



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



JÉSSICA BARBOZA DA SILVA

**FOSFATOMA DE *Vigna unguiculata* E *Vitis vinifera* SOB ESTRESSE BIÓTICO:
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E PERFIL TRANSCRICIONAL**

Recife

2023

JÉSSICA BARBOZA DA SILVA

**FOSFATOMA DE *Vigna unguiculata* E *Vitis vinifera* SOB ESTRESSE BIÓTICO:
CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E PERFIL TRANSCRICIONAL**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador (a): Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientador (a): Dra. Roberta Lane de Oliveira Silva

Recife

2023

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Marcos Antonio Soares da Silva
CRB4/1381

Silva, Jéssica Barboza da.

Fosfatoma de *Vigna unguiculata* e *Vitis vinifera* sob estresse biótico: caracterização genômica e perfil transcricional. / Jéssica Barboza da Silva . – 2023.

113 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientadora: Roberta Lane de Oliveira Silva.

.

Dissertação (mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, 2023.

Inclui referências.

1. Feijão-caupi. 2. Uva. 3. RNA-Seq. 4. qPCR. I. Benko-Iseppon, Ana Maria (Orient.). II. Silva, Roberta Lane de Oliveira (Coorient.). III. Título.

570

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2024-041

JÉSSICA BARBOZA DA SILVA

**FOSFATOMA DE *Vigna unguiculata* E *Vitis vinifera* SOB ESTRESSE
BIÓTICO: CARACTERIZAÇÃO GENÔMICA E PERFIL TRANSCRICIONAL**

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

Aprovada em: 28/02/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Jose Ribamar Costa Ferreira Neto (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Nataniel Franklin de Melo (Examinador Interno)

Embrapa Semiárido

Prof^o. Dr. Manassés Daniel da Silva (Examinador Externo)

Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Reginaldo de Carvalho (Examinador Externo)

Universidade Federal Rural de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

A Deus, antes de tudo, por guiar meus passos e permitir a celebração dessa conquista.

À minha orientadora Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon, por quem tenho grande admiração e respeito, por todo o suporte e incentivos, além dos conselhos e puxões de orelha. Agradeço também por confiar a mim este trabalho e abrir as portas do laboratório desde a iniciação científica.

À minha coorientadora Dra. Roberta Lane, por toda dedicação, paciência, confiança e ensinamentos. Ao Dr. Nataniel Melo, por quem tenho grande admiração e respeito, agradeço pela colaboração e apoio durante a condução dos experimentos de videira na Embrapa Semiárido.

À minha família por todo apoio. Às minhas irmãs, Ana Karolina e Ana Rafaela, e cunhados, Diego e Márcio, pelo incentivo e apoio incondicional.

À minha sobrinha tão amada, Áyla Barboza Neves, por trazer tanta luz, alegria, leveza e amor à nossa família.

Aos membros do LGBV, em especial à Agnes Guedes, Carlos André e Lívia Vilela, por serem sempre tão solícitos e por me ajudaram nos momentos em que eu mais precisei, com toda paciência e amizade, meu eterno reconhecimento.

Aos amigos de longa data, Romero Medeiros, Paula Cavalcanti, Leidyane Guerra, por todo carinho, atenção, momentos únicos compartilhados, por torcerem por mim, por continuarem comigo apesar da ausência física, eu amo vocês. À Marcela Olivera, por todo apoio e incentivo na reta final do meu curso de doutorado, eu amo você.

Agradeço o suporte financeiro oferecido pelas agências de fomento à pesquisa, CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

A todos que de forma direta ou indireta auxiliaram neste trabalho.

RESUMO

As proteínas fosfatases (PPs) compreendem uma superfamília de enzimas, envolvidas em uma ampla gama de processos metabólicos por meio da desfosforilação de fosfoproteínas, incluindo processos envolvidos na resposta a estresses. As PPs são classificadas em quatro famílias gênicas: PPP (Fosfoproteína fosfatase), PPM (Proteína fosfatase metalo-dependente), PTP (proteína tirosina fosfatase) e AspPP (Aspartato (Asp)-fosfatases dependentes). Dessas, a família PPM (PP2C) é a mais estudada e relatada por seu papel em mecanismos de defesa vegetal. O presente estudo objetivou analisar essa superfamília de proteínas de forma ampla, por meio de abordagens genômicas, transcriptômicas e moleculares utilizando duas espécies de interesse agrônomo: feijão-caupi e videira. As PPs foram investigadas quanto às suas características estruturais, distribuição genômica, mecanismos de expansão genômica, conservação entre outras espécies vegetais, sítios de ligação a fatores de transcrição (TFBSs), e padrões de expressão frente ao estresse biótico. Foram analisados dados de RNA-Seq de cultivares contrastantes de feijão-caupi (IT85F-2687 e BR-14 Mulato) quanto à tolerância ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) e ao *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV), bem como de videira (IAC-572 e Red Globe) inoculadas com a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcpv). As PPs identificadas nos genomas do feijão-caupi e da videira apresentaram, em sua maioria, conservação de suas sequências proteicas. Além disso, relatamos, pela primeira vez, PPs possivelmente associadas à membrana em plantas. O mecanismo expensor das PPs nos genomas do feijão-caupi e da videira foi, majoritariamente, a duplicação segmental. Além disso, essas proteínas apresentaram um alto grau de conservação com outras espécies vegetais. Os FTs C2H2 e DOF foram os TFBSs mais enriquecidos em feijão-caupi e videira, respectivamente, estando diretamente relacionados à resposta vegetal sob as condições de estresse avaliadas. Os dados de RNA-Seq indicaram que a maioria das PPs de feijão-caupi estavam moduladas (induzidas ou reprimidas) em ambas as bibliotecas (CABMV e CPSMV). Além disso, identificamos que cerca de 24% das PPs estavam induzidas e eram específicas para cada um dos estresses aplicados. Em videira, os dados de expressão gênica via qPCR, apontaram a indução de seis genes PPs, 48 horas após imposição do estresse, apontando o envolvimento dessa classe de genes no mecanismo de resposta contra a bactéria *X. citri*. Diante do exposto, nosso estudo disponibiliza dados inovadores sobre o envolvimento das PPs nos mecanismos de defesa vegetal.

Palavras-chave: feijão-caupi. uva. RNA-Seq. qPCR.

ABSTRACT

Protein phosphatases (PPs) comprise a superfamily of enzymes that are involved in a wide range of metabolic processes through the dephosphorylation of phosphoproteins, including processes involved in stress response. PPs are classified into four gene families: PPP (Phosphoprotein Phosphatase), PPM (Metallo-Dependent Protein Phosphatase), PTP (Protein Tyrosine Phosphatase) and AspPP (Aspartate (Asp)-Dependent Phosphatases). Of these, the PPM family (PP2C) is the most studied and reported for its role in plant defense mechanisms. The present study aimed to analyze this superfamily of proteins in a broad way, through genomic, transcriptomic and molecular approaches using two species of agronomic interest (cowpea and grape). PPs were investigated for their structural characteristics, genomic distribution, genomic expansion mechanisms, conservation among other plant species, transcription factor binding sites (TFBSs), and expression patterns under biotic stresses. RNA-Seq libraries were constructed using contrasting cowpea cultivars (IT85F-2687 and BR-14 Mulato) for tolerance to *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) and *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) and grapevine (IAC -572 and Red Globe) inoculated with the bacterium *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (*Xcpv*). The PPs identified in cowpea and grape genomes showed, for the most part, conservation of their protein sequences. Furthermore, we report, for the first time, possible membrane-associated PPs in plants. The expander mechanism of the PPs in cowpea and grape genomes was, mostly, segmental duplication. In addition, these proteins showed a high degree of conservation with other plant species. The TFs C2H2 and DOF were the most enriched TFBSs in cowpea and grape, respectively, being directly related to the plant response under the evaluated stress conditions. RNA-Seq data indicated that most cowpea PPs were modulated (induced or repressed) in both libraries (CABMV and CPSMV). Furthermore, we identified that approximately 24% of the PPs were induced and were specific for each of the applied stresses. In grapevine, validation of gene expression data via qPCR, pointed to the induction of six PPs genes, in 48 hours after stress imposition, pointing to the involvement of this class of genes in response mechanisms against *X. citri*. Therefore, our study provides innovative data on the involvement of PPs in plant defense mechanisms.

Keywords: Cowpea. Grape. RNA-Seq, qPCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com CPSMV.....	21
Figura 2 –	Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com CABMV.....	23
Figura 3 –	Região do submédio do Vale de São Francisco.....	26
Figura 4 –	Sintomas do cancro bacteriano na videira em diferentes tecidos: a) Folha, b) Nervuras e pecíolos das folhas, c) Ráquis dos frutos e d) Bagas.....	28
Figura 5 –	Visão geral do mecanismo de fosforilação e desfosforilação proteica.....	32
Figura 6 –	Classificação das proteínas fosfatases (PPs) com base na especificidade do substrato, mecanismo de catálise e sensibilidade do inibidor. As PPs incluem fosfoproteína fosfatases (PPP), proteínas fosfatases metalo-dependentes (PPM), fosfatases dependentes de aspartato (AspPP), fosfatases de especificidade dupla (DsPTPs) e as proteínas tirosina fosfatases (PTP).....	35

ARTIGO 1

Figura 1 –	Distribuição de genes <i>VvPP</i> no genoma da videira baseada na localização física (Mb) de 19 pseudocromossomos do genoma de <i>V. vinifera</i> . O número de cada pseudocromossomo é exibido na parte lateral. As famílias foram identificadas em cores variadas (<i>VvPPP</i> – verde claro, <i>VvPPM</i> – roxo, <i>VvPTP</i> – vermelho e <i>VvAspPP</i> - azul). Barra de escala na esquerda indica o comprimento (Mb) dos pseudocromossomos de <i>V. vinifera</i>	41
Figura 2 –	Eventos de duplicação gênica de <i>VvPP</i> . As famílias foram identificadas em cores variadas (<i>VvPPP</i> – verde claro, <i>VvPPM</i> – roxo, <i>VvPTP</i> – vermelho e <i>VvAspPP</i> - azul).....	42
Figura 3 –	Visão geral das fosfatases específicas de serina/treonina (STF) em <i>Vitis vinifera</i> . Árvore fenética das STF de <i>V. vinifera</i> e <i>Arabidopsis</i> . As sequências completas de aminoácidos das proteínas fosfatases foram alinhadas utilizando o ClustalW e a árvore fenética foi construída usando o método de <i>Neighbor-joining</i> (NJ) no MEGA11. As duas famílias são representadas por cores diferentes, sendo cinza para as PPP e rosa para as PPM, conforme mostra a legenda e os valores dos nós representam os valores de <i>bootstrap</i>	47

Figura 4 –	Visão geral do grupo das STPYs em <i>Vitis vinifera</i> . Árvore fenética das proteínas fosfatases de <i>V. vinifera</i> e <i>Arabidopsis</i> . As sequências completas de aminoácidos das proteínas fosfatases foram alinhadas utilizando o ClustalW e a árvore fenética foi construída usando o método de <i>Neighbor-Joining</i> (NJ) no MEGA11. Os agrupamentos são representados por cores diferentes, sendo verde para o agrupamento I, laranja para o agrupamento II e azul para o agrupamento III, conforme mostra a legenda e os valores dos nós representam os valores de <i>bootstrap</i>	48
Figura 5 –	a) Análise de sintenia dos genes <i>VvPP</i> entre <i>V. vinifera</i> e <i>A. thaliana</i> e <i>V. vinifera</i> e <i>O. sativa</i> . As linhas cinzas ao fundo indicamos blocos colineares entre as espécies enquanto as linhas verdes e vermelhas indicam as sintenias entre os pares de genes <i>VvPP</i> entre <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> , respectivamente. B) Diagrama de Venn de genes <i>VvPP</i> ortólogos entre <i>V. vinifera</i> e <i>A. thaliana</i> (<i>VvPPs</i> x <i>AtPPs</i>), <i>V. vinifera</i> e <i>O. sativa</i> (<i>VvPPs</i> x <i>OsPPs</i>) <i>OsPPs</i>) e <i>V. vinifera</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> (<i>VvPPs</i> x <i>AtPPs</i> x <i>OsPPs</i>).....	51
Figura 6 –	<i>Heatmap</i> das fosfatases diferencialmente expressas (DEs) no tempo de 90 minutos (T=90') de <i>Vitis</i> spp. [cultivar Red Globe (V.v) e híbrido IAC-572 (V.h)] contrastantes quanto à infecção por <i>X. citri</i> . Na visualização gráfica, a cor branca indica a ausência de expressão, os níveis de verde (reprimido) e vermelho (induzido) estão relacionados com a intensidade de expressão na biblioteca em análise.....	52

ARTIGO 2

Figura 1 –	Distribuição dos genes fosfatase no genoma de <i>V. unguiculata</i> . As diferentes famílias fosfatases são distinguidas em cores diferentes: PPP (roxo), PPM (vermelho), PTP (amarelo) e AspPP (preto). As abreviaturas são as seguintes: Vu (<i>V. unguiculata</i>), Chr (pseudocromossomo), PPP (fosfoproteína fosfatases), PPM (proteínas fosfatases metalo-dependentes), PTP (proteínas tirosina fosfatases) e AspPP (fosfatases dependentes de aspartato). Os comprimentos dos pseudocromossomos são mostrados em Mb (milhões de bases) O dendrograma foi gerado pelo software TBtools.....	80
Figura 2 –	Categorias e quantidades, considerando os principais mecanismos de expansão dos genes <i>VuPPs</i>	81
Figura 3 –	Eventos de duplicação dos genes <i>VuPPs</i> . As barras marrons indicam os 11 pseudocromossomos da espécie. As linhas coloridas indicam os genes duplicados dentro de Cada família.....	82
Figura 4 –	Análise de sintenia entre <i>V. unguiculata</i> , <i>P. vulgaris</i> e <i>G. max</i> . As linhas em cinza indicam os blocos colineares entre as espécies enquanto que as linhas azuis e vermelhas destacam	

	os pares sintênicos dos genes <i>VuPPs</i>	84
Figura 5 –	a) Quantidade de transcritos <i>VuPPs</i> diferencialmente expressos nos tratamentos estudados. b) Diagrama de Venn para os transcritos <i>VuPP</i> diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre os estresses por CABMV e CPSMV em 60 minutos de interação patogênica. c) Diagrama de Venn para os transcritos <i>VuPP</i> diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre os estresses por CABMV e CPSMV em 16 horas de interação patogênica. Mi = Injúria mecânica; CABMV = <i>Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus</i> ; CPSMV = <i>Cowpea Severe Mosaic Virus</i>	86

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1 – Domínios específicos da família PPP retornados pelo CD-Search.....	39
Tabela 2 – Tempo de divergência estimado dos pares de genes de <i>VvPP</i>	43
Tabela 3 – Expressão relativa (em qPCR e RNA-Seq) dos genes <i>VvPP</i> em cDNAs de tecidos foliares de videira infectada com <i>X. citri</i> após 90 minutos e 48 horas.....	53

ARTIGO 2

Tabela 1 – Fatores de transcrição ancorados nos promotores dos genes <i>VuPP</i> com seus respectivos identificadores na Matrix JASPAR.....	79
Tabela 2 – Genes <i>VuPPs</i> duplicados com seus respectivos tempos de duplicação.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Avr	Avirulência, <i>Avirulence</i>
BLAST	Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
cDNA	DNA Complementar, <i>Complementary DNA</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
ET	Etileno, <i>Ethylene</i>
ETI	Imunidade desencadeada pelo efetor, <i>effector-triggered immunity</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FT	Fator de transcrição, <i>Transcription Factor</i>
GLR	Receptor tipo glutamato, <i>Glutamate receptor-like</i>
HAMP	Padrões moleculares associados a herbívoros, <i>Herbivore-associated molecular patterns</i>
HR	Reação de Hipersensibilidade, <i>Hypersensitive Response</i>
LRR	Repetições Ricas em Leucina, <i>Leucine Rich Repeats</i>
MEGA	Análises Genéticas da Evolução Molecular, <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
mRNA	RNA mensageiro, <i>Messenger RNA</i>
MAMP	Padrões moleculares associados a microrganismos, <i>Microbe associated molecular pattern</i>
N	Nitrogênio, <i>Nitrogen</i>
NO	Óxido Nítrico, <i>Nitric Oxide</i>
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
pb	Pares de bases, <i>Base pairs</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PKs	Proteínas quinases, <i>protein kinases</i>
PPKL	Fosfatases de proteínas com domínios semelhantes a Kelch, <i>protein phosphatases with Kelch-like domains</i>
PPM	Fosfatases proteicas dependentes de metal, <i>metallo-dependent protein phosphatases</i>

PPP	Fosfoproteína fosfatases, <i>phosphoprotein phosphatases</i>
PPs	Proteínas fosfatases, <i>protein phosphatases</i>
PTP	Proteína tirosina (Tyr) fosfatases, <i>protein Tyrosine (Tyr) phosphatases</i>
RT-qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real, <i>Quantitative Real Time PCR</i>
PTI	Imunidade desencadeada por PAMPs, <i>PAM-triggered immunity</i>
PR	Proteína Relacionada À Patogênese, <i>Pathogen Related</i>
PRR	Receptores de reconhecimento padrão, <i>PAMP-recognition receptor</i>
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos, <i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
RLPH	Fosfatases do tipo Rhizobiales/Rhodobacterales/Rhodospirillaceae, <i>Rhizobiales/Rhodobacterales/Rhodospirillaceae-like phosphatases</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, <i>Ribonucleic Acid</i>
RNAseq	Sequenciamento do RNA, <i>RNA Sequencing</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio, <i>Reactive oxygen species</i>
R	Resistência, <i>Resistance</i>
SA	Ácido salicílico, <i>Ácido salicílico</i>
SLP	Fosfatases do tipo Shewanella, <i>type-one protein phosphatase Shewanella-like phosphatases</i>
STP	Fosfatases específicas de serina (Ser)/treonina (Thr), <i>Serine (Ser)/Threonine (Thr)-specific phosphatases</i>
STTP	Fosfatases específicas de serina (Ser)/treonina(Thr)/tirosina(Tyr), <i>Serine (Ser)/Threonine (Thr)/Tyrosine (Tyr)-specific phosphatases</i>
TOPP	Proteína fosfatase tipo um, <i>type-one protein phosphatase</i>
Xcpa	<i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>anacardii</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	GERAL.....	17
2.2	ESPECÍFICOS.....	17
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1	CULTURAS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA.....	18
3.1.1	<i>Vigna unguiculata</i>: aspectos botânicos, socioeconômicos e nutricionais.....	18
3.1.1.1	Restrições na produção do feijão-caupi.....	19
3.1.1.2	Estresse biótico em feijão-caupi.....	19
3.1.1.2.1	<i>Cowpea severe mosaic virus (CPSMV)</i>	20
3.1.1.2.2	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)</i>	22
3.1.2	<i>Vitis vinifera</i>: Aspectos botânicos, socioeconômicos e nutricionais.....	23
3.1.2.1	Restrições na produção da videira.....	26
3.1.2.2	Cancro bacteriano da videira: Etiologia e epidemiologia.....	27
3.1.2.3	Cultivares de <i>Vitis</i> spp. e a resistência a <i>Xanthomonas citri</i>	29
3.2	ESTRATÉGIAS DE DEFESA VEGETAL FRENTE AO ESTRESSE BIÓTICO.....	30
3.2.1	Modificação pós-traducional: Fosforilação.....	32
3.2.1.1	Proteínas fosfatases.....	33
3.2.1.2	Proteínas fosfatases na resposta ao estresse biótico.....	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1	ARTIGO 1: Fosfatoma de <i>Vitis vinifera</i> : Análise genômica ampla e transcriptômica em <i>Vitis</i> spp. na resposta de defesa à <i>Xanthomonas citri</i> pv vitícola.....	37
4.2	ARTIGO 2: Fosfatoma de <i>Vigna unguiculata</i> : Abordagem genômica e transcriptômica sob condições de estresse biótico..	75
5	CONCLUSÕES.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103

1 INTRODUÇÃO

Mecanismos de defesa das plantas são ativados mediante uma cascata de transdução de sinais, que se inicia através do reconhecimento de sinais exógenos do patógeno pela planta hospedeira, culminando numa reprogramação do metabolismo celular, que engloba a ativação de barreiras físicas e químicas, envolvidas no processo de defesa (RICHTER e RONALD, 2000). Dentre as barreiras físicas destacam-se o fortalecimento da parede celular, o qual promove uma barreira entre a célula e o patógeno, a biossíntese de lignina, formação de camadas de cortiça bem como a formação de calos após o ataque de microrganismos (CHISHOLM et al., 2006). As barreiras químicas representam a segunda estratégia de defesa vegetal, chamada “resistência de campo”, a qual compreende a produção de metabólitos secundários e proteínas antimicrobianas, uma vez que a planta detecte a presença de padrões moleculares associados a micróbios (*Microbe-Associated Molecular Patterns* - MAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns* - PAMPs), levando a indução de uma cascata de sinalização e desencadeando a Imunidade Desencadeada pelo PAMP (PAMP *Triggered Immunity* – PTI) (SALVAUDON et al., 2005; MIYA et al., 2007).

Para superar a resistência de campo, moléculas efetoras (Avr) de patógenos evoluíram, as quais têm como alvo componentes regulatórios específicos do sistema basal de defesa. As plantas, por sua vez, desenvolveram um segundo mecanismo imune conhecido como “resistência hospedeiro-específica”, a qual é mediada por proteínas de resistência 3 (*Resistance* - R), que protegem a planta contra os efetores provenientes do patógeno (INGLE et al., 2006). O reconhecimento destas moléculas efetoras através dos genes R dá início a uma segunda linha de defesa, conhecida como Imunidade Desencadeada por Efetores (*Effector-Triggered Immunity* – ETI) (AMORIM et al., 2017). Já é sabido que nos primeiros 15 minutos após a interação planta-patógeno ocorre a indução de fluxos iônicos através da membrana plasmática, produção de compostos reativos de oxigênio (ROS) e óxido nítrico, bem como uma reprogramação da expressão gênica por meio da ação de fatores de transcrição (FTs) e proteínas quinases e fosfatases (BENKO-ISEPPON et al., 2010; SANABRIA et al., 2010).

Os quinomas (conjunto de proteínas quinase - PKs) de diversas espécies vegetais já foram extensivamente investigados e provaram ser reguladores chave do metabolismo celular basal, além de participarem de respostas refinadas, atuando nas vias de sinalização

de diferentes agentes estressantes, sejam de natureza abiótica ou biótica (RITSEMA et al., 2007; SINGH et al., 2013; ZULAWSKI et al., 2014; WEI et al., 2014; LIU et al., 2015; GILL et al., 2017; ZHU et al., 2018a; ZHU et al., 2018b; YAN et al., 2018; LIU et al., 2020 e FERREIRA-NETO et al., 2021). No entanto, as proteínas que complementam a ação das PKs, as PPs carecem de informações genômicas, tendo sido disponibilizados, até o momento, o fosfatoma de duas espécies: *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (KERK et al., 2002 e SINGH et al., 2010). Também foram disponibilizados dados isolados de famílias PPs, comprovando sua importância em diversos processos vegetais, como desenvolvimento, imunidade vegetal e na resposta a estresses bióticos e abióticos (XUE et al., 2008; BRADAI et al., 2018; KHAN et al., 2020; CHAO et al., 2020; QIU et al., 2022).

As PP atuam por meio da desfosforilação (remoção do grupo fosfato – PO₂), de proteínas fosforiladas. Com base no resíduo de aminoácido que desfosforilam preferencialmente, as PP são divididas em quatro famílias: as fosfoproteínas fosfatases (PPP), proteínas fosfatases metalo-dependente (PPM), proteína tirosina fosfatase (PTP) e fosfatases dependentes de aspartato (AspPP). As famílias PPP e PPM são fosfatases específicas de serina e treonina e pertencem ao grupo das STPs (serina/treonina fosfatases), apesar de apresentarem o mesmo sítio de desfosforilação e estarem intimamente relacionadas, essas famílias não apresentam homologia de sequência e requerem diferentes íons metálicos – PPP - manganês (Mn²⁺) e ferro (Fe²⁺) e PPM- magnésio (Mg²⁺) e Mn²⁺ – formando assim duas famílias distintas (DAS et al., 1996, BARR et al., 1998, SHI, 2009). Por sua vez, as famílias PTPs e AspPPs apresentam sítios de desfosforilação mais diversos, sendo reunidas, neste estudo, no grupo das fosfatases de serina, treonina e tirosina (STTPs). As PTPs desfosforilam resíduos específicos de tirosina; nessa família encontram-se também as fosfatases de especificidade dupla (DsPTPs) que podem desfosforilar resíduos de serina, treonina e tirosina, utilizando resíduos de cisteína para a atividade fosfatase. Por sua vez, os membros da família AspPPs desfosforilam resíduos de ser, thr e tyr, e utilizam resíduos de aspartato para sua atividade catalítica (SHI 2009, BARR et al., 2011).

Portanto, um entendimento minucioso sobre o mecanismo de controle das proteínas fosfatases, como também a identificação de seu papel nas respostas de defesa aos diferentes estresses é fundamental para elucidar mecanismos específicos de adaptação e resistência das plantas em condições adversas, tornando-se foco de interesse para a biotecnologia com possíveis aplicações no melhoramento genético vegetal.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar e caracterizar fosfatases de *Vitis vinifera* e *Vigna unguiculata* envolvidas nos mecanismos de defesa associados à interação patogênica com *Xanthomonas citri* (em videira), CABMV e CPSMV (em feijão-caupi) visando selecionar alvos promissores para validação por qPCR e aplicação em programas de melhoramento vegetal.

2.2 ESPECÍFICOS

I. Identificar o conjunto de genes que constitui o fosfatoma da videira e do feijão-caupi e comparar seus ortólogos em eucariotos para encontrar regiões conservadas (domínios e motivos) características dessa família gênica;

II. Avaliar as sequências genômicas de fosfatases de videira e feijão-caupi inferindo sobre sua distribuição, evolução, diversidade estrutural e funcional.

III. Realizar uma análise genômica comparativa para a identificação de genes sintênicos entre

V. vinifera, *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* e entre *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max*, inferindo sobre sua conservação e macrossintenia.

IV. Analisar o perfil transcricional dos genes *PPs* em videira e feijão-caupi nos diferentes tratamentos visando selecionar alvos para validação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

V. Avaliar a expressão diferencial por qPCR de transcritos *PPs* alvos em videira e do feijão-caupi.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CULTURAS DE IMPORTÂNCIA AGRONÔMICA

3.1.1 *Vigna unguiculata*: aspectos botânicos, socioeconômicos e nutricionais

O feijão-caupi, feijão-de-corda ou feijão-macassar [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa anual de grande importância agronômica no mundo. Trata-se de uma espécie diploide ($2n = 2x = 22$), com seu genoma contendo em torno de 620 milhões de pares de bases (LONARDI et al., 2019). O feijão-caupi é classificado morfológicamente como uma planta herbácea, autógama, que apresenta raiz pivotante e com ramificações laterais, folhas primárias sésseis, simples e opostas e altamente variável (forma e tamanho), folhas secundárias trifoliadas e alternas, inflorescência axilar e flores pediceladas, as vagens variam em forma, cor, tamanho e número de sementes (VERDCOURT, 1970, ARAÚJO et al., 1985).

Com origem no continente africano, o feijão-caupi é cultivado atualmente em cerca de 100 países (SINGH, 2014; GONÇALVES et al., 2016). Mundialmente, possui uma área de cultivo superior a 12,5 milhões de hectares, com a África apresentando 98% dessa superfície. Entre os anos de 2012 e 2016 a cultura atingiu uma produção média de 7,0 milhões de toneladas por ano (FAO, 2020). Segundo os dados divulgados pela FAOSTAT (2020) e Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB (2021) relacionados a safra 2020/2021, os dez maiores produtores de feijão-caupi no mundo, em ordem decrescente, são: Nigéria, Níger, Burkina Faso, Brasil, Gana, Mali, Camarões, Sudão, República Unida da Tanzânia, e Mianmar. Em conjunto, esses dez países respondem por cerca de 89% (9.526.844 ton.) da produção de feijão-caupi no mundo (Figura 1), onde o Brasil ocupa o 4º lugar no *ranking* dos maiores produtores mundiais da cultura.

O feijão-caupi é cultivado no Brasil desde o Século XVI, mas foi somente a partir do Século XX que a cultura emergiu como uma das leguminosas mais cultivadas, ganhando alta visibilidade no setor agrícola, devido, principalmente, aos seus aspectos nutricionais (BOUKAR et al., 2013; SINGH, 2010; SINGH et al., 2002). Segundo a CONAB, a produção nacional de feijão-caupi na safra 2020/2021 foi de 695,6 mil toneladas, com uma produtividade de 153,2 kg/ha e uma área de 1.351 mil hectares, apresentando uma retração

de 2,44% na produção em relação à safra anterior, que foi da ordem de 712,6 mil toneladas (CONAB, 2021). Além disso, a região Nordeste apresenta notoriedade no que tange à produção da cultura, contribuindo com 403,6 mil toneladas na safra de 2020/2021, seguido pelo Centro-Oeste, Norte e Sudeste, com 203,1, 79,6 e 4,6 mil toneladas, respectivamente (CONAB, 2021).

O feijão-caupi constitui uma importante fonte de nutrientes, sendo composto principalmente por proteínas (~ 25%) e carboidratos, destacando-se pelo alto teor de fibras alimentares, vitaminas e minerais, além de possuir baixos índices lipídicos, sendo altamente valorizado na alimentação humana, produção agropecuária e fertilidade do solo, através da fixação biológica do nitrogênio (ARAGÃO; FARIA, 2013, ALEMU et al., 2016). Assim, o feijão-caupi é uma cultura estratégica para impulsionar a saúde e a segurança alimentar, especialmente em países subdesenvolvidos (SILVA et al., 2018).

Diante do exposto, há uma perspectiva de que o feijão-caupi possa se tornar a principal espécie leguminosa cultivada nas próximas décadas (SINGH, 2014). No entanto, apesar de sua notável importância, a produção ainda é baixa em diferentes locais do mundo, sobretudo devido à influência de diversos agentes estressantes de natureza biótica e/ou abiótica (SINDHU et al., 2019).

3.1.1.1 Restrições na produção do feijão-caupi

Diversas condições de estresses bióticos e abióticos reduzem significativamente o potencial de produtividade e rendimento do feijão-caupi (BOUKAR et al., 2016). Os estresses bióticos abrangem interações entre os vegetais e uma ampla gama de organismos, como pragas, nematódeos, fungos, vírus e bactérias, que podem desencadear um efeito nocivo ao desenvolvimento da planta (HARTLEY, 2001). Por sua vez, os estresses abióticos resultam da indisponibilidade, insuficiência ou excesso de recursos naturais que são essenciais para o desenvolvimento da planta, como calor, seca, salinidade, baixa fertilidade do solo e encharcamento que diminuem o rendimento e a qualidade vegetal, prejudicando a sua sobrevivência (SCHULZE et al., 2005, VAN ZONNEVELD et al., 2020).

3.1.1.2 Estresse biótico em feijão-caupi

As doenças ocasionadas por vírus figuram dentre os principais fatores limitantes da cultura, podendo acarretar na perda total da produção (BARROS, 2010). Os vírus são agentes infecciosos cuja incidência e severidade variam dependendo do hospedeiro, do vetor e da fonte de inóculo (CAMARÇO et al., 2009). O feijão-caupi pode ser naturalmente infectado por cerca de 20 espécies pertencentes a diferentes gêneros de vírus (HAMPTON et al., 1997). No Brasil, os vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV, família *Comoviridae*, gênero *Comovirus*), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV, família *Potyviridae*, gênero *Potyvirus*), *Cucumber mosaic virus* (CMV, família *Bromoviridae*, gênero *Cucumovirus*) e *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV, família *Geminiviridae*, gênero *Begomovirus*), destacam-se como os principais agentes virais que acometem a cultura de forma natural (LIMA et al., 2005; PIO-RIBEIRO et al., 2005).

Além dos vírus, doenças ocasionadas por fungos, como a podridão cinzenta do caule (*Macrophomina phaseolina*), carvão (*Entyloma vignae*), murchas e podridões de fusário e esclerócio (*Fusarium oxysporum f. sp. tracheiphilum*), bem como a mela (*Rhizoctonia solani* Kuhn), são as principais enfermidades fúngicas do feijão-caupi (POLTRONIERE et al., 1994). De forma geral, as doenças virais e fúngicas desencadeiam sintomas mais severos se ocorrerem entre a emergência e a floração, uma vez que interferem diretamente no processo fotossintético. Além disso, desorganizam a síntese e o acúmulo de produtos oriundos da fotossíntese, com reflexos diretos sobre o rendimento da cultura. Dentre todas as patologias mencionadas anteriormente, os vírus CPSMV e CABMV se destacam devido à severidade com que acometem a cultura (BASTOS, 2016), e o fungo *M. pseudophaseolina*, pela baixa disponibilidade de dados na literatura.

3.1.1.2.1 *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV)

A doença conhecida como mosaico severo é acometida pelo vírus CPSMV e foi descrita inicialmente no Brasil por Oliveira, em 1947, no Rio Grande do Sul. Atualmente, a doença é relatada em praticamente todas as regiões produtoras do país, com ocorrência registrada nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de

Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal (BRIOSO et al., 1994, PIO-RIBEIRO et al., 2005 e LIMA et al., 2005). Além do Brasil, a ocorrência do CPSMV compreende ainda os Estados Unidos, Trinidad e Tobago, Porto Rico, El Salvador, Venezuela, Costa Rica, Suriname e Peru (PIO-RIBEIRO et al., 2005).

O CPSMV apresenta forma isomérica de aproximadamente 28 nm de diâmetro, seu genoma é bipartido, com um total de 9,73 kb, sendo constituído de duas moléculas de RNA de fita simples (uma de 6,0 kb –RNA 1 e outra de 3,73 kb –RNA 2), com senso positivo (VAN REGENMORTEL et al., 2000; LIMA et al., 2005). Os RNAs genômicos possuem uma pequena proteína básica [proteína viral associada ao genoma (VPg)] covalentemente ligada às suas extremidades 5', além de serem poliadenilados na extremidade 3', e ambas as moléculas de RNA são necessárias para a infecção (CHEN e BRUENING, 1992). Além das partículas contendo as moléculas de RNA, uma terceira partícula sem ácido nucléico é produzida, cuja presença e concentração dependem da estirpe envolvida (PIO-RIBEIRO et al., 2005). Segundo Lima et al. (2005), o CPSMV apresenta versatilidade biológica possuindo uma ampla gama de espécies hospedeiras, especialmente dentro da família Leguminosae. O CPSMV transmitido experimentalmente é eficientemente disseminado na natureza por coleópteros de modo circulativo (persistente), com o *Cerotoma arcuata* (Oliv.) sendo, possivelmente, o principal vetor do vírus no campo (COSTA et al., 1978; PIO-RIBEIRO et al., 2005).

Os sintomas ocasionados pelo CPSMV são geralmente severos em cultivares suscetíveis, e incluem: intenso encrespamento do limbo foliar (em virtude das bolhosidades) e a presença de mosqueado (alternância de zonas de coloração verde-clara com outras de cor verde-escuro nos folíolos), subdesenvolvimento das nervuras principais resultando em franzimento, redução do limbo e distorção foliar, as plantas podem apresentar intenso nanismo, quando infectadas em estágios iniciais do desenvolvimento (Figura 1), o que pode ocasionar grandes perdas na produção. As sementes oriundas de plantas doentes apresentam-se deformadas, murchadas e manchadas, com redução de seu poder germinativo. Estima-se que o CPSMV possa reduzir a produção da cultura em aproximadamente 80%, dependendo da idade em que a planta for infectada (BARROS, 2007, BASTOS, 2016).

Figura 1 – Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com CPSMV.



Fonte: BARROS (2010).

Como medida preventiva a doença, é indicado o uso de cultivares comerciais com alto grau de resistência ao vírus, como a BR 10 - Piauí, BR 14 - Mulato e BR 17 – Gurguéia (BASTOS, 2016), e medidas auxiliares devem ser adotadas quando os plantios de feijão-caupi forem conduzidos com genótipos susceptíveis, que, em geral, envolvem a aplicação de inseticidas visando reduzir a população de insetos vetores (coleópteros da família Chrysomelidae) (COSTA et al., 1978).

3.1.1.2.2 *Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV)*

O vírus do mosaico transmitido por afídeos, é outra virose que acomete a cultura do feijão-caupi, sendo ocasionado pelas espécies virais *Bean common mosaic virus* (BCMV) e CABMV, ambas do Gênero Potyvirus. Os potyvírus possuem partículas filamentosas e flexuosas com comprimento variando de 690-760 nm e diâmetro em torno de 11-13 nm. O genoma do CABMV é composto por um RNA de fita simples, sentido positivo, com aproximadamente dez mil nucleotídeos e um único tipo de proteína capsial de aproximadamente 34 kDa, representando 95% da constituição química da partícula (LIMA et al., 2005). No Brasil, há relatos dessa virose desde 1974, tendo sido observada também nos Estados Unidos, Itália, Holanda, Austrália, Japão, Filipinas, China, Marrocos e Zâmbia (PIO-RIBEIRO et al., 2005).

A severidade dos sintomas ocasionados pelo vírus depende de fatores como: interação com a estirpe viral, cultivar e temperatura. Os sintomas em plantas infectadas pelo CABMV podem manifestar-se de diversas formas, tais como: mosqueado, mosaico

foliar (áreas amareladas alternadas por outras de verde normal), manchas cloróticas, bolhosidade e deformação foliar, levando a redução do limbo foliar e redução no porte, podendo levar ao nanismo. No entanto, a severidade dos sintomas vai depender da cultivar envolvida, da época e da forma de inoculação (LIMA et al., 2005, BASTOS, 2016).

Figura 2 – Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com CABMV



Fonte: BARROS (2010).

Como medidas de controle para o CABMV, recomenda-se o uso de cultivares resistentes (IT85F-2687, Patativa, TE97-309G-9, TE97-309G-22, TVu 379, TVu 410, TVu 382 e TVu 966) e sementes saudáveis, além de promover a eliminação de plantas hospedeiras do vírus, realizar o controle da população de vetores, bem como o plantio em época de baixa população dos insetos transmissores. Além disso, é recomendado também o uso de fileiras adensadas de milho ou sorgo, visando proteger a cultura, que devem ser plantadas 15 dias antes do cultivo de feijão-caupi (OLIVEIRA et al., 2012, BASTOS, 2016).

