses and tolerance in plants, volume 1**. Springer, Cham, 2018. p. 85-136.
- MEIRA, Ariana Lisboa et al. Estimativas de parâmetros genéticos para características de crescimento em feijão-caupi sob estresse hídrico severo. **Agropecuária científica no semiárido**, v. 13, n. 1, p. 41-47, 2017.
- MERWAD, Abdel-Rahman MA; DESOKY, El-Sayed M.; RADY, Mostafa M. Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. **Scientia Horticulturae**, v. 228, p. 132-144, 2018.
- MHAMDI, Amna et al. Catalase function in plants: a focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.
- MINHAS, P. S. et al. Coping with salinity in irrigated agriculture: Crop evapotranspiration and water management issues. **Agricultural Water Management**, v. 227, p. 105832, 2020.
- MISRA, Rajesh Chandra et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-14, 2016.
- MUCHERO, Wellington et al. A consensus genetic map of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) Walp.] and synteny based on EST-derived SNPs. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 106, n. 43, p. 18159-18164, 2009.
- MUNNS, Rana. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250, 2002.
- MUNNS, Rana. Genes and salt tolerance: bringing them together. **New phytologist**, v. 167, n. 3, p. 645-663, 2005.
- MUNNS, Rana; TESTER, Mark. Mechanisms of salinity tolerance. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 651-681, 2008.
- NAKASHIMA, Kazuo; ITO, Yusuke; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. **Plant physiology**, v. 149, n. 1, p. 88-95, 2009.
- NASCIMENTO, Hugo Henrique Costa do et al. Ajustamento osmótico em mudas de jatobá submetidas à salinidade em meio hidropônico. **Revista Árvore**, v. 39, p. 641-653, 2015.
- NIU, CAN-FANG et al. Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 6, p. 1156-1170, 2012.
- NIU, CAN-FANG et al. Wheat WRKY genes *TaWRKY2* and *TaWRKY19* regulate abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants. **Plant, cell & environment**, v. 35, n. 6, p. 1156-1170, 2012.
- OUÉDRAOGO, J. T. et al. An improved genetic linkage map for cowpea (*Vigna unguiculata* L.) combining AFLP, RFLP, RAPD, biochemical markers, and biological resistance

traits. **Genome**, v. 45, n. 1, p. 175-188, 2002.

PEREIRA, Andy. Plant abiotic stress challenges from the changing environment. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1123, 2016.

RAI, Manoj K. et al. Developing stress tolerant plants through in vitro selection—an overview of the recent progress. **Environmental and experimental botany**, v. 71, n. 1, p. 89-98, 2011.

RASEL, Md et al. Discerning of rice landraces (*Oryza sativa* L.) for morpho-physiological, antioxidant enzyme activity, and molecular markers' responses to induced salt stress at the seedling stage. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, p. 41-59, 2020.

RAVELOMBOLA, Waltram et al. Association analysis of salt tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) at germination and seedling stages. **Theoretical and applied genetics**, v. 131, n. 1, p. 79-91, 2018.

RAVELOMBOLA, Waltram Second et al. Evaluation of salt tolerance at germination stage in cowpea [*Vigna unguiculata* L. Walp]. **HortScience**, v. 52, n. 9, p. 1168-1176, 2017.a

RUSHTON, Paul J. et al. WRKY transcription factors. **Trends in plant science**, v. 15, n. 5, p. 247-258, 2010.

SEAB-Secretaria do Estado da Agricultura e do Abastecimento (2020) Acessado <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/2016/_feijao_2015_16.pdf>. > jan 2020.

SHABALA, Sergey et al. Xylem ionic relations and salinity tolerance in barley. **The Plant Journal**, v. 61, n. 5, p. 839-853, 2010.

SHAHBAZ, M.; ASHRAF, M. Improving salinity tolerance in cereals. **Critical reviews in plant sciences**, v. 32, n. 4, p. 237-249, 2013.

Shannon, M. C. Adaptation of plants to salinity. **Advances in Agronomy**, v. 60, p. 75-120, 1997.

SHANNON, Michael C. Salinity-An environmental constraint on crop productivity. **Responding to Change**, p. 9-18, 1987.

SHARAN, Ashutosh et al. Mapping the 'Two-component system' network in rice. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

SHARONI, Akhter Most et al. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. **Plant and cell physiology**, v. 52, n. 2, p. 344-360, 2011.

