



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

AYUG BEZERRA LEMOS

**OSMOPROTETORES DO FEIJÃO-CAUPI: ANÁLISE ESTRUTURAL E
FUNCIONAL**

Recife

2021

AYUG BEZERRA LEMOS

**OSMOPROTETORES DO FEIJÃO-CAUPI: ANÁLISE ESTRUTURAL E
FUNCIONAL**

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

Orientadora: Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadores: Dr^a Roberta Lane de Oliveira da Silva

Dr. Marx Oliveira de Lima

Recife

2021

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Lemos, Ayug Bezerra

Osmoprotetores do feijão-caupi: análise estrutural e funcional /Ayug Bezerra Lemos - 2021.

132 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Maria Benko-Iseppon

Coorientadores: Roberta Lane de Oliveira da Silva

Marx Oliveira de Lima

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

Inclui referências.

1. *Vigna unguiculata* 2. Solutos compatíveis 3. Seca

I. Benko-Iseppon, Ana Maria (Orientadora) II. Silva, Roberta Lane de
Oliveira da (Coorientadora) III. Lima, Marx Oliveira de (Coorientador)

IV. Título

583.74 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021-191

AYUG BEZERRA LEMOS

**OSMOPROTETORES DO FEIJÃO-CAUPI: ANÁLISE ESTRUTURAL E
FUNCIONAL**

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

Aprovado em: 26/03/2021.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto (Membro interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dr^a. Lidiane Lindinalva Barbosa Amorim (Membro externo)

Instituto Federal do Piauí

AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço a DEUS pela oportunidade de estar vivo, por me sustentar e me guiar em vários momentos da minha vida que em primeira estância parecia não ter solução, e finalmente por todas as bênçãos a mim concebidas muito obrigado.

Aos meus pais, Vânia e Marcos que me acompanham desde o início de tudo, sempre me incentivando e auxiliando no que fosse necessário, por todo amor, carinho e cuidado comigo, e estão sempre dispostos a me ajudar em tudo que precisar, e a minha irmã Rayanne pelos momentos de descontração e leveza proporcionados.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Maria Benko-Iseppon, pela oportunidade de orientar-me e por toda ajuda que me foi concebida.

Aos meus coorientadores Dr^a Roberta Lane e Dr. Marx Lima por todo apoio, disponibilidade e paciência ao passar todo conhecimento necessário. Além dos momentos de descontração e conforto.

Ao Dr. João Pacífico, por ser praticamente um terceiro coorientador, por me acalmar e me auxiliar a organizar as ideias.

A todos os membros do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), aos amigos que formei nessa caminhada: Andreia Cristiny, Joelson Germano, Vanessa Emanuelle, Wilson Oliveira, Mirelli Sanrego, Marianne Firmino, Marx Oliveira por promoverem momentos únicos na minha caminhada que nunca irei esquecer.

A Artemisa Borges, Jéssica Bárbara, Caroline Píres e Bruna Brito, Silvany Araujo por todos os conselhos, risos e choros compartilhados, principalmente da minha parte.

Aos meus amigos Rodolfo Assis e Erick Menezes por todas as conversas e momentos de descontração que me tiravam sorrisos, nos ajudando a superar este ano atípico que foi 2020.

Aos meus amigos do LBCM Thaynara, Taína Anderson, Jorge, Rubens, Fernanda, Gabriel e Amanda por todo o carinho e amizade, por todos os almoços e lanches da tarde compartilhados, acompanhados de um bom café e muitas gargalhadas.

Agradeço fortemente a Eduardo Araújo por todo suporte técnico com relação aos desafios da informática.

Agradeço imensamente a Nairomberg Portela, por estar comigo em momentos bons e momentos ruins, por me inspirar e me motivar, e por permitir tentar fazer o mesmo por ele, por todos os momentos únicos que compartilhamos juntos, onde serviram de grande aprendizado, por todos os conselhos e por todo o apoio e companheirismo desde o momento que te conheci.