3.1.2 *Vitis vinifera*: Aspectos botânicos, socioeconômicos e nutricionais

A família *Vitaceae* (família das videiras), anteriormente conhecida como *Vitidaceae* ou *Ampelidaceae*, pertence à ordem Vitales, que é composta por 14 gêneros e aproximadamente 850 espécies, distribuídas principalmente em regiões tropicais da Ásia, África, Austrália, Neotrópicos e Ilhas do Pacífico, com dois gêneros (*Parthenocissus* Planch. e *Ampelopsis* Michx.) difundidos separadamente no leste da Ásia e leste da América do Norte, respectivamente (SOEJIMA e WEN, 2006; CHASE et al., 2016; COL, 2018). *Vitaceae* tem sido considerado um grupo taxonômico com limites de gênero pouco claros e de difícil

classificação (LOMBARDI, 2000), sendo classificado com base na posição e natureza da inflorescência, grau de desenvolvimento do disco nectarífero e adnação+ à parede do ovário (PLANCHON, 1887), onde foram descritos inicialmente dez gêneros. Posteriormente, novos gêneros foram incluídos na família, *Acareosperma* (GAGNEPAIN, 1919), *Cissus* (LOMBARDI 2000), *Cyphostemma* (ALSTON, 1931) e *Nothocissus* (LATIFF, 1983) e *Yua* (LI, 1990).

Dentre os gêneros de *Vitaceae*, o gênero *Vitis* é o representante mais notável, destacando-se por agregar espécies produtoras de uvas extensivamente cultivadas em todo o mundo, tanto como fruta fresca quanto como matéria prima para fabricação de diversos subprodutos, como sucos, vinhos, uvas-passas e geleias, entre outros (LEÃO et al., 2008). Além disso, é o gênero mais antigo, formado por cerca de 70 espécies, reunidas em três centros de origem: Sul da Europa e Ásia menor, Leste da Ásia e América do Norte e Central (VAVILOV, 1929; CHASE et al., 2016). Suas plantas são trepadeiras perenes, monoicas ou dioicas, com folhas simples, grandes, alternas, apresentando pecíolos e cinco lóbulos pontiagudo. Suas flores são pequenas, pediceladas e actinomorfas, com inflorescência do tipo racemo, podendo ser hermafroditas perfeitas ou apresentarem sexo separados (CHASE et al., 2016).

As espécies do gênero *Vitis* foram agrupadas em dois subgêneros, *Muscadinia* Planch (2n = 40) e *Euvitis* Planch (2n = 38), de acordo com o número de cromossomos, morfologia e origem geográfica. O subgênero *Euvitis* reúne espécies de maior interesse econômico, como as videiras americanas (*V. labrusca*, *V. bourquina* Munson e *V. rotundifolia*) e a europeia (*V. vinifera*) (LEÃO e BORGES, 2009). Devido à sua fácil propagação assexual, diversidade morfológica e genética, o gênero *Vitis* possui cerca de 15.000 cultivares, com diferentes finalidades: uvas de mesa, passas, sucos e vinhos, oriundos de quatro grupos principais, *V. vinifera* puro, híbridos francês-americanos, híbridos americanos e híbridos interespecíficos (JACKSON, 2000). Entretanto, análises de marcadores microssatélites identificaram inúmeros casos de cultivares sinonímias e homonímias de *V. vinifera*, reduzindo o número de cultivares únicas em cerca de 70% (THIS et al., 2006; LEÃO et al., 2008). Contudo, processos naturais (cruzamentos e as mutações), bem como os artificiais (manipulação genética) tornam crescente o número de novas cultivares de videira, favorecendo tanto as características fenotípicas mais vigorosas quanto a obtenção de cultivares mais resistentes e/ou adaptadas as condições adversas (PELLIZZARI, 1997; THIS et al., 2006; LEÃO et al., 2008; GIOVANNINI, 2014).

A videira é uma das espécies frutíferas mais antigas da civilização humana e seus primeiros relatos estão atrelados, principalmente, a um dos seus produtos de consumo, o vinho, que por esse motivo, tornou-se uma das frutas de maior importância agrônômica no mundo (THIS et al., 2006). A produção global de uva gira em torno de 15 milhões de toneladas por ano, com a Espanha, França, China, Itália e Turquia destacando-se entre os cinco países com as maiores áreas de cultivo da videira (OIV, 2020). O Brasil ocupa a 21ª posição, com 80 milhões de hectares (OIV, 2020).

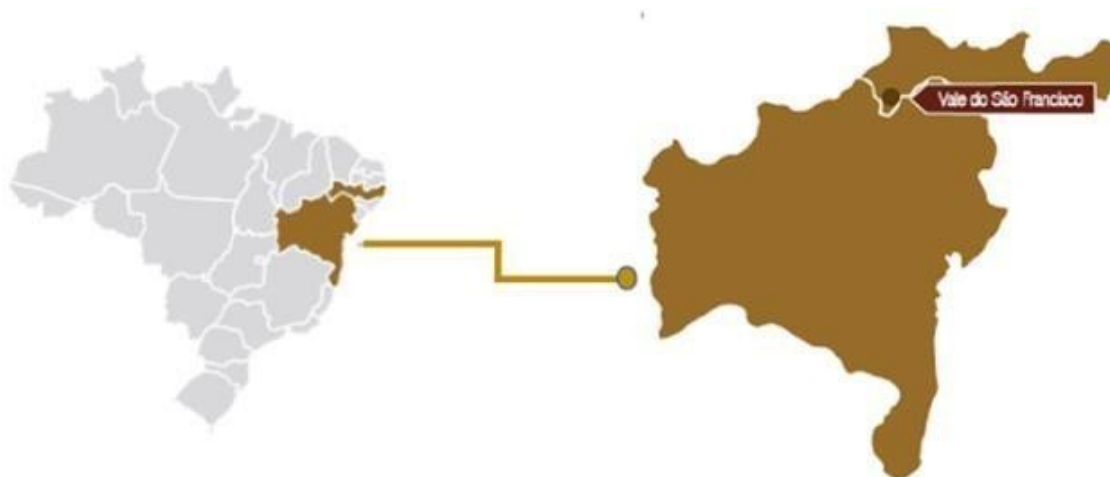
No Brasil, a viticultura apresenta características particulares a cada região de cultivo, devido às diferentes condições climáticas do país, apresentando ciclos de produção, época de colheita e tipos de produtos característicos para cada região. No geral, a viticultura brasileira pode ser dividida em dois grandes grupos, de acordo com a sua finalidade: uvas para consumo *in natura* e uvas utilizadas como insumo para fabricação de subprodutos (sucos e vinhos) (MELLO, 2019). Atualmente, o Brasil produz aproximadamente 1,5 milhões de toneladas de uva por ano (FAOSTAT, 2020), com 46,5% da colheita direcionada para a produção de vinhos e sucos e 53,5% para uvas de mesa (ROCA, 2019). O Brasil ocupa o 15º lugar no *ranking* dos maiores produtores de uva no mundo e o 9º maior produtor de uvas de mesa, destacando a importância do Brasil no cenário vitivinícola mundial (ROCA, 2019).

Em 2020, a produção de uvas no Brasil foi 1.416.398 toneladas, sendo 2,03% inferior à produzida em 2019. A Região Sul é a maior produtora de uvas, contribuindo com 60,24% da produção nacional em 2020, com o Rio Grande do Sul sendo responsável pela produção de 745.356 toneladas, apresentando um aumento de 10,34% em relação ao ano de 2019. A Região Nordeste é a segunda maior produtora de uvas e a primeira em produção de uvas de mesa, contribuindo com cerca de 27% da produção nacional. No entanto, essa região apresentou uma queda de produção em cerca de 38% em relação ao verificado em 2019. Já a Região Sudeste, cuja produção de uvas representou 12,09% da produção nacional em 2020, teve um acréscimo de 1,24% em relação ao ano anterior (Melo e Machado, 2021). Em 2021, a produção nacional foi de 1.748.197 toneladas, com acréscimo de aproximadamente 23% em relação a 2020, numa área plantada de 75.622 hectares (IBGE, 2022).

A viticultura na região Nordeste tem apresentado notoriedade no cenário do agronegócio nacional devido aos altos rendimentos alcançados com a produção de uvas de mesa (com e sem sementes) com um alto padrão de qualidade, bem como pela produção de duas safras e meia de uva por ano, característica que torna essa região a mais

representativa na viticultura nacional (MELLO, 2019). Além disso, este segmento agrícola apresenta grande importância socioeconômica, destacando-se entre as culturas irrigadas com o maior coeficiente de geração de empregos diretos e indiretos (SILVA e COELHO, 2010). Essa região concentra sua viticultura no submédio do Vale do São Francisco (VSF), que compreende os polos de Petrolina-PE e Juazeiro-BA (Figura 1). Em 2021, esse polo envolveu aproximadamente 11 mil hectares de área plantada, representando a segunda região do país que mais produz a fruta, participando com mais de 28% da produção nacional de uva (IBGE, 2022). Nesta região são cultivadas mais de oito variedades de uva (Itália, Benitaka, Red Globe, Crimson, Thompson e Festival, entre outras), incluindo uvas com e sem sementes, tendo em vista o mercado externo (CODEVASF, 2016).

Figura 3 – Região do submédio do Vale do Rio São Francisco.



Fonte: Wine and Food (2019).

3.1.2.1 Restrições na produção da videira

Embora a viticultura no VSF apresente grande visibilidade no cenário do agronegócio, algumas variedades de uva cultivadas na região, como por exemplo, a Red Globe e Itália, são altamente susceptíveis a doenças fúngicas, bacterianas, virais e provocadas por nematoides. Dentre as doenças que podem comprometer ou até mesmo inviabilizar a produção da uva, destacam-se o míldio, oídio, antracnose, podridões dos cachos e cancro bacteriano (HICKEL et al., 2005).

A principal doença fúngica que acomete a videira é o míldio, provocada pelo fungo

Plasmopara viticola, que tem sido um dos principais patógenos limitantes para o cultivo da videira, provocando perdas severas em sua produção. Os fungos *Uncinula necator*, *Phakopsora euvitidis*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Elsinoe ampelina*, agentes causais do oídio, da ferrugem, podridão seca e antracnose, respectivamente, também representam patógenos fúngicos que acometem fortemente a cultura, causando perdas de até 60% na produção (NEVES et al., 2005; BARBOSA, 2010).

No que se refere às viroses, já foram relatadas cerca de 15 espécies de vírus que ocasionam doenças na videira, desencadeando sintomas ou não na planta, o que dificulta a triagem das plantas saudáveis em campo. No entanto, algumas viroses são economicamente importantes, com sintomas característicos, como por exemplo o intumescimento dos ramos, com transmissão indireta (transmissão do vírus pelas cochonilhas *Planococcus ficus*, *P. citri*, *Pseudococcus longispinus* e *P. affinis*) podendo ocasionar morte dos ramos e de mudas jovens, maturação incompleta e mudanças organolépticas na fruta, e consequente queda de produtividade em cultivares de uvas viníferas (KUHN e FARJADO, 2005). Diversas pragas também causam danos diretos à cultura da uva na região Nordeste, em especial os ácaros *Polyphagotarsonemus latus* e *Tetranychus urticae*, que infestam cerca de 30% das folhas da videira em diferentes fases do desenvolvimento, podendo desencadear a morte da planta (HICKEL et al., 2005; OLIVEIRA, 2010).

Atualmente, apenas uma bacteriose de importância econômica para a cultura tem sido relatada no Brasil, o cancro-bacteriano, que é ocasionado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (GAMA et al., 2018), a qual tem sido apontada como um dos mais críticos fatores limitantes da cultura no VSF, causando perdas severas em sua produtividade (NASCIMENTO e MARIANO, 2004; SILVA et al., 2012).

3.1.2.2 Cancro bacteriano da videira: Etiologia e epidemiologia

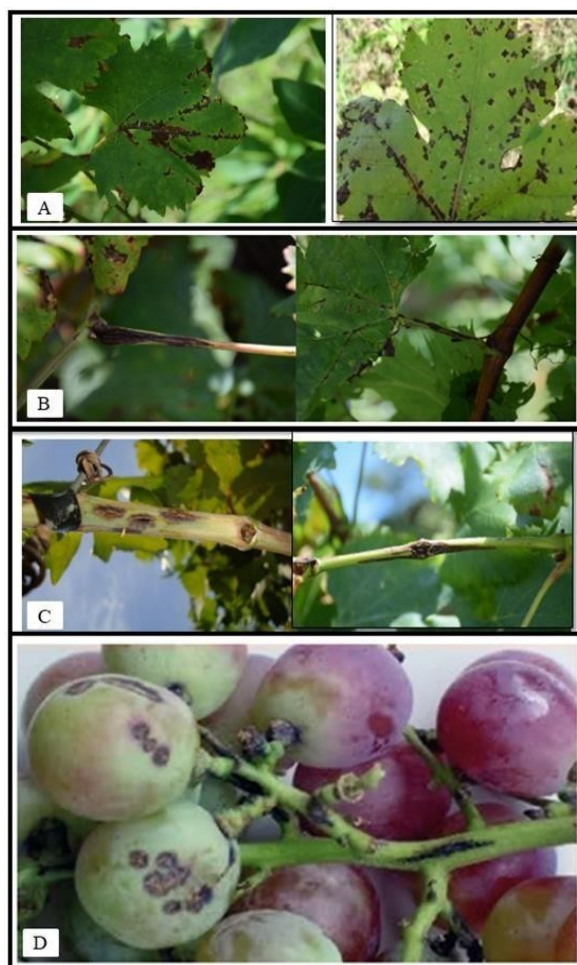
A *X. citri* pv. *viticola*, agente causal do cancro bacteriano da videira, foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1998, no submédio do VSF, em três cultivares de *Vitis* (Red Globe, Piratininga e Itália), onde foram detectadas lesões características da doença. O fitopatógeno foi identificado por meio de análises bioquímicas, fisiológicas, características culturais e de patogenicidade (LIMA et al., 1998, NASCIMENTO et al., 1998; MALAVOLTA

et al., 1999). Os testes de patogenicidade apontaram que a severidade da infecção ocasionada pela *X. citri* varia de acordo com a cultivar infectada (LIMA *et al.*, 1999). Além disso, foram observados sintomas mais severos na cultivar Red Globe comparativamente as demais cultivares utilizadas na região (ARAÚJO, 2001).

De forma geral, as bactérias do gênero *Xanthomonas* fazem parte de um grupo bastante heterogêneo, sendo responsáveis por provocar a podridão e o escurecimento de tecidos vasculares. Em meio de cultura, a bactéria apresenta dimensões de 0,6 x 1,2 - 2,5 µm, colônias arredondadas, convexas, brilhantes, com bordas lisas e coloração esbranquiçada (NAYUDU, 1972). A *X. citri* é uma bactéria fitopatogênica aeróbia, gram-negativa, que pertence à subdivisão das proteobactérias, diferenciando-se da maioria das espécies do gênero por não sintetizar o composto xanthomonadina, que confere coloração amarela brilhante, apresentando colônias apigmentadas (QIAN, 2005).

As videiras infectadas pela *X. citri* apresentam pontos necróticos nas folhas (1-2 mm de diâmetro), podendo apresentar halos amarelados que se expandem e ocasionam a morte de extensas áreas do limbo foliar (Figura 4a). Ocorre o surgimento de cancrios (manchas escuras e alongadas, podendo evoluir para fissuras) nas nervuras e pecíolos das folhas (Figura 4b), na ráquis dos frutos (Figura 4c) e as bagas se desenvolvem de forma desuniforme em tamanho e cor, podendo ou não apresentar cancrios (Figura 4d) (NAYUDU, 1972).

Figura 4 – Sintomas do cancro bacteriano na videira em diferentes tecidos: a) Folha, b) Nervuras e pecíolos das folhas, c) Ráquis dos frutos e d) Bagas.



Fonte: EMBRAPA (2015).

Os sintomas do cancro bacteriano ocorrem de forma mais intensa no primeiro semestre do ano no VSF devido às condições climáticas, que favorecem o desenvolvimento da *X. citri*. Esse período é caracterizado por uma maior incidência de chuvas, alta umidade relativa e temperatura, propiciando a exsudação de pus bacteriano a partir dos cancrios presentes em ramos, favorecendo a disseminação do patógeno (LOPES e NASCIMENTO, 2004; TOSTES, 2012; BARBOSA, 2016). A disseminação pode ocorrer através do contato

planta a planta durante as práticas agrícolas, água da chuva e irrigação (importante veículo disseminador), solo contaminado e por insetos (AGRIOS, 2005). Além disso, observou-se que a *X. citri* sobrevive tanto em plantas sintomáticas como assintomáticas, de forma epifítica em órgãos de parte aérea, sob condições de umidade e temperaturas elevadas (ARAÚJO, 2001).

3.1.2.3 Cultivares de *Vitis* spp. e a resistência a *Xanthomonas citri*

Diversos estudos foram realizados nos últimos anos para melhor compreender a interação entre diferentes cultivares de videira com a bactéria *X. citri*, como o conduzido por Malavolta Jr. e colaboradores (2003), que avaliaram quatro cultivares de *V. vinifera* (Red Globe, Itália, Benitaka e Rubi) e duas cultivares híbridas (Niagara Rosada e Niagara Branca) resultantes do cruzamento entre *V. vinifera* x *V. labrusca* L., sendo observado que todas as cultivares utilizadas no estudo apresentaram suscetibilidade à bactéria, com as espécies de *V. vinifera* exibindo sintomas mais intensos da doença.

Em outro trabalho, avaliou-se a sintomatologia de 20 clones de videira, sendo 13 de copa (incluindo as cultivares comumente utilizadas no VSF, como a Red Globe, Itália, Benitaka, Thompson e Crimson, e sete de porta-enxertos (IAC 572, IAC 766, Courdec, Paulsen, Harmony, 420 A e SO4), sendo verificado uma alta suscetibilidade dos clones de *V. vinifera* ao patógeno, enquanto as cultivares Isabel (*Vitis labrusca*) e Paulsen 1103 (*Vitis berlandieri* x *Vitis rupestris*) apresentaram níveis reduzidos da doença (NASCIMENTO *et al.*, 2006). Em 2016, Zucal realizou um estudo mais abrangente da diagnose do cancro bacteriano, utilizando 53 genótipos de videira, sendo novamente observado que as cultivares viníferas (Itália e Red Globe) eram mais susceptíveis à doença, enquanto os menores níveis de infecção foram observados nas cultivares Moscato, Petit Verdot e BRS Cora.

A Instrução Normativa - IN 09/2006 (Brasil, 2006), tomando como base a regulamentação fitossanitária, classificou as cultivares de videira em três grupos, de acordo com o grau de suscetibilidade a *X. citri*: (i) Alto grau de suscetibilidade (Red Globe), (ii) Média suscetibilidade (Thompson, Benitaka, Festival - Sugraone, Sonaka, Itália e Rubi) e (iii) Baixa suscetibilidade (Niagara Rosada, Niagara Branca e Princês). Embora as variedades de *V. vinifera* tenham apresentado uma maior suscetibilidade a *X. citri*, os

resultados obtidos até o momento demonstraram que esse patógeno também pode afetar espécies híbridas, diferindo apenas quanto ao nível de severidade da doença (LOPES e NASCIMENTO, 2004; NAUE et al., 2014).

A Red Globe, obtida do cruzamento de dois híbridos (*Hunisa* x *Emperor*) x (*Hunisa* x *Emperor* x *Nocera*), é uma das variedades mais cultivadas na região do VSF por possuir boa capacidade de conservação pós-colheita e resistência ao rachamento das bagas em períodos chuvosos e de colheita, o que lhe confere uma alta produtividade. Além disso, tem boa aceitação no mercado devido às suas características morfológicas favoráveis, que incluem cachos e bagas grandes, polpa carnuda, sabor neutro e película resistente (EMBRAPA UVA e VINHO, 2018).

A IAC 572 'Jales' é um híbrido resultante do cruzamento do porta-enxerto 101-14 MGT (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*) com a espécie *V. caribaea*. Esse acesso é atualmente um dos porta-enxertos mais utilizados em regiões produtoras de uvas de mesa devido à sua capacidade de adaptação a solos argilosos, arenosos e ácidos, alto enraizamento, estacas com bom índice de pegamento e resistência a diversas pragas e doenças como a antracnose, míldio, fusariose, filoxera e nematoides (EMBRAPA UVA e VINHO, 2018). Além disso, esse porta-enxerto apresenta boa afinidade com as variedades de uvas de mesa cultivadas no VSF (Red Globe, Itália e Benitaka) (LEÃO, 2010), o que o torna bastante atrativo para uso em programas de melhoramento genético que visem o desenvolvimento de estratégias alternativas envolvendo a ativação do sistema de defesa inato da planta com o intuito de minimizar custos na produção e impactos negativos ao meio ambiente.

3.2 ESTRATÉGIAS DE DEFESA VEGETAL FRENTE AO ESTRESSE BIÓTICO

As plantas estão constantemente expostas a condições adversas ambientais e bióticas. Para garantir sua sobrevivência, desenvolveram, ao longo do seu processo evolutivo, uma intrincada rede de respostas moleculares altamente complexas, dirigida por hormônios vegetais. A sinalização hormonal, ou sinalização imune, garante o ajuste da homeostase vegetal, e pode ser ativada e regulada de acordo com a interação planta-patógeno (ATKINSON e URWIN, 2012; LU et al, 2017; NOBORI e TSUDA, 2019).

Os hormônios vegetais são reguladores centrais da resposta imune. As vias de sinalização do ácido jasmônico (JA) e do ácido salicílico (SA), representam a espinha dorsal

do sistema imune vegetal (WASTERACK e SONG, 2017; ZHANG e LI, 2019). A via JA pode ser subdividida em dois ramos: (1) O ramo ERF da via JA é corregulado pelo etileno (ET) e é ativado mediante infecção com patógenos necrotróficos e (2) O ramo MYC da via JA é corregulado pelo ácido abscísico (ABA) e geralmente fornece proteção contra insetos mastigadores (PIETERSE et al., 2012). Por sua vez, a via SA está relacionada, principalmente, pela interação da planta com patógenos biotróficos. Dessa forma, o tipo de organismo invasor vai determinar quais hormônios se acumulam e quais vias a planta ativa para expressar as respostas de defesa apropriadas ao invasor em questão (BERENS et al., 2019; NOBORI e TSUDA, 2019)

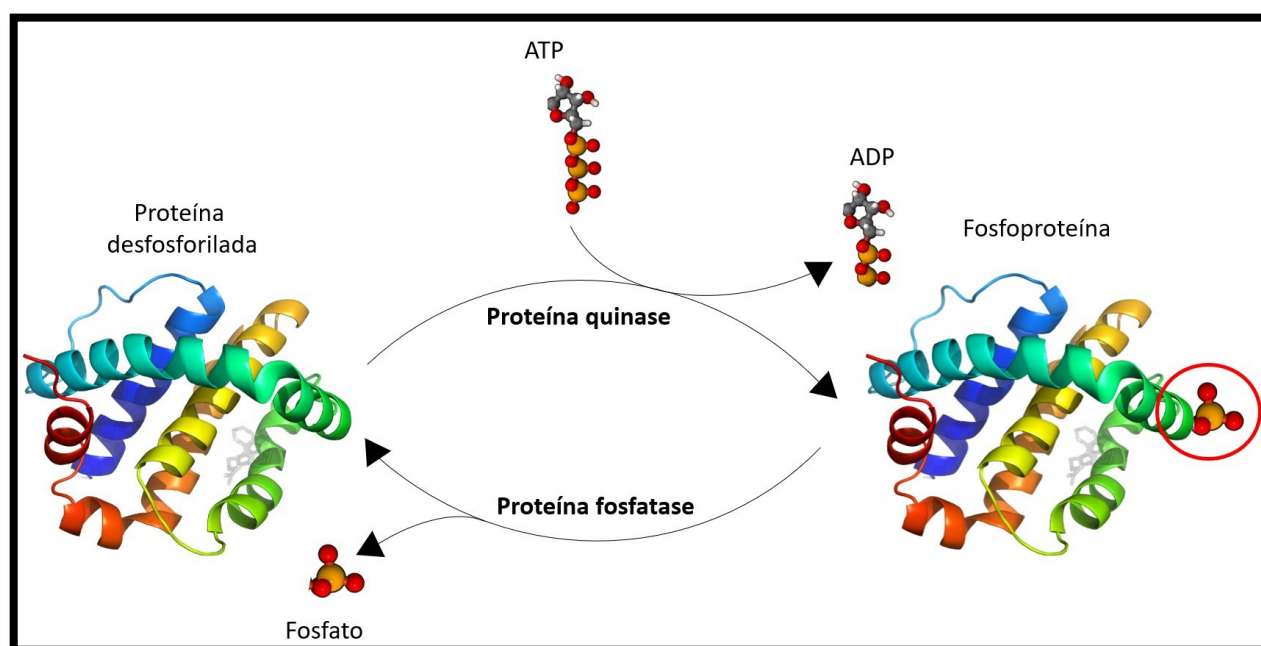
O processo de reconhecimento pelo sistema imune das plantas compreende desde a percepção dos padrões moleculares inespecíficos associados à PAMPs/MAMPs/HAMPS (*pathogen, or microbe, or herbivorous associated molecular patterns*) e GLR (*glutamate receptor-like*) (MIYA et al., 2007; SCHWESSINGER e ZIPFEL, 2008; FORDE e ROBERTS, 2014), como também pelo reconhecimento de moléculas efetores (ETI, *effector-triggered immunity*), ocorrendo uma interação altamente específica entre um gene de resistência (Genes R) da planta e o produto de um gene de avirulência (Avr; *avirulence*) dominante correspondente do patógeno, ativando uma reação de hipersensibilidade – HR na planta, que confere resistência a uma grande variedade de fitopatógenos (TANG et al., 1999, MOFFET, 2009, AMORIM et al., 2017).

Após o contato com o patógeno e da ativação do sistema específico de defesa, várias reações secundárias são desencadeadas. Dentre elas, destaca-se a ativação dos genes relacionados à patogenicidade (PR; *Pathogenesis Related*) que, juntamente com os genes “R” (Resistência), participam dos mecanismos de defesa das plantas tanto contra estresses bióticos quanto abióticos (VAN LOON et al., 2006). Já é sabido que nos primeiros 15 minutos após a interação planta-patógeno ocorre a indução de fluxos iônicos através da membrana plasmática, produção de compostos reativos de oxigênio (ROS) e óxido nítrico, bem como uma reprogramação da expressão gênica por meio da ação de fatores de transcrição (FTs), das proteínas quinase e proteínas fosfatases (BENKO-ISEPPON et al., 2010; SANABRIA et al., 2010). As proteínas fosfatases vêm ganhando destaque por participarem de diversas vias de transdução de sinais, incluindo desde processos basais, como o controle do ciclo celular e desenvolvimento embrionário, até respostas refinadas, como nas vias de reconhecimento a estresses bióticos e abióticos (LEHTI-SHIU et al., 2009).

3.2.1 Modificação pós-traducional: Fosforilação

Modificações pós-traducionais (MPTs), como fosforilação, glicosilação e a acetilação, são eventos de processamento covalente que mudam as propriedades das proteínas por clivagem proteolítica ou por adição de um grupo químico a um ou mais aminoácidos. As MPTs controlam diversos processos celulares que mantêm a homeostase e o funcionamento celular, além de determinar a atividade, localização e interações com outras proteínas, também estando atrelada ao controle da regulação gênica (JENTSCH e SCHLENKER, 1995, KWON et al., 2006). Dentre as MPTs, destaca-se a fosforilação reversível de proteínas, processo no qual proteínas quinases (PKs) e fosfatases (PPs) se ligam a proteínas alvo, ativando e desativando-as pela adição ou remoção reversível de grupos fosfato $[(PO_3)^{2-}]$ (Figura 1).

Figura 5 – Visão geral do mecanismo de fosforilação e desfosforilação proteica



Fonte: a autora (2023).

A fosforilação reversível funciona como um interruptor molecular, que permite a regulação do metabolismo e a transdução de sinal nas células (LEITNER et al., 2011). Cerca de um terço de todas as proteínas eucarióticas são fosforiladas, em sua grande maioria, em resíduos de serina, treonina ou tirosina, controlando uma ampla gama de

funções celulares (WALSH et al., 2005; ANDREEVA e KUTUZOV, 2008). Na célula, as PKs e as PPs têm um papel antagônico no controle da fosforilação. De forma conjunta, promovem a mudança conformacional de proteínas alvo, modulando a sua função, estabilidade e localização celular, bem como influenciam na formação de complexos proteicos. Todo esse dinamismo ocorre através de cascatas de sinalização e regulam diferentes processos celulares como o ciclo celular, diferenciação, interação (célula-célula e célula/substrato) e motilidade celular, resposta imune e na transcrição e tradução gênica (SZOOR, 2010).

As PKs, responsáveis pela fosforilação proteica, compreendem uma das maiores famílias gênicas presente em organismos vegetais, e a maioria dos membros dessa família compartilham uma região N-terminal de folha B para ligar ATP e uma região C-terminal α -helicoidal para se ligar a diferentes substratos. Essa família gênica já foi extensivamente investigada em diferentes organismos vegetais, sendo relatada por seu papel em diversos processos vegetais, incluindo a resposta ao estresse biótico e abiótico. Por sua vez, as PPs, responsáveis pela desfosforilação de fosfoproteínas, estão emergindo como alvos potenciais na participação no processo de defesa vegetal frente a condições adversas de natureza biótica ou abiótica.

3.2.1.1 Proteínas fosfatases

As fosfatases compõem uma superfamília de proteínas responsáveis pela regulação de inúmeros processos celulares, como sinalizações metabólicas, comunicação, crescimento e proliferação celular (BRENCHLEY et al., 2007). Os membros dessa superfamília divergem em suas estruturas tridimensionais, sítios ativos, mecanismos hidrolíticos e sensibilidade do inibidor (BRAUTIGAN, 2013). A partir disso, convencionou-se classificar as PPs em: fosfoproteína fosfatase (PPP), proteína fosfatase metalo-dependente (PPM), proteína tirosina (Tyr) fosfatase (PTP) e aspartato (Asp)-fosfatases dependentes (KERK et al., 2008).

De forma geral, as famílias PPP e PPM são fosfatases específicas de serina (Ser) e treonina (Thr), estando incluídas no grupo das fosfatases de serina e treonina (STPs). Os membros de STP compartilham uma dobra estrutural semelhante, indicando um mecanismo catalítico comum (DAS et al., 1996, FARKAS et al., 2007). Apesar disso, essas

duas famílias não compartilham homologia de sequência e requerem diferentes íons metálicos, sendo o íons Fe^{2+} e Mg^{2+} , específicos para a família PPP e PPM, respectivamente, com o íon Mn^{2+} sendo comum as duas famílias, e apresentam motivos de assinatura gênica distintos e altamente conservados entre seus membros: PPP – GdxHG(x), GdxVDRG(x) e GNHE e PPM – (E/Q)D(x) nDGH (A/G)(x) nD(N/D), onde x representa qualquer aminoácido (DAS et al., 1996, BARFORD et al., 1998, COHEN, 2010, SHI, 2009, LILLO et al., 2014). As STPs compreendem dez subfamílias, dessas, nove pertencem a família PPP e são classificadas como PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6, PP7, PPKL, RLPK e SLP, e a família PPM inclui fosfatases PP2C e outras fosfatases dependentes dos íons Mg^{2+} ou Mn^{2+} (KERK et al., 2008, LILLO et al., 2014, COHEN, 2010).

Já a família PTP reúne fosfatases específicas de tirosina e as famílias DsPTP e AspPP são fosfatases específicas de serina, treonina e tirosina. A estrutura tridimensional das PTPs, apresentam um domínio catalítico único e ausência de homologia de sequência com as STPs, indicando que as PTPs evoluíram de forma independente, além disso, esses dois grupos de PPs divergem também em relação ao seu mecanismo catalítico, enquanto as PTPs e as DsPTPs estão intimamente relacionadas (SINGH et al., 2010; SHI, 2009). O mecanismo hidrolítico da família PTP ocorre através de um resíduo de cisteína (Cys) e esse grupo é dividido em três subfamílias do tipo I, II e III. A subfamília I é a maior e compreende PTPs e DsPTPs específicas de tirosina, identificadas como: MTMs – miotubularinas, MKPs, PRL – fosfatases de regeneração hepática, PTEN – homóloga de tensina, fosfatases CDC14 e DsPTPs atípicas (MOORHEAD, 2009). As PTPs das subfamílias II são específicas para tirosina e treonina, e a subfamília III são LMWPTPs, específicas para tirosina (KERK et al., 2008, NEEL e TONKS, 1997). Por sua vez, as AspPPs utilizam o resíduo de aspartato para a atividade fosfatase e desfosforilam os fosforesíduos de ser, thr e tyr, e incluem fosfatases do tipo FCP (componente associado a TFIIF da RNA polimerase II CTD fosfatase), SCP (pequena fosfatase CTD) e HAD (fosfatases haloácidos dehalogenase) (KERK, 2008).

exógeno e tratamento com a cepa virulenta do patógeno *M. grisea*. Qui et al (2022) avaliando a expressão diferencial de nove genes *PP2C* em caules de tomate infectado com o patógeno *Ralstonia solanacearum* por um período de 3 dias, e relataram que cinco genes *SIPP2C* (*SIPP2C28*, *SIPP2C38*, *SIPP2C43*, *SIPP2C48* e *SIPP2C92*) foram induzidos, um foi constitutivo (*SIPP2C40*) e três genes *SIPP2C* (*SIPP2C14*, *SIPP2C27* e *SIPP2C36*) foram reprimidos. Tais resultados apontam a potencialidade dos genes *PPs* na resistência a diversos agentes patogênicos em plantas, no entanto, a função biológica desempenhada por essa classe de genes ainda precisa ser melhor elucidada (CAO et al., 2016, QUI et al., 2022).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO 1

Artigo a ser submetido à Revista Scientific Reports.

Fosfatoma de *Vitis vinifera*: Análise genômica ampla e transcriptômica em *Vitis* spp. na resposta de defesa à *Xanthomonas citri* pv *viticola*

Jéssica Barboza da Silva¹, Agnes Angélica Guedes de Barros^{1,2}, Roberta Lane de Oliveira Silva², Nataniel Franklin de Melo³, Ana Maria Benko-Iseppon^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 50670-901, Brasil

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 52171-900, Brasil

³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Semiárido, Petrolina, 56300-000, Brasil

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

RESUMO

As proteínas fosfatases (PPs) compreendem uma superfamília de genes envolvidos na regulação das respostas a uma ampla gama de estresses bióticos e/ou abióticos e no desenvolvimento vegetal. No entanto, estudos envolvendo a expressão de PPs em estresses bióticos são escassos. O presente estudo prospectou e caracterizou o conjunto de genes que compõem o conjunto de PPs em videira. Identificamos 129 genes VvPP no genoma de *Vitis vinifera*, que foram classificados em quatro famílias e 33 subfamílias, com suporte da organização exon-intron e composição de motivos conservados. A análise de duplicação gênica indicou que os eventos de duplicação segmental desempenharam um papel crucial na expansão das famílias de genes VvPP. Além disso, com base no perfil de expressão de VvPP indicado no transcriptoma (RNA-Seq), selecionamos seis genes VvPP e analisamos o perfil de expressão por qPCR. Os resultados demonstraram que todos os genes VvPP selecionados foram induzidos, após 48 horas de infecção pela *X. citri*, no acesso IAC-572, apontando seu papel na tolerância da cultivar ao patógeno. Nosso estudo é o primeiro a apresentar uma visão abrangente da caracterização bioinformática de PPs em videira, como também a identificar a expressão diferencial dessa classe de genes na resposta de defesa da videira inoculada com *X. citri*, o que será útil para uma caracterização funcional adicional de PPs em plantas no âmbito da resposta ao estresse biótico.

INTRODUÇÃO

Modificações pós-traducionais (MPT) de proteínas, como fosforilação reversível, que no seu conjunto representam o principal mecanismo de regulação celular presente em organismos eucariotos, responsáveis por alterar a função e a localização de proteínas, como também por participar do controle do comportamento proteico, por meio da ativação e desativação de proteínas¹. Dentre as MTPs, a fosforilação reversível se destaca por participar de quase todas as vias de transdução de sinal celular em organismos eucariotos. Esse processo é catalisado por proteínas do tipo quinase (PK) e fosfatase (PP) as quais atuam, de forma antagônica e neutralizadora, fosforilando (ativando) e desfosforilando (desativando), em sua maioria, resíduos de serina (ser), treonina (tre) e tirosina (tyr) de proteínas¹⁻³.

Neste contexto, o conhecimento de diversas espécies vegetais já foi extensivamente investigado. As PK provaram ser reguladoras-chave do metabolismo celular basal, como também foram relatadas por participarem de respostas refinadas, atuando nas vias de sinalização de diferentes agentes estressantes, sejam de origem abiótica ou biótica⁴⁻¹⁴. No entanto, as proteínas PP, que complementam a ação das PK, ainda carecem de informações genômicas, tendo sido disponibilizados, até o momento, o fosfatoma complementar de apenas duas espécies: *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa*^{15,16}. Além disso, foram disponibilizados dados isolados de famílias e subfamílias das PP, que comprovam sua importância em diversos processos vegetais, como desenvolvimento, imunidade vegetal e resposta a estresses bióticos e abióticos¹⁷⁻²².

As PP atuam por meio da desfosforilação (remoção do grupo fosfato – PO⁻²), de proteínas fosforiladas²³. Com base no resíduo de aminoácido que desfosforilam preferencialmente, as PP são divididas em quatro famílias: as fosfoproteínas fosfatases (PPP), proteínas fosfatases metalo-dependente (PPM), proteína tirosina fosfatase (PTP) e fosfatases dependentes de aspartato (AspPP)²⁴. As famílias PPP e PPM são fosfatases específicas de serina e treonina e pertencem ao grupo das STP (serina/treonina fosfatases), apesar de apresentarem o mesmo sítio de desfosforilação e estarem intimamente relacionadas, essas famílias não apresentam similaridade de sequência e requerem diferentes íons metálicos – PPP - manganês (Mn²⁺) e ferro (Fe²⁺) e PPM- magnésio (Mg²⁺) e Mn²⁺ – formando assim duas famílias distintas^{25,26}. Por sua vez, as famílias PTP, classificadas como PTPs tirosina-específicas e DsPTP (proteína tirosina fosfatase de especificidade dupla), que podem desfosforilar tanto resíduos de fosfotirosina quanto de fosfoserina/fosfotreonina, e a família AspPP, que desfosforilam resíduos de Tyr/Ser apresentam sítios de desfosforilação mais diversos, sendo reunidas, neste estudo, no grupo das fosfatases de serina, treonina e tirosina (STTP)²⁶⁻²⁸.