SHINOZAKI, Kazuo; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. **Current opinion in plant biology**, v. 3, n. 3, p. 217-223, 2000.

SHRIVASTAVA, Pooja; KUMAR, Rajesh. Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. **Saudi journal of**

biological sciences, v. 22, n. 2, p. 123-131, 2015.

SIMON, M. 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, 2007.

SOMERVILLE, Chris; KOORNNEEF, Maarten. A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 11, p. 883-889, 2002.

SOUMARE, Abdoulaye et al. Preliminary screening of cowpea-Bradyrhizobium symbiotic traits subjected to salinity stress in Senegal. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 45, p. 3233-3243, 2017.

SOUSA, Jaqueline Luz Moura et al. Potential of genotypes for fresh pod and fresh-shelled cowpea market. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 50, p. 392-398, 2015.

SREE, K. Sowjanya et al. Natural variance in salt tolerance and induction of starch accumulation in duckweeds. **Planta**, v. 241, n. 6, p. 1395-1404, 2015.

THIAM, Mahamadou et al. NaCl effects on in vitro germination and growth of some senegalese cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) cultivars. **International Scholarly Research Notices**, v. 2013, 2013.

TIMKO, Michael P. et al. Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 1-20, 2008.

ÜLKER, Bekir; SOMSSICH, Imre E. WRKY transcription factors: from DNA binding towards biological function. **Current opinion in plant biology**, v. 7, n. 5, p. 491-498, 2004.

ULLAH, Abid et al. A novel cotton WRKY gene, *GhWRKY6*-like, improves salt tolerance by activating the ABA signaling pathway and scavenging of reactive oxygen species. **Physiologia Plantarum**, v. 162, n. 4, p. 439-454, 2018.

ULLAH, Abid et al. Osmotin: a plant defense tool against biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 123, p. 149-159, 2018.

VAN SCHILFGAARDE, J. Drainage design for salinity control. **Ecological studies: analysis and synthesis**, 1984.

WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 2003.

WANG, Wei-Chen et al. Response regulators 9 and 10 negatively regulate salinity tolerance in rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 60, n. 11, p. 2549-2563, 2019.

WATSON, James D. et al. **Biologia molecular do gene**. Artmed Editora, 2015.

WATT, E. E. First annual report on the EMBRAPA/IITA-Cowpea Program in Brasil. **Goiânia, EMBRAPA-CNPAF**, 1978.

WEI, Wei et al. The WRKY transcription factors in the diploid woodland strawberry *Fragaria*

vesca: identification and expression analysis under biotic and abiotic stresses. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 105, p. 129-144, 2016.

XIONG, Liming; ZHU, J.-K. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 131-139, 2002.

ZAHEDI, Seyed Morteza; ANSARI, Naser Alemzadeh; AZIZI, Mehrdad. The study of the effect of salinity stress on the germination and the initial growth of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). **J. Agric. Technol**, v. 8, n. 7, p. 2353-2372, 2012.

ZHANG, Langlang et al. Overexpression of *VaWRKY14* increases drought tolerance in *Arabidopsis* by modulating the expression of stress-related genes. **Plant cell reports**, v. 37, n. 8, p. 1159-1172, 2018.

ZHANG, Yuanji; WANG, Liangjiang. The WRKY transcription factor superfamily: its origin in eukaryotes and expansion in plants. **BMC evolutionary biology**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2005.

ZHU, Jian-Kang. Salt and drought stress signal transduction in plants. **Annual review of plant biology**, v. 53, n. 1, p. 247-273, 2002.

APÊNDICE A

Figura 1S. Desenvolvimento de plântulas de linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21-OE* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT), germinadas sob diferentes concentrações de NaCl: (A) 0 mM; (B) 100 mM; e (C) 200 mM, após 15 dias de cultivo.