À Universidade Federal de Pernambuco, ao departamento de Genética pela infraestrutura concedida possibilitando realizar todas nossas análises, a Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pelo suporte oferecido neste período a Embrapa semiárido e ao Instituto Agrônômico de Pernambuco pela realização do experimento de Vigna, por toda disponibilidade a que nos foi dado quanto aos acessos de Vigna e pela parceria de longas datas.

Aos órgãos de apoio à pesquisa FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), a rede InterSys pelo financeiro.

A todos que contribuíram de alguma forma para que eu concluísse essa nova etapa!

Muito Obrigado!

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma leguminosa cultivada em regiões áridas e semiáridas, que contém uma rica composição nutricional. Figura como um dos grãos de destacada importância para o cenário socioeconômico mundial. No entanto, a ocorrência de condições ambientais adversas pode afetar consideravelmente sua qualidade e produtividade. Neste sentido, estudos direcionados para avaliação dos mecanismos de defesa ou tolerância vegetal têm sido propostos visando estabelecer estratégias aplicáveis ao melhoramento e à biotecnologia, a fim de minimizar os danos decorrentes de estresses abióticos e bióticos. O presente trabalho objetivou identificar e caracterizar as diferentes classes de osmoprotetores em *V. unguiculata* sob desidratação radicular ou em folhas com estresses combinados (injúria+inoculação viral), inferindo sobre seus padrões de expressão, características funcionais e estruturais. Para tanto, foram geradas bibliotecas de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) usando os acessos Pingo de Ouro (tolerante ao déficit hídrico), Santo Inácio (sensível ao déficit hídrico), BR14-Mulato (resistente ao *Cowpea severe mosaic virus* – CPSMV e susceptível ao *Cowpea aphid-borne mosaic virus* – CABMV) e IT85F-2687 (resistente ao CABMV e susceptível ao CPSMV). Para o experimento de déficit hídrico, as coletas dos tecidos vegetais foram realizadas nos tempos de 25 minutos, 75 minutos e 150 minutos após a imposição do estresse. Para o ensaio das viroses, foram realizadas coletas com 30 minutos, 60 minutos e 16 horas após a inoculação. Inicialmente, foram realizadas análises *in silico* visando selecionar sequências sondas das quatro classes de osmoprotetores. Foram obtidas 664 sequências, que foram submetidas a um BLAST local contra o transcriptoma de *V. unguiculata* e traduzidas para aminoácidos, totalizando 1325 transcritos homólogos associados a osmoprotetores. A análise de domínios conservados identificou 44 candidatos com domínio P5CS, 2 P5CR, 5 BADH, 7 CMO, 11 IMP, 32 MIPS, 30 TPP, 56 TPS e 22 TPS. A caracterização físico-química indicou que a maioria dos candidatos estavam localizados no citoplasma. Alinhamentos múltiplos realizados com as sequências de *V. unguiculata* e seus ortólogos permitiram identificar padrões conservados importantes para o funcionamento dessas proteínas. As árvores fenéticas de osmoprotetores demonstraram o agrupamento das sequências de *V. unguiculata* com outras espécies da família Fabaceae, comprovando sua similaridade e apontando a conservação dessas proteínas. 31 genes ancoraram nos 11 cromossomos do genoma de referência do feijão-caupi. A variedade estrutural observada a partir da ferramenta GSDS identificou a conformação de éxons e íntrons nos genes associados às quatro classes de osmoprotetores.