A cultura da videira tem grande relevância social e econômica no mundo (OIV, 2016). No entanto, o desenvolvimento de doenças vem comprometendo a produtividade ou até mesmo inviabilizando sua produção. Em algumas regiões, a bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, causadora do cancro-bacteriano na videira, tem sido apontada como um dos mais críticos fatores limitantes da cultura, acarretando perdas severas em sua produtividade²⁹⁻

³¹. Com isso, investigar a função dos genes *PP* que participam da resposta de defesa/tolerância aos mais diversos agentes estressantes, pode auxiliar os programas de melhoramento genético vegetal no que tange a seleção de genes que participam de forma crucial na manutenção da homeostase vegetal. No presente estudo, identificamos 129 membros da superfamília fosfatase no genoma de *V. vinifera*. Também avaliamos suas relações evolutivas, arquitetura gênica, motivos proteicos, posição cromossômica e elementos *cis* em regiões promotoras de forma sistemática. A expressão diferencial dos genes *VvPP* sob estresse biótico também foi investigada por qPCR. Os resultados obtidos neste estudo disponibilizam dados importantes sobre as vias moleculares que sustentam a tolerância ao estresse biótico na videira.

RESULTADOS

Identificação e análise de membros da superfamília fosfatase no genoma de *Vitis vinifera*

Identificamos um total de 175 e 1138 proteínas putativas de *VvPP*, pelo HMMER e BLASTp, respectivamente. Após a concatenação dos arquivos e eliminação das sequências redundantes restaram 346 sequências. A análise de domínio indicou um total de 131 sequências com domínio fosfatase, pelo CD-Search e Pfam. Apenas as sequências que continham o domínio fosfatase conservado nos dois algoritmos foram utilizadas neste estudo. Dessa forma, 129 proteínas *VvPP* foram identificadas (**Tabela S1**) e divididas em dois grupos, de acordo com o seu domínio catalítico: a) Fosfatases específicas de Serina e treonina (STPs): 21 *VvPPP* e 65 *VvPPM*, e b) Serina/treonina/tirosina fosfatase (STYPs): 25 *VvPTP* e 18 *VvAspPP*.

A análise de domínio das STPs pela ferramenta CD-Search indicou que a família PPP abriga domínios catalíticos variados e específicos para uma ou mais subfamílias (**Tabela 1**). As subfamílias PP1, PP7, PPKL e SLP apresentam domínios específicos, por sua vez, as subfamílias PP2A, PP4 e PP6 compartilham o mesmo domínio catalítico. Além dos domínios específicos, a análise de domínio pelo CD-Search também retornou um domínio genérico “*MPP_superfamily superfamily*”, que pode pertencer a qualquer subfamília de PPP. Já o Pfam retornou o domínio “*Metallophos*” para todos os membros da família, revelando a maior especificidade do CD-Search sobre o Pfam no que se refere a identificação de domínios específicos para os membros dessa família. Por sua vez, o CD-Search e o Pfam foram igualmente específicos para identificação dos domínios da família PPM e para os membros do grupo das STYPs.

Tabela 1 – Domínios específicos da família PPP retornados pelo CD-Search.

Subfamília(s) PPP	Domínios
PP1	MPP_PP1_PPKL
PP2A, PP4 e PP6	MPP_PP2A_PP4_PP6
PP7	MPP_PP7
PPKL	MPP_Bsu1_C

Além dos domínios fosfatases característicos dos membros de VvPP, foram identificados membros que abrigam domínios adicionais, como PMD, PHA03269 superfamily, motivos Kelch, DSRM e quinase, entre outros. Todos os 129 domínios identificados para VvPP (incluindo domínios fosfatases e domínios adicionais) estão descritos na **Tabela S1**.

As características dos genes *VvPP*, como comprimento dos genes, proteínas, características físico-químicas, GRAVY e regiões transmembranares, estão detalhadas na **Tabela S2**. O comprimento das sequências gênicas e CDS candidatas a *VvPP* variou de 943 (*VvPPM-27*) a 49.242 (*VvPTP-12*) e de 486 (*VvPPM-34*) a 4.419 (*VvPTP-2*) nucleotídeos, enquanto o comprimento das proteínas e o PM relativo variou de 162 aa e 18,434 kDa (*VvPPM-34*) e de 1473 aa e 163,27 kDa (*VvPTP-2*). Aproximadamente 75% das proteínas VvPPs apresentaram pl ácido, compreendendo 100% da família VvPPP, enquanto dois membros da família VvAspPP, nove VvPTP e 16 VvPPM apresentaram pl variando de neutro a básico. O GRAVY das VvPP variou de -0,72 (*VvPTP-8*) a -0,039 (*VvPPM-53*), indicando a predominância da natureza hidrofílica dessas proteínas, com exceção das proteínas VvPTP-16 e VvPTP-24 que apresentaram GRAVY positiva de 0,058 e 0,434, respectivamente. Os resultados da localização subcelular mostraram que mais da metade das proteínas estavam direcionadas para o núcleo, seguido pelo cloroplasto e citoplasma, e em menor quantidade para o sistema endomembranar, região extracelular e mitocôndria. Domínios transmembranares putativos (TMDs) foram pouco representativos nas proteínas VvPP, estando presentes em apenas oito proteínas VvPP, apresentando um TMD (*VvPPM-18*, *VvPTP-1*, *VvPTP-2*, *VvPTP-14*, *VvAspPP-14* e *VvAspPP-17*), três TMDs (*VvPTP-16*) e quatro TMDs (*VvPTP-24*).

Mapeamento cromossômico, estrutura gênica e mecanismos de expansão dos genes *VvPP*

Cento e dezenove genes *VvPP* estão distribuídos em 18 pseudocromossomos de *V. Vinifera* (**Figura 1**), três genes (*VvPPM-60*, *VvPPM-61* e *VvPTP-19*) encontram-se em pseudocromossomos randômicos e sete estão associados ao pseudocromossomo 0 (um *scaffold*) chamado de *chrUn* (**Figura S1**). Os pseudocromossomos 8 e 13 foram os mais representativos, com onze genes *VvPP* em cada. Por outro lado, apenas dois genes *VvPP* foram mapeados no pseudocromossomo 2 e 3. Os pseudocromossomos 6, 5 e 13 se destacaram por conter o maior número de genes *VvPP* das famílias VvPPP, VvPPM e VvPTP, respectivamente. O pseudocromossomo 15 não apresentou nenhum VvPP.

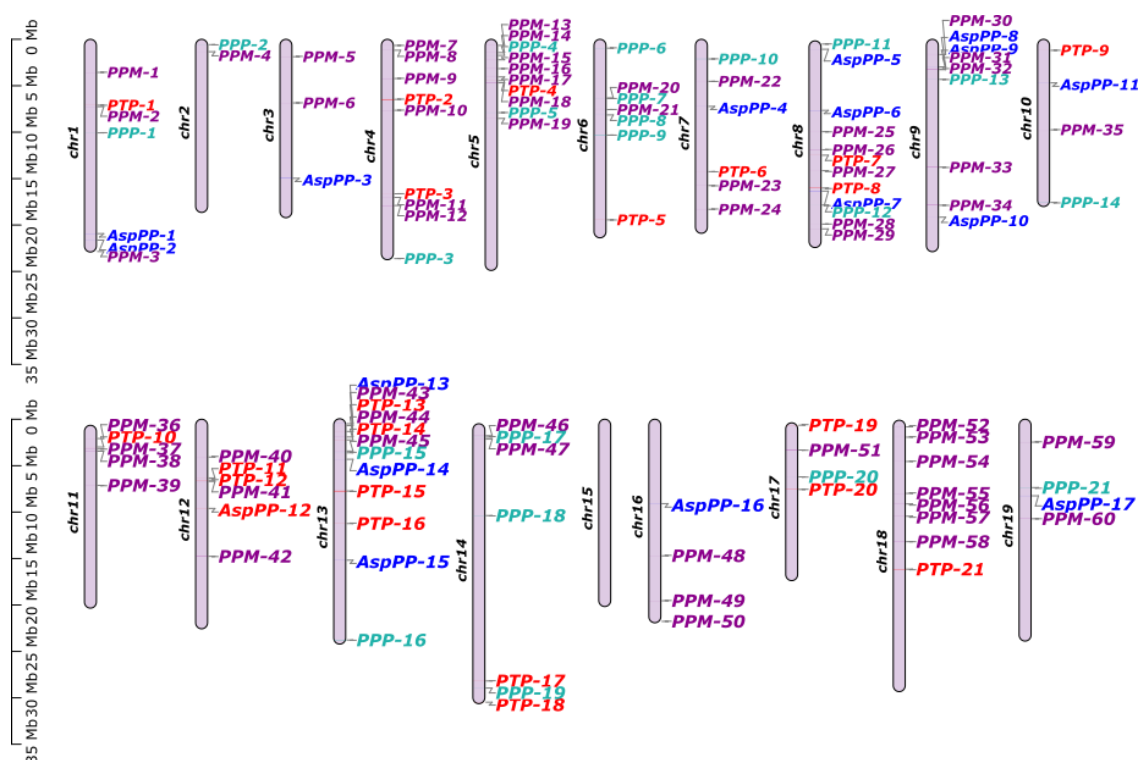


Figura 1 – Distribuição cromossômica de genes *VvPP* da videira. A localização cromossômica é baseada localização física (Mb) de 19 pseudocromossomos de *V. vinifera*. Os números dos pseudocromossomos são exibidos na parte lateral de cada pseudocromossomo. As famílias foram identificadas em cores variadas (*VvPPP* – verde claro, *VvPPM* – roxo, *VvPTP* – vermelho e *VvAspPP* - azul). Barra de escala na esquerda indica o comprimento (Mb) dos pseudocromossomos de *V. vinifera*.

Para estudar a diversidade estrutural nos genes *VvPP* foi avaliada a organização éxon/intron das sequências de codificação de cada gene. De forma geral, o resultado revelou que as proteínas *VvPP* são codificadas por pelo menos um éxon, apresentando uma variação de 1 a 21 éxons, com o número de íntrons variando de 0 a 20. A estrutura dos genes da família *VvPPP* variou de 3 a 21 éxons (2 a 20 íntrons) (**Figura S2**). Os membros da subfamília KELCH apresentaram a estrutura gênica mais divergente da família, apresentando 21 éxons (20 íntrons), as demais subfamílias apresentaram pequenas variações de éxon/intron. Já para a família *VvPPM* a variação foi de 3 a 15 éxons (2 a 14 íntrons), com as subfamílias apresentando, em sua maioria, quantidade de éxons/íntrons semelhantes, com exceção da subfamília E, em que um membro (*VvPPM*-37) apresentou 15 éxons (14 íntrons) (**Figura S3**). Por sua vez, a família *VvPTP* apresentou uma variação de 1 a 22 éxons (0 a 21 íntrons), com as subfamílias MCR, MTM e PTEN.2 apresentando uma maior abundância de éxons/íntrons (16-22/15-21) (**Figura S4**). A estrutura dos genes da família *AspPP* variou de 5 a 16 éxons (5 a 15 íntrons), com a subfamília FCP apresentando membros com maior quantidade de éxons/íntrons (**Figura S5**).

Para compreender o impacto da duplicação gênica na expansão da família *VvPP*, foram analisados os possíveis eventos de duplicação usando os métodos BLASTp e MCScanX. A análise revelou que 15 pares de genes *VvPP* estavam envolvidos em

duplicações segmentares, compreendendo as famílias *VvPPP*, *VvPPM* e *VvAspPP*, e em nenhum par de gene foi identificada duplicação em tandem (**Figura 2, Tabela 2**). O resultado mostrou que a razão Ka/Ks dos genes *VvPP* duplicados variou de 0,13528 a 0,64154 (<1), sugerindo que os genes *VvPP* podem ter sofrido seleção purificadora (**Tabela 2**). Os valores de Ks foram utilizados para calcular o tempo aproximado da duplicação gênica no processo evolutivo dos *VvPPs*, que variou de 32,86 (*VvAspPP-7/ VvAspPP-3*) a 48,88 (*VvPPM-42/ VvPPM-20*) milhões de anos atrás (MYA) (**Tabela 2**).

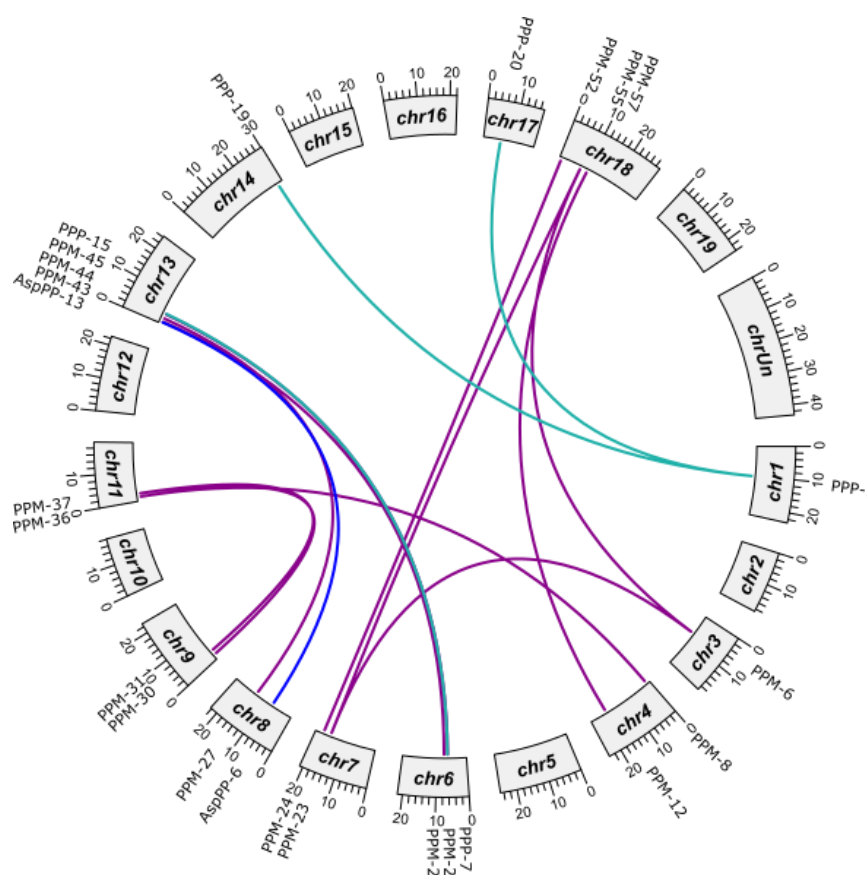


Figura 2 – Eventos de duplicação gênica de *VvPP*. As famílias foram identificadas em cores variadas (*VvPPP* – verde claro, *VvPPM* – roxo, *VvPTP* – vermelho e *VvAspPP* - azul).

Tabela 2 – Tempo de divergência estimado dos pares de genes de *VvPP*.

Pares de genes duplicados					Duplicação	Ka	Ks	Ka/Ks	Pressão Seletiva	Tempo (MYA)
nº	chr	gene1	gene2	chr						
1	chr1	VvPPP-1	VvPPP-18	chr14	Segmental	0,0811	0,599	0,1352753	Purificadora	46,091
2	chr1	VvPPP-1	VvPPP-19	chr17	Segmental	0,0750	0,540	0,1389203	Purificadora	41,510
3	chr13	VvPPP-14	VvPPP-6	chr6	Segmental	0,1691	0,529	0,3196197	Purificadora	40,704
4	chr3	VvPPM-6	VvPPM-22	chr7	Segmental	0,2273	0,496	0,4586428	Purificadora	38,127
5	chr11	VvPPM-35	VvPPM-8	chr4	Segmental	0,2025	0,534	0,3789436	Purificadora	41,100
6	chr11	VvPPM-35	VvPPM-29	chr9	Segmental	0,2415	0,616	0,3920132	Purificadora	47,384
7	chr11	VvPPM-36	VvPPM-30	chr9	Segmental	0,3408	0,580	0,5879614	Purificadora	44,589
8	chr13	VvPPM-42	VvPPM-20	chr6	Segmental	0,2129	0,635	0,3350534	Purificadora	48,882
9	chr13	VvPPM-43	VvPPM-26	chr8	Segmental	0,2861	0,446	0,6415400	Purificadora	34,307
10	chr13	VvPPM-44	VvPPM-19	chr6	Segmental	0,2728	0,629	0,4333709	Purificadora	48,418
11	chr18	VvPPM-51	VvPPM-23	chr7	Segmental	0,1432	0,625	0,2290278	Purificadora	48,110
12	chr18	VvPPM-54	VvPPM-6	chr3	Segmental	0,2759	0,589	0,4681681	Purificadora	45,331
13	chr18	VvPPM-54	VvPPM-22	chr7	Segmental	0,2025	0,463	0,4372184	Purificadora	35,618
14	chr18	VvPPM-56	VvPPM-11	chr4	Segmental	0,1912	0,459	0,4166992	Purificadora	35,292
15	chr13	VvAspPP-	VvAspPP-	chr8	Segmental	0,2525	0,427	0,5910407	Purificadora	32,867
		7	3							

Ka: Nonsynonymous only, Ks: Synonymous only, MYA: Milhões de anos atrás. Ka/Ks < 1: seleção purificadora; Ka/Ks = 1: seleção neutra; enquanto Ka/Ks > 1: seleção positiva.

Alinhamento múltiplo, análises de *Neighbor-joining*, de sítios e de motivos conservados

Para investigar as relações fenéticas das proteínas candidatas a PP em *V. vinifera* e *A. thaliana*, uma árvore foi construída pelo método de *neighbor-joining* para cada grupo de PP identificado neste estudo (STPs e STYPs), com base no comprimento total das proteínas.

O fenograma dos membros de STP (**Figura 3**) construído a partir do alinhamento múltiplo de 87 sequências *V. vinifera* (21 VvPPP e 65 VvPPM) e 98 de *Arabidopsis* (28 AtPPP e 70 AtPPM), demonstrou claramente a separação das famílias PPP e PPM. O fenograma foi dividido em dois *clusters* principais, o *cluster* I (destacado em cinza, *bootstrap* = 100%), que agrupou os membros da família PPP e revelou a formação de oito subfamílias (PP1, PP2A, PP4, PP6, PP7, PPKL, RLPH e SLP), e o *cluster* II (destacado em rosa, *bootstrap* = 100%), que agrupou os membros de PPM e indicou a formação de 13 grupos, classificados de A-M.

O *cluster* I foi subdividido em Ia, Ib, Ic, Id e Ie. O *cluster* Ia agrupou as subfamílias PP1 e PPKL (*bootstrap* = 97%), demonstrando uma alta similaridade entre os seus membros. A subfamília PP1 (*bootstrap* = 100%) foi a mais abundante, reunindo sete e nove membros em *A. thaliana* e *V. vinifera*, já a subfamília PPKL (*bootstrap* = 100%) agrupou dois membros em *V. vinifera* e quatro em *Arabidopsis*, sendo incluída nessa subfamília a proteína VvPPP-10, que contém o domínio genérico “*MPP_superfamily superfamily*”. O *cluster* Ib (*bootstrap* = 100%) reuniu as subfamílias PP2A, PP4 e PP6, que compartilham o mesmo domínio catalítico (*MPP_PP2A_PP4_PP6*). A subfamília PP2A (*bootstrap* = 100%) foi a segunda mais abundante entre os membros de PPP, com cinco representantes em cada espécie. Por sua vez, as subfamílias PP4 (*bootstrap*=100%) e PP6 (*bootstrap*=100%) apresentaram um membro em *V. vinifera* e dois em *Arabidopsis* (**Tabela 1**). Nenhum membro de *V. vinifera* agrupou na subfamília PP5, cujo único membro foi AT2G42810 em *Arabidopsis*, sugerindo evolução divergente. O *cluster* Ic (*bootstrap* = 100%) agrupou dois e três membros de *V. vinifera* e *A. thaliana* da subfamília PP7, incluindo nesse grupo a VvPPP-12, que possui o domínio genérico “*MPP_superfamily superfamily*”. O *cluster* Id e Ie (ambos com *bootstrap* = 100%), por sua vez, reuniu as subfamílias SLP e RLPH que se agruparam distintamente de outras PPP, com a SLP e RLPH apresentando um membro em cada espécie, com o VvPPP-11, que contém o domínio “*genérico*” *MPP_superfamily superfamily*, sendo o representante da RLPH.

O *cluster* II foi subdividido em IIa, IIb, IIc e IId, tornando-se possível classificar os membros de VvPPM em treze subfamílias “clássicas” (A-M), com bons valores de *bootstrap* nos ramos terminais. O *cluster* IIa reuniu os membros da subfamília K, com cinco e três membros para *V. vinifera* e *A. thaliana*, respectivamente. O *cluster* IIb agrupou as subfamílias C e D, com a subfamília D sendo a mais abundante, com nove membros nas duas espécies. Por sua vez, o *cluster* IIc reuniu os membros das subfamílias L, com dois membros em cada espécie, e E, com sete membros em *V. vinifera* e 13 em *A. thaliana*. Já o *cluster* IId, agrupou as demais subfamílias (A, B, F, G, H, I, J e M), com a subfamília A e F sendo as mais abundantes de PPM, com uma variação de nove a 12 membros entre as

espécies. Em contrapartida, a subfamília M foi a menor, com apenas um membro em cada espécie.

O fenograma dos membros de STYPs (**Figura 4**), construído a partir do alinhamento múltiplo de 43 sequências *V. vinifera* (25 VvPTP e 18 VvAspPP) e 52 de *Arabidopsis* (27 VvPTP e 25 VvAspPP). O fenograma foi dividido em três *clusters* principais, o *cluster* I (destacado em verde) e o *cluster* II (destacado em laranja) agruparam membros das famílias PTP e AspPP, e o *cluster* III (destacado em azul) que agrupou membros da família PTP, os baixos valores de bootstrap nos ramos basais podem estar relacionados com a alta similaridade entre os membros de STYPs.

O *cluster* I, foi subdividido em Ia e Ib. O *cluster* Ia reuniu três subfamílias, a HAD da família AspPP, com um membro em *V. vinifera*, e LMWPTP e PTEN.1, da família PTP, com um e dois membros em *V. vinifera*, respectivamente. Já o *cluster* Ib agrupou os membros de PTP, da subfamília MCR, com um membro em *V. vinifera*, formou um grupo órfão com oito membros da família AspPP, o qual não agrupou com nenhum outro membro de *A. thaliana* e revelou uma possível perda do gene CDC25, uma vez que a proteína “AT5G03455” de *A. thaliana* não agrupou com nenhum membro de *V. vinifera*. O *cluster* II, dividido em IIa e IIb, onde IIa agrupou um membro da família EYA em *V. vinifera* e o IIb reuniu membros da subfamília FCP, sendo a maior da família AspPP, com nove membros. Por sua vez, o *cluster* III, dividido em IIIa e IIIb, reuniu quatro subfamílias de PTP, com a subfamília MTM apresentando dois membros pertencentes ao *cluster* IIIa, e as subfamílias PTEN.2, PTP e DSP1 e 2, pertencendo ao *cluster* IIIb, com a subfamília DSP (DSP1 e DSP2) sendo a mais abundante dentro das PTPs, com 15 membros em *V. vinifera*.

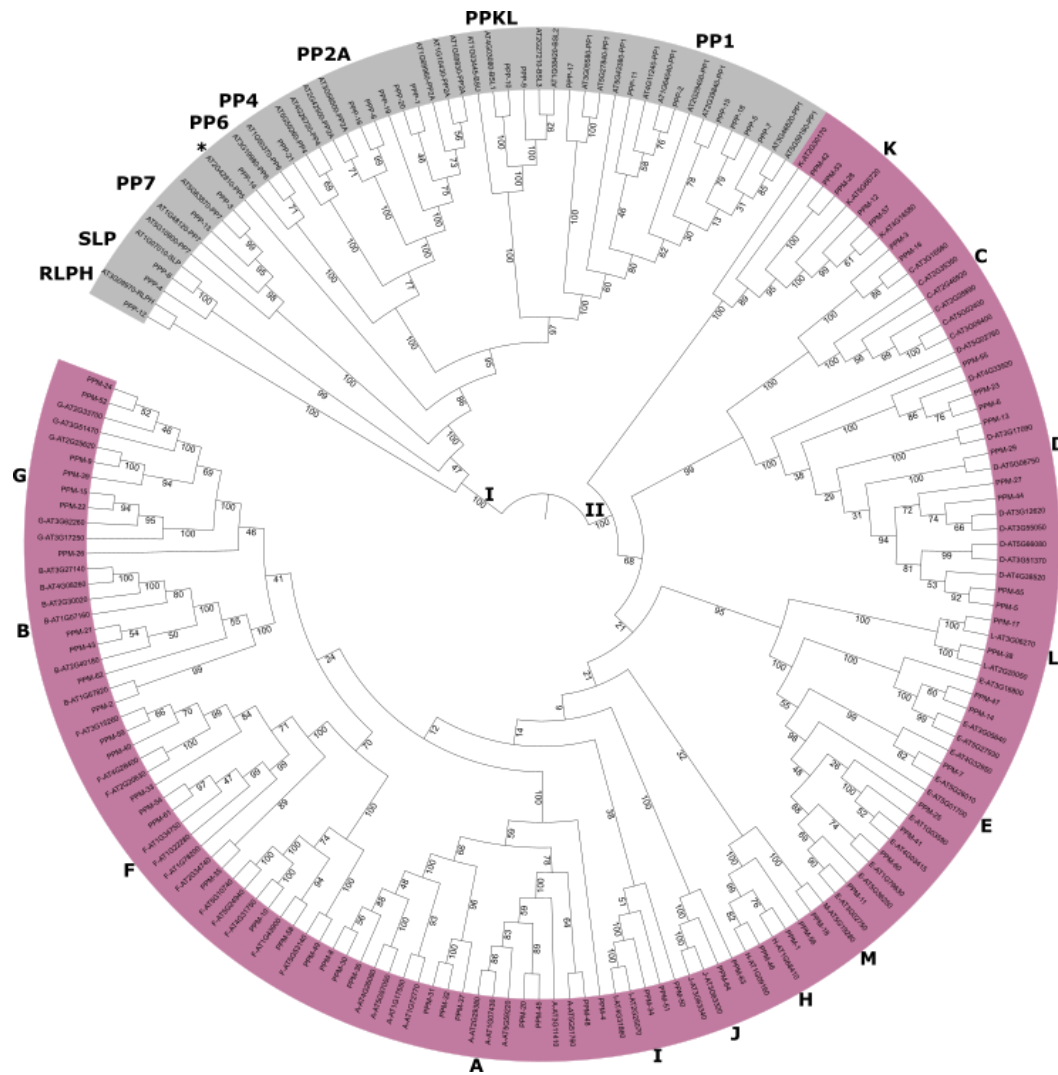


Figura 3 – Visão geral das fosfatases específicas de serina/treonina (STF) em *Vitis vinifera*. Árvore fenética das STF de *V. vinifera* e *Arabidopsis*. As sequências completas de aminoácidos das proteínas fosfatases foram alinhadas utilizando o ClustalW e a árvore fenética foi construída usando o método de *Neighbor-joining*(NJ) no MEGA11. As duas famílias são representadas por cores diferentes, sendo cinza para as PPP e rosa para as PPM, conforme mostra a legenda e os valores dos nós representam os valores de *bootstrap*.

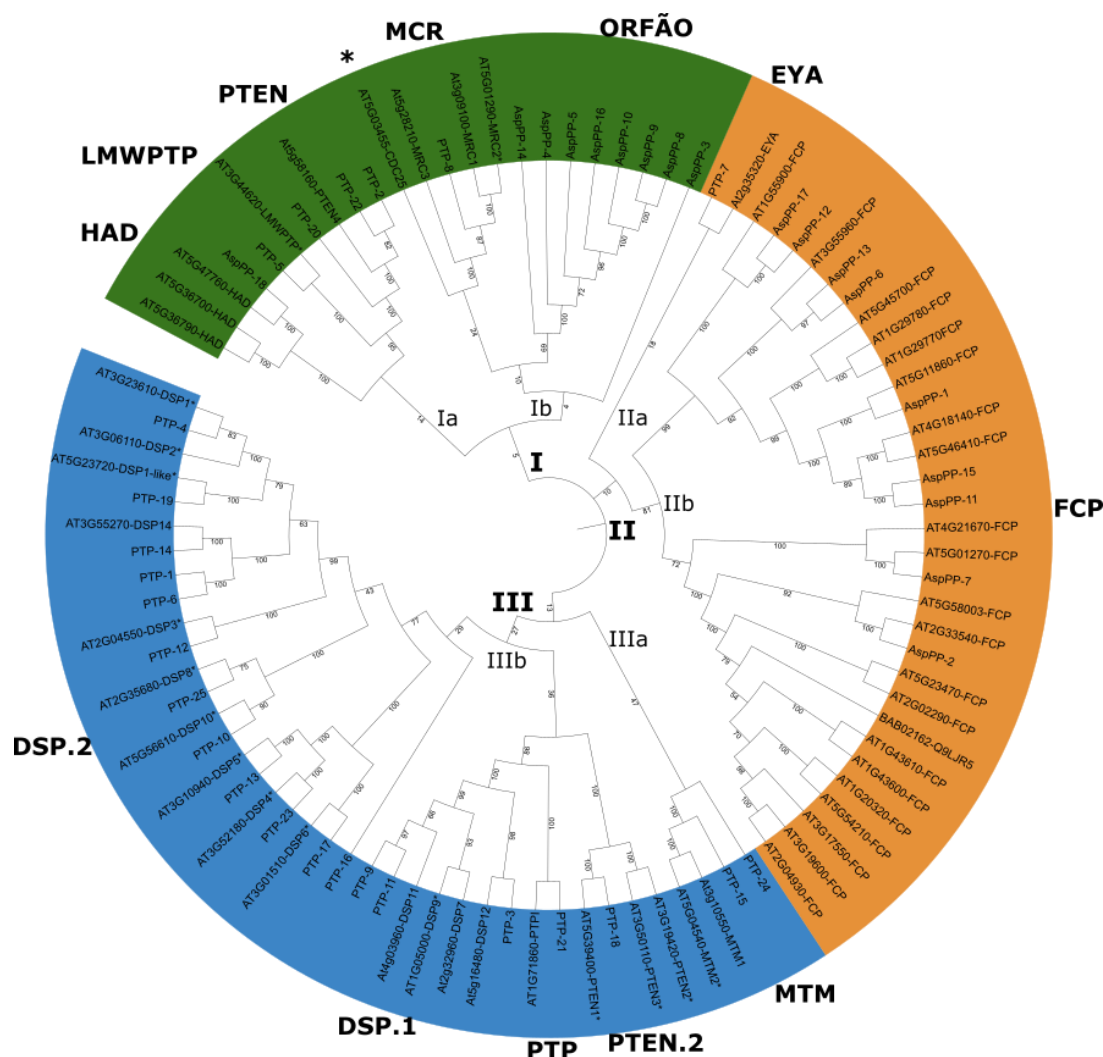


Figura 4 – Visão geral do grupo das STPYs em *Vitis vinifera*. Árvore fenética das proteínas fosfatases de *V. vinifera* e *Arabidopsis*. As sequências completas de aminoácidos das proteínas fosfatases foram alinhadas utilizando o ClustalW e a árvore fenética foi construída usando o método de *Neighbor-Joining* (NJ) no MEGA11. Os agrupamentos são representados por cores diferentes, sendo verde para o agrupamento I, laranja para o agrupamento II e azul para o agrupamento III, conforme mostra a legenda e os valores dos nós representam os valores de *bootstrap*.

Para obter mais informações sobre as características estruturais das proteínas VvPP, investigamos o alinhamento múltiplo das sequências de aminoácidos em busca dos sítios ativos característicos e os motivos conservados de cada família de VvPP.

As proteínas PPs eucarióticas apresentam em sua estrutura motivos de sítios ativos característicos e específicos para cada família de PP. Em nosso estudo identificamos os sítios de PPP-<GDXHG>; <GDXVDRG> e <GNHE> (**Figura S6**), PPM-<ED>, <DGNG> E <DD> (**Figura S7**) e AspPP- <DXDXT> (**Figura S8**), com bons níveis de conservação, com exceção de seis membros da família AspPP (AspPP-6, AspPP-7, AspPP-12, AspPP-13, AspPP-17

e AspPP-18), que não apresentaram nenhum resíduo de aminoácido do sítio ativo conservado. Em contrapartida, o sítio ativo de PTP apresentou um alto grau de variação, com o resíduo de cisteína ausente e o resíduo de arginina parcialmente conservado entre os membros da família <X₆R> (**Figura S9**).

A análise de motivos da família VvPPP (**Figura S2**) indicou que a maioria dos membros da família compartilham pelo menos cinco motivos (motivo 1, 2, 3, 4, 5) em comum, apresentando distribuição e quantidades semelhantes, sugerindo um importante papel na função dessas proteínas. O motivo 7 estava presente apenas nos membros de PP2A. Em contrapartida, o membro de RLPH compartilhou apenas o motivo 1 e os membros de SLP não compartilharam nenhum motivo em comum com os membros da família PPP, corroborando com o seu agrupamento na árvore fenética, uma vez que ambas agruparam em ramos distintos dos outros membros da família.

Por sua vez, na família VvPPM (**Figura S3**) a maioria dos motivos foram distribuídos ao longo da sequência peptídica, com um padrão de disposição de motivos semelhante entre os membros de VvPPM. A maioria dos VvPPM continham os motivos 1, 2, 3 e 6. Quase todos os VvPPM continham mais de quatro motivos conservados. Apenas os membros do grupo D tinham o motivo 10. Os motivos 7 e 9 estavam presentes apenas nos membros das subfamílias C e D. O motivo 8 estava amplamente distribuído entre os membros dos grupos A, B, G, I, J e E, além de estar presente em três membros do grupo F (VvPPM-10, VvPPM-49 e VvPPM-58). Por sua vez, o motivo 5 estava ausente nas subfamílias K, D, C, H e em alguns membros das subfamílias F (VvPPM-33, VvPPM-35, VvPPM-40, VvPPM-54 e VvPPM-59) e I (VvPPM-50).

Já os membros de VvPTP (**Figura S4**) continham de um (VvPTP-7, VvPTP-10, VvPTP-13, VvPTP-15, VvPTP-16, VvPTP-17, VvPTP-18, VvPTP-19, VvPTP-21, VvPTP-23, VvPTP-24 e VvPTP-25) a seis motivos (VvPTP-2, VvPTP-20, VvPTP-22), com exceção de VvPTP-4, que pertence a subfamília LMWPTP, que não compartilhou nenhum motivo com os demais membros da família. O motivo 1 estava presente na maioria dos membros. O motivo 10 foi específico dos membros de DSP.1. Alguns membros de DSP.2 continham os motivos 2, 3 e 4 em sua estrutura, se diferenciando dos demais membros do grupo. Os motivos 5, 6, 8 e 9 foram específicos dos membros de PTEN.2. e o motivo 7 estava presente nos membros de PTEN.2 e em VvPTP-24 da subfamília MTM. Por fim, possível observar que os membros da família VvAspPP não apresentam um padrão de motivos entre os membros da mesma subfamília. O fenograma auxiliar demonstrou a formação de dois grupos, no grupo I a maioria dos membros apresentam os motivos 1, 2, 5 e 6, com o AspPP-7 apresentando apenas o motivo 7 em sua estrutura e os membros AspPP-3 e AspPP-7 (que pertence a subfamília HAD), não compartilharam nenhum motivo com os demais membros da família. O grupo II reuniu membros de FCP que apresentaram os motivos 4 e 7 amplamente distribuídos e os motivos 3, 8 e 10 presente na maioria dos membros (**Figura S5**).

Identificação de sítios de ligação a fatores de transcrição nas regiões promotoras dos genes *VvPP*

A fim de identificar os sítios de ligação a fatores de transcrição (TFBSs) em motivos de DNA conservados nas regiões promotoras de cada família de genes *VvPP*, foram analisadas as sequências *upstream* de 1500 pb dos códons de iniciação. Dessa forma, foram identificados sete, sete, quatro e três motivos de DNA, para *VvPPP*, *VvPPM*, *VvPTP* e *VvAspPP*, respectivamente, adotando um *e-value* de $<10^{-2}$ (**Tabela S3**). Os motivos de DNA identificados foram comparados e validados com o banco de dados “JASPAR2022_CORE_plants_non-redundant_v2.meme” usando a ferramenta TOMTOM, sendo determinados os FT correlatos. A comparação de motivos de DNA identificou que 11 (4 *VvPPP*, 3 *VvPPM*, 3 *VvPTP* e 1 *VvAspPP*) estavam associados a fatores de transcrição candidatos das famílias DOF e/ou MYB. As regiões promotoras de *VvPPP* apresentaram dois TFBS de DOF (MA1267.1, MA1274.1) e dois de MYB (MA1768.1 e MA2032.1), com 214 e 42 sítios de ligação, respectivamente. Para *VvPPM* e *VvPTP* foram identificados três TFBSs, sendo dois DOF (MA1267.1, MA1274.1 ou MA1268.1), com 455 e 184 sítios de ligação, respectivamente, e um de MYB (MA0576.1 ou MA1352.1), com nove e 17 sítios de ligação, respectivamente. Por fim, a família *VvAspPP* apresentou um TFBS da família DOF (MA1274.1), com 70 sítios de ligação.

Análise de sintenia entre *V. vinifera*, *A. thaliana* e *O. sativa*

Para explorar as origens genéticas e as relações evolutivas dos genes *VvPP*, realizamos a análise de sintenia entre os genomas de *V. vinifera*, *A. thaliana*, e *O. sativa* (**Figura 5a**), a fim de identificar genes de *PP* ortólogos entre essas espécies. Foram detectados 96 e 50 pares de genes *PP* ortólogos nas comparações entre *V. vinifera* x *A. thaliana* e *V. vinifera* x *O. sativa*, respectivamente. Os 96 pares de genes ortólogos entre *V. vinifera* e *A. thaliana* incluíam 65 *VvPP* (**Figura 5b**) e 84 *AtPP*, com os pseudocromossomos 5, 6 e 13, de *V. vinifera*, apresentando a maior quantidade de genes ortólogos. Já os 50 pares de genes ortólogos entre *V. vinifera* e *O. sativa* incluíam 34 *VvPP* (**Figura 5b**) e 38 *OsPP*, com os pseudocromossomos 7, 11 e 13, de *V. vinifera*, apresentando a maior quantidade de genes ortólogos. Além disso, 26 genes *VvPPs* foram ortólogos com os *AtPP* e *OsPP*, indicando que esses genes podem desempenhar uma função relevante em diferentes processos celulares. Nossos dados sugerem que esses genes podem ter existido antes da divergência dessas espécies de plantas (**Figura 5b**).