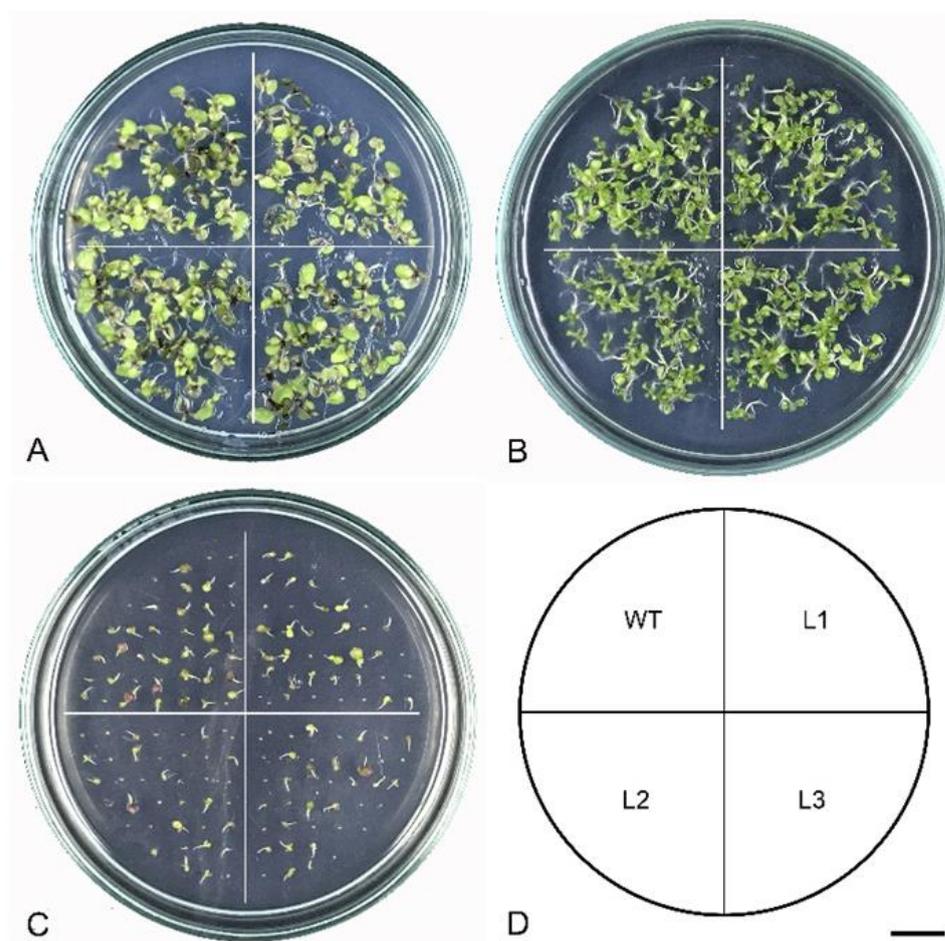


Figura 2S. Desenvolvimento de plântulas de linhagens de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT), germinadas sob diferentes concentrações de NaCl: (A) 0 mM; (B) 100 mM; e (C) 200 mM, após 15 dias de cultivo.