De acordo com a ferramenta MEME e TOMTOM, os fatores de transcrição ZF-HD e BHLH são importantes para a regulação de genes associados a osmoprotetores sob situações de estresse. O perfil transcricional indicou que a maioria das classes de osmoprotetores participam do processo de defesa/tolerância em *V. unguiculata* sob múltiplos estresses. Entretanto, sua expressão é mais acentuada sob déficit hídrico em tempos tardios (150 minutos). Os resultados obtidos permitiram ampliar o conhecimento de osmoprotetores em *V. unguiculata* sob múltiplos estresses e são de grande valia para aplicação desses candidatos no melhoramento genético da espécie e de outras leguminosas de importância agrícola.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata*; solutos compatíveis; seca; CABMV; CPSMV; RNA-Seq.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata*) is a legume grown in arid and semi-arid regions, which contains a rich nutritional composition. Figures as one of the grains of great importance for the world socioeconomic scenario. However, the occurrence of adverse environmental conditions can considerably affect its quality and productivity. In this sense, studies aimed at evaluating defense mechanisms or plant tolerance have been proposed with a view to establishing strategies applicable to breeding and biotechnology, in order to minimize the damage resulting from abiotic and biotic stresses. The present work aimed to identify and characterize the different classes of osmoprotectors in *V. unguiculata* under root dehydration or in leaves with combined stresses (injury + viral inoculation), inferring about their expression patterns, functional and structural characteristics. For this purpose, RNA-Seq libraries (Illumina HiSeq2500) were generated using the accessions Pingo de Ouro (tolerant to water deficit), Santo Inácio (sensitive to water deficit), BR14-Mulato (resistant to *Cowpea severe mosaic virus* - CPSMV and susceptible *Cowpea aphid-borne mosaic virus* - CABMV) and IT85F-2687 (resistant to CABMV and susceptible to CPSMV). For the water deficit experiment, the collections of plant tissues were performed within 25 minutes, 75 minutes and 150 minutes after the imposition of stress. For the viruses test, collections were performed at 30 minutes, 60 minutes and 16 hours after inoculation. Initially, *in silico* analyzes were carried out in order to select probe sequences from the four classes of osmoprotectors. 664 sequences were obtained, which were subjected to a local BLAST against the transcriptome of *V. unguiculata* and translated into amino acids, totaling 1325 homologous transcripts associated with osmoprotectors. The analysis of conserved domains identified 44 candidates with P5CS domain, 2 P5CR, 5 BADH, 7 CMO, 11 IMP, 32 MIPS, 30 TPP, 56 TPS and 22 TPS. The physicochemical characterization indicated that most of the candidates were located in the cytoplasm. Multiple alignments carried out with the *V. unguiculata* sequences and their orthologs allowed the identification of conserved patterns important for protein functioning. The phenetic trees of osmoprotectant orthologs demonstrated the grouping of *V. unguiculata* sequences with other species of the Fabaceae family, proving their similarity and pointing out the conservation of these proteins. 31 genes anchored in the 11 chromosomes of cowpea's reference genome. The structural variety uncovered by the GSDS tool revealed the conformation of exons and introns in the genes of the four classes of osmoprotectors. According to the MEME and TOMTOM tools, the transcription factors ZF-HD and BHLH are important for the regulation of genes associated

with osmoprotectors in situations of stress. The transcriptional profile indicated that most classes of osmoprotectors participate in the defense/tolerance process in *V. unguiculata* under multiple stresses. However, its expression was more pronounced under water deficit in later times (150 minutes). The results obtained allowed to expand the knowledge of osmoprotectors in *V. unguiculata* under multiple stresses and are of great value for the application of these candidates in the genetic improvement of the species and other legumes of agricultural importance.

Keywords: *Vigna unguiculata*; compatible solutes; drought; CABMV; CPSMV; RNA-Seq.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Figura 1 – Principais órgãos de <i>Vigna unguiculata</i> . (A) flor; (B) vagens; (C) sementes de diferentes cultivares; (D) e (E) raízes com nódulos; (F) folhas.....	22
Figura 2 – Produção anual de feijão-caupi no Brasil em toneladas, entre os anos de 1985 e 2017	24
Figura 3 – Produtividade média da cultura do feijão-caupi nas regiões mais produtoras do Brasil.....	24
Figura 4 – Estresses abióticos e respostas ao estresse em plantas.....	26
Figura 5 – Estratégias de resistencia ao déficit hídrico	30
Figura 6 – Principais grupos de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos, especialmente para seca e salinidade. (A) proteínas envolvidas na cascata de sinalização, (B) proteínas funcionais envolvidas diretamente na resposta ao estresse.....	31
Figura 7 – Visão geral das vias de biossíntese de osmoprotetores. (A) glicina betaína, (B) prolina e (C) metabolismo dos açúcares.....	37

ARTIGO 1 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE OSMOPROTETORES EM *VIGNA UNGUICULATA* SOB MÚLTIPLOS ESTRESSES