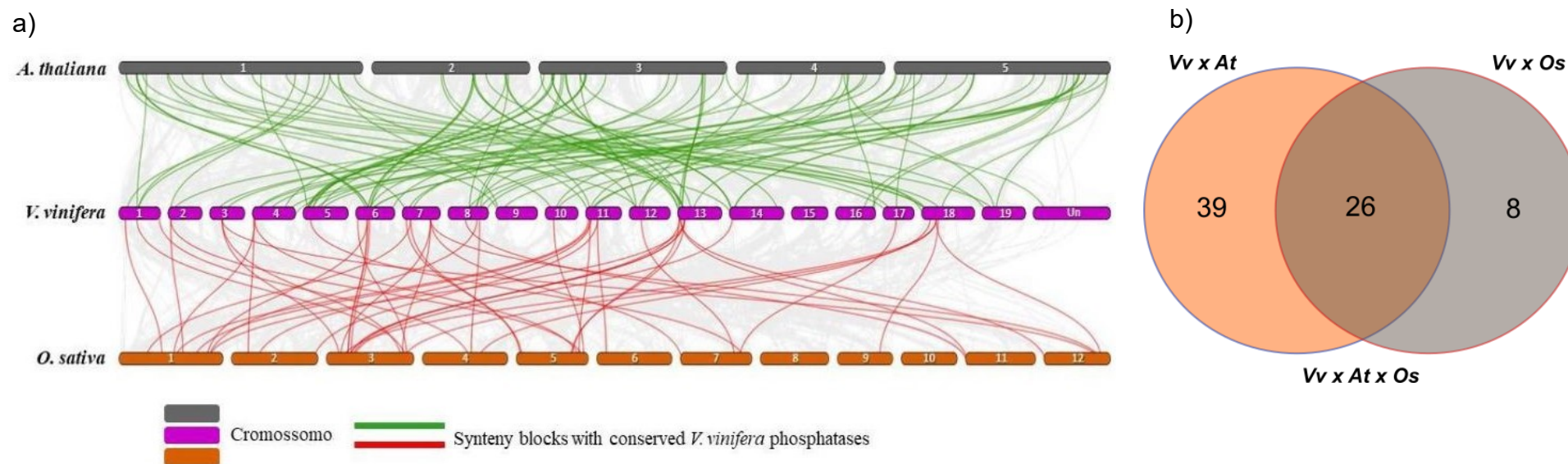


Figura 5 – a) Análise de sintenia dos genes *VvPP* entre *V. vinifera* e *A. thaliana* e *V. vinifera* e *O. sativa*. As linhas cinzas ao fundo indicam os blocos colineares entre as espécies enquanto as linhas verdes e vermelhas indicam as sintenias entre os pares de genes *VvPP* entre as *A. thaliana* e *O. sativa*, respectivamente. B) Diagrama de Venn de genes *VvPP* ortólogos entre *V. vinifera* e *A. thaliana* (*VvPPs* x *AtPPs*), *V. vinifera* e *O. sativa* (*VvPPs* x *OsPPs*) e *V. vinifera*, *A. thaliana* e *O. sativa* (*VvPPs* x *AtPPs* x *OsPPs*).

Perfil transcricional de VvPPs (RNA-Seq)

Utilizando os dados de expressão obtidos no RNA-Seq para o tecido foliar da cultivar Red Globe e do híbrido IAC-572 com 90 minutos de exposição a *X. citri* foi construído um perfil de expressão por clusterização (**Figura 6**). Foram identificados 122 transcritos relacionados com as proteínas fosfatases, desse total, 20 apresentaram-se diferencialmente expressos (DE), tomando como base os valores de Log2FC. De forma geral, os transcritos apresentaram expressão constitutiva na cultivar Red Globe e reprimida na cultivar IAC-572. A família VvPPM foi a mais abundante, com 14 transcritos demonstrando expressão diferencial (aumentando ou reprimindo a sua expressão) mediante o estresse aplicado, seguido pela VvPPP, com três representantes, sendo dois da subfamília PP2A e um da PP7 (**Figura 6**).

No *heatmap* é possível observar a formação de dois *clusters* (**Figura 6**). No *cluster* I foram agrupados cinco transcritos (VIT_00s0179g00110, VIT_04s0008g06530, VIT_02s0025g01390, VIT_01s0011g03910 e VIT_01s0150g00510), que se apresentaram reprimidos (com log2FC variando de 0,70 a 0,94) ou constitutivos na cultivar Red Globe, mas que estavam induzidos ou constitutivos na cultivar IAC-572 (VIT_00s0179g00110, VIT_04s0008g06530 e VIT_02s0025g01390), apresentando log2FC variando de 1,14 e 1,24. Por sua vez, o *cluster* II reuniu 15 transcritos, quatro estavam induzidos (com variação de log2FC de 0,63 a 1,26) e 11 constitutivos na cultivar Red Globe e 13 transcritos estavam reprimidos e dois constitutivos na cultivar IAC-572, com log2FC variando de 0,50 a 1,53.

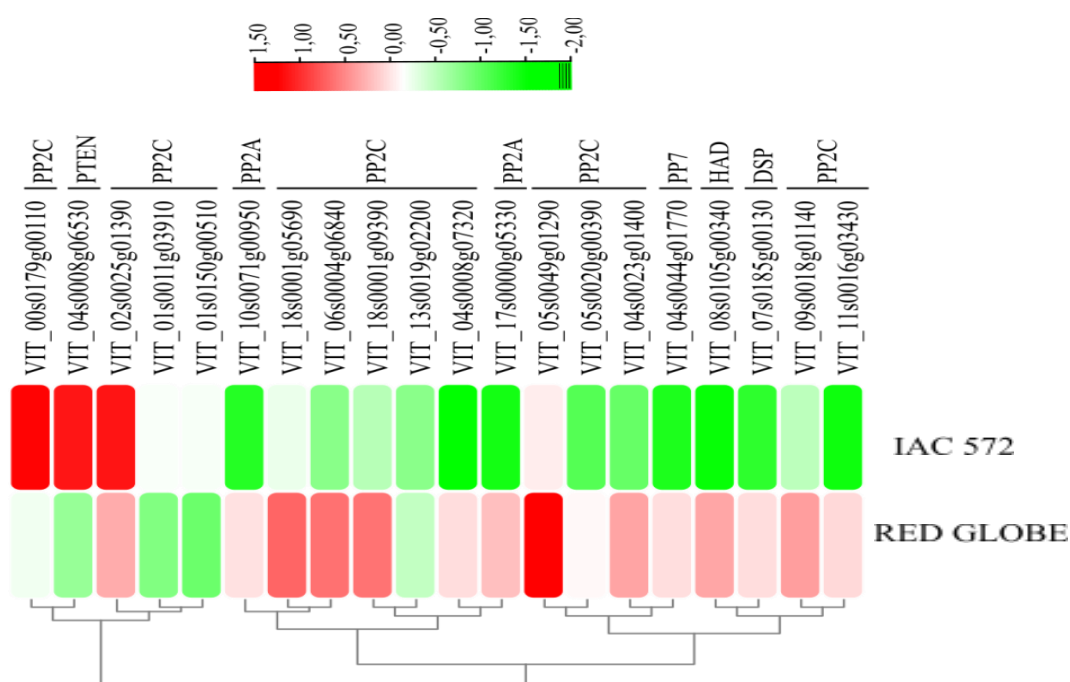


Figura 6 – *Heatmap* das fosfatases diferencialmente expressas (DEs) no tempo de 90 minutos (T=90') de *Vitis* spp. [cultivar Red Globe (V.v) e híbrido IAC-572 (V.h)] contrastantes quanto à infecção por *X. citri*. Na visualização gráfica, a cor branca indica a ausência de expressão, os níveis de verde (reprimido) e vermelho (induzido) estão relacionados com a intensidade de expressão na biblioteca em análise.

Análise da expressão gênica por qPCR

Para confirmar o papel dos genes *VvPP* no processo de resistência da videira, selecionamos seis genes (PP2C – VIT_11s0016g03430 e VIT_13s0019g02200, PPP – VIT_10s0071g00950, VIT_04s0044g01770, PTP – VIT_07s0185g00130 e AspPP – VIT_08s0105g00340) e avaliamos via qPCR em dois genótipos de videira (Red Globe e IAC-572, contrastantes quanto a resistência ao patógeno bacteriano) inoculados com a *X. citri*. Avaliamos a resposta da videira sob condições normais (amostras não inoculadas) e sob estresse (90 minutos e 48 horas após a inoculação com *X. citri*), usando os genes de referência TRU5, TCBP e 60SRP (**Figura S10**). Na quantificação relativa foi verificado um padrão de expressão semelhante entre os dois genótipos com 90 minutos de estresse (**Tabela 3**). O gene VIT_11s0016g03430 foi reprimido (0.52 e 0.75, para IAC-572 e Red Globe, respectivamente), por sua vez, o gene VIT_04s0044g01770 foi induzido (1.48 e 1.30, para IAC-572 e Red Globe, respectivamente). Para os genes VIT_13s0019g02200, VIT_10s0071g00950 e VIT_07s0185g00130 não foi verificada alteração no padrão de expressão em nenhuma das cultivares. No entanto, o gene VIT_08s0105g00340 apresentou expressão contrastante entre os dois genótipos, sendo constitutivo na cultivar IAC-572 e induzido na cultivar Red Globe, (Log2FC 1.50). Com 48 horas de estresse todos os genes *VvPPs* investigados tiveram sua expressão significativamente alterada na cultivar IAC-572, apresentando uma indução maior que 2 vezes em relação aos seus controles (**Tabela 3**). Já para a cultivar Red Globe, o gene VIT_13s0019g02200 foi induzido 2.02 vezes comparativamente aos controles. Com os demais genes (VIT_11s0016g03430, VIT_10s0071g00950, VIT_04s0044g01770, VIT_07s0185g00130 e VIT_08s0105g00340) sendo constitutivos nessa cultivar. Esses resultados sugerem que os genes *VvPPs* são provavelmente acionados à medida que a infecção se instala na planta. Embora os dados de RNA-Seq e de qPCR não tenham se correlacionado totalmente, a qPCR indica que os genes *VvPPs* podem desempenhar um papel importante na tolerância da videira frente ao patógeno bacteriano.

Tabela 3 – Expressão relativa (em qPCR e RNA-Seq) dos genes *VvPP* em cDNAs de tecidos foliares de videira infectada com *X. citri* após 90 minutos e 48 horas.

Família <i>VvPP</i>	ID (RNA-Seq)	RNA-Seq (Log2FC)			
		90 minutos			
		IAC-572	Red Globe		
PPP	VIT_17s0000g05330	1,37 / DOWN	N/S		
	VIT_04s0044g01770	1,42 / DOWN	N/S		
PPM	VIT_11s0016g03430	1,45 / DOWN	N/S		
	VIT_13s0019g02200	N/S	N/S		
PTP	VIT_07s0185g00130	1,27 / DOWN	N/S		
AspPP	VIT_08s0105g00340	1,49 / DOWN	N/S		

Família <i>VvPP</i>	ID (RNA-Seq)	qPCR			
		90 minutos		48 horas	
		IAC-572	Red Globe	IAC-572	Red Globe
PPP	VIT_17s0000g05330	N/S	N/S	6.61 / UP	N/S
	VIT_04s0044g01770	1.48 / UP	1.30 / UP	5.65 / UP	N/S
PPM	VIT_11s0016g03430	0.52 / DOWN	0.74 / DOWN	2.19 / UP	N/S
	VIT_13s0019g02200	N/S	N/S	2.37 / UP	2.02 / UP
PTP	VIT_07s0185g00130	N/S	N/S	7.00 / UP	N/S
AspPP	VIT_08s0105g00340	N/S	1.50 / UP	5.08 / UP	N/S

DISCUSSÃO

Nos últimos anos, o quinoma de diversas espécies vegetais foi extensivamente investigado, dando luz à importância da atuação desse grupo de proteínas em diversas vias de sinalização de estresse biótico e abiótico ⁴⁻¹⁴. No entanto, o progresso nas pesquisas envolvendo o fosfatoma, é relativamente mais lento. Até o momento existem apenas dois fosfatomas, disponibilizados para *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* ^{15,16}. Contudo, análises de famílias de *PPs* isoladas em diferentes espécies vem sendo realizadas, relatando a ação dessas proteínas na resposta a estresses bióticos e abióticos ^{19-22,33-35}.

No presente estudo, 129 genes *VvPPs* foram identificados de forma minuciosa no genoma de *Vitis vinifera*. Com base na análise de domínio catalítico os genes *VvPP* foram agrupados em quatro famílias, *VvPPP*, *VvPPM*, *VvPTP* e *VvAspPP* com 21, 65, 25 e 18 genes, respectivamente. De forma semelhante, foi relatado que o genoma de *Arabidopsis* e arroz continham 150 genes *AtPP* (26 *AtPPP*, 76 *AtPPM*, 25 *AtPTP* e 23 *AtAspPP*) e 132 genes *OsPP* (17 *OsPPP*, 90 *OsPPM*, 25 *OsPTP*) ^{15,16}. Dados isolados da família PTP reportados para *B. rapa* ³⁶ e PPM reportados para *B. distachyon* ³³, *Medicago truncatula* ³⁴, *B. rapa* ¹⁹, *S. tuberosum* L. ³⁵, diferentes espécies de Rosaceae ³⁷ e em *S. lycopersicum* ²⁰ corroboram com os dados obtidos neste estudo.

Além disso, durante a análise de domínio identificamos outros domínios ou motivos conservados associados ao domínio fosfatase, como PMD (*Plant mobile domains*), FHA (*Forkhead associated domain*), PKc_like superfamily, FH2 (*Formin Homology 2 Domain*), BRCT_C (*BRCT Domain of RNA polymerase II subunit A C-terminal Domain Phosphatase (CTDP1) and Similar Proteins*), e DSRM (*Double-stranded RNA binding motif*). O domínio PMD foi identificado em um membro da família PPP (*VvPPP*-12). Domínios PMD são amplamente distribuídos entre as angiospermas estando associados a uma grande diversidade de proteínas, sendo relatados por seu papel em diversos processos de desenvolvimento, estabilidade do genoma, regulação da expressão gênica e silenciamento de elementos transponíveis ³⁸. Investigando o papel do gene MAIN-LIKE1 no processo de divisão e diferenciação celular, Uhlken e colaboradores (2014) ³⁹ identificaram o gene MAIL3 em *Arabidopsis*, que codifica uma proteína com domínio PMD associado a um domínio fosfatase (PP7), em plântulas e folhas da roseta. No entanto, até o presente momento, o papel biológico da fusão de domínios PDM e fosfatase em plantas ainda permanece incompreendido, necessitando de estudos aprofundados.

Por sua vez, o domínio FHA é um domínio envolvido no reconhecimento de resíduos específicos de fosfotreonina, que pode atuar em conjunto com proteínas quinases e fosfatases, facilitando a interação proteína-proteína, sendo essenciais para a transdução de sinais ^{40,41}. Em *Arabidopsis* e milho, a proteína KAPP, uma fosfatase do tipo 2C (PP2C) que contém um domínio FHA, é responsável por reconhecer proteínas RLKs fosforiladas na membrana celular. Acredita-se que a interação de KAPP com o RLKs aproxime o domínio PP2C da proteína KAPP, com o domínio quinase do RLK, regulando negativamente a atividade da quinase através da desfosforilação ⁴². Já o domínio DSRM, que pertence a superfamília DRBs, é um domínio funcional curto que se liga a moléculas de dsRNAs e/ou facilitam a interação proteína-proteína ^{43,44}. Dessa forma, supõe-se que os domínios que facilitam o processo de interação proteína-proteína, como KAPP e DSRM, podem desempenhar papéis-chave na regulação pós-traducional da expressão gênica.

De forma geral, as *VvPPs* apresentam peso molecular altamente diversificado, variando de 18.434 a 163.27 kDa e ponto isoelétrico apresentando uma ampla faixa de pH, com uma predominância de proteínas ácidas, o que é consistente com o observado para as famílias PPM, PTP e AspPP de *B. distachyon*³³, *M. truncatula*³⁴, *B. rapa*^{19,36}, *S. tuberosum* L.³⁵, diferentes espécies de Rosaceae³⁷ e em *S. lycopersicum*²⁰. Nossos resultados revelaram ainda que as *VvPPs* possuem GRAVY majoritariamente negativa, indicando a natureza hidrofílica dessas proteínas. Além disso, as *VvPPs* estavam direcionadas em maior quantidade para o núcleo, seguido do citoplasma. Schwartz e colaboradores (2001)⁴⁵ avaliaram a correlação entre o ponto isoelétrico e a localização subcelular de proteínas e revelaram que as proteínas nucleares apresentam uma ampla faixa de ponto isoelétrico, corroborando com nossos resultados. Identificamos sete *VvPPs* que continham estruturas transmembranares em suas estruturas, com as *VvPTP-16* e *VvPTP-24* contendo três e quatro estruturas, respectivamente, ambas associadas a uma pontuação GRAVY positiva e direcionadas para o sistema endomembranar. Dessa forma, pela primeira vez, relatamos duas proteínas fosfatases vegetais de membrana que possivelmente atuam na comunicação e percepção celular.

Em relação a diversidade dos genes *VvPPs*, a organização éxon-íntron foi analisada e os resultados foram concatenados de acordo com as subfamílias, utilizando para isso uma árvore fenética como suporte. De uma forma geral, foi possível observar que o número de éxons nas quatro famílias dos genes *VvPPs* é diverso, variando de 1 a 22 éxons. A variação no número de éxons identificada em nosso estudo, foi semelhante ao observado anteriormente para os genes *BdPTPs* de *Brassica rapa*³⁶ e para genes PPM (PP2C) em *M. truncatula*³⁴ e tomate²⁰, em contraste ao reportado em *Triticum aestivum*, que apresentou de 1 a 12 exons e *Cucumis sativus* com 2 a 10 éxons nas estruturas de seus genes *PP2C*^{46,47}. Além disso, os membros de cada subfamília identificada nos genes *VuPPs* apresentaram uma organização éxon-íntron semelhante, sendo observada apenas uma variação no tamanho dos íntrons. Essa conservação estrutural a nível de subfamília também foi anteriormente relatada em genes da família PPM (PP2C) em outras espécies vegetais^{20,22,34,46,47} indicando que as *VvPPs* mantiveram-se conservadas durante o processo evolutivo.

No nosso estudo, também foi possível observar que apenas quatro genes *VvPPs* (*PPP-4*, *PTP-1*, *PTP-6* e *PTP-14*) não apresentaram íntron em sua estrutura. Genes envolvidos em respostas biológicas rápidas tendem a apresentar poucos íntrons, pois necessitam de indução rápida e eficiente⁴⁸, porém, apesar dessa desvantagem energética, os íntrons podem desempenhar alguns papéis dentro do genoma, como regular o *splicing* alternativo, aumentar a expressão de genes, controlar o transporte do mRNA ou a montagem da cromatina⁴⁹.

Eventos de duplicação gênica representam o principal agente impulsionador evolutivo em plantas superiores e desempenham um papel crucial na expansão de famílias gênicas, revelando como os genes são gerados e como suas funções evoluíram⁵⁰. As duplicações em tandem e segmentares são os dois principais mecanismos de expansão de famílias gênicas em plantas. Neste estudo, identificamos 15 pares de genes envolvidos em duplicações segmentares, com 11 pares pertencentes à família PPM (PP2C), e nenhum evento de duplicação em tandem foi identificado. Portanto, a duplicação segmentar foi crucial para a expansão dos genes *VvPPs* durante o processo evolutivo da videira. Estudos

anteriores reportaram que o evento de duplicação segmentar é o principal agente expensor da família gênica PP2C em *O. sativa* e *Arabidopsis*²², *B. distachyon*³³, *Populus euphratica*⁵¹, *M. truncatula*³⁴, algodão⁵² e *Cucumis sativus*⁴⁷.

Para detectar a natureza e o padrão evolutivo dos pares de genes *VvPP* duplicados, utilizamos a razão das substituições não sinônimas e sinônimas (Ka/Ks). Os quinze pares de genes duplicados revelaram uma razão Ka/Ks inferior a 1, indicando que esses genes evoluíram sob uma forte seleção purificadora, sugerindo os mesmos mantiveram a sua função básica conservada ao longo do tempo. Além disso, o tempo médio de duplicação dos quinze pares de genes é 39.76 milhões de anos atrás, semelhante ao tempo médio de divergência dos genes PP2C de *Solanum lycopersicum* (31.59 MYA) e precedente ao tempo de divergência em *Arabidopsis* (cerca de 16.1 MYA)^{20,53}. Em organismos eucariotos, genes reguladores envolvidos na transdução de sinais tendem a ser dependentes da altas dosagem, ficando preferivelmente retidos nos genomas^{54,55}.

A análise de *Neighbor-Joining* para os membros do grupo das STPs revelou a formação de dois grandes *clusters*, separando as famílias PPP e PPM. Em *Arabidopsis*, para os membros de AtPPP foi observada a formação de sete subfamílias, a PP1, PP2A, PP4, PP5, PP6, PP7 e PPP Kelch (FARKAS et al., 2007). O *cluster I* agrupou os membros de PPP e revelou a formação de mais duas subfamílias, além das observadas para *Arabidopsis*, a RLPH e a SLP. Em nosso estudo as subfamílias PP1 e PP2A foram as mais abundantes, com sete e cinco membros, respectivamente. Resultados semelhantes ao observado para as PP1 e PP2A em *Arabidopsis*, *O. sativa* e *Vicia faba*, sugerindo que essas duas subfamílias podem apresentar funções relevantes de desenvolvimento e/ou na resposta a estresse nos vegetais. Em *Arabidopsis*, a PP1 contém nove membros e são anotadas como TOPPs, enquanto que *O. Sativa* e *V. faba* têm cinco e quatro^{16,56,57}. Takemiya e colaboradores (2006)⁵⁶ avaliando a expressão dos genes *VfPP1* verificaram que o gene *VfPP1c-1* é responsável pela abertura dos estômatos mediante sinalização de luz azul. De forma semelhante, a TOPP4 de *Arabidopsis* foi relatada por participar da sinalização luminosa, TOPP4 e apresentam expressão constitutiva na maioria dos tecidos⁵⁸. O *cluster II* reuniu os membros de PPM em 13 subgrupos, onde 10 são PP2Cs clássicas (A-J) reportadas em *B. distachyon*³³, *M. truncatula*³⁴, *B. rapa*¹⁹, *S. tuberosum*³⁵, oito espécies de Rosaceae³⁷ e em *S. lycopersicum*²⁰.

Até o momento, estudos envolvendo as proteínas PP2C em diferentes espécies vegetais destacaram a importância dessa família de proteínas em diferentes processos metabólicos, incluindo a resposta a estresse biótico e abióticos^{59,60}. Em plantas, os membros PP2C têm sido descritos como reguladores negativos na via de sinalização ABA^{61,62}. Por exemplo, PP2Cs pertencentes ao subgrupo A, de *Arabidopsis* e musgo, foram relatados por serem fatores chave nas vias de sinalização ABA^{63,64}. Além disso, PP2C dos subgrupos B, F e C vem sendo reportados por seu envolvimento nas vias de estresse e de desenvolvimento⁶⁵⁻⁶⁸.

No fenograma gerado para as STYPs, as fosfatases foram divididas em três *clusters*, os *cluster I* e II reuniram alguns membros de PTPs e o *cluster III* reuniu membros de AspPP e duas subfamílias de PTP. No entanto, esse agrupamento foi divergente ao observado para as PTPs em *B. rapa*³⁶, onde os membros das subfamílias PTP, LMWPTP, MTM e CDC25-like estavam intimamente relacionados, os membros de MCR, estavam dentro do mesmo *cluster* que as PTENs, EYA e algumas DSPs. Esse agrupamento divergente pode

estar associado à uma possível divergência funcional, uma vez que em nosso estudo foi observado uma íntima relação das subfamílias LMWPTP, PTEN.2, a EYA (AT2G35320) e CDC25-like (AT5G03455) de *Arabidopsis*, com as HADs e FCPs, que pertencem a subfamília AspPP. As EYA são relatadas por serem altamente conservadas e estarem associadas a um protótipo de proteínas Asp-PTP⁶⁹. Nossos resultados indicam que essas subfamílias podem desempenhar funções semelhantes e precisam ser melhor investigadas. Em geral, os genes PP da mesma subfamília ou subgrupo têm funções biológicas semelhantes, embora as funções de muitos membros de PPs ainda não tenham sido bem elucidadas.

Analisando as regiões promotoras dos genes *PPs*, identificamos onze motivos de DNA com suporte estatístico, associados a dois FTs. O FT da família DOF estava majoritariamente presente nas regiões promotoras de todas as *VvPPs*, com 732 TFBS, indicando que os processos desempenhados pelos *VvPPs* são amplamente coordenados pelo mesmo FT. Os DOF são FTs específicos de plantas que desempenham papéis cruciais em diversos processos de desenvolvimento e regulatórios^{70–72} e na resposta as condições ambientais adversas^{73,74}. Regiões promotoras de genes que respondem a moléculas elicitoras relacionadas a estresses bióticos geralmente contêm TFBS da família DOF^{75–77}. Curiosamente, essa família de FTs também foi evidenciada nas regiões promotoras de genes RLK-Pelle de feijão-caupi⁴, sugerindo que genes que codificam proteínas fosforilases (quinases e fosfatases) são coordenadas por FTs semelhantes. Além de DOF, 76 TFBS da família MYB estavam associados à região promotora dos genes da família *VvPPM*. Nos vegetais, FTs MYB estão envolvidos no desenvolvimento e nas respostas de defesa^{78,79}. A coordenação dos genes *VvPPM* mediada por FTs DOF e MYB pode indicar uma amplificação da regulação desses genes, que por sua vez, desempenham papéis chave em diversos processos metabólicos, como reportado para outras espécies vegetais^{18–20,33–35,37}.

Estabelecer as relações de sintenia entre diferentes espécies oferece uma ferramenta valiosa para compreender a evolução cromossômica e permite a transferência de informações genéticas e genômicas de um genoma modelo para a espécie sob investigação⁸⁰. A análise de sintenia dos genes *PPs* entre *V. vinifera* x *A. thaliana* e *V. vinifera* x *O. sativa* revelou que 50% e ~26% dos *VvPPs* são ortólogos com os *AtPPs* e *OsPPs*, respectivamente, apontando uma melhor relação de sintenia com os membros de *Arabidopsis* do que com os membros de *O. sativa*. Assim, especulamos que as correlações de sintenia entre os membros de PPs podem estar ligadas à divergência evolutiva das espécies. Notavelmente, 20% dos genes *VvPP* foram sintênicos com *Arabidopsis* e *O. sativa*, o que indica que esses pares ortólogos são conservados e podem existir antes da divergência ancestral. Dessa forma, as interseções dos membros sintênicos de PPs entre espécies distintas podem ser valiosas para compreensão do processo evolutivo de PPs nas plantas.

Diversas evidências indicam que os genes da família PPM (PP2C) desempenham papéis cruciais nas respostas das plantas a diferentes estresses abióticos, como seca, sal, temperatura e estresses por fitohormônios^{20,22,33–35,46,47}. No entanto, pouco se sabe sobre o papel das demais famílias dos genes PPs (PPP, PTP e AspPP) na resposta a essas condições de estresse. Hormônios vegetais, como ABA estão diretamente ligados ao processo de tolerância as condições de estresse abiótico, permitindo que a planta

mantenha a sua homeostase em equilíbrio ⁸¹. Por exemplo, em arroz todos os genes do grupo A de PP2C podem ser induzidos por ABA, e quando associados a tratamentos abióticos (salinidade e baixa temperatura) os níveis de indução desses genes são aumentados ²². Em *Arabidopsis*, a investigação dos genes PP2C (*ABI1*, *ABI2*, *HAB1*, *HAB2*, *PP2CA* e *AHG1*) revelou um aumento na sensibilidade do ABA sob múltiplos estresses abióticos, sugerindo uma resposta variada na sinalização do ABA ^{81–86}. Resultados semelhantes foram relatados por Yang et al. (2018)³⁴ em mudas *M. truncatula* sob estresse térmico (frio), hídrico e ABA em quatro tempos distintos (0, 1, 3 e 12 horas de tratamento) sugeriram que os genes *MtPP2C46*, *MtPP2C47* e *MtPP2C72* podem desempenhar um papel vital na resposta ao estresse abiótico, especialmente ao frio.

Em *Cannabis sativa*, sob estresse hídrico e ABA, a análise de sete genes PP2C demonstrou que os mesmos são induzidos quando submetidos a condições estressantes ⁸⁷. Resultados semelhantes foram observados em plantas de tomate, pepino, batata e juta (*Corchorus* spp.) sob abiótico, indicando que os genes PP2C podem modular a severidade do estresse ^{20,35,88,89}. Singh e colaboradores (2010)¹⁶ analisando a expressão diferencial da superfamília fosfatase em folhas maduras, plântulas e raízes de *O. sativa* sob diferentes condições de estresse abiótico (frio, sal, desidratação) e desenvolvimento reprodutivo revelaram que os genes *PPs* podem apresentar padrões de expressão idênticos, sob diferentes estresses, sendo verificado que todos os genes induzidos pertenciam a família PPM (PP2C), já os genes reprimidos eram representantes das famílias PPM (PP2C), PPP (PP2A) e PTP (DSP).

No entanto, pouco se sabe sobre o papel dessa superfamília na resposta ao estresse biótico, sendo esse um importante fator limitante no cultivo de diversas espécies vegetais de importância agrônômica ⁹⁰. Estresses ambientais enfraquecem o mecanismo de defesa das plantas e aumentam sua sensibilidade à infecção por patógenos ^{91,92}. Dessa forma, identificar genes que auxiliam no processo de tolerância a condições ambientais desfavoráveis, bem como genes que medeiam os processos de resistência a infecção por patógenos é muito importante para melhorar o rendimento das culturas. Cao et al. (2016)³³ avaliaram o perfil transcricional de genes PP2C em plântulas de *B. distachyon* sob múltiplas condições de estresse, incluindo a infecção patogênica por *Fusarium graminearum* e duas cepas de *Magnaporthe grisea*, contrastantes quando a virulência, revelaram que quase todos os membros dos genes *BdPP2C* estavam induzidos sob condições de estresse abiótico. Foi demonstrado também que 20 genes *BdPP2C* (*como* *BdPP2C13*, *BdPP2C14*, *BdPP2C25*, *BdPP2C42* e *BdPP2C62*) foram ativados sob estresse biótico. Em *Arabidopsis*, o gene PP2C WIN2 (AT4G31750), homólogo de *BdPP2C13*, pode intensificar a resistência a bactéria *Pseudomonas. Syringae* ⁶⁸. Qiu et al. (2022)²⁰ investigando a ação dos genes PP2C em caules de tomate, infectada pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, relataram que nove genes *SIPP2C* foram induzidos quando a planta foi submetida a infecção patogênica.

Dessa forma, a identificação de genes *PPs* responsivos a infecção pela bactéria *X. citri* na videira irá auxiliar no entendimento mecanismos de defesa utilizados pela videira na resposta ao estresse biótico. O perfil de expressão da qPCR observado neste estudo revelou que após 90 minutos da inoculação com *X. citri* as duas cultivares da videira (Red Globe e IAC 572) não alteraram a expressão dos genes *PPs*. No entanto, após 48 horas, um gene (VIT_13s0019g02200 – PP2C) foi induzido nas duas cultivares e cinco foram

induzidos no híbrido IAC-572, permanecendo constitutivos na Red Globe. Esses resultados sugerem que os genes VIT_11s0016g03430 (PP2C), VIT_10s0071g00950 e VIT_04s0044g01770 (PPP), VIT_07s0185g00130 (PTP) e VIT_08s0105g00340 (AspPP) podem desempenhar um papel importante na tolerância da planta em tempos tardios da infecção.

CONCLUSÃO

O presente estudo conduziu a primeira identificação e caracterização genômica ampla dos 129 membros da superfamília de genes codificantes de *PPs* em videira, compreendendo desde as suas relações fenéticas, estruturas gênicas, motivos, regiões promotoras e relações de sintenia com *A. thaliana* e *O. sativa*. Analisamos a expressão diferencial via qPCR de seis genes *VvPPs* das quatro famílias (PPP, PPM, PTP e AspPP) e todos foram induzidos no híbrido que apresenta resistência moderada ao cancro bacteriano, indicando que os genes *VvPPs* podem desempenhar um papel relevante no processo de resistência à infecção patogênica de *X. citri*. Os resultados contribuíram para um entendimento mais amplo dos mecanismos de defesa da videira sob estresse biótico. Além disso, nosso estudo fornece uma nova visão sobre as vias de sinalização da videira.

METODOLOGIA

Identificação e análise de membros da superfamília fosfatase no genoma de *Vitis vinifera*

Para mineração das sequências candidatas da superfamília fosfatase em *V. vinifera* foram recuperadas as anotações do proteoma predito no banco de dados do Phytozome (*V. vinifera*: Vvinifera_457_v2.1.protein_primaryTranscriptOnly.fa.gz). A identificação das proteínas fosfatases foi feita por meio de dois métodos: (1) BLASTp, utilizando as sequências sonda proteicas das quatro famílias dos membros fosfatase (PPP, PPM, PTP, Asp fosfatase) de *Arabidopsis*, disponível no banco de dados TAIR¹⁵ e (2) HMMER (Modelos ocultos de Markov), utilizando os domínios fosfatase de cada família [PPP (Database Pfam ID: PF00149), PPM (PF00481), PTP (PF04387, PF00102, PF00782 e PF01451) e Asp-dep Phosphatase (PF09309, PF12689 e PF03767)] baixados do Pfam⁹³. As sequências redundantes foram removidas e as sequências únicas foram analisadas quanto à presença do domínio catalítico fosfatase pelo Batch CD-Search⁹⁴ e Pfam⁹³. A conservação do domínio catalítico único e específico para cada família/subfamília foi avaliada pelo Batch CD-Search. As sequências candidatas que não apresentaram domínios fosfatase ou que apresentaram quebra na região N e/ou C terminal em seu domínio catalítico foram excluídas da análise.

O comprimento do gene, CDS e o número de aminoácidos dos genes *VvPP* foram obtidos do banco de dados do Phytozome. Os parâmetros físico-químicos, incluindo peso molecular (P.M) e ponto isoelétrico teórico (p.I) de cada proteína *VvPP* foram calculados usando a ferramenta do JVirGel 2.0⁹⁵. Os valores de GRAVY (grande média de hidropatia)

foram calculados usando a ferramenta fornecida pelo Bioinformatics.org (https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html). A localização subcelular e as regiões transmembranares putativas das proteínas VvPP foram preditas por meio do servidor online BUSCA ⁹⁶ e do TMHMM Server v.2.0 ⁹⁷, respectivamente.

Mapeamento cromossômico, estrutura gênica e mecanismos de expansão dos genes VvPP

Os *loci* associados aos genes VvPP e as estruturas éxons-íntrons foram determinadas de acordo com os arquivos de anotação do genoma GFF (Vvinifera_457_v2.1.gene_exons.gff3.gz) no Phytozome v13. As VvPP foram renomeadas de acordo com a sua família específica e localização cromossômica. Os eventos de duplicação dos genes VvPP foram analisados usando o kit de ferramentas MCScanX (*Multiplique Collinearity Scan*) com parâmetros padrão ⁹⁸. Os diagramas de localização cromossômica, estrutura gênica e eventos de duplicação foram desenhados pelo software TBtools ⁹⁹. A razão entre as substituições não sinônimas (Ka) e sinônimas (Ks) fornece dados importantes acerca da pressão seletiva dos genes duplicados – Ka/Ks < 1 significa seleção purificadora; Ka/Ks = 1 significa seleção neutra; enquanto que Ka/Ks > 1 significa seleção positiva ¹⁰⁰. A razão de Ka/Ks dos pares de genes duplicados foi calculada pelo programa MEGA 11 ¹⁰¹. Além disso, o tempo de divergência entre os pares de genes duplicados foi calculado usando a seguinte fórmula: $T = Ks/2\lambda$, em que $\lambda = 6.5 \times 10^{-9}$ para *V. vinifera* ¹⁰². A análise de colinearidade entre *V. vinifera* x *A. thaliana* e *V. vinifera* x *O. sativa* foi realizada utilizando o pacote MCScanX no TBtools, com base em sequências genômicas disponíveis no Phytozome v.13 (Vvinifera_457_Genoscope.12X.fa.gz, Athaliana_447_TAIR10.fa.gz e Osativa_323_v7.0.fa.gz) e seus arquivos GFF correlatos.

Alinhamento múltiplo, análise de *Neighbor-joining* e de sítios e motivos conservados

O alinhamento múltiplo das sequências proteicas de VvPP foi feito usando o ClustalW, no MEGA 11 ¹⁰¹, com parâmetros padrão e ajuste manual das sequências. As regiões de sítios ativos característicos de cada família de PP foram destacadas utilizando a ferramenta Jalview ¹⁰³. Para classificar as VvPPs em nível de subfamília foram recuperadas sequências proteicas curadas de AtPP ¹⁵, que foram alinhadas via ClustalW com as sequências candidatas de *V. vinifera*, com posterior ajuste manual das sequências. Com isso, as sequências foram divididas em dois grupos de acordo com seu sítio de fosforilação: a) Fosfatases específicas de Serina e treonina (STPs): família PPP (20 VvPPP e AtPPP) e família PPM (64 VvPPM e AtPPM) e b) Serina/treonina/tirosina fosfatase (STYPs): família PPP (20 VvPPP e AtPPP) e família PPM (64 VvPPM e AtPPM). As árvores fenéticas foram construídas pelo método de *Neighbor Joining* (NJ), método *p-distance*, deleção completa, com *bootstrap* de 1000 reamostragens. O arquivo Newick foi visualizado pela ferramenta on-line iTOL ¹⁰⁴. A ferramenta MEME ¹⁰⁵ foi utilizada para a busca de motivos conservados compartilhados pelos membros de cada família de VvPP.