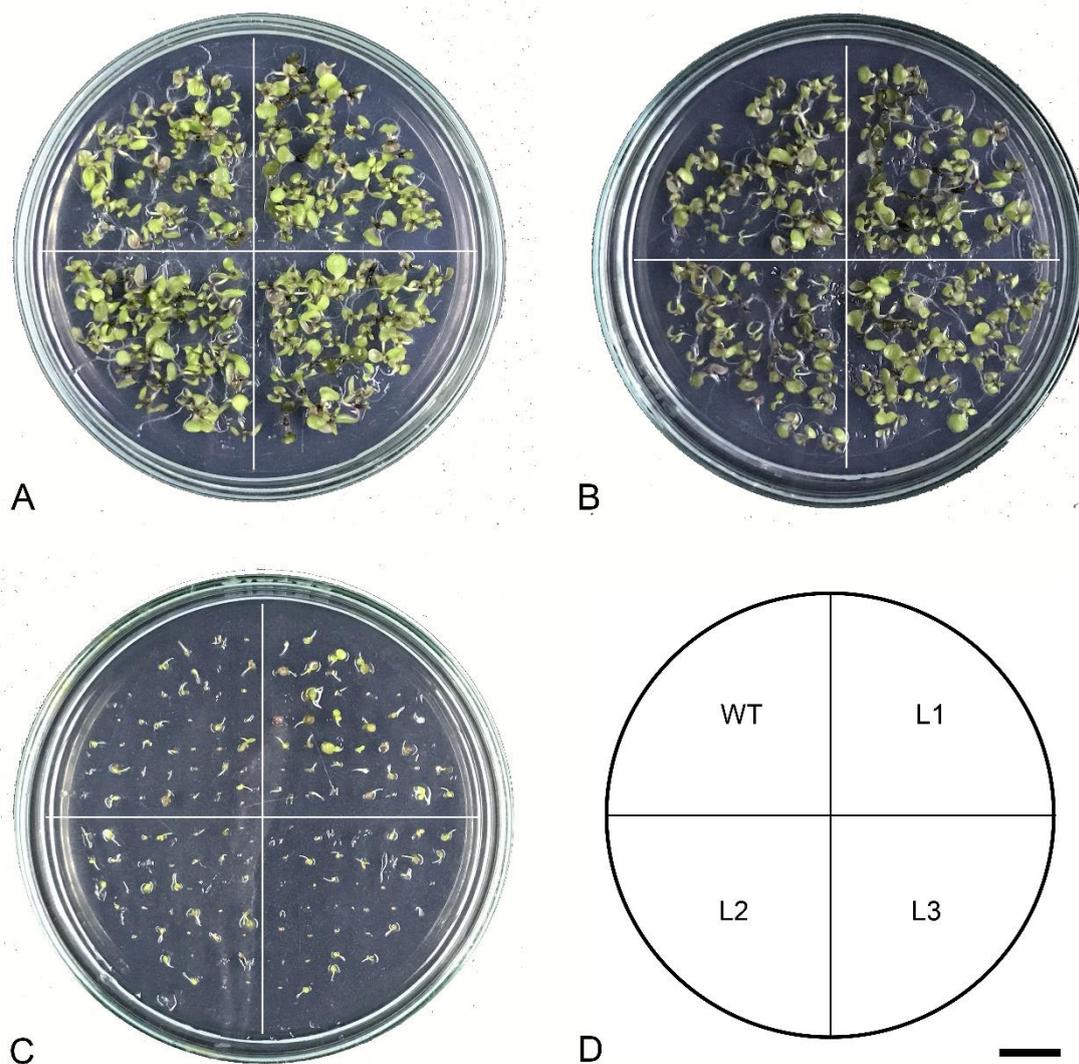


Figura 3S. Comprimento das raízes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY21* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) cultivadas sob diferentes concentrações de NaCl: (A) 0 mM; (B) 100 mM, e (C) 200 mM, após sete dias.