Análise dos elementos *cis-acting* nas regiões promotoras dos genes VvPP

As sequências nucleotídicas *upstream* (1,5 kb) dos genes codificadores de VvPP foram extraídas do banco de dados *Phytozome* v12. As sequências promotoras foram analisadas no servidor MEME v5.0.3 ¹⁰⁵ visando identificar motivos de DNA comuns,

adotando os seguintes parâmetros: (1) zero e uma ocorrência por modelo de sequência escolhida, (2) extensão: seis a 50 nucleotídeos, (3) número máximo de motivos: dez e (4) ocorrência de motivos em ambas as fitas das sequência de DNA de entrada, associados a um *e-value* 10^{-2} . Os motivos-cis obtidos pelo MEME foram comparados no banco de dados de motivos conhecidos JARPAR (JASPAR2022_CORE_plants_non-redundant_v2) utilizando o *software* TomTom v5.4.1¹⁰⁵ visando atribuir um fator de transcrição (FT) aos motivos-cis identificados, utilizando os seguintes parâmetros: (1) valor p (*cutoff* $< 10^{-2}$) e (2) valor q: *cutoff* da taxa de falsa descoberta (FDR) $< 10^{-2}$. Neste trabalho, as identidades dos TFs associados aos CCRES bona fide enriquecidos foram relacionadas ao melhor acerto obtido.

Material vegetal, ensaio experimental e transcriptômica

O experimento visando à geração de bibliotecas de RNA-Seq de videira foi conduzido nos telados da Embrapa Semiárido (Petrolina - Brasil) usando clones da cultivar 'Red Globe' (Vv, considerada susceptível ao cancro bacteriano) e do híbrido IAC-572 (Vh, resultante do cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT [(*Vitis riparia* X *Vitis rupestris*) e *Vitis caribaea*] considerado moderadamente resistente ao cancro bacteriano)^{106,107}. As plantas foram propagadas por estaquia de cada matriz e cultivadas em vasos plásticos de 5 L, com substrato composto por proporções iguais de solo do tipo argiloso e vermiculita, sob condições controladas de temperatura, umidade e luminosidade [$25\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$; $60\% \pm 5\%$ de umidade relativa; e com 12 h/dia de luz natural (*Photosynthetic Photon Flux Density* (PPFD) = $1.5 \times 10^3\text{ }\mu\text{moles}$)]. Após 30 dias de cultivo, as plantas sadias de ambas as cultivares foram divididas em dois grupos: (1) Controle - plantas inoculadas com água destilada esterilizada; (2) Tratamento - plantas inoculadas com a bactéria *X. citri* (isolado Xcv117), ambos compostos por três réplicas biológicas para cada cultivar e tratamento. A inoculação foi realizada utilizando seringas hipodérmicas sem agulhas, na parte abaxial das primeiras três folhas, injetando aproximadamente 20 μL de suspensão bacteriana em três pontos de infiltração por folha, conforme metodologia descrita por Gama et al. (2011)¹⁰⁸. As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos após a inoculação: (1) 90 minutos; (2) 6 horas; (3) 24 horas e (4) 48 horas após a inoculação. O tecido foliar foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado em freezer -80°C .

Extração de RNA, síntese de cDNA, construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento

A extração do RNA total foi realizada a partir da associação do protocolo CTAB Acetato¹⁰⁹ e do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) utilizando aproximadamente 200 mg de tecido foliar e tratamento de DNase (Promega) visando remover qualquer contaminação genômica. As amostras foram analisadas quanto à sua pureza, concentração e integridade em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific), fluorímetro Qubit® (Life Technologies) e Bioanalyser (Agilent Technologies), respectivamente. Os RNAs purificados foram enviados para a construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento no Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP utilizando a plataforma V4 2 X 100 HiSeq2500 (Illumina), *paired end*. A síntese de cDNA foi realizada empregando-se o GoScript™ Reverse Transcription System, seguindo instruções do fabricante. A

montagem do transcriptoma foi feita pelo Trinity¹¹⁰ utilizando o genoma de referência de *V. vinifera* versão 12X. v2 ¹¹¹ disponível no NCBI. A análise estatística dos genes diferencialmente expressos foi realizada através do programa Edge-R ¹¹², seguindo o protocolo de HAAS et al¹¹³. As proteínas fosfatases foram mineradas no RNA-Seq de *Vitis* spp. e caracterizadas através de ferramentas de bioinformática, detalhadas a seguir.

Mineração das proteínas fosfatases no transcriptoma de *Vitis* spp. e análise de expressão *in silico*

Conforme descrito anteriormente na sessão anterior, foram utilizados os arquivos contendo modelos ocultos de Markov (HMMs) fosfatase de cada família [PPP (PF00149), PPM (PF00481), PTP (PF04387, PF00102, PF00782 e PF01451) e Asp-dep Phosphatase (PF09309, PF12689 e PF03767)] baixados do Pfam ⁹³ e usados para identificar PP putativas no transcriptoma de *Vitis* spp., usando o HMMER v. Software 3.1b1 ¹¹⁴ com *e-value* < 1,0. As sequências proteicas foram analisadas quanto à presença e conservação do domínio fosfatase por meio do Batch CD-Search ⁹⁴.

O perfil de expressão diferencial dos dados de RNA-Seq foi baseado na análise dos valores de *log2 Fold Change* (Log2FC) dos transcritos isolados de cada biblioteca/tratamento a partir das análises via EdgeR, sendo considerados diferencialmente expressos aqueles com *log2FC* > +1 ou < -1 (*p-value* ≤ 0.05). O agrupamento hierárquico (*Hierarchical Clustering Analysis*) e o *heatmap* foram gerados pelo programa TBtools ⁹⁹.

Desenho de *primers* e análise da expressão diferencial por qPCR

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenvolvidos por meio do programa Primer3 Plus ¹¹⁵ utilizando as seguintes modificações nos parâmetros padrões: conteúdo de GC 50%, tamanho do fragmento entre 70 e 150 pares de base (pb) e temperatura de *Melting* entre 40 °C e 60 °C. Em seguida, os *primers* foram analisados quanto à sua especificidade pelo Primer-BLAST ¹¹⁶ utilizando o RefSeq de mRNA de *V. vinifera* (taxid:29760).

As validações por qPCR seguiram como base as orientações do MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) ¹¹⁷. As reações foram realizadas em equipamento CFX96 Touch Real-Time (Bio-Rad), utilizando triplicatas biológicas e técnicas (amostrais) e detecção por SYBR Green. Os valores de eficiência de amplificação (*E* = 10⁻¹ /slope), coeficiente de correlação (*R*), *interception* (*Y*) e *slope* foram calculados pelo método da curva padrão utilizando diluições seriadas de um *pool* equimolar contendo uma alíquota de todas as amostras a serem analisadas. Genes normalizadores e alvos de interesse foram validados via qPCR e analisados pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool*) versão 2.0.13 ¹¹⁸. A seleção dos genes candidatos foi realizada com base na sua regulação e valores de modulação (Log2FC) verificados nas bibliotecas de RNASeq. Os genes TRU5, TCBP e 60SRP foram utilizados para a normalização dos resultados (SILVA et al., em preparação).

MATERIAL SUPLEMENTAR

As tabelas suplementares desse artigo podem ser encontradas em:

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/10Tx3lBnIJ7FVvK7aOZQP2ogSmN4TNrgm/edit?usp=sharing&oid=109984610125148084676&rtpof=true&sd=true>

Tabela S1: Domínios identificados nos 129 genes VvPPs, incluindo domínios fosfatases e domínios adicionais.

Tabela S2: As características dos genes VvPP, como comprimento dos genes, proteínas, características físico-químicas, GRAVY e regiões transmembranares.

Tabela S3: Fatores de Transcrição ancorados nos promotores dos genes VvPP com seus respectivos Matrix JASPAR ID.

Figura S1: Distribuição genômica dos genes *PP* em pseudocromossomos randômicos e zero de *V. vinifera*.

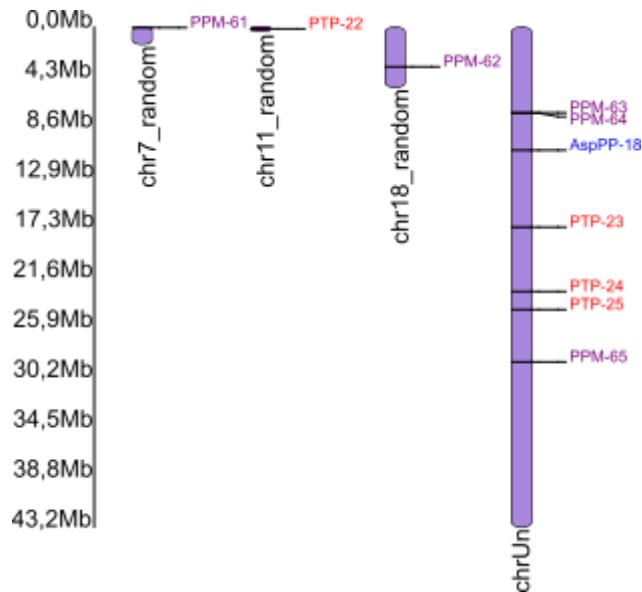


Figura S2: A) Distribuição de motivos conservados obtidos pelo software MEME. B) Organização genômica dos genes PPP da videira.

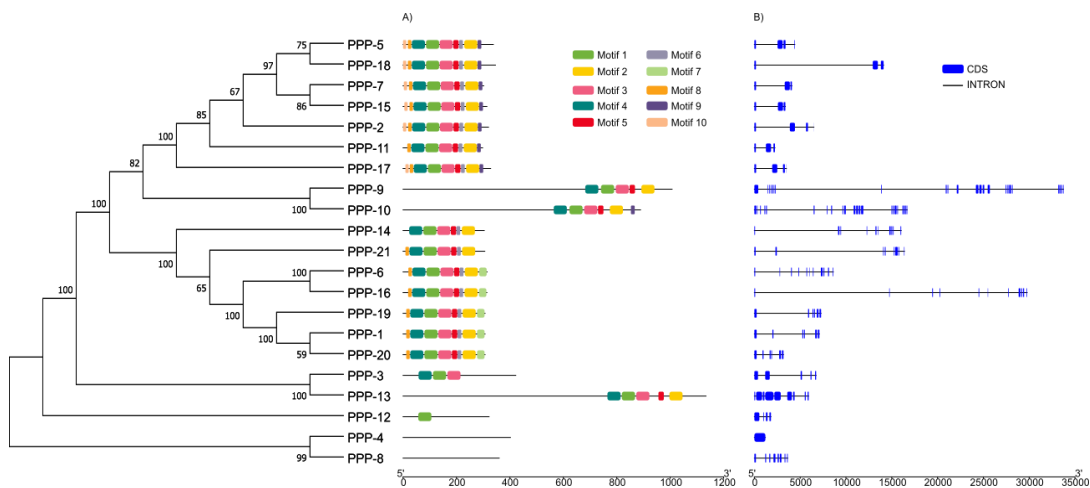


Figura S3: A) Distribuição de motivos conservados obtidos pelo software MEME. B) Organização genômica dos genes PPM da videira.

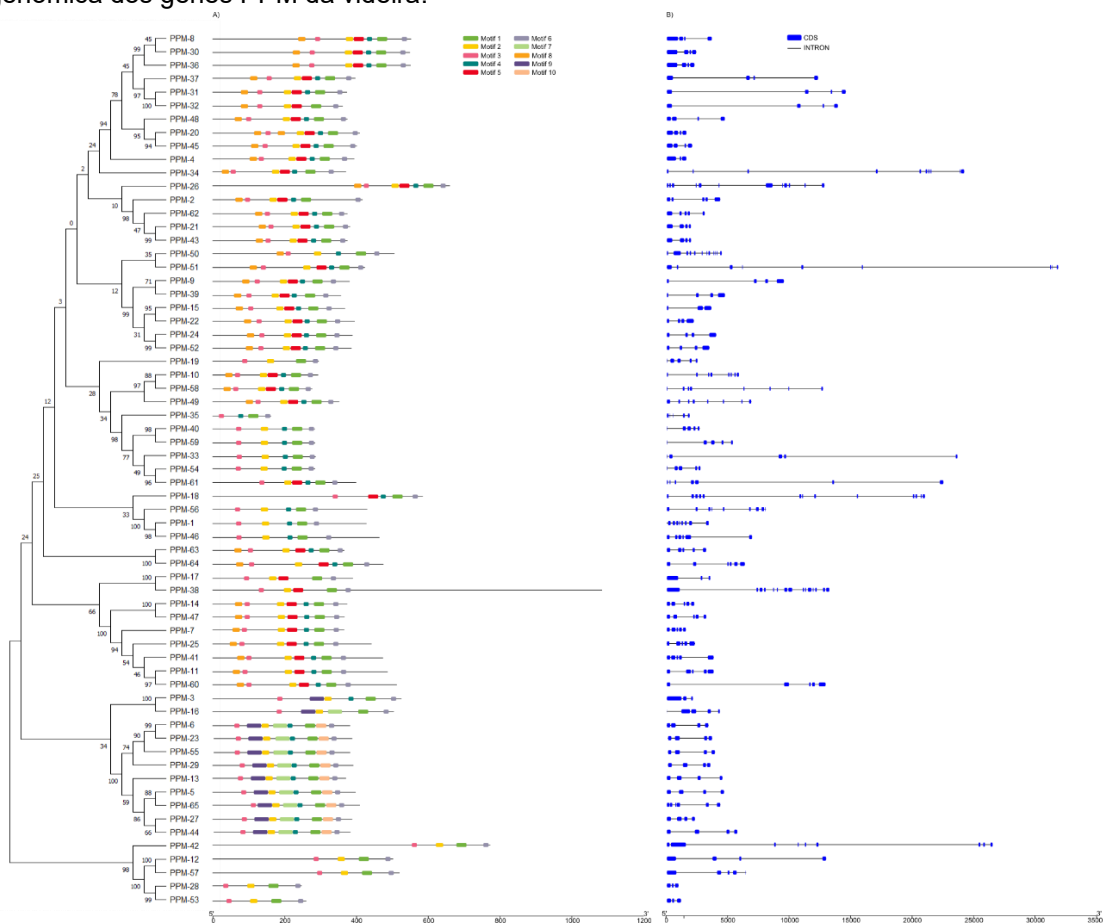


Figura S4: A) Distribuição de motivos conservados obtidos pelo software MEME. B) Organização genômica dos genes PTP da videira.

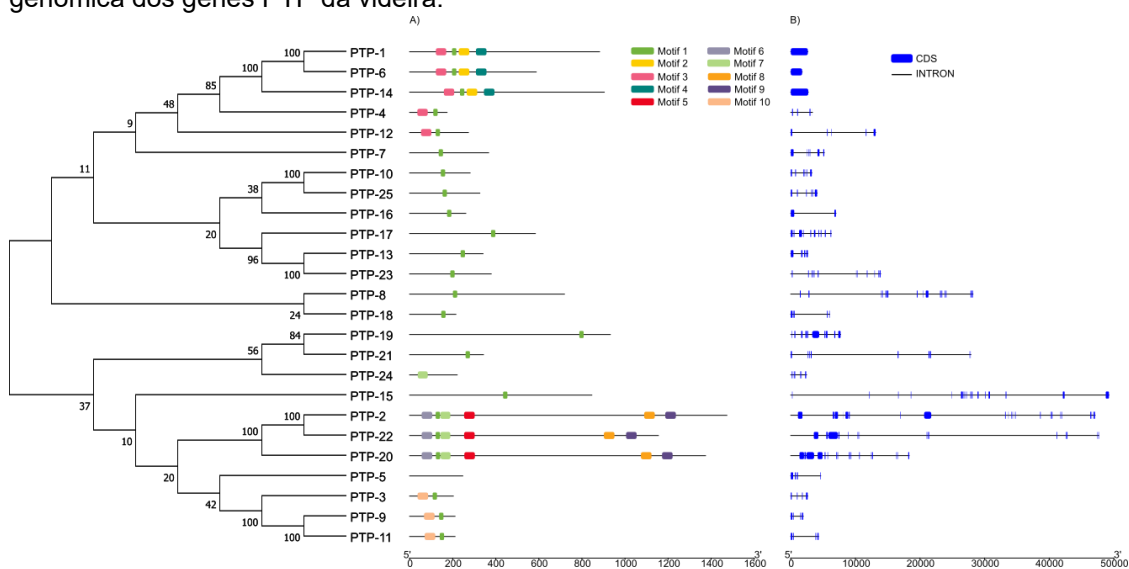


Figura S5: A) Distribuição de motivos conservados obtidos pelo software MEME. B) Organização genômica dos genes AspPP da videira.

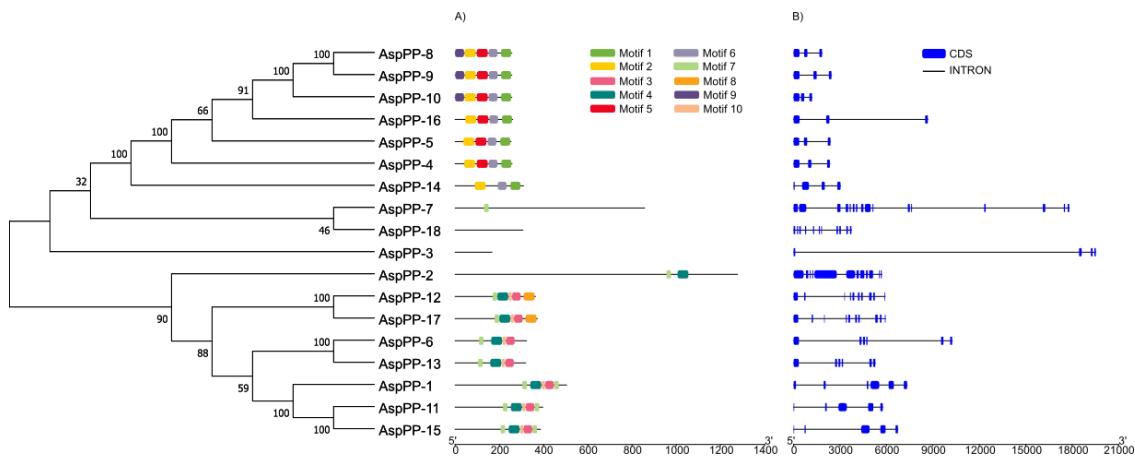


Figura S6: Motivos de sítios ativos característicos e específicos da família PPP identificados em videira.

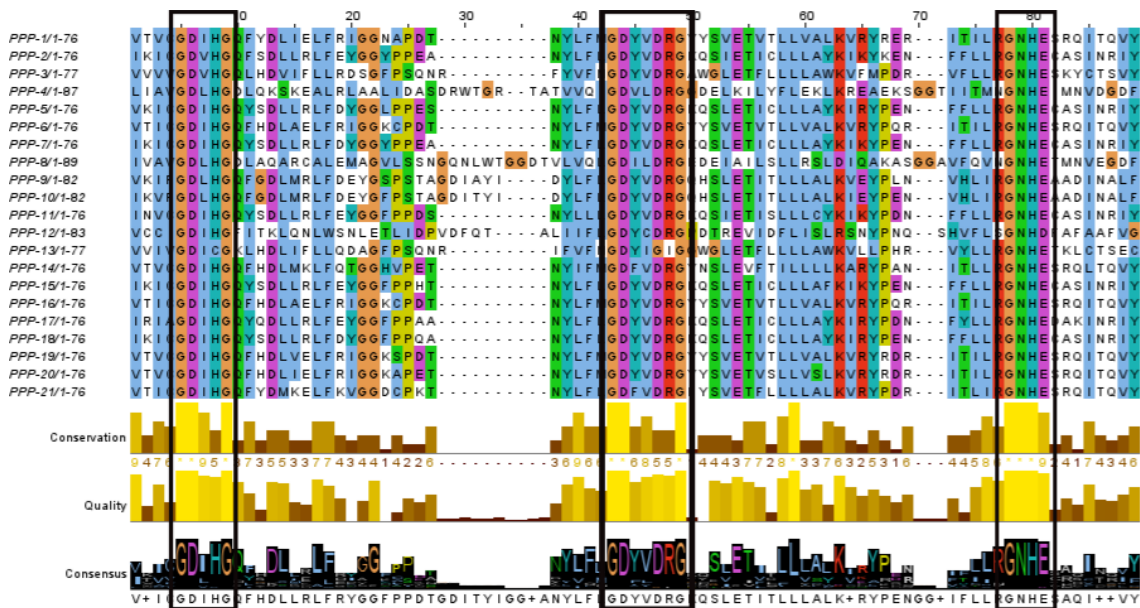


Figura S7: Motivos de sítios ativos característicos e específicos da família PPM identificados em videira.

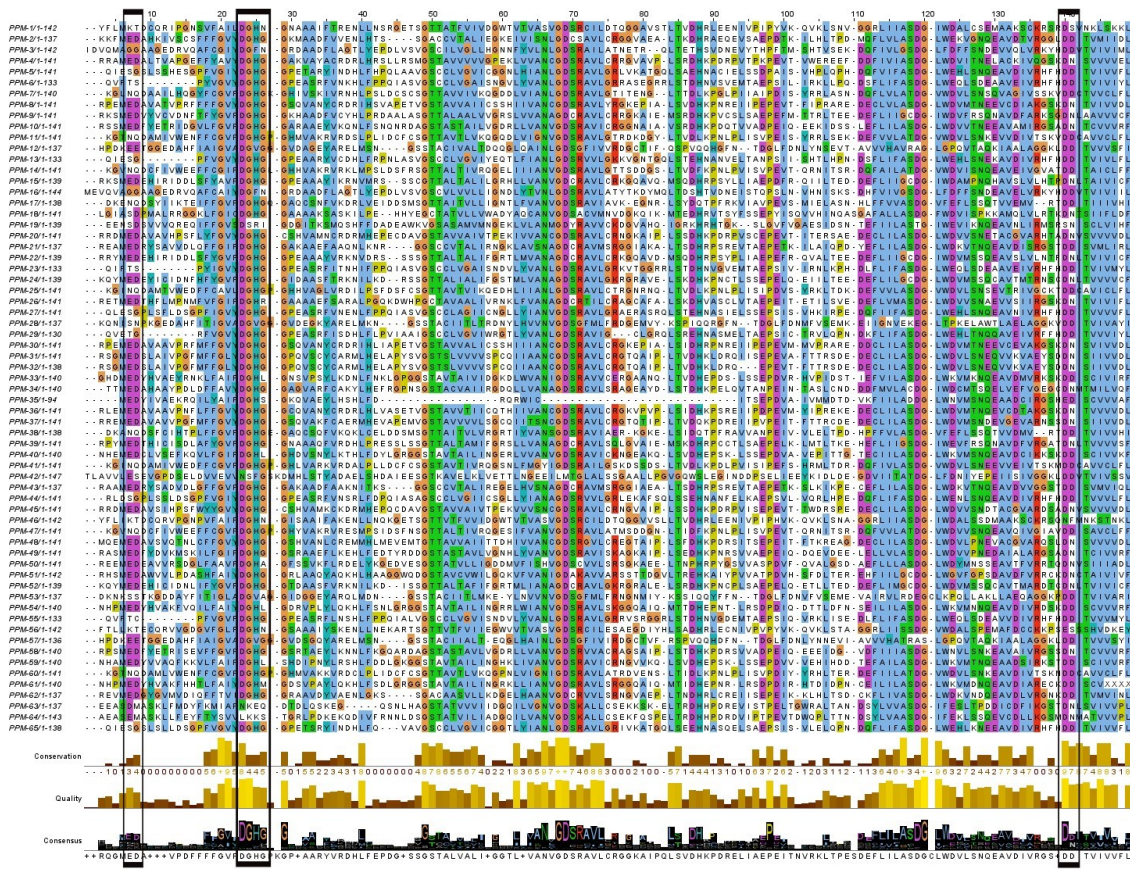


Figura S8: Motivos de sítios ativos característicos e específicos da família AspPP identificados em videira.

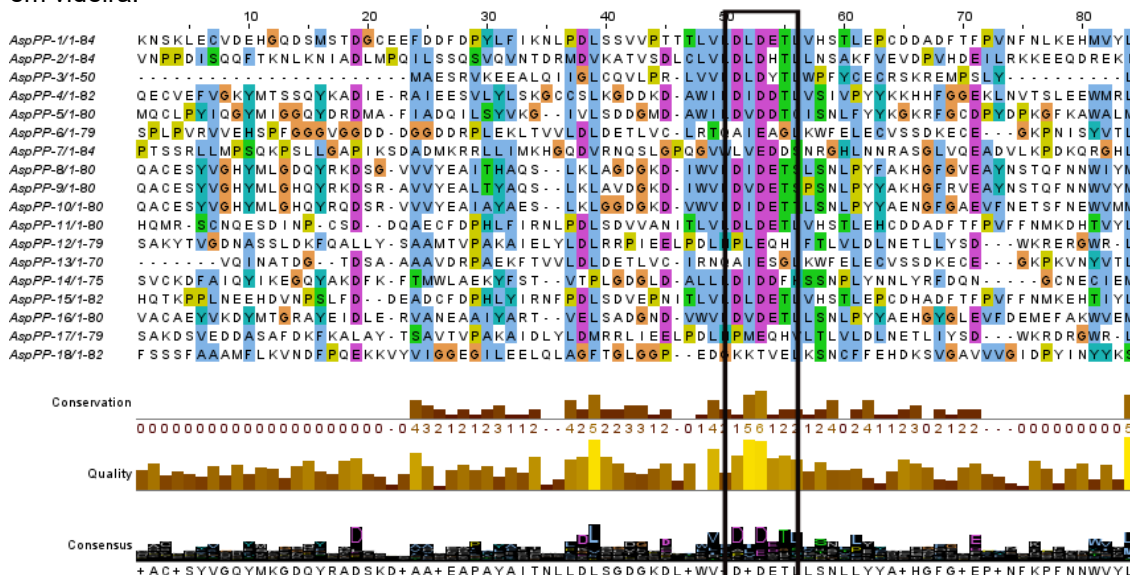


Figura S9: Motivos de sítios ativos característicos e específicos da família PTP identificados em videira.

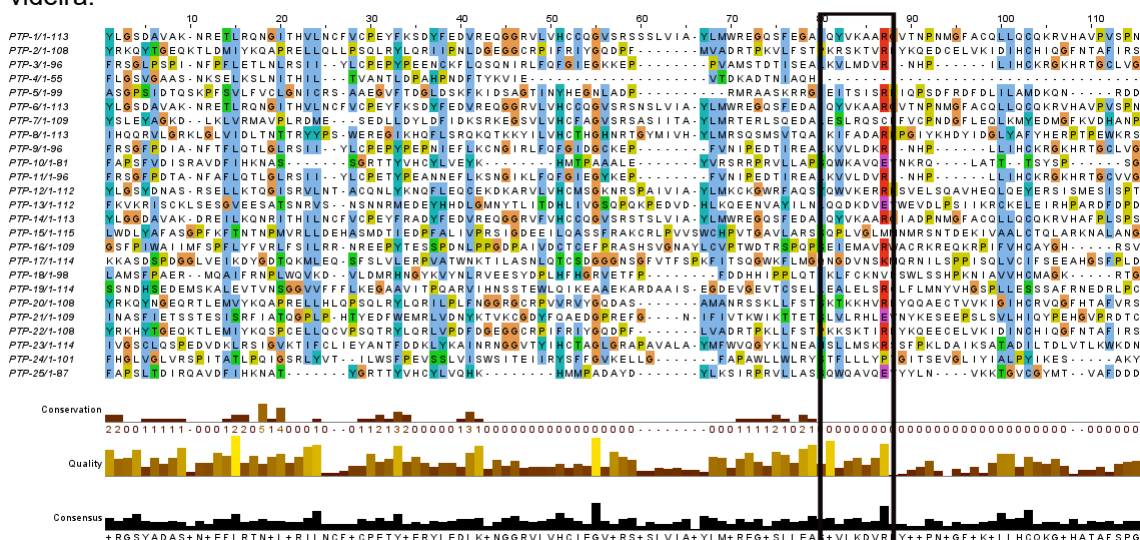
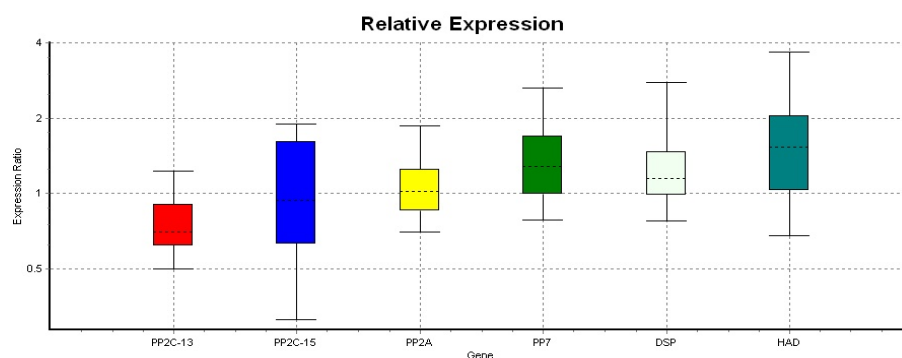
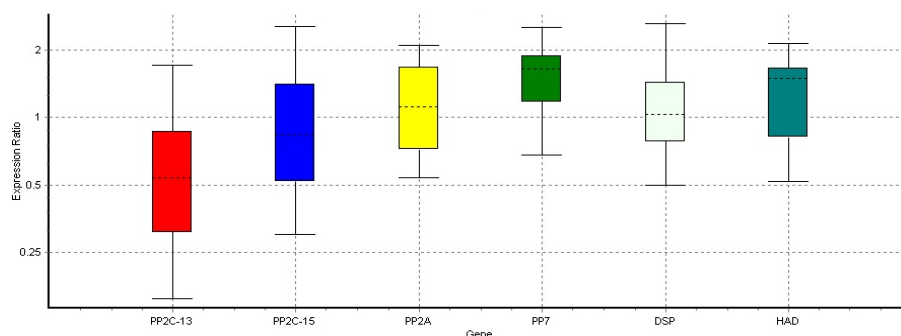


Figura S10: Expressão relativa via qPCR dos genes *VvPPs* em cDNAs de tecidos foliares de videira infectada com *X. citri*. (a) RedGlobe – 90 minutos após inoculação com *X. citri*, b) IAC 572 – 90 minutos após inoculação com *X. citri*, c) RedGlobe – 48 horas após inoculação com *X. citri*, d) IAC 572 – 48 horas após inoculação com *X. citri*.

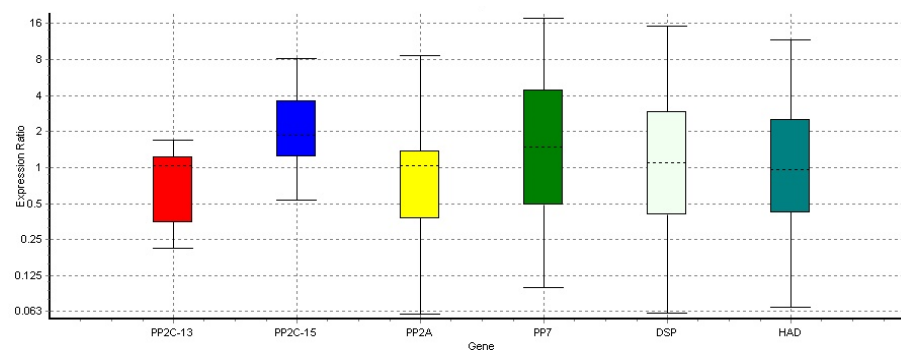
a)



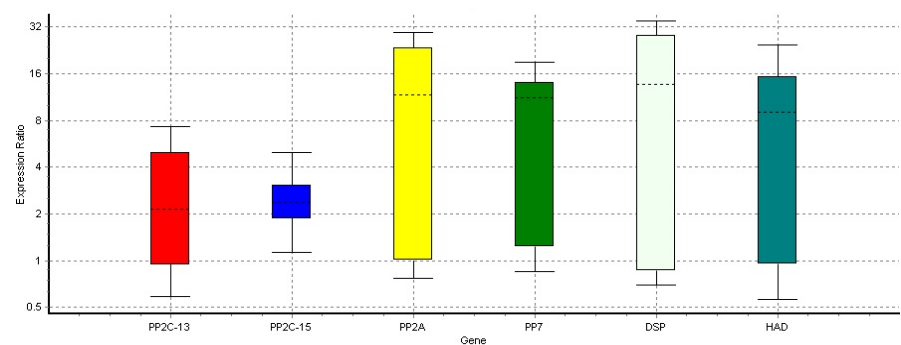
b)



c)



d)



REFERÊNCIAS

1. Ramazi, S. & Zahiri, J. Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database* **2021**, baab012 (2021).
2. Skamnaki, V. T. *et al.* Catalytic Mechanism of Phosphorylase Kinase Probed by Mutational Studies. *Biochemistry* **38**, 14718–14730 (1999).
3. Duan, G. & Walther, D. The roles of post-translational modifications in the context of protein interaction networks. *PLoS Comput Biol* **11**, e1004049 (2015).
4. Ferreira-Neto, J. R. C. *et al.* The Cowpea Kinome: Genomic and Transcriptomic Analysis Under Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science* **12**, (2021).
5. Gill, R. A. *et al.* Reduced Glutathione Mediates Pheno-Ultrastructure, Kinome and Transportome in Chromium-Induced *Brassica napus* L. *Front Plant Sci* **8**, 2037 (2017).
6. Liu, H., Qu, W., Zhu, K. & Cheng, Z.-M. The wild strawberry kinome: identification, classification and transcript profiling of protein kinases during development and in response to gray mold infection. *BMC Genomics* **21**, 635 (2020).
7. Liu, J. *et al.* Soybean kinome: functional classification and gene expression patterns. *J Exp Bot* **66**, 1919–1934 (2015).
8. Ritsema, T., Joore, J., van Workum, W. & Pieterse, C. M. [No title found]. *Plant Methods* **3**, 3 (2007).
9. Singh, D. K. *et al.* The tomato kinome and the tomato kinase library ORFeome: novel resources for the study of kinases and signal transduction in tomato and solanaceae species. *Mol Plant Microbe Interact* **27**, 7–17 (2014).
10. Wei, K., Wang, Y. & Xie, D. Identification and expression profile analysis of the protein kinase gene superfamily in maize development. *Mol Breeding* **33**, 155–172 (2014).
11. Yan, J., Li, G., Guo, X., Li, Y. & Cao, X. Genome-wide classification, evolutionary analysis and gene expression patterns of the kinome in *Gossypium*. *PLOS ONE* **13**, e0197392 (2018).
12. Zhu, K., Liu, H., Chen, X., Cheng, Q. & Cheng, Z.-M. The kinome of pineapple: catalog and insights into functions in crassulacean acid metabolism plants. *BMC Plant Biol* **18**, 199 (2018).
13. Zhu, K. *et al.* The grapevine kinome: annotation, classification and expression patterns in developmental processes and stress responses. *Hortic Res* **5**, 19 (2018).
14. Zulawski, M., Schulze, G., Braginets, R., Hartmann, S. & Schulze, W. X. The Arabidopsis Kinome: phylogeny and evolutionary insights into functional diversification. *BMC Genomics* **15**, 548 (2014).
15. Kerk, D. *et al.* The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 908–925 (2002).
16. Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., Tyagi, A. K. & Pandey, G. K. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics* **11**, 435 (2010).
17. Bradai, M. *et al.* Genome wide identification of wheat and Brachypodium type one protein phosphatases and functional characterization of durum wheat TdPP1a. *PLOS ONE* **13**, e0191272 (2018).
18. Chao, J., Huang, Z., Yang, S., Deng, X. & Tian, W. Genome-wide identification and expression analysis of the phosphatase 2A family in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *PLoS One* **15**, e0228219 (2020).
19. Khan, N. *et al.* Genome-Wide Identification, Evolution, and Transcriptional Profiling of PP2C Gene Family in *Brassica rapa*. *BioMed Research International* **2019**, 15 (2019).
20. Qiu, J. *et al.* Genome-Wide Analysis of the Protein Phosphatase 2C Genes in Tomato. *Genes (Basel)* **13**, 604 (2022).
21. Wang, S., Guo, J., Zhang, Y., Guo, Y. & Ji, W. Genome-wide characterization and expression analysis of TOPP-type protein phosphatases in soybean (*Glycine max* L.) reveal the role of GmTOPP13 in drought tolerance. *Genes Genom* **43**, 783–796 (2021).

22. Xue, T. *et al.* Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and Arabidopsis. *BMC Genomics* **9**, 550 (2008).
23. Bheri, M., Mahiwal, S., Sanyal, S. K. & Pandey, G. K. Plant protein phosphatases: What do we know about their mechanism of action? *The FEBS Journal* **288**, 756–785 (2021).
24. Kerk, D., Templeton, G. & Moorhead, G. B. G. Evolutionary Radiation Pattern of Novel Protein Phosphatases Revealed by Analysis of Protein Data from the Completely Sequenced Genomes of Humans, Green Algae, and Higher Plants. *Plant Physiol* **146**, 351–367 (2008).
25. Barford, D., Das, A. K. & Egloff, M.-P. THE STRUCTURE AND MECHANISM OF PROTEIN PHOSPHATASES: Insights into Catalysis and Regulation. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **27**, 133–164 (1998).
26. Shi, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. *Cell* **139**, 468–484 (2009).
27. Brautigan, D. Protein Ser/Thr phosphatases-The ugly ducklings of cell signaling. *The FEBS journal* **280**, (2012).
28. Nilsson, J. Protein phosphatases in the regulation of mitosis. *Journal of Cell Biology* **218**, 395–409 (2019).
29. Barbosa, M. A. G. & Júnior, P. M. R. Manejo do Cancro Bacteriano da Videira no Vale do São Francisco. 14.
30. Junior, V. A. M., Sugimori, M. H., Almeida, I. M. G. & Ribeiro, I. J. A. RESISTÊNCIA DE VARIEDADES DE VIDEIRA A XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV. VITICOLA. *São Paulo* **4** (2003).
31. Silva, A. M. F., Menezes, E. F. de, Souza, E. B. de, Melo, N. F. de & Mariano, R. de L. R. Sobrevivência de Xanthomonas campestris pv. viticola em tecido infectado de videira. *Rev. Bras. Frutic.* **34**, 757–765 (2012).
32. Divergence of duplicate genes in exon–intron structure | PNAS.
<https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.1109047109>.
33. Cao, J., Jiang, M., Li, P. & Chu, Z. Genome-wide identification and evolutionary analyses of the PP2C gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in Brachypodium distachyon. *BMC Genomics* **17**, 175 (2016).
34. Yang, Q. *et al.* Genome-wide Identification of PP2C Genes and Their Expression Profiling in Response to Drought and Cold Stresses in Medicago truncatula. *Scientific Reports* **8**, (2018).
35. Wang, Y. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of StPP2C gene family in response to multiple stresses in potato (Solanum tuberosum L.). *Journal of Integrative Agriculture* **19**, 1609–1624 (2020).
36. Liu, M. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the PTP family in Chinese cabbage (Brassica rapa subsp. pekinensis). *Botany* **97**, 599–614 (2019).
37. Wang, G. *et al.* Genome-wide Identification and Evolution of the PP2C Gene Family in Eight Rosaceae Species and Expression Analysis Under Stress in Pyrus bretschneideri. *Front Genet* **12**, 770014 (2021).
38. Steinbauerová, V., Neumann, P., Novák, P. & Macas, J. A widespread occurrence of extra open reading frames in plant Ty3/gypsy retrotransposons. *Genetica* **139**, 1543–1555 (2011).
39. Uhlken, C., Hoth, S. & Weingartner, M. MAIL1 is essential for development of the primary root but not of anchor roots. *Plant Signal Behav* **9**, e976477 (2014).
40. Mahajan, A. *et al.* Structure and Function of the Phosphothreonine-Specific FHA Domain. *Sci. Signal.* **1**, (2008).
41. Gökirmak, T., Paul, A.-L. & Ferl, R. J. Plant phosphopeptide-binding proteins as signaling mediators. *Curr Opin Plant Biol* **13**, 527–532 (2010).
42. Morris, E. R., Chevalier, D. & Walker, J. C. DAWDLE, a Forkhead-Associated Domain Gene, Regulates Multiple Aspects of Plant Development. *Plant Physiology* **141**, 932–941 (2006).