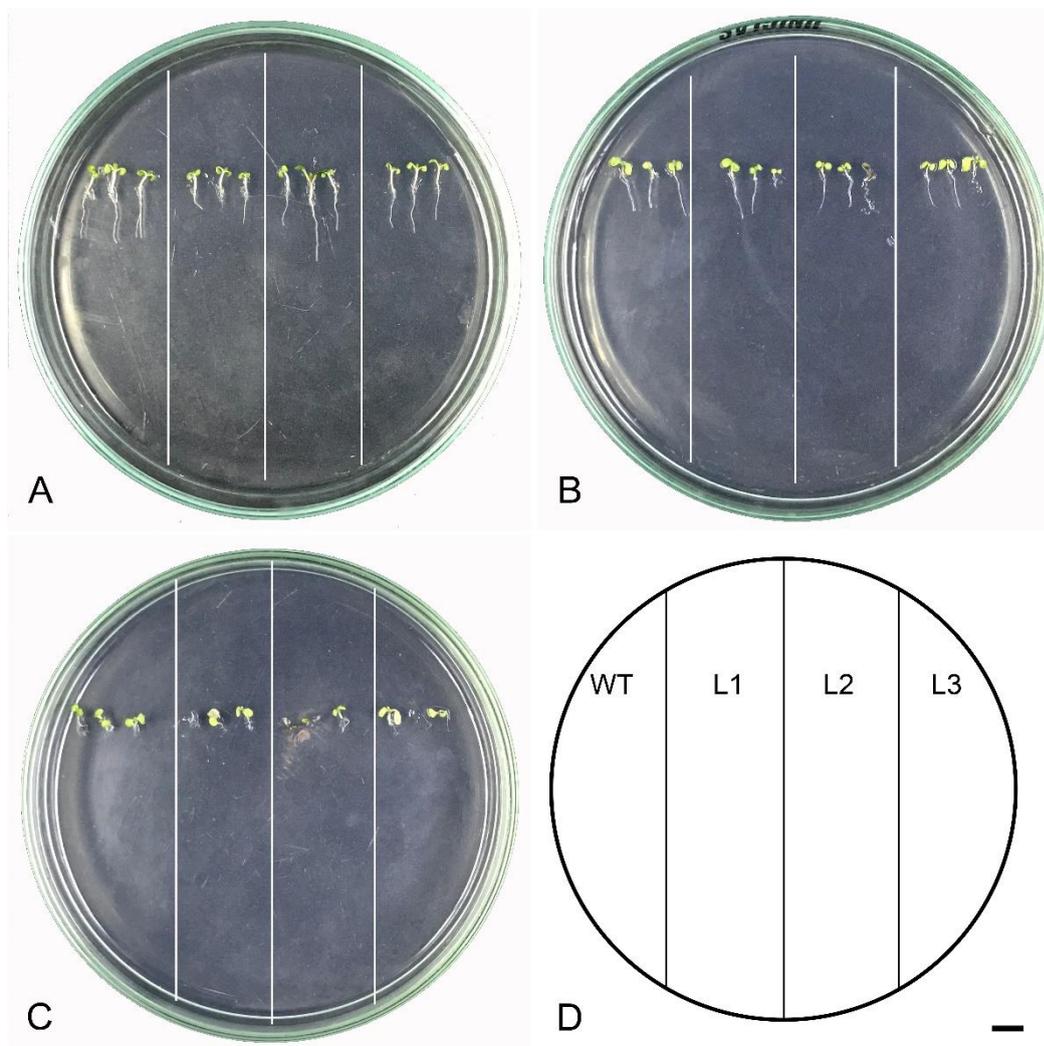


Figura 4S. Comprimento das raízes de *Arabidopsis thaliana* superexpressando o gene *VuWRKY87* (L1, L2, L3) e da linhagem selvagem (WT) cultivadas sob diferentes concentrações de NaCl: (A) 0 mM; (B) 100 mM, e (C) 200 mM, após sete dias.