43. Kini, H. K. & Patrick Walton, S. In vitro binding of single-stranded RNA by human Dicer. *FEBS Lett* **581**, 5611–5616 (2007).
44. Wostenberg, C. *et al.* The role of human Dicer-dsRBD in processing small regulatory RNAs. *PLoS One* **7**, e51829 (2012).
45. Schwartz, R., Ting, C. S. & King, J. Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res* **11**, 703–709 (2001).
46. Yu, X. *et al.* Genome-Wide Identification and Homoeologous Expression Analysis of PP2C Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Frontiers in Genetics* **10**, (2019).
47. Zhang, G. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the cucumber PP2C gene family. *BMC Genomics* **23**, 1–15 (2022).
48. Jeffares, D. C., Penkett, C. J. & Bähler, J. Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends Genet* **24**, 375–378 (2008).
49. Jo, B.-S. & Choi, S. S. Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics Inform* **13**, 112–118 (2015).
50. Cannon, S. B., Mitra, A., Baumgarten, A., Young, N. D. & May, G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **4**, 10 (2004).
51. Li, J. *et al.* Genome-wide characterization of protein phosphatase 2C genes in *Populus euphratica* and their expression profiling under multiple abiotic stresses. *Tree Genetics & Genomes* **14**, 80 (2018).
52. Shazadee, H. *et al.* Identification and Expression Profiling of Protein Phosphatases (PP2C) Gene Family in *Gossypium hirsutum* L. *Int J Mol Sci* **20**, 1395 (2019).
53. Haider, M. S. *et al.* Genome-wide identification, evolution, and molecular characterization of the PP2C gene family in woodland strawberry. *Gene* **702**, 27–35 (2019).
54. Birchler, J. A., Bhadra, U., Bhadra, M. P. & Auger, D. L. Dosage-Dependent Gene Regulation in Multicellular Eukaryotes: Implications for Dosage Compensation, Aneuploid Syndromes, and Quantitative Traits. *Developmental Biology* **234**, 275–288 (2001).
55. Blanc, G. & Wolfe, K. H. Functional Divergence of Duplicated Genes Formed by Polyploidy during *Arabidopsis* Evolution [W]. *The Plant Cell* **16**, 1679–1691 (2004).
56. Takemiya, A., Kinoshita, T., Asanuma, M. & Shimazaki, K. Protein phosphatase 1 positively regulates stomatal opening in response to blue light in *Vicia faba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 13549–13554 (2006).
57. Templeton, G. W. *et al.* Identification and characterization of AtI-2, an *Arabidopsis* homologue of an ancient protein phosphatase 1 (PP1) regulatory subunit. *Biochem J* **435**, 73–83 (2011).
58. Yue, J. *et al.* TOPP4 Regulates the Stability of PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR5 during Photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **170**, 1381–1397 (2016).
59. Sugimoto, H. *et al.* Overexpression of a novel *Arabidopsis* PP2C isoform, AtPP2CF1, enhances plant biomass production by increasing inflorescence stem growth. *J Exp Bot* **65**, 5385–5400 (2014).
60. Singh, A., Pandey, A., Srivastava, A. K., Tran, L. S. & Pandey, G. K. Plant protein phosphatases 2C: from genomic diversity to functional multiplicity and importance in stress management. *Crit Rev Biotechnol* **36**, 1023–1035 (2016).
61. Merlot, S., Gosti, F., Guerrier, D., Vavasseur, A. & Giraudat, J. The ABI1 and ABI2 protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway: ABI2 is a negative regulator of ABA signalling. *The Plant Journal* **25**, 295–303 (2001).
62. González-García, M. P. *et al.* Negative Regulation of Absciscic Acid Signaling by the *Fagus sylvatica* FsPP2C1 Plays A Role in Seed Dormancy Regulation and Promotion of Seed Germination. *Plant Physiology* **133**, 135–144 (2003).
63. Hirayama, T. & Umezawa, T. The PP2C-SnRK2 complex. *Plant Signal Behav* **5**, 160–163 (2010).
64. Komatsu, K. *et al.* Group A PP2Cs evolved in land plants as key regulators of intrinsic

- desiccation tolerance. *Nat Commun* **4**, 2219 (2013).
65. Schweighofer, A. *et al.* The PP2C-Type Phosphatase AP2C1, Which Negatively Regulates MPK4 and MPK6, Modulates Innate Immunity, Jasmonic Acid, and Ethylene Levels in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 2213–2224 (2007).
 66. Song, S.-K., Hofhuis, H., Lee, M. M. & Clark, S. E. Key divisions in the early Arabidopsis embryo require POL and PLL1 phosphatases to establish the root stem cell organizer and vascular axis. *Dev Cell* **15**, 98–109 (2008).
 67. Servet, C. *et al.* Characterization of a phosphatase 2C protein as an interacting partner of the histone acetyltransferase GCN5 in Arabidopsis. *Biochim Biophys Acta* **1779**, 376–382 (2008).
 68. Lee, M. W., Jelenska, J. & Greenberg, J. T. Arabidopsis proteins important for modulating defense responses to *Pseudomonas syringae* that secrete HopW1-1. *Plant J* **54**, 452–465 (2008).
 69. Rebay, I., Silver, S. J. & Tootle, T. L. New vision from Eyes absent: transcription factors as enzymes. *Trends Genet* **21**, 163–171 (2005).
 70. Molina-Hidalgo, F. J. *et al.* The fruit-specific transcription factor FaDOF2 regulates the production of eugenol in ripe fruit receptacles. *J Exp Bot* **68**, 4529–4543 (2017).
 71. Yang, Q., Chen, Q., Zhu, Y. & Li, T. Identification of MdDof genes in apple and analysis of their response to biotic or abiotic stress. *Funct Plant Biol* **45**, 528–541 (2018).
 72. Liu, X. *et al.* Characterization of Dof family in *Pyrus bretschneideri* and role of PbDof9.2 in flowering time regulation. *Genomics* **112**, 712–720 (2020).
 73. Corrales, A.-R. *et al.* Characterization of tomato Cycling Dof Factors reveals conserved and new functions in the control of flowering time and abiotic stress responses. *J Exp Bot* **65**, 995–1012 (2014).
 74. Zhang, Z., Yuan, L., Liu, X., Chen, X. & Wang, X. Evolution analysis of Dof transcription factor family and their expression in response to multiple abiotic stresses in *Malus domestica*. *Gene* **639**, 137–148 (2018).
 75. Kang, H.-G., Foley, R. C., Oñate-Sánchez, L., Lin, C. & Singh, K. B. Target genes for OBP3, a Dof transcription factor, include novel basic helix-loop-helix domain proteins inducible by salicylic acid. *Plant J* **35**, 362–372 (2003).
 76. Gómez-Ros, L. *et al.* The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains cis-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. *Planta* **236**, 327–42 (2012).
 77. Sx, Z., S, X. & Ml, C. The gene encoding Arabidopsis acyl-CoA-binding protein 3 is pathogen inducible and subject to circadian regulation. *Journal of experimental botany* **63**, (2012).
 78. Yanhui, C. *et al.* The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. *Plant Mol Biol* **60**, 107–124 (2006).
 79. Li, C., Ng, C. K.-Y. & Fan, L.-M. MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany* **114**, 80–91 (2015).
 80. Schmidt, R. Synteny: recent advances and future prospects. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 97–102 (2000).
 81. Peleg, Z. & Blumwald, E. Hormone balance and abiotic stress tolerance in crop plants. *Curr Opin Plant Biol* **14**, 290–295 (2011).
 82. Allen, G. J., Kuchitsu, K., Chu, S. P., Murata, Y. & Schroeder, J. I. Arabidopsis *abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rises in guard cells. *Plant Cell* **11**, 1785–1798 (1999).
 83. Saez, A. *et al.* Gain-of-function and loss-of-function phenotypes of the protein phosphatase 2C HAB1 reveal its role as a negative regulator of abscisic acid signalling. *Plant J* **37**, 354–369 (2004).
 84. Kuhn, J. M., Boisson-Dernier, A., Dizon, M. B., Maktabi, M. H. & Schroeder, J. I. The protein phosphatase AtPP2CA negatively regulates abscisic acid signal transduction in Arabidopsis,

- and effectsof abh1 on AtPP2CA mRNA. *Plant Physiol* **140**, 127–139 (2006).
85. Rubio, S. *et al.* Triple Loss of Function of Protein Phosphatases Type 2C Leads to Partial ConstitutiveResponse to Endogenous Absciscic Acid. *Plant Physiology* **150**, 1345–1355 (2009).
 86. Sun, H.-L. *et al.* Identification of an important site for function of the type 2C protein phosphataseABI2 in absciscic acid signalling in Arabidopsis. *J Exp Bot* **62**, 5713–5725 (2011).
 87. Gao, C. *et al.* Genome-Wide Expression Profiles of Hemp (*Cannabis sativa* L.) in Response to DroughtStress. *International Journal of Genomics* **2018**, e3057272 (2018).
 88. Sun, L. *et al.* Transcriptional regulation of SIPYL, SIPP2C, and SISnRK2 gene families encoding ABA signal core components during tomato fruit development and drought stress. *J Exp Bot* **62**, 5659–5669(2011).
 89. Yang, Z. *et al.* De novo transcriptome sequencing of two cultivated jute species under salinity stress. *PLOS ONE* **12**, e0185863 (2017).
 90. Ali, M. *et al.* Biotic stress triggered small RNA and RNAi defense response in plants. *Mol Biol Rep* **47**, 5511–5522 (2020).
 91. Atkinson, N. J. & Urwin, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to thefield. *J Exp Bot* **63**, 3523–3543 (2012).
 92. Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. & Mittler, R. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* **203**, 32–43 (2014).
 93. Mistry, J. *et al.* Pfam: The protein families database in 2021. *Nucleic Acids Research* **49**, D412–D419(2021).
 94. Marchler-Bauer, A. & Bryant, S. H. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucleic AcidsResearch* **32**, W327–W331 (2004).
 95. Hiller, K., Grote, A., Maneck, M., Münch, R. & Jahn, D. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane andsecreted proteins. *Bioinformatics* **22**, 2441–2443 (2006).
 96. Savojardo, C., Martelli, P. L., Fariselli, P., Profiti, G. & Casadio, R. BUSCA: an integrative web server topredict subcellular localization of proteins. *Nucleic Acids Research* **46**, W459–W466 (2018).
 97. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* **305**, 567–580(2001).
 98. Wang, Y. *et al.* MCSanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny andcollinearity. *Nucleic Acids Res* **40**, e49 (2012).
 99. Chen, C. *et al.* TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big BiologicalData. *Molecular Plant* **13**, 1194–1202 (2020).
 100. Lynch, M. & Conery, J. S. The Evolutionary Fate and Consequences of Duplicate Genes. *Science* **290**, 1151–1155 (2000).
 101. Tamura, K., Stecher, G. & Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**, 3022–3027 (2021).
 102. Cao, J. *et al.* Genome-wide and molecular evolution analysis of the subtilase gene family in *Vitisvinifera*. *BMC Genomics* **15**, 1116 (2014).
 103. Procter, J. B. *et al.* Alignment of Biological Sequences with Jalview. *Methods Mol Biol* **2231**, 203–224(2021).
 104. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display andannotation. *Nucleic Acids Research* **49**, W293–W296 (2021).
 105. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E. & Noble, W. S. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* **43**, W39–W49(2015).
 106. Naue, C. R., Barbosa, M. A. G., Batista, D. da C., Souza, E. B. de & Mariano, R. de L. R. Effect of treatment of 'Red Globe' vine cuttings on the control of bacterial canker caused by *Xanthomonascampestris* pv. *viticola*. *Rev. Bras. Frutic.* **36**, 853–861 (2014).

107. Lopes, D. B. & Nascimento, A. R. P. Situação Atual do Cancro Bacteriano da Videira no Semi-Árido Nordestino. 9.
108. Gama, M. A. S., Mariano, R. L. R., Viana, F. M. P., Ferreira, M. A. S. V. & Souza, E. B. Polyphasic Characterization of Pigmented Strains of *Xanthomonas* Pathogenic to Cashew Trees. *Plant Disease* **95**, 793–802 (2011).
109. Zhao, L. *et al.* An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochem Anal* **23**, 647–650 (2012).
110. Grabherr, M. G. *et al.* Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat Biotechnol* **29**, 644–652 (2011).
111. Canaguier, A. *et al.* A new version of the grapevine reference genome assembly (12X.v2) and of its annotation (VCost.v3). *Genom Data* **14**, 56–62 (2017).
112. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).
113. Haas, B. J. *et al.* De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc* **8**, 1494–1512 (2013).
114. Finn, R. D., Clements, J. & Eddy, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic Acids Res* **39**, W29–W37 (2011).
115. Untergasser, A. *et al.* Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**, W71–W74 (2007).
116. Ye, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* **13**, 134 (2012).
117. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* **55**, 611–622 (2009).
118. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e36 (2002).

4.2 ARTIGO 2

*Artigo a ser submetido à Revista *Scientific Reports*.

Fosfatoma de *Vigna unguiculata*: Abordagem genômica e transcriptômica sob condições de estresse biótico

Jéssica Barboza da Silva¹, Agnes Angélica Guedes de Barros^{1,2}, Roberta Lane de Oliveira Silva², Ruana Carolina Cabral da Silva¹, Ana Maria Benko-Iseppon^{2*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Recife, 50670-901, Brasil

²Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, 52171-900, Brasil

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

RESUMO

Proteínas fosfatases (PPs) são relatadas por participarem do processo de tolerância a diversas condições de estresse abiótico. Por sua vez, estudos envolvendo a ação dessas proteínas frente ao estresse biótico são escassos. No presente estudo, as PPs foram identificadas e caracterizadas no genoma do feijão-caupi. Além disso, o perfil de expressão de PPs foram avaliados (*VuPPs*) sob diferentes estresses bióticos [vírus (inoculação com CABMV ou CPSMV). Identificamos 146 genes *VuPP*, sendo 28 da família PPP (fosfoproteína fosfatase), 81 da família PPM (proteína fosfatase metalo-dependente), 27 da família PTP (proteína tirosina fosfatase) e 10 da família AspPP (aspartato (Asp)-fosfatases dependentes). Observamos que as estruturas gênicas e os motivos apresentam padrões de conservação nas famílias PPs identificadas. Os promotores de *VuPP* associaram TFs relacionados à regulação da resposta a estresses, majoritariamente, a C2H2. Além disso, as relações de colinearidade dos genes *VuPP* com *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max* demonstraram que 89% dos genes apresentavam ortólogos. Dados de RNA-Seq revelaram que a maioria dos *VuPPs* foram recrutados nos dois tempos (60 minutos e 16 horas) de imposição do estresse, sugerindo que os *VuPPs* apresentam especialização funcional relacionada a cada ensaio analisado, reforçando sua pluralidade funcional. Nosso estudo aborda pela primeira vez, em feijão-caupi, a caracterização e o perfil transcricional de *VuPPs* sob estresse biótico, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos de defesa vegetal frente ao estresse biótico.

INTRODUÇÃO

Estresses bióticos e abióticos, ocasionam grandes perdas na agricultura pondo em risco a segurança alimentar mundial¹. Por outro lado, as plantas evoluíram em alto grau de desenvolvimento e plasticidade metabólica a fim de possibilitar respostas a estes desafios, recrutando uma série de sinalizadores como receptores, proteínas quinases e fosfatases para detectar e transduzir uma grande quantidade de sinais ambientais².

As proteínas fosfatases compõem uma superfamília de proteínas responsáveis pela regulação de inúmeros processos celulares como sinalizações metabólicas, comunicação, crescimento e proliferação celular³. Em plantas, essa superfamília compreende cerca de 150 membros⁴ divididos em quatro classes: fosfoproteínas fosfatases (PPP), proteínas fosfatases dependentes de metal (PPM), proteína tirosina (Tyr) fosfatases (PTP), e fosfatases dependentes de aspartato (Asp), dependendo da especificidade do substrato, mecanismo de catálise e sensibilidade do inibidor⁵. As famílias PPP e PPM são fosfatases específicas de serina (Ser) e treonina (Thr)⁶ e compartilham de uma homologia de sequência o que indica um mecanismo catalítico comum⁷. A família PPP inclui as subfamílias PP1, PP2A, PP2B, e PP4-7⁵ ao passo que a família PPM é representada pelas proteínas fosfatases do tipo 2C (PP2C) que necessitam de íons Mn^{2+} ou Mg^{2+} para sua atividade².

Diversos estudos vêm apontando a ação das proteínas fosfatases como agentes ativos na tolerância a diversos tipos de agentes estressantes de origem abiótica em plantas. Em *Oryza sativa*, dois genes *OsPP2A-1* e *OsPP2A-3* mostraram-se altamente induzidos em folhas em resposta à alta salinidade⁸. Em *Triticum aestivum*, transcritos de PP2A (*TaPP2Ac-1*) mostraram-se acumulados em plântulas durante o déficit hídrico, ao passo que a superexpressão deste gene em plantas transgênicas de tabaco permitiram a tolerância à seca e ao estresse salino⁹. Genes PP2C de diferentes espécies também têm demonstrado expressão sob vários tipos de estresses, como seca, salinidade, baixas temperaturas e calor¹⁰⁻¹⁴. Em contraste, estudos que relatem a ação das PPs no processo de defesa vegetal contra patógenos ainda são escassos. Recentemente, Qiu et al. (2022) avaliaram a ação das proteínas PP2C de *Solanum lycopersicum* e observaram nove genes (*SIPP2C28*, *SIPP2C38*, *SIPP2C40*, *SIPP2C43*, *SIPP2C44*, *SIPP2C48*, *SIPP2C50*, *SIPP2C89*, *SIPP2C92*) induzidos em resposta à infecção pela bactéria *Ralstonia solanacearum*, indicando que as PP2C podem estar envolvidas no processo de defesa da planta ao patógeno¹⁵.

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa anual de grande importância agrônoma no mundo¹⁶. Diversas condições de estresses bióticos e abióticos

como calor, seca e salinidade, bem como baixa fertilidade do solo diminuem o rendimento e a qualidade do seu cultivo, prejudicando a sua sobrevivência^{17,18}. As doenças ocasionadas por vírus são apontadas como os principais fatores limitantes da cultura, podendo acarretar em perda total da produção¹⁹. Nesse contexto, os vírus *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV, família Comoviridae, gênero Comovirus), *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV, família Potyviridae, gênero Potyvirus), *Cucumber mosaic virus* (CMV, família Bromoviridae, gênero Cucumovirus) e *Cowpea golden mosaic virus* (CGMV, família Geminiviridae, gênero Begomovirus) se destacam como agentes causais das principais viroses que acometem a cultura no Brasil,^{20,21}.

O *Cowpea Genomics Consortium* (CpG) foi criado para o desenvolvimento de estudos de genômica e transcriptômica, incluindo o sequenciamento de diversas bibliotecas de RNA-Seq de cultivares contrastantes de feijão-caupi inoculadas pelos vírus CABMV e CPSMV, bem como sob desidratação radicular. O CpG possibilitou a identificação de genes relacionados a estas condições estressantes que poderão ser aplicados na biotecnologia e em programas de melhoramento da cultura^{22,23}.

Nosso estudo é o primeiro a caracterizar o fosfatoma de *V. unguiculata* além de demonstrar sua relação na resposta ao estresse biótico. Utilizamos da abordagem genômica para inferir sobre as características destas proteínas, distribuição de motivos, elementos cis-regulatórios, duplicação de genes e sintenia entre espécies vegetais. Para o perfil de expressão, utilizamos o RNA-Seq de duas cultivares contrastantes para o experimento com os vírus CABMV e CPSMV, de modo a compreender a relação destes genes na defesa do feijão-caupi a tais estresses.

RESULTADOS

Identificação e anotação dos membros de PP de *Vigna unguiculata*

Neste estudo, 146 genes *VuPP* foram identificados a partir do genoma de *V. unguiculata* de acordo com os resultados da pesquisa dos HMMs, os quais foram renomeados de acordo com a sua família e posição cromossômica (PPP - *VuPPP1-VuPPP28*, PPM - *VuPPM1-VuPPM81*, PTP - *VuPTP1-VuPTP27* e AspPP - *VuAspPP1-VuAspPP10*). As características dos genes *VuPPs* incluindo comprimento da sequência de codificação, peso molecular da proteína, ponto isoelétrico (pI) e localização subcelular foram analisadas (**Tabela S1**). O quadro de leitura aberta completa (ORF) das *VuPPs* variou de 160 bp (*VuAspPP2*) a 543 bp (*VuPPM42*), enquanto os pesos moleculares variaram de

21,26 kDa (*VuAspPP2*) a 119,64 kDa (*VuPPM42*). Os valores de pI variaram de 4,56 (*VuPPP4*) a 9,83 (*VuPPM39*), com 73% dos membros de *VuPP* apresentando pI ácido. A grande média de hidropaticidade (GRAVY) variou de -0,745 a 0,399. Apenas os valores de GRAVY de *VuPPP10*, *VuPTP20* e *VuPTP27* foram maiores que 0, o que indicou que a maioria dos *VuPPs* eram preferencialmente proteínas hidrofílicas. A análise de localização subcelular mostrou que a maioria dos *VuPPs* estavam localizados no citoplasma, enquanto alguns deles podem estar no núcleo. Utilizando o TMHMM 2.0, foram preditas nove proteínas *VuPP* contendo de uma (*VuPPM-11*, *VuPPM-28*, *VuPPM-42* e *VuAspPP-5*) a quatro (*VuPPP-10* e *VuPTP-27*) hélices transmembranares.

Estrutura gênica e motivos conservados dos genes *VuPPs*

Devido à importância da estrutura gênica e domínios conservados para a história evolutiva e a estrutura dos genes, os padrões de éxon/íntron e motivos conservados das proteínas *VuPPs* foram analisados de acordo com as suas relações na árvore fenética. A investigação das estruturas

éxon/íntron revelou que a maioria das subfamílias apresentou um padrão semelhante em quantidade de éxons e íntrons, que variaram em seus tamanhos. Nas famílias *VuPPP* (**Figura S1a**) e *VuPPM* (**Figura S2a**) a quantidade de éxons nos genes variou de 2 a 21, enquanto que essa variação foi de 2 a 19 nos genes *VuPTP* (**Figura S3a**) e de 3 a 10 nos genes *VuAspPP* (**Figura S4a**). Nenhuma das quatro famílias apresentou genes sem íntrons.

Foram identificados dez motivos conservados nas sequências proteicas dos genes *VuPPs* pelo software MEME. Assim como ocorreu com as estruturas gênicas, as subfamílias dentro das quatro famílias apresentaram padrões semelhantes nas quantidades de motivos. Na família *VuPPM* (**Figura S1b**) houve uma melhor distribuição dos motivos e uma maior conservação, com os motivos 1, 2, 3, 4, 5 e 10, estando presentes em praticamente todas as sequências. Em *VuPPP* (**Figura S2b**), dois *clusters* mostraram-se bem conservados, agrupando a maior quantidade de motivos, que se mostraram mais dispersos nas outras sequências, onde *VuPPP-9*, *VuPPP-10* e *VuPPP-27* não exibiram nenhum motivo na análise. Já em *VuPTP* (**Figura S3b**), de forma geral, as sequências mostraram-se bem distintas, com poucos motivos distribuídos entre as subfamílias, onde apenas o motivo 1 revelou-se presente em todas elas e as sequências *VuPTP-26* e *VuPTP-27* não possuíam nenhum dos motivos conservados. Dos dez motivos identificados para a família *VuAspPP* (**Figura S4b**), sete obtiveram um valor satisfatório de *e-value* e, entre estes, os motivos 1,

2, 3 e 4 estiveram presentes na maioria das sequências. Já os motivos 5 e 6 estiveram presentes apenas nas sequências *VuAspPP-2* e *VuAspPP-5* que se mostraram bem divergentes das outras, ao passo que em *VuAspPP-4* e *VuAspPP-9* nenhum motivo foi identificado.

FTs associados aos promotores dos genes *VuPPs*

Sítios de ligação a fatores de transcrição foram identificados nas quatro famílias de *VuPP* em quantidades variáveis. Dos dez motivos identificados para cada família no MEME, oito exibiram valores de suporte satisfatórios para o ponto de corte maior que 10^{-2} (**Tabela 1**). Estes oito candidatos a elementos cis-regulatórios podem estar associados a 6 sítios de ligação de fatores de transcrição definidos experimentalmente para plantas (Matrix Jaspas ID), onde a família C2H2 “fatores de dedode zinco” mostrou-se presente em todas as famílias de *VuPPs*.

Tabela 1. Fatores de transcrição ancorados nos promotores dos genes *VuPP* com suas respectivas identificações na Matrix JASPAR.

Família <i>VuPP</i>	Nº	Motivo	Motivo <i>e-value</i>	Matrix Jaspas ID	Jaspas <i>e-value</i>	Nome FT (Classe ou família)
<i>VuPPP</i>	1	GAARRAAAGARRAWGRRAAWR	6.30E-24	MA1279.1	1.19E-05	COG1 (C2H2 zinc finger factors)
	1	YMYBSHBYBTCHYHNYMWKYNHCCHCBBC	3.90E-92	MA1403.1	3.93E-04	BPC5 (BBR-BPC)
<i>VuPPM</i>	2	AWAWWTAWATATAWATAWAWA	4.50E-14	MA1274.1	1.64E-02	OBP3 (C2H2 zinc finger factors)
	3	RAAARAAAARARAAAAARAA	9.00E-08	MA1281.1	1.70E-07	AT5G02460 (C2H2 zinc finger factors)
<i>VuPTP</i>	1	SWCCHDSRCCDHCHCSVYYKVMWHSVSCC	2.70E-66	MA1248.1	6.13E-05	DREB26 (AP2/ERF domain)
	2	AAAAWAAWTAAAAAAATWAW	2.70E-07	MA1274.1	1.17E-06	OBP3 (C2H2 zinc finger factors)
<i>VuAspPP</i>	1	BYCYBCACCCCSDMACCCDBCTCC WCCRCCTHCDWYACHWMCCYTTYRMC	7.30E-16	MA1248.1	4.53E-04	DREB26 (AP2/ERF domain)
	2	TTTTHWKTTTTCTTTTTCHHTYTTNHWT	5.00E-02	MA1268.1	2.22E-09	AT1G69570 (C2H2 zinc finger factors)

Localização cromossômica, expansão dos genes *VuPPs* e sintenia entre *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max*

Os 146 genes codificadores de *PPs* estavam localizados nos onze pseudocromossomos de *V. unguiculata*, distribuídos de maneira não uniforme. O pseudocromossomo 7 incorporou a maior quantidade de genes fosfatases, seguido do pseudocromossomo 3, com 28 e 23 genes *VuPPs*, respectivamente. Em média, 7 a 16 genes *VuPP* foram identificados nos pseudocromossomos 1, 2, 5, 6, 8-11, enquanto no pseudocromossomo 4 foram identificados apenas quatro genes (**Figura 1, Tabela S1**). O pseudocromossomo 7 apresentou a maior carga gênica *VuPP* para as quatro famílias, com sete, treze, seis e duas cópias de *VuPPP*, *VuPPM*, *VuPTP* e *VuAspPP*, respectivamente. De forma semelhante, 6 genes de *VuPTP* foram localizadas no pseudocromossomo 3 e duas cópias do gene *VuAspPP* foram identificadas nos pseudocromossomos 6 e 10 (**Tabela S1**).

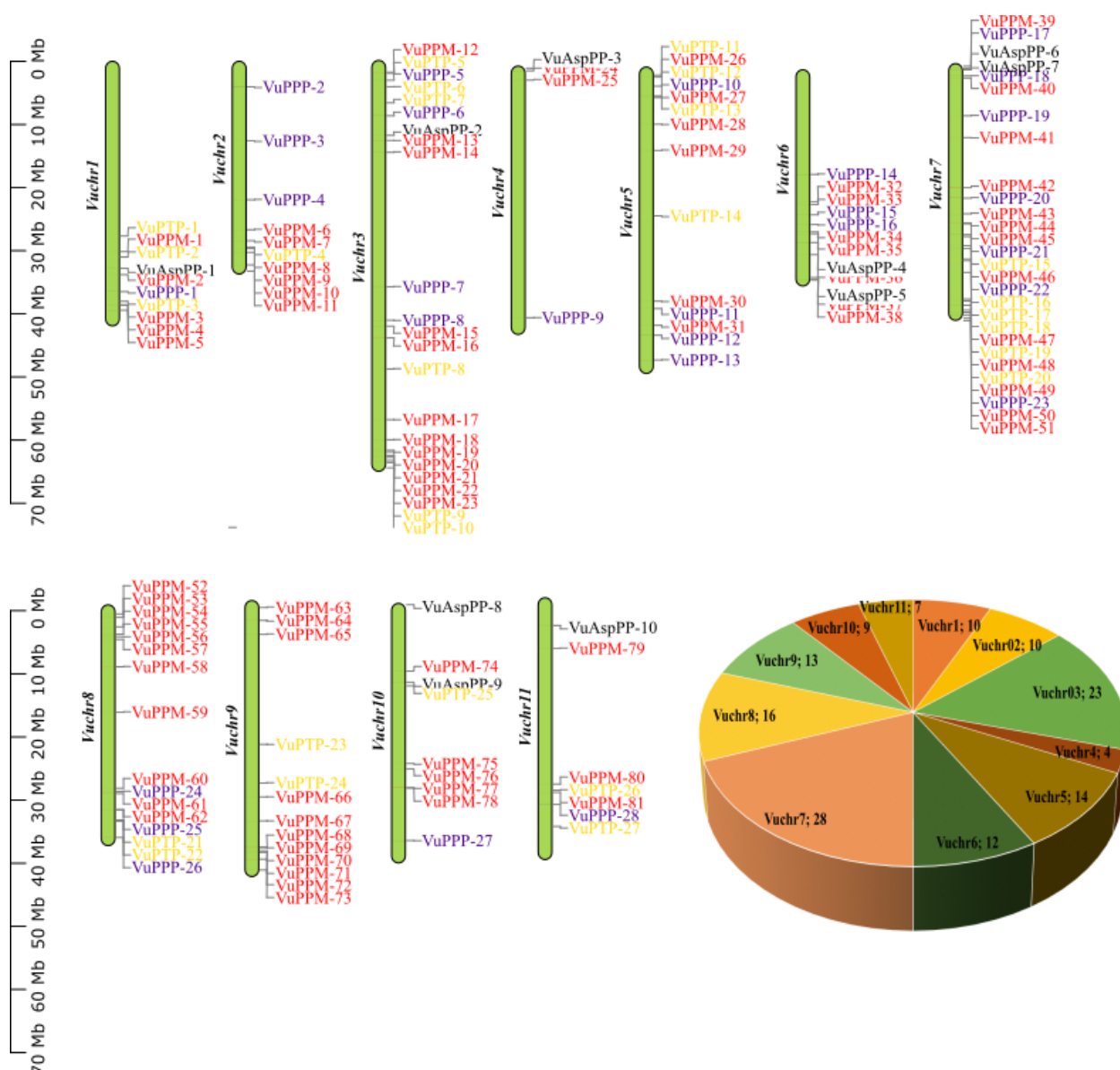


Figura 1. Distribuição cromossômica dos genes fosfatase em *V. unguiculata*. As diferentes famílias fosfatases são distinguidas em cores diferentes: PPP (roxo), PPM (vermelho), PTP (amarelo) e AspPP (preto). As abreviaturas são as seguintes: Vu (*V. unguiculata*), Chr (pseudocromossomo), PPP (fosfoproteínas fosfatases), PPM (proteínas fosfatases dependentes de metal), PTP (proteína tirosina (Tyr) fosfatases) e AspPP (fosfatases dependentes de aspartato). Os comprimentos dos pseudocromossomos são mostrados em Mb (milhões de bases). Este dendrograma foi gerado pelo software TBtools.

A duplicação gênica é a maior provedora de diversidade genética, sendo extremamente importante na expansão destes genes, a qual pode ocorrer através de vários mecanismos. Para a análise de duplicação, nós utilizamos o MCScanX para determinar os tipos de genes *VuPP* duplicados presentes no genoma de *V. unguiculata*. Foram

identificados quatro mecanismos que contribuíram para a expansão dos genes *VuPPs*: WGD (*Whole Genome Duplication*, que envolve o genoma inteiro) ou Segmental, *Dispersed*, *Singleton* e Proximal, não sendo identificada a presença de nenhuma duplicação em Tandem. Um total de 6 *VuPPs* (4.1%) foram consideradas *Singletons* e 8 (5.5%) mostraram duplicação do tipo Proximal. As duas maiores forças que contribuíram para a expansão dos genes *VuPPs* foram a *Dispersed*, representando um total de 51.4% (75) e a duplicação WGD ou Segmental, com 39% (57) dos genes duplicados (**Figura 2**).

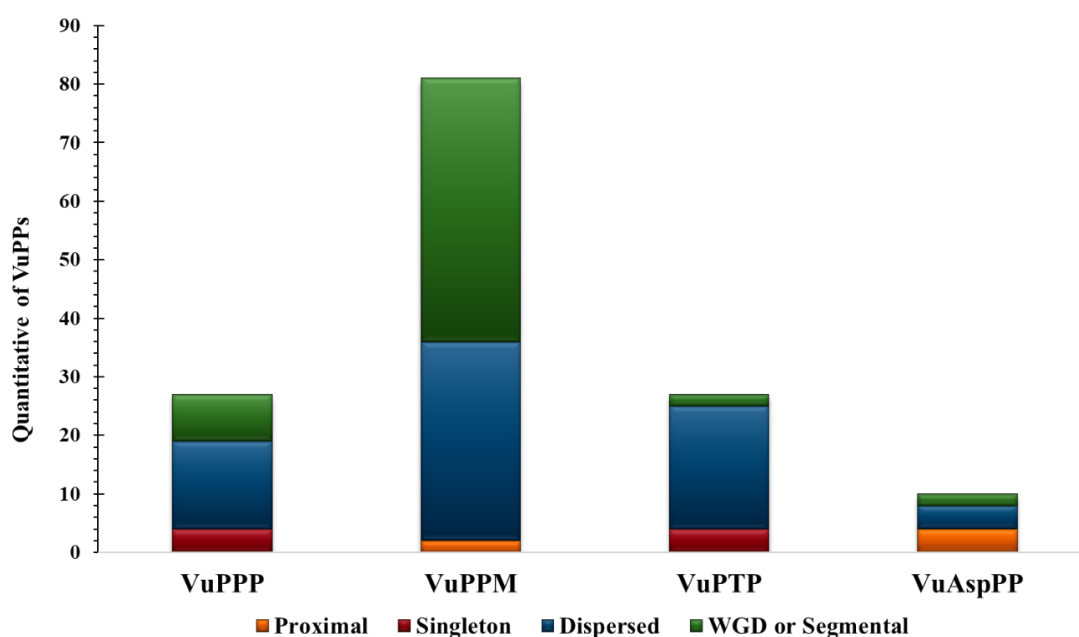


Figura 2. Categorias e quantidade dos principais mecanismos de expansão dos genes *VuPPs*.

Em relação a duplicação WGD ou Segmental, foi possível identificar 29 pares de genes *VuPPs* distribuídos nas quatro famílias, com a família *VuPPM* apresentando a maior quantidade (23 pares duplicados (**Figura 3**). Estes pares se apresentaram partilhados em todos os pseudocromossomos de

V. unguiculata, com exceção do pseudocromossomo 04, sendo os pseudocromossomos 03, 07 e 09 os que exibiram a maior quantidade de pares, com 10, 9 e 9 pares, respectivamente.