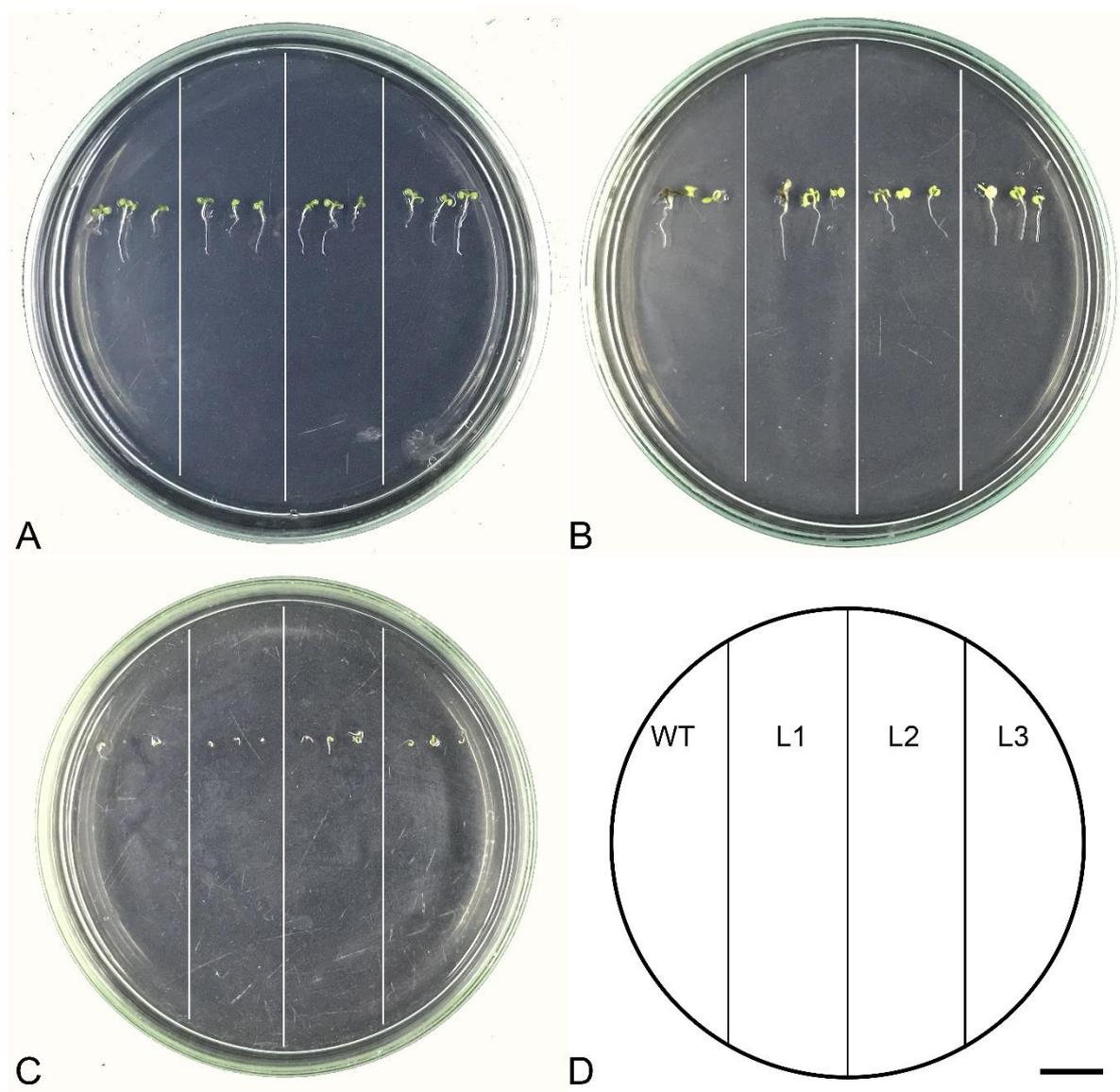


Tabela S1. Lista de *primers* utilizados na análise de superexpressão dos genes *VuWRKY21* e *87*, via qPCR em linhagens de *Arabidopsis* transformadas e WT.

Primer	Sequência (5' – 3')	Referência
<i>AtP5CS1</i>	(F) AGGGAAAGTTCCAGAAAG	Zhu et al. (2018)
(AT2G398000)	(R) CATAACTAAGCGAGCCAC	
<i>AtNXH1</i>	(F) GACTCCTTCATGCGACCCG	Bao et al. (2018)
(AT5G27150.1)	(R) CACGTTACCCTCAAGCCTTAC	
<i>AtRD29A</i>	(F) CAAAGCAATGAGCATGAGCAAG	Ullah et al. (2018)
(AT5g52310)	(R) CGGAAGACACGACAGGAAACAC	
<i>AtSOS1</i>	(F) TCGGCAGCATGGTTAATGTG	Bao et al. (2018)
(AT2G01980.1)	(R) TTGGCTGAAACGAGACCTTGA	
<i>AtSOS2</i>	(F) TTTGGTCTTGCGGGGTTATTC	Ullah et al. (2018)
(AT5G35410.1)	(R) CGTGTTTTGGGATTGGGGTC	
<i>AtSOS3</i>	(F) AATCCATCGCTCATCAAGAACA	Bao et al. (2018)
(AT5G24270.1)	(R) CGGTTTATTTCCAAATCCTAGCTTC	
<i>AtUbiquitin</i>	(F)CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	Ullah et al. (2018)
(AT1G02860)	(R) TTGTGCCATTGAATTGAACCC	
<i>VuWRKY21</i>	(F) TGTCGGTGGTGTGTGAGAAC	Matos, et al.
	(R) CGGACTGGTTTCTTTTTTCGCC	(2022)
<i>VuWRKY87</i>	(F) CCACTTCCTGCCGCTGAAT	Matos et al.
	(R) ACTTCGGGGACTACTGCTGA	(2022)

Tabela S2. Resultados do blastn no genoma de *Arabidopsis thaliana* usando as sequências dos primers *VuWRKY* utilizados na qPCR, realizada após o experimento de salinidade com linhagens transgênicas e WT de *A. thaliana*.

Genes	Resultado	Link de acesso
<i>VuWRKY2</i> 1	AT1G75810	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1648657455&job_key=5uw5B6lSr7qIgD-FMuUbt0j-CoVI7RGYZA
<i>VuWRKY8</i> 7	-	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool.cgi?ctg_time=1648661036&job_key=vbdiXb3HsG-XUbVUuDSRZslvgFTvPJtJ7g