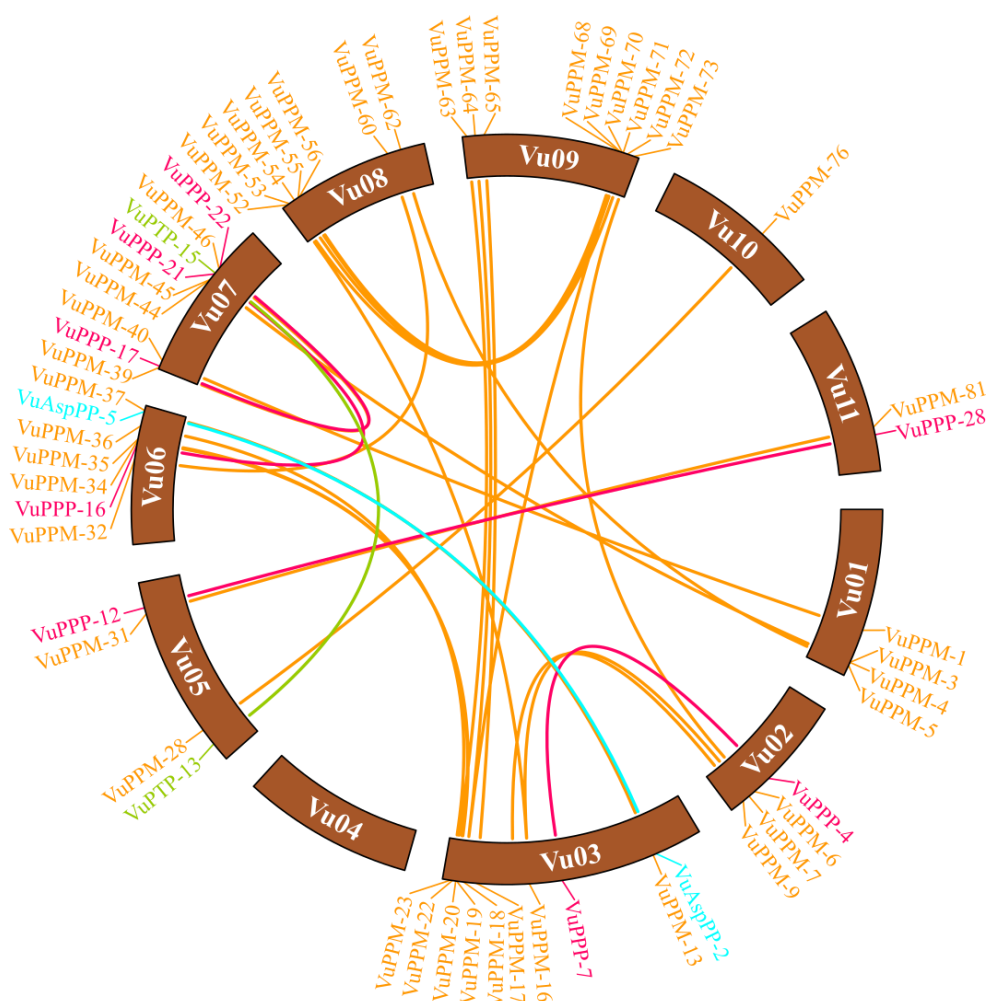


Figura 3 Eventos de duplicação dos genes VuPPs. As barras marrons indicam os 11 pseudocromossomos da espécie. As linhas coloridas indicam os genes duplicados dentro de cada família.

Adicionalmente, foram calculados os valores de Ka (substituição não sinônima) e Ks (substituição sinônima) de modo a prever qual o mecanismo responsável pela divergência destes pares de genes. A razão ka/ks identifica o tipo de pressão de seleção que os pares de genes sofreram durante a evolução. Foi possível observar que para todos os pares de genes VuPPs duplicados os valores de Ka/Ks foram menores que 1 (< 1), exceto para o par VuPPM-52/VuPPM-16, que não apresentou resultado na análise, indicando que existiu pressão de seleção purificadora sobre esses genes após a duplicação. As avaliações do tempo de divergência demonstraram que os eventos de duplicação desses pares ocorreram de 42.7 a 138 milhões de anos atrás (**Tabela 2**).

Tabela 2. Genes *VuPPs* duplicados com seus respectivos tempos de duplicação.

Duplicação	Seq 1	Seq 2	Ka	Ks	Ka/Ks	Tempo (MYA)
WGD ou Segmental	<i>VuPPP-4</i>	<i>VuPPP-7</i>	0.015035	0.527247	0.028515	43.2
WGD ou Segmental	<i>VuPPP-12</i>	<i>VuPPP-28</i>	0.038672	0.521228	0.074194	42.7
WGD ou Segmental	<i>VuPPP-16</i>	<i>VuPPP-21</i>	0.030599	0.551253	0.055508	45.2
WGD ou Segmental	<i>VuPPP-17</i>	<i>VuPPP-22</i>	0.098755	0.949458	0.104012	77.8
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-1</i>	<i>VuPPM-40</i>	0.362421	1.007197	0.359831	82.5
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-3</i>	<i>VuPPM-44</i>	0.06716	0.590564	0.113722	48.4
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-4</i>	<i>VuPPM-45</i>	0.106828	0.786983	0.135743	64.5
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-5</i>	<i>VuPPM-62</i>	0.24272	1.299891	0.186724	106.5
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-6</i>	<i>VuPPM-73</i>	0.286505	1.669474	0.171614	136.8
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-7</i>	<i>VuPPM-16</i>	0.194061	0.76233	0.254562	62.5
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-13</i>	<i>VuPPM-37</i>	0.104959	0.605842	0.173244	49.6
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-17</i>	<i>VuPPM-65</i>	0.1462	0.852635	0.171468	69.9
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-18</i>	<i>VuPPM-64</i>	0.23637	0.670078	0.35275	54.9
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-19</i>	<i>VuPPM-35</i>	0.148526	1.022902	0.1452	83.8
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-20</i>	<i>VuPPM-34</i>	0.114424	0.746524	0.153276	61.2
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-22</i>	<i>VuPPM-63</i>	0.195534	0.74323	0.263087	60.9
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-23</i>	<i>VuPPM-36</i>	0.16904	0.585461	0.28873	48
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-28</i>	<i>VuPPM-76</i>	0.245605	0.698751	0.351492	57.3
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-31</i>	<i>VuPPM-81</i>	0.084638	0.784639	0.107868	64.3
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-32</i>	<i>VuPPM-60</i>	0.176038	0.828979	0.212355	67.9
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-39</i>	<i>VuPPM-46</i>	0.187966	0.569449	0.330084	46.7
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-52</i>	<i>VuPPM-16</i>	0.267391	NaN	NaN	X
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-53</i>	<i>VuPPM-72</i>	0.112134	0.693277	0.161745	56.8
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-54</i>	<i>VuPPM-71</i>	0.207266	0.681008	0.304352	55.8
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-55</i>	<i>VuPPM-68</i>	0.108625	0.582514	0.186476	47.7
WGD ou Segmental	<i>VuPPM-56</i>	<i>VuPPM-69</i>	0.076802	0.692345	0.110931	56.7

WGD ou Segmental	VuPPM-70	VuPPM-18	0.402684	1.683518	0.239192	138
WGD ou Segmental	VuPTP-13	VuPTP-15	0.203959	1.0266	0.198674	84.1
WGD ou Segmental	VuAspPP-2	VuAspPP-5	0.178436	0.91628	0.19474	75.1

Para um melhor entendimento da conservação das famílias gênicas *VuPP*, foram analisadas as relações de colinearidade entre *V. unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*. Dos 141 genes *VuPPs* identificados na análise, 130 possuíam ortólogos com ambas as espécies, 6 com *P. vulgaris* e 5 com *G. max*, com um total de 602 pares de genes ortólogos entre as espécies (**Figura 4**). Destes, 395 (65 PPP, 255 PPM, 58 PTP e 17 PP) entre *V. unguiculata* e *G. max* e 207 (32 PPP, 137 PPM, 28PTP e 10 AspPP) entre *V. unguiculata* e *P. vulgaris*, correspondendo a praticamente metade do observado na comparação anterior (**Tabela S2**).

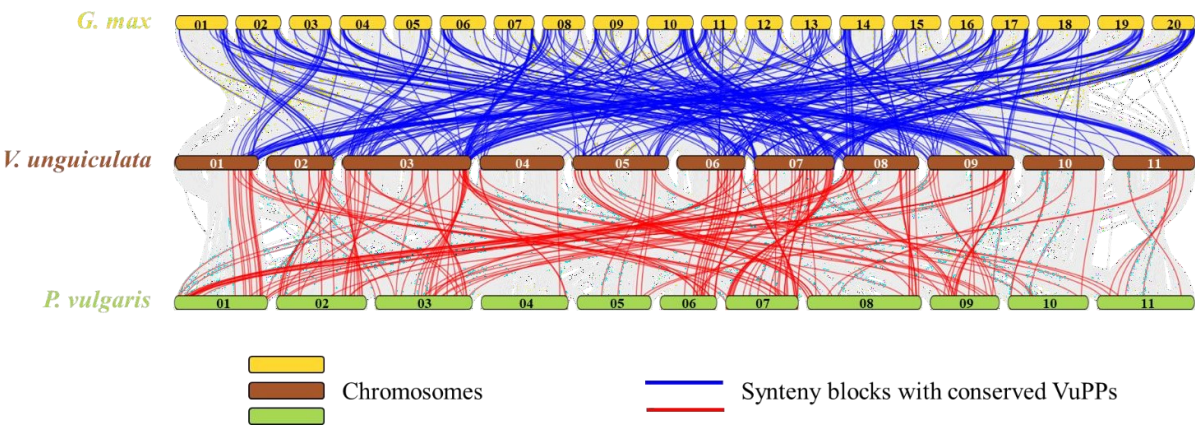


Figura 4. Análise de sintenia entre *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max*. As linhas em cinza indicamos blocos colineares entre as espécies e as linhas azuis e vermelhas destacam os pares sintênicos dos genes *VuPPs*.

Expressão *in silico* mediante estresse biótico

Os padrões de expressão gênica de *VuPPs* sob diferentes condições de estresse biótico (CABMV e CPSMV) foram investigados (**Figura 5a**). Os resultados da análise das bibliotecas de RNA-Seq mostraram que 101 e 121 genes *VuPPs* estavam induzidos ou reprimidos nos ensaios para CABMV e CPSMV em 60 minutos após a infecção (**Tabela S3**, **Figura 5b**). Desses, 31/22 e 40/33 estavam UP/DOWN e foram exclusivos de CABMV e CPSMV, respectivamente. Dezesete genes foram induzidos para os dois agentes virais e

nove foram reprimidos nos dois ensaios experimentais. Seis e dezesseis genes *VuPP* apresentaram expressão contrastante para as combinações CABMV x CPSMV (DONW/UP) e CABMV x CPSMV (UP/DONW), respectivamente. Os níveis de expressão variaram de 6.86/UP (TR67555|c2_g2_i18) a 7.88/DONW (TR17070|c2_g1_i5) para CABMV e 7.40/UP (TR67555|c2_g2_i2) a 6.71/DONW (TR21002|c0_g1_i5) para CPSMV.

Já em 16 horas após a inoculação, 91 e 87 genes *VuPPs* diferencialmente expressos foram escrutinados (**Tabela S3, Figura 5c**). Desses, 40/25 e 36/25 eram UP/DOWN, sendo exclusivos de CABMV e CPSMV, respectivamente. Oito foram induzidos e seis foram reprimidos nas duas viroses. Dois e dez genes *VuPPs* apresentaram expressão contrastante entre as duas viroses. Os níveis de expressão variaram de 9.15/UP (TR21002|c0_g1_i5) e 7.06/DOWN (TR16124|c0_g1_i16) para CABMV e 7.69/UP (TR11426|c0_g4_i8) e 4.40/DONW (TR114387|c0_g1_i3).

De forma geral, 128 (54%) genes *VuPPs* escrutinados nos tempos de 60 min e 16 horas após a inoculação pertenciam à família PPM, seguido por PTP e PPP com 54 (23%) e 39 (16%) genes, e em menor quantidade os AspPP, com 6% (15 genes).

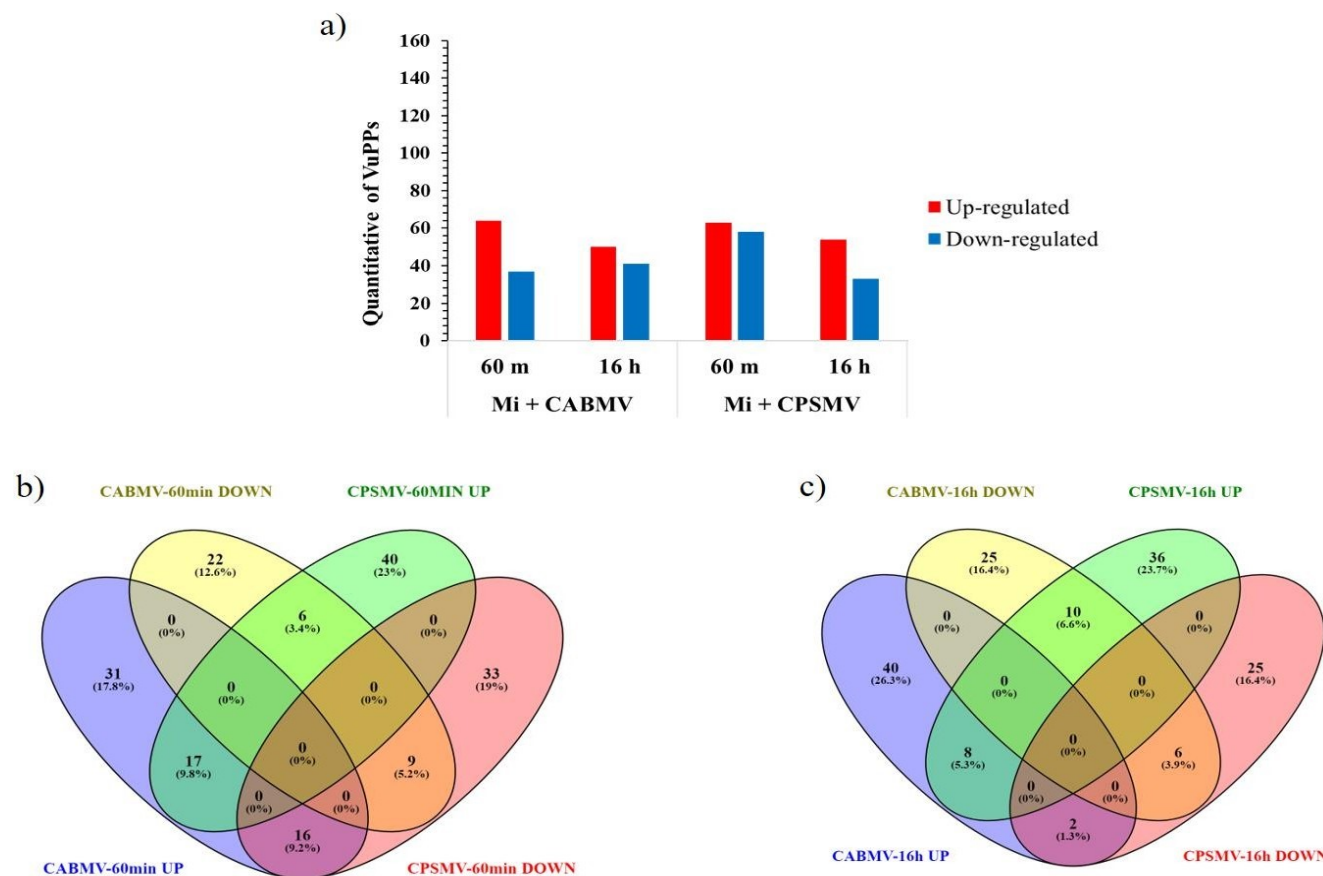


Figura 5. a) Quantidade de transcritos *VuPPs* diferencialmente expressos nos tratamentos estudados. b) Diagrama de Venn para os transcritos *VuPP* diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre os estresses por CABMV e CPSMV em 60 minutos de interação patogênica. c) Diagrama de Venn para os transcritos *VuPP* diferencialmente expressos compartilhados e exclusivos entre os estresses por CABMV e CPSMV em 16 horas de interação patogênica. Mi = Injúria mecânica; CABMV = *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus*; CPSMV = *Cowpea Severe Mosaic Virus*.

DISCUSSÃO

As proteínas fosfatases representam um dos mais importantes mecanismos reguladores, desempenhando papéis em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento em plantas, incluindo a resposta a estresses bióticos e abióticos. Após a conclusão do sequenciamento do genoma de *V. unguiculata*, estudos que envolvem a identificação, caracterização e função de família gênicas envolvidas em processos de interesse vêm sendo desenvolvidos. Recentemente, Ferreira-Neto et al (2021)²³ revelaram a genômica estrutural e a transcriptômica do quinoma do feijão-caupi sob condições de estresse biótico e abiótico. No entanto, informações acerca das proteínas complementares a ação PKs, as proteínas fosfatases, ainda permanecem incompreendidos no feijão-caupi e em outras espécies de interesse econômico, só tendo sido revelado até o momento o fosfatoma de *Oryza sativa* e *Arabidopsis thaliana*^{12,24}.

Neste estudo, os genes *PP* de *V. unguiculata* foram amplamente investigados, desde a identificação no genoma, localizações cromossômicas, relações evolutivas, estrutura gênica, análise de motivos conservados e padrões de expressão sob diferentes agentes patogênicos virais (CABMV e CPSMV). Revelamos que o genoma do feijão-caupi compreende 146 genes *VuPP* divididos em quatro famílias, de acordo com seu domínio catalítico, corroborando ao reportado em *Arabidopsis* e arroz, com 150 e 132 genes *PPs*^{12,24}, respectivamente. Além disso, os *VuPPs* apresentaram uma ampla faixa de peso molecular, entre 21,26 e 119,64 kDa, ponto isoelétrico predominantemente ácido, e estavam, em sua maioria, direcionados para o citoplasma, semelhantemente ao reportado para as famílias PPM, PTP e AspPP em *Brachypodium distachyon*^{10,25}, *Medicago truncatula*¹⁴, *Brassica rapa*^{26,27}, *Solanum tuberosum* L.²⁸, em diferentes espécies de Rosaceae²⁹ e em *Solanum lycopersicum*¹⁵. Schwartz et al (2007)³⁰ relataram que os valores de pI estão correlacionados com a localização subcelular das proteínas e que o pI de proteínas citosólicas são ácidos, corroborando aos dados obtidos neste estudo. Uma pontuação GRAVY positiva representa as propriedades físico-químicas de proteínas ligadas à membrana, enquanto uma pontuação GRAVY negativa

sugere a natureza solúvel da proteína. Em nosso estudo, os valores de GRAVY das proteínas VuPPs foram predominantemente negativos, evidenciando a natureza solúvel (hidrofílica) dessas proteínas, sendo que apenas três VuPPs apresentaram valores de GRAVY positiva (VuPPP10, VuPTP20 e VuPTP27).

A fim de obter informações acerca da conservação e diversidade dos genes VuPPs, foram realizadas análises estruturais de éxon/íntron e de motivos conservados em conjunto com a construção de árvores fenéticas para saber se a distribuição dos padrões dessas estruturas e motivos eram consistentes dentro dos subgrupos das árvores. Foi possível observar que a quantidade de éxons e íntrons foi bastante divergente entre as quatro famílias. A variação no número de éxons identificada no nosso trabalho, foi consistente com o reportado anteriormente para genes PTPs em *Brassica rapa*²⁶ e para genes PP2C em *Medicago truncatula*¹⁴ e tomate¹⁵. Por outro lado, foi contrastante ao reportado em *Triticum aestivum*³¹ e *Cucumis sativus*³² que apresentaram de 1 a 12 e 2 a 10 éxons em seus genes PP2C, respectivamente.

A diversidade no número de íntrons em VuPPM, que foi de 1 a 20, também foi similar ao previamente reportado para genes PP2C em *Arabidopsis* e *O. sativa*¹³. De forma geral, para as quatro famílias de genes VuPPs, os membros das subfamílias apresentaram um padrão de estrutura gênica similar, havendo maior diferença no tamanho dos íntrons. Essa conservação dentro das subfamílias também foi identificada previamente em *M. truncatula*¹⁴, *T. aestivum*³¹, *C. sativus*³², tomate¹⁵, *Arabidopsis* e *O. sativa*¹³ para genes PP2C. Tal manutenção dessas estruturas dentro das subfamílias suporta, portanto, a relação próxima evolutivamente entre estas sequências¹³.

No nosso estudo, também observamos que nenhum gene VuPP apresentou-se sem íntron na sua estrutura. Genes envolvidos em respostas biológicas rápidas tendem a ser pobres em íntrons, pois necessitam de indução rápida e eficiente³³. Porém, apesar dessa desvantagem energética, os íntrons podem desempenhar alguns papéis dentro do genoma, como regular o *splicing* alternativo, aumentar a expressão de genes, controlar o transportado mRNA ou a montagem da cromatina³⁴.

O padrão de composição dos motivos conservados nas famílias dos genes VuPPs mostrou-se semelhante dentro das subfamílias e variou entre elas,

sendo consistente com os resultados da árvore fenética e das estruturas gênicas. Em *VuPPM*, que mostrou um maior padrão de conservação nas suas sequências, o motivo 4 presente em todas elas, contendo os aminoácidos [DG]X₂[G] é caracterizado por ser a assinatura da família³¹. Esta diversificação na distribuição dos motivos pode ser um indicativo de divergência nas funções dos genes nestas subfamílias ao mesmo ponto que a sua conservação dentro destas subfamílias também demonstra a proximidade da relação evolutiva entre estas sequências¹³.

A transcrição de um gene é regulada através da interação entre fatores de transcrição com os elementos cis-regulatórios presentes nos promotores, portanto, a identificação destes elementos nos genes *VuPPs* pode ajudar no entendimento das suas possíveis funções na maquinaria celular. Identificamos três famílias de fatores de transcrição que codificam potenciais reguladores nos genes *VuPPs*. As famílias C2H2, BBR-BPC e AP2/ERF apresentaram 6 domínios de ligação nas regiões reguladoras dos genes, onde C2H2 mostrou-se presente nas quatro famílias *VuPPP*, *VuPPM*, *VuPTP* e *VuAspPP*. Este fator de transcrição atua como regulador transcricional na resposta de plantas a diversos tipos de estresses abióticos, como temperaturas extremas, salinidade, seca, estresse oxidativo, luz excessiva e quebra de silício^{35,36}.

BBR-BPC apesar de não ser tão bem estudado quanto outros fatores de transcrição em plantas, mostrou possuir papel no controle do tamanho do meristema floral e desenvolvimento de sementes, controlando outros fatores de transcrição como LEC2 e WUSCHEL^{37,38}, além de estar envolvido na sinalização dos hormônios auxina, citocinina e etileno³⁹. Como uma das maiores famílias de fatores de transcrição em plantas, AP2/ERF atua na regulação de diversos processos como desenvolvimento vegetal, regulação hormonal e na resposta a vários tipos de estresses⁴⁰. Por exemplo, os genes da subfamília DREB apresentam importante papel na resposta a estresses abióticos, como seca e baixas temperaturas^{41,42}. A existência de diversos tipos de fatores de transcrição nos promotores dos genes *VuPPs* indica a sua atuação na regulação destes genes e seu envolvimento na resposta a estresses abióticos e desenvolvimento das plantas.

A duplicação gênica fornece material genético com diversas funções através dos diferentes mecanismos da evolução, aumentando assim, a capacidade dos genomas de se adaptar a mudanças ambientais⁴³. Um dos maiores mecanismos responsáveis pela expansão dos genes *VuPPs* foi a duplicação dispersa (*dispersed*). A duplicação dispersa é predominante em diferentes genomas de plantas⁴⁴. A distribuição deste tipo de duplicação dentro e entre genomas pode ser em parte explicada devido à transposição de um único gene distante, que pode ocorrer por mecanismos baseados por DNA ou RNA^{45,46}. A outra força que mais contribuiu para a ampliação dos genes *VuPPs* foi a duplicação WGD ou segmental. O presente estudo identificou 29 pares de genes *VuPPs* duplicados segmentalmente, apontando que tal evento contribuiu significativamente para a complexidade destas famílias gênicas na espécie.

A duplicação segmental é definida pela existência de genes parálogos causados pela duplicação do genoma completo (WGD) ou pela duplicação de grandes porções de cromossomos²⁶, sendo o mecanismo prevalente na família *VuPPM* (PP2C). Estudos anteriores reportaram que a família gênica PP2C se expandiu, em sua maioria, devido à duplicação através de todo o genoma ou segmental em arroz e *Arabidopsis*¹³, *Populus euphratica*¹¹, algodão⁴⁷ e *C. sativus*³². Este grupo de genes expandiu continuamente durante a escala evolutiva, por exemplo, em plantas não vasculares como *Chlamydomonas reinhardtii* (alga verde) e *Physcomitrella patens*, que possuem 10 e 50 genes PP2C em seus genomas, respectivamente. Já em plantas superiores, esse número é aumentado significativamente para 80 em *Arabidopsis* e 130 em milho, estando esta expansão e diversificação correlacionada com a adaptação das plantas superiores às mudanças das condições ambientais².

De forma a determinar o tipo de pressão de seleção atuante nos pares duplicados dos genes *VuPPs*, calculamos a razão das substituições de mutações não sinônimas/esinônimas (Ka/Ks) que se mostrou menor de 1 para todos os pares duplicados, indicando que estes genes sofreram uma seleção purificadora⁴⁸ e mantiveram suas estruturas e funções biológicas conservadas durante a evolução. Também estimamos o tempo de divergência destes pares de genes, que ocorreu em 84.1 e 75.1 para os genes *VuPTP* e *VuAspPP* e variou entre 42.7 a 77.8 nos genes *VuPPP* e 46.7 a 138 milhões de

anos nos genes *VuPPM*, sendo similar ao tempo de divergência dos genes *PP2C* em *B. distachyon* (50.8–131.5 milhões de anos) e bem anterior ao ocorrido em *Arabidopsis* (16.1)⁴⁹, *Fragaria vesca* (19)⁴⁹ e *S. lycopersicum* (31.59)¹⁵. A manutenção destes genes ao longo de todos esses anos é consistente com o estudo de Blanc e Wolfe (2004)⁵⁰ que propõe que genes envolvidos na transdução de sinais têm sido preferencialmente retidos no genoma. Compreender a relação de sintonia entre espécies é fundamental para avaliar o potencial da análise genômica e identificar genes funcionalmente relacionados⁵¹. Nós analisamos a evolução dos genes *PPs* entre as espécies *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max*. A relação ‘caupi versus feijão comum’ demonstrou praticamente a metade da quantidade de pares ortólogos identificados entre ‘caupi versus soja’, sugerindo uma razão de 2:1:1 entre GM:PV:VU. Restrepo-Montoya et al. (2021)⁵² estudando a ortologia entre genes *RLK-RLP* em algumas espécies de leguminosas, também identificaram uma razão de 2:1 entre os genes de soja e feijão comum. Esta razão, como aponta o autor, seria mais um indicativo da duplicação do genoma completo de soja, afirmação previamente reportada por McClean et al. (2010)⁵¹, que também sugere que o genoma de feijão comum sofreu apenas duplicações segmentares localizadas. Uma outra particularidade desta análise é o fato de apesar de uma alta quantidade de genes *VuPPs* serem provenientes de duplicação do tipo dispersa. Este fato não impediu que estes genes possuíssem ortólogos com outras espécies de leguminosas, o que também foi observado por Ferreira-Neto et al. (2021)²³ para genes codificantes de quinases em *V. unguiculata*. Por outro lado, contrasta com a afirmação de Ganko et al. (2007)⁵³ que diz que genes de duplicação do tipo dispersa não são encontrados próximos uns aos outros no genoma e não demonstram sintonia conservada.

Durante o seu crescimento e desenvolvimento, as plantas nem sempre conseguem manter a sua homeostase para o seu crescimento saudável devido a condições ambientais adversas (estresses bióticos e abióticos). Esses estresses afetam significativamente o rendimento e a qualidade do feijão-caupi^{18,54}. Os mecanismos moleculares dos genes *PP* envolvidos na resposta das plantas a estresses abióticos foram extensivamente estudados em diversas espécies vegetais^{10,14,25–29}. No entanto, estudos envolvendo a resposta dos genes *PP* a

estresses bióticos ainda são escassos. Em tomate infectado com *R. solanacearum*, dados de RNA-seq revelaram que nove genes *SIPP2C* foram induzidos frente ao estresse aplicado, demonstrando que a família de genes *SIPP2C* estava intimamente relacionada com a resposta a *R. solanacearum*¹⁵.

Em nosso estudo, os dados de RNA-Seq de CABMV e CPSMV, revelaram que 26 genes apresentaram níveis de expressão equivalentes para os dois ensaios experimentais, sendo dezessete genes induzidos e nove reprimidos. Identificamos também que um conjunto de 53 e 73 genes *VuPPs* foram diferencialmente expressos para CABMV e CPSMV, respectivamente, indicando que os genes *VuPP* podem responder de forma similar para diferentes patógenos virais.

CONCLUSÕES

Nosso estudo disponibilizou informações inéditas acerca da identificação e caracterização de genes PP no genoma do feijão-caupi, que conta com 146 membros *VuPP*. Relatamos pela primeira vez o padrão de expressão (RNA-Seq) dos genes *VuPP* na resposta a infecção por CABMV e CPSMV. A indução e/ou repressão de transcritos de *VuPP* indica que essa família pode desempenhar um papel importante na resposta de defesa da planta contra os agentes virais. Além disso, um conjunto de genes foi induzido de forma exclusiva para cada ensaio experimental, demonstrando a pluralidade de funções dos *VuPPs*. No entanto, essa expressão ainda necessita ser validada via qPCR. Os nossos dados disponibilizam um novo painel de candidatos para auxiliar os programas de melhoramento genético da cultura, como também revelam características únicas dos genes *VuPP*, que são importantes para auxiliar no desenvolvimento de marcadores moleculares em feijão-caupi.

METODOLOGIA

Identificação e anotação dos membros de PP de *Vigna unguiculata*

Os domínios HMM específicos para cada família PPs [PPP (PF00149),

PPM (PF00481), PTP (PF04387, PF00102, PF00782 e PF01451) e Asp-dep Phosphatase (PF09309, PF12689 e PF03767)] foram recuperados do Pfam⁵⁵ e utilizados como busca no banco de dados do Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>), utilizando para isso o proteoma predito de *V. unguiculata* (Vunguiculata_540_v1.2.protein_primaryTranscriptOnly.fa.gz). As sequências de aminoácidos retornadas foram verificadas manualmente usando o Pfam (<http://pfam.xfam.org/>) e o Batch CD-search online (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) para confirmar a presença dos domínios PPs. Todos os candidatos a genes PPs sem domínio ou que apresentaram quebra na região N e/ou C terminal foram excluídos da análise.

O comprimento do gene, sequência de codificação (CDS) e o número de aminoácidos dos genes *VuPP* foram obtidos no banco de dados Phytozome. Os parâmetros físico-químicos, incluindo peso molecular (P.M) e ponto isoelétrico teórico (pI) de cada proteína candidata a *VuPP* foram calculados usando a ferramenta do JvirGel 2.0⁵⁶. Os valores de GRAVY (grande média de hidropatia) foram calculados usando a ferramenta fornecidas pela Bioinformatics.org (https://www.bioinformatics.org/sms2/protein_gravy.html). A localização subcelular foi realizada por meio do servidor online Plant-mPLOC⁵⁷. As regiões transmembranares putativas das proteínas *VuPPs* foram preditas usando o TMHMM Server v.2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>).

Análise de estrutura gênica e motivos conservados

Os motivos conservados das proteínas *VuPPs* foram avaliados através do MEME⁵⁸ (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) e as estruturas gênicas de éxon-íntron foram identificadas através do arquivo GFF (Vunguiculata_540_v1.2.gene_exons.gff3) disponível no banco de dados Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) e a imagem foi gerada pelo software TBtools⁵⁹.

Análise de promotores e enriquecimento de candidatos à elementos cis-regulatórios

As sequências genômicas de 1,5 kbp antes da região CDS de cada gene *VuPPs* foram extraídas do Phytozome v.12 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>) e definidas como portadoras de regiões promotoras putativas. Essas sequências foram utilizadas para a busca de motivos (candidatos à elementos *cis-regulatórios*) pelo software MEME⁵⁸. (<http://meme-suite.org/tools/meme>) com os seguintes parâmetros: ponte de corte adotado de *e-value* < 10^{-2} , máximo número de motivos analisados foram 10 e a extensão desses motivos variou de 6 a 50 nucleotídeos. Após a busca no MEME, os motivos foram analisados pelo software TOMTOM⁶⁰ (<http://meme-suite.org/tools/tomtom>) com o objetivo de identificar um fator de transcrição (FT) ao candidato à elemento cis-regulatório identificado pelo MEME. O banco *JASPAR2018_CORE_plants_nonredundant* foi utilizado para a busca destes FTs e os critérios estatísticos dos alinhamentos foram: *p-value* e *q-value* com ponto de corte de < 10^{-2} , sendo escolhido o *best hit* de cada análise.

Análise de duplicação gênica e sintenia

A identificação dos genes duplicados foi realizada pelo software TBtools⁵⁹, no qual os genes parálogos dentro das espécies foram extraídos utilizando a ferramenta *duplicate_gene_classifier* com parâmetros *default*, pelo pacote MCScanX⁶¹, tendo como base as sequências das proteínas e os arquivos GFF. Foi realizado um BLASTp das sequências proteicas utilizando um *e-value* de 10^{-5} . Posteriormente, os resultados do BLAST foram analisados pelo MCScanX para identificação da colinearidade e dos pares duplicados. Os pares de genes e as regiões de ligação foram extraídos pelas ferramentas File Merge for MCScanX e File Transformat for MicroSynteny View. A pressão de seleção dos genes *VuPPs* duplicados foi determinada pelo cálculo das substituições sinônimas (*Ks*) e não sinônimas (*Ka*) e a sua proporção (*Ka/Ks*) por meio do software TBtools⁵⁹. O tempo de divergência e de duplicação foram avaliados por uma taxa de mutação sinônima de substituições por local sinônimo (λ) pelo tempo $T = (Ks/2\lambda)$, onde $\lambda = 6.1 \times 10^{-9}$ para soja⁶². Os genes ortólogos *V. unguiculata*, *P. vulgaris* e *G. max* foram identificados pelo software TBtools⁵⁹ através da análise de colinearidade

pelo pacote MCScanX⁶¹, utilizando os arquivos com as sequências genômicas retiradas do Phytozome (Vunguiculata_540_v1.0.fa, Pvulgaris_442_v2.0.fa e Gmax_508_v4.0.fa) com seus respectivos arquivos GFF, adotando como ponto de corte um *e-value* de e^{-10} .

Material biológico e condições de estresse biótico

Os experimentos de inoculação com CABMV, CPSMV e *Macrophomina pseudophaseolina* foram conduzidos em casa de vegetação no Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), em Recife, Pernambuco, Brasil. Os ensaios virais foram realizados utilizando duas plantas com genótipos contrastantes quando a resistência: IT85F-2687^{63,64} e BR14-Mulato⁶⁵, resistentes ao CABMV e CPSMV, respectivamente. Por sua vez, para o ensaio fúngico foi utilizado apenas o genótipo BR14-Mulato.

Para os experimentos virais, as plantas foram cultivadas até o início do estágio vegetativo (3 semanas) sob fotoperíodo natural e temperatura variando de 28 a 32 °C. Para a inoculação do vírus, o tecido foliar foi injuriado mecanicamente com Carborundum(carboneto de silício) seguido da aplicação de cada inóculo viral. Cada ensaio experimental foi conduzido separadamente, visando minimizar os impactos dos compostos voláteis utilizados na comunicação entre as plantas. Após a injúria e inoculação do vírus o tecido foliar foi coletado em dois tempos distintos, para cada controle/tratamento: 6 minutos e 16 horas. O desenho experimental foi feito utilizando três repetições biológicas (RBs) para cada tratamento utilizado. Cada RB foi composta por cinco plantas. Após a aplicação do estresse, os tecidos foliares foram coletados, sendo imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer a – 80° C até a extração do RNA.

As sementes dos genótipos de feijão-caupi 'IT85F-2687' e 'BR-14 Mulato' foram obtidas formalmente no 'Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-de-corda' do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife, Pernambuco, Brasil). O Prof. Dr. Antônio Félix da Costa gentilmente realizou a identificação da espécie/genótipo.

Extração de RNA e síntese de cDNA

Para a extração do RNA total do feijão-caupi inoculado por CABMV e CPSMV foi utilizado o kit “SV Total RNA Isolation System®” (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. A extração do RNA total do feijão-caupi sob inoculação com *M. pseudophaseolina* foi realizada a partir da associação do protocolo CTAB Acetato⁶⁶ e do kit “SV Total RNA Isolation System®” (Promega). A concentração e pureza das amostras de RNA foram verificadas com fluorímetro Qubit (Invitrogen®) e NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) e sua integridade verificada em eletroforese em gel de agarose 1,5%. A síntese do cDNA foi realizada com o kit GoScript™ Reverse Transcription Systems (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante.

Construção de bibliotecas de RNA-Seq e análise de expressão diferencial

As bibliotecas de RNA-Seq foram geradas via sequenciamento Illumina HiSeq2500, utilizando leituras emparelhadas com 100 pb. Todas as etapas de sequenciamento foram realizadas no Centro de Genômica Funcional da Universidade de São Paulo (Piracicaba, Brasil). A montagem do transcriptoma foi realizada pela abordagem 'de novo' usando o software Trinity, seguindo estratégia descrita por Ferreira-Neto et al., (2021)²³.

As análises de expressão gênica diferencial foram realizadas de forma independente para cada ensaio (Injúria + inoculação de CABMV, Injúria + inoculação de CPSMV). Para isso, foi utilizada a ferramenta edgeR⁶⁸. Os transcritos com $-1 > \log_2FC$
 > 1 , $p < 0,05$ e $FDR < 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos.

MATERIAL SUPLEMENTAR

As tabelas suplementares desse artigo podem ser encontradas em:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1Mzc_m3HTxer2KEYZ1JnVsNS3wT1B5NF/edit?usp=sharing&oid=109984610125148084676&rtp_of=true&sd=true

Tabela S1: As características dos genes VvPP, como características físico-químicas, GRAVY, regiões transmembranares, localização subcelular e ancoragem genômica **Tabela S2:** Pares sintênicos dos genes *VuPPs* entre *V. unguiculata* X *P. vulgaris* e *V. unguiculata* X *G. max*.

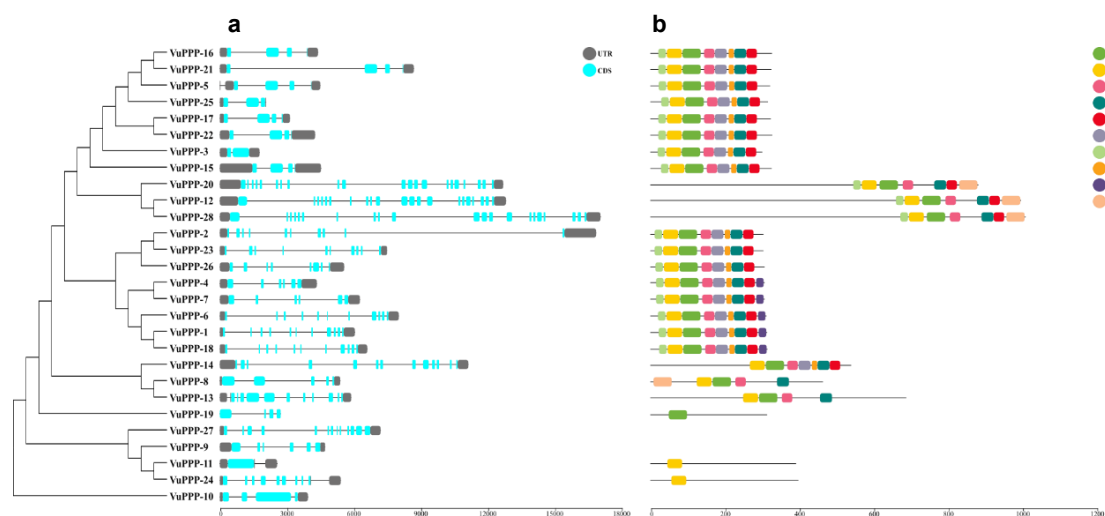


Figura S1. a) Organização genômica dos genes *VuPPP*. b) Distribuição dos motivos conservados obtidos pelo software MEME.



Figura S2. a) Organização genômica dos genes *VuPPM*. b) Distribuição dos motivos conservados obtidos pelo software MEME.

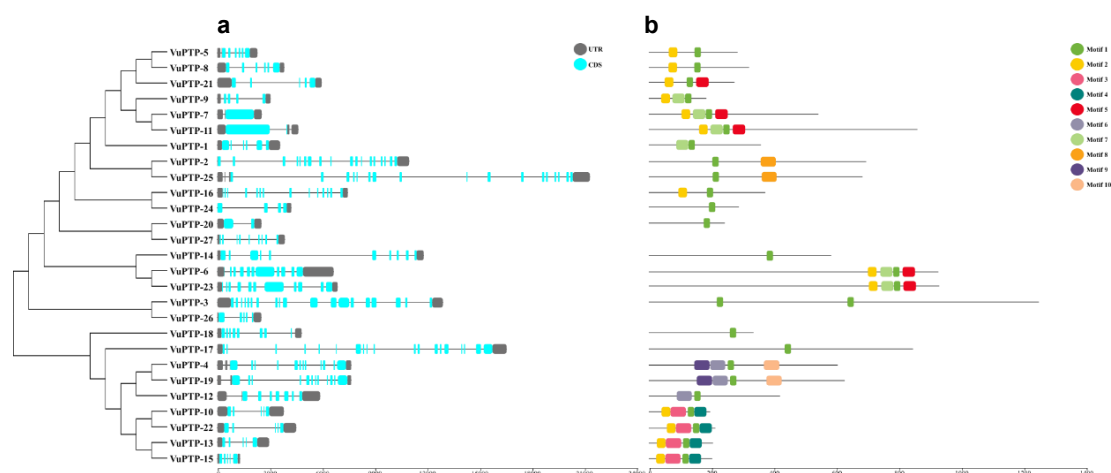


Figura S3. a) Organização genômica dos genes *VuPTP*. b) Distribuição dos motivos conservados obtidos pelo software MEME.

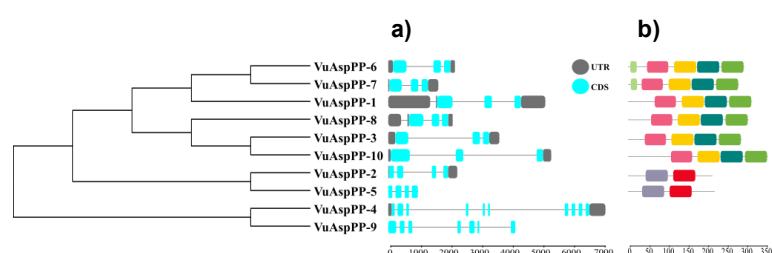


Figura S4. a) Organização genômica dos genes *VuAspPP*. b) Distribuição dos motivos conservados obtidos pelo software MEME.

Referências

1. Bailey-Serres, J., Parker, J. E., Ainsworth, E. A., Oldroyd, G. E. D. & Schroeder, J. I. Genetic strategies for improving crop yields. *Nature* **575**, 109–118 (2019).
2. Fuchs, S., Grill, E., Meskiene, I. & Schweighofer, A. Type 2C protein phosphatases in plants. *FEBS J* **280**, 681–693 (2013).
3. Brenchley, R. *et al.* The TriTryp Phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. *BMC Genomics* **8**, 434 (2007).
4. Chawla, S., Marothia, D. & Pati, P. Role of Serine/Threonine Phosphatase PP2A Class and Its Regulators in Salinity Stress Tolerance in Plants. in 53–66 (2020). doi:10.1007/978-3-030-48733-1_4.
5. Kerk, D., Templeton, G. & Moorhead, G. B. G. Evolutionary Radiation Pattern of Novel Protein Phosphatases Revealed by Analysis of Protein Data from the Completely Sequenced Genomes of Humans, Green Algae, and Higher Plants. *Plant Physiol* **146**, 351–367 (2008).
6. Farkas, I., Dombrádi, V., Miskei, M., Szabados, L. & Koncz, C. Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. *Trends Plant Sci* **12**, 169–176 (2007).
7. Das, A. K., Helps, N. R., Cohen, P. T. & Barford, D. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J* **15**, 6798–6809 (1996).
8. Yu, R. M. K., Zhou, Y., Xu, Z.-F., Chye, M.-L. & Kong, R. Y. C. Two genes encoding protein phosphatase 2A catalytic subunits are differentially expressed in rice. *Plant Mol Biol* **51**, 295–311 (2003).

9. Xu, C., Jing, R., Mao, X., Jia, X. & Chang, X. A wheat (*Triticum aestivum*) protein phosphatase 2A catalytic subunit gene provides enhanced drought tolerance in tobacco. *Ann Bot* **99**, 439–450 (2007).
10. Cao, J., Jiang, M., Li, P. & Chu, Z. Genome-wide identification and evolutionary analyses of the PP2C gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. *BMC Genomics* **17**, 175 (2016).
11. Li, J. *et al.* Genome-wide characterization of protein phosphatase 2C genes in *Populus euphratica* and their expression profiling under multiple abiotic stresses. *Tree genetics & genomes* (2018).
12. Singh, A., Giri, J., Kapoor, S., Tyagi, A. K. & Pandey, G. K. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. *BMC Genomics* **11**, 435 (2010).
13. Xue, T. *et al.* Genome-wide and expression analysis of protein phosphatase 2C in rice and *Arabidopsis*. *BMC Genomics* **9**, 550 (2008).
14. Yang, Q. *et al.* Genome-wide Identification of PP2C Genes and Their Expression Profiling in Response to Drought and Cold Stresses in *Medicago truncatula*. *Sci Rep* **8**, 12841 (2018).
15. Qiu, J. *et al.* Genome-Wide Analysis of the Protein Phosphatase 2C Genes in Tomato. *Genes (Basel)* **13**, 604 (2022).
16. Sociedade Nacional de Agricultura. Disponível em: https://issuu.com/sociedadnacionaldeagricultura/docs/a_lavoura_705/50 Acesso em: 17 jul. 2017.
17. Anten, N. P. R. Plant ecology. Schulze ED, Beck E, Müller-Hohenstein K. 2005. Berlin/Heidelberg: Springer. \$89.95 (hardback). 702 pp. *Annals of Botany* **97**, 153 (2006).
18. van Zonneveld, M. *et al.* Mapping patterns of abiotic and biotic stress resilience uncovers conservation gaps and breeding potential of *Vigna* wild relatives. *Sci Rep* **10**, 2111 (2020).
19. Barros, G. B. Identificação e caracterização de plantas de feijão-caupi obtidas por meio de retrocruzamento resistentes aos vírus Cowpea severe mosaic virus (CPSMV) e Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV). 2010. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade e Biotecnologia Aplicada) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, (2010).
20. Lima, J. A. A. *et al.* Diagnoses e Estratégias de Controle de Doenças Ocasionadas por Vírus. Melhoramento Genético. In: Freire-Filho *et al.* (eds). Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos, pp 405–459, (2005).
21. Pio-Ribeiro, G. *et al.* Doenças do caupi (*Vigna unguiculata*). In: Kimati, H. *et al.* (eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 2, pp. 215–222, (2005).
22. Ferreira-Neto, J. R. C. *et al.* Cowpea transcriptional reprogramming during two different physiological moments of root dehydration. *Plant Gene* **32**, 100374 (2022).
23. Ferreira-Neto, J. R. C. *et al.* The Cowpea Kinome: Genomic and Transcriptomic Analysis Under Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science* **12**, (2021).
24. Kerk, D. *et al.* The complement of protein phosphatase catalytic subunits encoded in the genome of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **129**, 908–925 (2002).
25. Bradai, M. *et al.* Genome wide identification of wheat and *Brachypodium* type one protein phosphatases and functional characterization of durum wheat TdPP1a. *PLoS One* **13**, e0191272 (2018).
26. Liu, M. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the PTP family in Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*). (2019) doi:10.1139/cjb-2018-0202.
27. Khan, N. *et al.* Genome-Wide Identification, Evolution, and Transcriptional Profiling of PP2C Gene Family in *Brassica rapa*. *BioMed Research International* **2019**, 2965035 (2019).
28. Wang, Y. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of StPP2C gene family in response to multiple stresses in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of Integrative Agriculture* **19**, 1609–1624 (2020).
29. Wang, G. *et al.* Genome-wide Identification and Evolution of the PP2C Gene Family in Eight Rosaceae Species and Expression Analysis Under Stress in *Pyrus bretschneideri*. *Front Genet* **12**, 770014 (2021).
30. Schwartz, R., Ting, C. S. & King, J. Whole proteome pI values correlate with subcellular localizations of proteins for organisms within the three domains of life. *Genome Res* **11**, 703–709 (2001).
31. Yu, X. *et al.* Genome-Wide Identification and Homoeologous Expression Analysis of PP2C Genes in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Front Genet* **10**, 561 (2019).

32. Zhang, G. *et al.* Genome-wide identification and expression analysis of the cucumber PP2C gene family. *BMC Genomics* **23**, 563 (2022).
33. Jeffares, D. C., Penkett, C. J. & Bähler, J. Rapidly regulated genes are intron poor. *Trends Genet* **24**, 375–378 (2008).
34. Jo, B.-S. & Choi, S. S. Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes. *Genomics Inform* **13**, 112–118 (2015).
35. Wang, K., Ding, Y., Cai, C., Chen, Z. & Zhu, C. The role of C2H2 zinc finger proteins in plant response to abiotic stresses. *Physiol Plant* **165**, 690–700 (2019).
36. Liu, Y., Khan, A. R. & Gan, Y. C2H2 Zinc Finger Proteins Response to Abiotic Stress in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **23**, 2730 (2022).
37. Berger, N., Dubreucq, B., Roudier, F., Dubos, C. & Lepiniec, L. Transcriptional regulation of Arabidopsis LEAFY COTYLEDON2 involves RLE, a cis-element that regulates trimethylation of histone H3 at lysine-27. *Plant Cell* **23**, 4065–4078 (2011).
38. Simonini, S. & Kater, M. M. Class I BASIC PENTACYSTEINE factors regulate HOMEBOX genes involved in meristem size maintenance. *J Exp Bot* **65**, 1455–1465 (2014).
39. Theune, M., Hummel, S., Jaspert, N., Lafos, M. & Wanke, D. Dimerization of the BASIC PENTACYSTEINE domain in plant GAGA-factors is mediated by disulfide bonds and required for DNA-binding. *Journal of Advances in Plant Biology* **1**, 27 (2017).
40. Feng, K. *et al.* Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. *Critical Reviews in Biotechnology* **40**, 750–776 (2020).
41. Liu, Q. *et al.* Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1391–1406 (1998).
42. Samarina, L. S. *et al.* Comparative Expression Analysis of Stress-Inducible Candidate Genes in Response to Cold and Drought in Tea Plant [*Camellia sinensis* (L.) Kuntze]. *Frontiers in Genetics* **11**, (2020).
43. Kondrashov, F. A. Gene duplication as a mechanism of genomic adaptation to a changing environment. *Proc Biol Sci* **279**, 5048–5057 (2012).
44. Wang, Y., Ficklin, S. P., Wang, X., Feltus, F. A. & Paterson, A. H. Large-Scale Gene Relocations following Ancient Genome Triplication Associated with the Diversification of Core Eudicots. *PLoS One* **11**, e0155637 (2016).
45. Freeling, M. Bias in plant gene content following different sorts of duplication: tandem, whole-genome, segmental, or by transposition. *Annu Rev Plant Biol* **60**, 433–453 (2009).
46. Cusack, B. P. & Wolfe, K. H. Not born equal: increased rate asymmetry in relocated and retrotransposed rodent gene duplicates. *Mol Biol Evol* **24**, 679–686 (2007).
47. Shazadee, H. *et al.* Identification and Expression Profiling of Protein Phosphatases (PP2C) Gene Family in *Gossypium hirsutum* L. *Int J Mol Sci* **20**, E1395 (2019).
48. Hurst, L. The Ka/Ks ratio: Diagnosing the form of sequence evolution. *Trends in genetics: TIG* **18**, 486 (2002).
49. Muhammad Salman, H. *et al.* Genome-wide identification, evolution, and molecular characterization of the PP2C gene family in woodland strawberry. *Gene* **702**, (2019).
50. Blanc, G. & Wolfe, K. H. Functional divergence of duplicated genes formed by polyploidy during Arabidopsis evolution. *Plant Cell* **16**, 1679–1691 (2004).
51. McClean, P. E., Mamidi, S., McConnell, M., Chikara, S. & Lee, R. Synteny mapping between common bean and soybean reveals extensive blocks of shared loci. *BMC Genomics* **11**, 184 (2010).
52. Restrepo-Montoya, D., McClean, P. E. & Osorno, J. M. Orthology and synteny analysis of receptor-like kinases “RLK” and receptor-like proteins “RLP” in legumes. *BMC Genomics* **22**, 113 (2021).
53. Ganko, E., Meyers, B. & Vision, T. Divergence in Expression between Duplicated Genes in Arabidopsis. *Molecular biology and evolution* **24**, 2298–309 (2007).
54. Boukar, O., Fatokun, C. A., Huynh, B.-L., Roberts, P. A. & Close, T. J. Genomic Tools in Cowpea Breeding Programs: Status and Perspectives. *Front Plant Sci* **7**, 757 (2016).
55. El-Gebali, S. *et al.* The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res* **47**, D427–D432

- (2019).
56. Hiller, K., Grote, A., Maneck, M., Münch, R. & Jahn, D. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics* **22**, 2441–2443 (2006).
 57. Chou, K.-C. & Shen, H.-B. Plant-mPLoc: a top-down strategy to augment the power for predicting plant protein subcellular localization. *PLoS One* **5**, e11335 (2010).
 58. Bailey, T. L., Johnson, J., Grant, C. E. & Noble, W. S. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* **43**, W39-49 (2015).
 59. Chen, C. *et al.* TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. *Molecular Plant* **13**, 1194–1202 (2020).
 60. Gupta, S., Stamatoyannopoulos, J. A., Bailey, T. L. & Noble, W. S. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol* **8**, R24 (2007).
 61. Wang, Y. *et al.* MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res* **40**, e49 (2012).
 62. Aleem, M. *et al.* Characterization of SOD and GPX Gene Families in the Soybeans in Response to Drought and Salinity Stresses. *Antioxidants* **11**, 460 (2022).
 63. Rocha, M. M., Lima, J. A. A., Freire Filho, F. R. R., and Lima, V. C. V. Resistência de Caupi de Tegumento Branco a Algumas Estirpes de Comovirus, Potyvirus e Cucumovirus. (1996). Available online at: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/53796> (accessed October 12, 2020).
 64. Oliveira, C. R. R., de Freire Filho, F. R., Nogueira, M., do, S., da, R., Barros, G. B., *et al.* Reação de Genótipos de Feijão-caupi Revela Resistência às Coinfecções pelo Cucumber Mosaic virus, Cowpea aphid-borne Mosaic Virus e Cowpea Severe Mosaic Virus. (2012). Available online at: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/940785> (accessed October 12, 2020).
 65. Cardoso, M. J., Freire Filho, F. R., and Athayde-Sobrinho, C. BR 14-mulato: Nova Cultivar de Feijão Macassar Para o Estado do Piauí. Teresina: Embrapa-UEPAE de Teresina, 4, (1990).
 66. Zhao, L. *et al.* An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochem Anal* **23**, 647–650 (2012).
 67. Bourgey, M. *et al.* GenPipes: an open-source framework for distributed and scalable genomic analyses. *Gigascience* **8**, giz037 (2019).
 68. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).

5 CONCLUSÕES

- O feijão-caupi e a videira apresentam 146 e 129 membros fosfatases (*VuPPs* e *VvPPs*), respectivamente, nos seus genomas, sendo consistente ao observado para outras espécies vegetais diploides.
- A maioria das *VuPPs* e *VvPPs* apresentou conservação de estruturas secundárias e motivos, indicando tratar-se de uma família gênica conservada, em consonância com sua significativa importância funcional.
- Até então não se tinha relatos de *PPs* apresentando regiões transmembranares em suas estruturas. No presente estudo foram descobertas nove *VuPPs* e oito *VvPPs*, apresentando de um a quatro hélices transmembranares, indicando se tratar, possivelmente, de fosfatases de membrana.
- A análise dos sítios de ligação a fatores de transcrição nas regiões promotoras de *VuPPs* e *VvPPs* apontou que esses genes são regulados, majoritariamente, por fatores das famílias C2H2 e DOF, os quais estão intimamente relacionados com respostas a estresses.
- O perfil de expressão de RNA-Seq de feijão-caupi sob infecção por CPSMV e CABMV, indicou que um grande conjunto de *VuPPs* são acionados em tempos precoces (60 minutos) e tardios (16 horas) da infecção. Além disso, os dados apontam uma associação funcional das *VuPPs* para as viroses avaliadas neste estudo.
- O perfil de RNA-Seq associado à validação da expressão via qPCR, indicou que seis *VvPPs* apresentaram modulação (indução) apenas em 48 horas de estresse, indicando a ação dessas proteínas frente à infecção por *X. citri* apenas em tempos tardios da infecção.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, George N. **Plant pathology**. Elsevier, 2005.
- ALSTON, A. H. G. A handbook to the flora of Ceylon, part 6, supplement. **London:Dulau**, 1931.
- AMORIM, Lidiane LB et al. Transcription factors involved in plant resistance to pathogens. **Curr Protein Pept Sci**, v. 18, n. 4, p. 335-51, 2017.
- ANDREEVA, Alexandra V.; KUTUZOV, Mikhail A. Protozoan protein tyrosine phosphatases. **International journal for parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1279-1295, 2008.
- ARAUJO, J. S. P. Perfil epidemiológico e subsídios para o controle de *Xanthomonas campestris* pv. viticola (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera*) no Brasil. 2001. Tese de Doutorado. Tese de Doutorado em Fitotecnia). Rio de Janeiro. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- ATHAYDE SOBRINHO, C. Principais doenças do feijão-caupi no Brasil. **Embrapa Meio-Norte-Capítulo em livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.
- BARBOSA, Maria Angélica Guimarães et al. Embrapa Semi-Árido. Sistemas de Produção, ISSN 1807-0027, 2010. Disponível em: <http://www.cpatia.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/doencas.html>.
- Acessado em: 20 de agosto de 2020.
- BARBOSA, Maria Angélica Guimarães; RIBEIRO JUNIOR, P. M.; BATISTA, D. da C. Manejo do cancro bacteriano da videira no Vale do São Francisco. 2016.
- BARFORD, David; DAS, Amit K.; EGLOFF, Marie-Pierre. The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation. **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 27, n. 1, p. 133-164, 1998.
- BARROS, Gislanne Brito et al. Identificação e caracterização de plantas de feijão-caupi obtidas por meio de retrocruzamento resistentes aos vírus cowpea severe mosaic virus (CPSMV) e cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV). 2010.
- BASTOS, E. A. A cultura do feijão-caupi no Brasil. **Embrapa Meio-Norte:Teresina**, Piauí, p- 71, 2016.
- BENKO-ISEPPON, Ana Maria et al. Overview on plant antimicrobial peptides. **Current protein & peptide science**, v. 11, n. 3, p. 181, 2010.
- BIANCHINI, A et al. Doenças do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Ceres, v. 2, p. 333-349, 2005.
- HICKEL, E. et al. **Uvas sem sementes: cultivares BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda**. Embrapa Uva e Vinho, 2005.

- BOUKAR, O et al. Genomic Tools in Cowpea Breeding Programs: Status and Perspectives. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. June, p. 1–13, 2016.
- BOUKAR, Ousmane et al. **Genetic and genomic resources of grain legume improvement: 6. Cowpea**. Elsevier Inc. Chapters, 2013.
- BRAUTIGAN, David L. Protein Ser/Thr phosphatases—the ugly ducklings of cell signalling. **The FEBS journal**, v. 280, n. 2, p. 324–325, 2013.
- BRECHLEY, Rachel et al. The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. **BMC genomics**, v. 8, n. 1, p. 1–22, 2007.
- BRIOSIO, P. S. T. et al. Vírus do mosaico severo do caupi - infecção natural em mungo green, *Vigna radiata*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 420–429, 1994.
- BRITO, A. C. Q. et al. First report of *Macrophomina pseudophaseolina* causing stem dry rot in cassava in Brazil. **Journal of Plant Pathology**, v. 101, n. 4, p. 1245–1245, 2019.
- CAMARÇO, R. et al. Biological, serological and molecular comparison between isolates of Cowpea severe mosaic virus. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 4, p. 239–244, 2009.
- CAO, J. et al. Genome-wide identification and evolutionary analyses of the PP2C gene family with their expression profiling in response to multiple stresses in *Brachypodium distachyon*. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2016.
- CHASE, M. W. et al. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.
- CHEN, X.; BRUENING, G. Cloned DNA copies of cowpea severe mosaic virus genomic RNAs: infectious transcripts and complete nucleotide sequence of RNA 1. **Virology**, v. 191, n. 2, p. 607–618, 1992.
- CODEVASF. Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba. 2016. Disponível em: <
<http://www.codevasf.gov.br/noticias/2014/exportacao-de-uva-deve-crescer-30-em-projeto-da-codevasf-no-semiarido-baiano/?searchterm=viticultura>>. Acesso em: Agosto de 2020.
- COHEN, P. T. W. Phosphatase families dephosphorylating serine and threonine residues in proteins. In: **Handbook of cell signaling**. Academic Press, p. 659–675, 2010.
- COL. Catalogue of Life: 2018 Annual Checklist (COL). 2018. Disponível em: <
<http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2018/>>. Acesso em 03 de agosto de 2020.
- COSTA, C. L. et al. *Ceratomyxa arcuata* (Oliv.), um crisomelídeo vetor do mosaico

- da Vigna no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 81–82, 1978.
- DALIO, Ronaldo JD. Deciphering mechanisms of pathogenicity and resistance induction in the interaction between *Phytophthora* spp. and European beech (*Fagus sylvatica* L.). Ph.D. Thesis. Technische Universitaet Muenchen (TUM), Freising, Germany, 2013.
- DAS, A. K. et al. Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. **The EMBO journal**, v. 15, n. 24, p. 6798-6809, 1996.
- DHINGRA, O. D. et al. Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina*. **Biology and pathology of *Macrophomina phaseolina***, 1978.
- EMBRAPA UVA E VINHO. Cultivares de Uva e Porta-Enxertos de Alta Sanidade. 2018. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/sprod/MesaNorteParana/cultivares.htm#copa>>. Acesso em 20 de agosto de 2020
- FARIA, J. C. de; ARAGÃO, F. J. L. Embrapa 5.1: o feijoeiro geneticamente modificado resistente ao mosaico dourado. Santo Antônio de Goiás: **Embrapa Arroz e Feijão**, 2013. 48 p. (Embrapa Arroz e Feijão. Documentos, 291). <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/974491>
- FARKAS, Ilona et al. Arabidopsis PPP family of serine/threonine phosphatases. **Trends in plant science**, v. 12, n. 4, p. 169-176, 2007.
- FARR, D. F.; ROSSMAN, A. Y. Fungal Databases, U.S. National Fungus Collections, ARS, USDA. Disponível em: <<https://nt.ars-grin.gov/fungal-databases>>. Acesso em 10 de out. 2022.
- FORDE, B. G.; ROBERTS, M. R. Glutamate receptor-like channels in plants: are they amino acid sensors in plant defence?. **F1000prime reports**, v. 6, 2014.
- GAGNEPAIN, F. *Acareosperma*, un genre nouveau d'Ampélidacées. **Bulletin du Muséum d'Histoire Naturelle**, v. 25, p. 131-132, 1919.
- GAMA, M. A. S. et al. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. **Phytopathology**, v. 108, n. 10, p. 1143-1153, 2018.
- GIOVANNINI, E. **Manual de viticultura: série tekne**. Bookman Editora, 2014.
- GOMES-SILVA, F. et al. Genetic diversity of isolates of *Macrophomina phaseolina* associated with cowpea from Brazil semi-arid region. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 11, p. 112-116, 2017.

- GONÇALVES, A. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp), a renewed multipurpose crop for a more sustainable agri-food system: nutritional advantages and constraints. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 96, n. 9, p. 2941- 2951, 2016.
- GUPTA, G. K.; SHARMA, S. K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Journal of Phytopathology**, v. 160, n. 4, p. 167-180, 2012.
- HAMPTON, R. et al. Viral diseases of cowpea and their control by resistance conferring genes, 1997
- HICKEL, E. et al. Uvas sem sementes: cultivares BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda. **Embrapa Uva e Vinho**, 2005.
- IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – julho 2020. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/home/lspa/brasil>>. Acesso em: Agosto de 2020.
- IBGE. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – julho 2021. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/uva/pe>>. Acesso em: dezembro de 2022.
- INSTRUÇÃO NORMATIVA nº 09, 2006. Ministério da Agricultura e Abastecimento. (Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=16772>). Acessado em: Agosto de 2020.
- International Organisation of Vine and Wine (OIV), Disponível em: <<http://www.oiv.int/en/>> Acesso em: Agosto 2020
- ISLAM, M. S. et al. Tools to kill: genome of one of the most destructive plant pathogenic fungi *Macrophomina phaseolina*. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 1-16, 2012.
- JACKSON, R. S. Wine science: principle, practice, perception. **Academic Press**, 2000.
- JENTSCH, S.; SCHLENKER, S. Selective protein degradation: a journey's end within the proteasome. **Cell**, v. 82, n. 6, p. 881-884, 1995.
- KERK, D.; TEMPLETON, G.; MOORHEAD, G. B. G. Evolutionary radiation pattern of novel protein phosphatases revealed by analysis of protein data from the completely sequenced genomes of humans, green algae, and higher plants. **Plant physiology**, v. 146, n. 2, p. 351, 2008.
- KUHN, G.B e FAJARDO, T.V.M. Uvas sem sementes: cultivares BRS Morena,

- BRS Clara e BRS Linda (Doenças causadas por vírus). **Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção** 8 ,ISSN 1678-8761, Versão Eletrônica. 2005.
- KWON, S. J. et al. Proteomics studies of post-translational modifications in plants. **Journal of experimental botany**, v. 57, n. 7, p. 1547-1551, 2006.
- LATIFF, A. **Studies in Malesian Vitaceae VII: The Genus Tetrastigma in the Malay Peninsula**. US Government Printing Office, 1983.
- LEÃO, P. C. S. Sistema de Produção - Cultivo da Videira (Cultivares). Embrapa Semiárido, Sistemas de Produção, 1 – 2a. Edição, ISSN 1807-0027 Versão Eletrônica. 2010
- LEÃO, P. C. S. et al. Recursos genéticos de videira (*Vitis* spp.): análise da diversidade e caracterização da coleção de germoplasma da Embrapa Semi-Árido. 2008.
- LEÃO, P. C. S.; BORGES, R. M. E. Melhoramento genético da videira. Embrapa Semiárido-Documents (INFOTECA-E), 2009.
- LEHTI-SHIU, M. D. et al. Evolutionary history and stress regulation of plantreceptor-like kinase/pelle genes. **Plant Physiology**, v. 150, n. 1, p. 12-26, 2009.
- LEITNER, A. et al. Tools for analyzing the phosphoproteome and other phosphorylated biomolecules: a review. **Analytica chimica acta**, v. 703, n. 1, p. 19-30, 2011.
- LI, C. L. Yua CL Li—a new genus of Vitaceae. **Acta Botanica Yunnanica**, v. 12, p. 1-10, 1990.
- LILLO, C. et al. Protein phosphatases PP 2A, PP 4 and PP 6: mediators and regulators in development and responses to environmental cues. **Plant, cell & environment**, v.37, n. 12, p. 2631-2648, 2014.
- LIMA, J. A. A. et al. Diagnoses e Estratégias de Controle de Doenças Ocasionadas por Vírus. Melhoramento Genético. In: FREIRE-FILHO et al. (eds). Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos, pp 405–459, 2005.
- LIMA, J. et al. Crotalaria paulinea, novo hospedeiro natural do vírus mosaico severo do caupi. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, p. 429-433, 2005.
- LIMA, M. F. et al. Ocorrência de bacteriose em videira (*Vitis* spp.) no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, n. 210.1998, 1998.
- LIMA, M.F. et al. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, n.3, p.440-443, 1999.
- LOMBARDI, J. A. Vitaceae—Gêneros Ampelocissus, Ampelopsis e Cissus, Flora Neotropica Monograph. **New York Botanical Garden**, Bronx, New York, USA,2000.

LONARDI, S. et al. The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.).

The Plant Journal, v. 98, n. 5, p. 767-782, 2019.

LOPES, D. B.; NASCIMENTO, A. R. P. Situação atual do cancro bacteriano da videirano semi-árido nordestino. In: **Embrapa Semiárido-Artigo em anais de congresso (ALICE)**.

In: SEMINÁRIO NOVAS PERSPECTIVAS PARA O CULTIVO DA UVA SEM SEMENTES NO VALE DO SÃO FRANCISCO, 2004, Petrolina. Palestras... Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2004., 2004.

MACHADO, A. R. et al. Bayesian analyses of five gene regions reveal a new phylogenetic species of *Macrophomina* associated with charcoal rot on oilseed crops in Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, v. 153, n. 1, p. 89-100, 2019.

MALAVOLTA JR., V. A et al. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. viticola. **Arq. Inst. Biol.**, v. 70, n. 3, p. 373-376, 2003. MALAVOLTA, V. M. A. et al. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. viticola em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.3, p.262-264, 1999.

MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: Panorama 2018. **Comunicado Técnico**, v. 175, n. 1, p. 6, 2019.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR (MDIC). Disponível em: www.mdic.gov.br/. Acesso em: 20 jun. 2017.

MIYA, A. et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 49, p. 19613-19618, 2007.

MOFFETT, P. Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated resistance. In: Advances in virus research. **Academic Press**, p. 1-229. 2009.

MOORHEAD, G. B. G. et al. Evolution of protein phosphatases in plants and animals. **Biochemical Journal**, v. 417, n. 2, p. 401-409, 2009.

MULUGETA, A. et al. Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) (Fabaceae) landrace diversity in northern Ethiopia. **International Journal of Biodiversity and Conservation**, v. 8, n. 11, p. 297-309, 2016.

NASCIMENTO, A. R. P. et al. Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. viticola, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2006.

NASCIMENTO, A. R. P.; MARIANO, R. L. R. Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 301-307, 2004.

NASCIMENTO, A. R. P et al. Avaliação da patogenicidade da bactéria da necrose em videiras (*Vitis* spp.). In: Embrapa Semiárido-Resumo em anais de congresso

(ALICE). **Fitopatologia Brasileira**, v. 23, p. 213, ago. 1998.

NAUE, C. R. et al. Efeito do tratamento de bacelos de videira 'Red Globe' no controle do cancro bacteriano causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*.

Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, n. 4, p. 853-861, 2014.

NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape vine. **Journal of Phytopathology**, v. 73, n. 2, p. 183-186, 1972.

NECHET, K. L.; HALFELD-VIEIRA, B. A. Ocorrência do fungo *Macrophomina phaseolina* em feijão-caupi no estado de Roraima. 2005.

NEEL, B. G.; TONKS, N. K. Protein tyrosine phosphatases in signal transduction. **Current opinion in cell biology**, v. 9, n. 2, p. 193-204, 1997.

NEGREIROS, A. M. P. et al. Identification and pathogenicity of *Macrophomina* species collected from weeds in melon fields in Northeastern Brazil. **Journal of phytopathology**, v. 167, n. 6, p. 326-337, 2019.

NEVES, R. L. et al. Uvas sem sementes: cultivares BRS Morena, BRS Clara e BRS Linda (Doenças fúngicas e bacterianas). Embrapa Uva e Vinho, Sistema de Produção 8, ISSN 1678-8761, Versão Eletrônica. 2005.

OLIVEIRA, C. R. R. et al. Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo Cucumber mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus e Cowpea severe mosaic virus. **Bragantia**, v. 71, p. 59-66, 2012.

OLIVEIRA, J. E. M et al. Embrapa Semi-Árido. Sistemas de Produção, 2010.

Disponível em:

<http://www.cpatu.embrapa.br:8080/sistema_producao/spuva/pragas.html>.

Acessado em: 20 de agosto de 2020.

PELLIZZARI, G. Grapevine. In: World Crop Pests. **Elsevier**. p.323-331. 1997.

PIO-RIBEIRO, G. et al. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata*). In: KIMATI, H. et al. (eds.). Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo, Agronômica Ceres, 2, pp. 215-222, 2005.

PLANCHON, J. E. Monographie des Ampélidées vraies. **Monographiae phanerogamarum**, v. 5, p. 452, 1887.

POLTRONIERI, L. S. et al. Principais doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) WAPL.) no Pará e recomendações de controle. **Embrapa-CPATU**, Documentos 75, 24p. 1994.

QIAN, W. et al. Comparative and functional genomic analyses of the pathogenicity of phytopathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **Genome research**, v. 15, n. 6, p. 757-767, 2005.

- QIU, Jianfang et al. Genome-Wide Analysis of the Protein Phosphatase 2C Genes in Tomato. **Genes**, v. 13, n. 4, p. 604, 2022.
- SALEH, A. A. et al. Relatedness of *Macrophomina phaseolina* isolates from tallgrass prairie, maize, soybean and sorghum. **Molecular ecology**, v. 19, n. 1, p. 79-91, 2010.
- SANABRIA, N. M. et al. Self/non-self perception in plants in innate immunity and defense. **Self/nonself**, v. 1, n. 1, p. 40-54, 2010.
- SARR, M. P. et al. Genetic diversity in *Macrophomina phaseolina*, the causal agent of charcoal rot. **Phytopathologia Mediterranea**, v. 53, n. 2, p. 250, 2014.
- SCHULZE, E. D. et al. **Plant ecology**. Springer Science & Business Media, 2005.
- SCHWESSINGER, B.; ZIPFEL, C. News from the frontline: recent insights into PAMP-triggered immunity in plants. **Current opinion in plant biology**, v. 11, n. 4, p. 389-395, 2008.
- SHI, Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 468-484, 2009.
- SILVA, A. M. F. et al. Sobrevivência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em tecido infectado de videira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 3, p. 757-765, 2012.
- SILVA, M. B. O. et al. Desempenho agronômico de genótipos de feijão-caupi. 2018.
- SILVA, P. C. G. S. e COELHO, R. C. Cultivo da Videira. Embrapa, 2010.
- Disponível em:
http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/CultivodaVideira_2ed/Caracterizaca_social_da_%20videira.html. Acessado em: Agosto 2020.
- SINDHU, M. et al. Current advances and future directions in genetic enhancement of a climate resilient food legume crop, cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 139, n. 3, p. 429-453, 2019.
- SINGH, A. et al. Protein phosphatase complement in rice: genome-wide identification and transcriptional analysis under abiotic stress conditions and reproductive development. **BMC genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-18, 2010.
- SINGH, B. B. Improved Cowpea Cultivation and Seed Production. **Cowpea: The Food Legume of the 21st Century**, n. cowpea the foodle, p. 87-123, 2014.
- SINGH, B. B. The quiet revolution. IITA Research to Nourish Africa, R4D Review. Ibadan: IITA, 2010. Disponível em:
<http://r4dreview.iita.or/index.php/2010/09/29/the-quietrevolution/>. Acesso em: 06 abr.

2020.

SINGH, B. B et al. Recent progress in cowpea breeding. In: FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B. B.; KORMAWA, P.M.; TAMÒ, M. (Eds.). Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production. Ibadan: IITA. cap.1 , p. 22-40, 2002.

SINGLETON, Larry L.; MIHAIL, Jeanne D.; RUSH, Charles M. **Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi**. 1992.

SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. Disponível em:

https://issuu.com/sociedadnacional deagricultura/docs/a_lavoura_705/50 Acesso em: 17 jul. 2017.

SOEJIMA, A.; WEN, J. Phylogenetic analysis of the grape family (Vitaceae) based on three chloroplast markers. **American Journal of Botany**, v. 93, n. 2, p. 278-287, 2006.

SZÖÖR, B. et al. A novel phosphatase cascade regulates differentiation in Trypanosoma brucei via a glycosomal signaling pathway. **Genes & development**, v. 24, n. 12, p. 1306-1316, 2010.

TANG, X. et al. Overexpression of Pto activates defense responses and confers broad resistance. **The Plant Cell**, v. 11, n. 1, p. 15-29, 1999.

THIS, P. et al. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 9, p. 511-519, 2006.

TOSTES, G. O. et al. Contribuições ao estudo bioquímico molecular e epidemiológico de Xanthomonas campestris pv. viticola e implicações no patossistema do cancro bacteriano da videira. 2012.

VAN LOON, L. C. et al. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v. 44, p. 135-162, 2006.

VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic Press**, p-1167, 2000.

VAN ZONNEVELD, M. et al. Mapping patterns of abiotic and biotic stress resilience uncovers conservation gaps and breeding potential of Vigna wild relatives. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

VAVILOV, N. I. et al. Studies on the origin of cultivated plants. *Bulletin of Applied Botany*, **Genetics and Plant Breeding**, v. 16, p. 1-248, 1926.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the 'Flora of Tropical East Africa': II. **Kew Bulletin**, p. 235-307, 1970.

WALSH, Christopher T.; GARNEAU-TSODIKOVA, Sylvie; GATTO JR, Gregory J. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 44, n. 45, p. 7342-7372, 2005.

ZHAO, Lin et al. *Macrophomina vaccinii* sp. nov. causing blueberry stem blight in China. **MycoKeys**, v. 55, p. 1, 2019.

ZUCAL, M. P. M. et al. Reação de genótipos de videira ao cancro bacteriano.

Interciencia, v. 41, n. 9, p. 639-645, 2016.