Figura 1 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de proteínas MIPS. O bloco preto indica a assinatura conservada GWGGNNG, presente nas MIPS de todas as espécies alinhadas. Foram utilizados de <i>Zea mays</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Setaria itálica</i> , <i>Glycine max</i> e <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
Figura 2 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de proteínas IMP. Foram encontrados três motivos conservados catalíticos marcados em caixas pretas: “M-A” motivo GEET, “M-B” motivo DPLDGT, e “M-C” motivo WDxAAG. Foram utilizados de <i>Populus alba</i> , <i>Doroceras hygrometricum</i> , <i>O. sativa</i> , <i>Z. mays</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>Solanum lycopersicum</i>	53
Figura 3 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de BADH. M-A indica o motivo relacionado ao sinal cloroplastidial, M-B decapeptídeo conservado, e M-C o sinal peroxissomal. Em vermelho encontra-se o aminoácido crítico na produção de GB. Foram utilizados de <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> e <i>Beta vulgaris</i>	54

Figura 4 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de CMO . M-A indica a sequência motivo localizada no domínio Rieske [2Fe-2S] e M-B indica o motivo mononuclear não heme de ligação ao ferro. Foram utilizados de <i>Cajanus cajan</i> , <i>Medicago truncatula</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>O. sativa</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>B. vulgaris</i> , <i>Z. mays</i> e <i>G. max</i>	55
Figura 5 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de P5CS. M-A indica o motivo conservados ATP Sítio de Ligação, M-B é marcado o motivo Leucina Zipper, M-C indica o motivo Glu-5-Kinase e M-D o domínio de ligação NAD(P)H. Foram utilizados de <i>S. lycopersicum</i> , <i>O. sativa</i> , <i>A. thaliana</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>M. truncatula</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> e <i>Saccharum hybrid</i>	57
Figura 6 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de P5CR. O primeiro motivo (M-A) indica o motivo conservado, Rossmann fold. (M-B) motivo de ligação nucleotídica, (M-C) representa o núcleo de dimerização, (M-D) sequência consenso conservada entre os . Foram utilizados de <i>Pisum sativum</i> , <i>Z. mays</i> , <i>G. max</i> , <i>B. napus</i> e <i>A. thaliana</i>	58
Figura 7 – Alinhamento múltiplo de sequências ortólogas de TPP. As três caixas pretas no alinhamento (M-A, M-B e M-C) indicam os motivos conservados característicos das enzimas TPP. Foram utilizados de: <i>O. sativa</i> , <i>Z. mays</i> , <i>N. tabacum</i> , <i>Vitis vinifera</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>Gossypium arboreum</i>	59
Figura 8 – Alinhamento múltiplo das sequências ortólogas de TPS. Os triângulos invertidos indicam os resíduos conservados importantes para o funcionamento de TPS, os triângulos do lado esquerdo indicam os candidatos de <i>V. unguiculata</i> com os domínios TPS e TPP fusionados. Foram utilizados de <i>A. thaliana</i> , <i>G.max</i> , <i>V. vinifera</i> , <i>O. sativa</i> , <i>Z. mays</i> , <i>T. aestivum</i> e <i>Solanum tuberosum</i>	60
Figura 9 – Dendrogramas com as relações entre e proteínas de síntese de osmoprotetores pelo método <i>Neighboor-Joining</i> onde ramos em vermelho indicam a localização dos candidatos de <i>Vigna</i> na árvore. Mio-inositol (MI) (a- MIPS, b- IMP), Glicina- betaína (GB) (c-BADH, d-CMO), Prolina (PRO) (e-P5CS, f-P5CR), Trealose (TRE) (g-TPP e h-TPS). Números nas bases dos ramos referem-se aos valores de bootstrap.	63
Figura 10 – Distribuição dos genes das quatro categorias de osmoprotetores nos cromossomos virtuais da espécie <i>V. unguiculata</i> . A posição dos genes ou <i>clusters</i> ancorados aos osmoprotetores são indicadas em vermelho. As cores dos círculos determinam as categorias de osmólitos: mio-inositol em amarelo, glicina-betaína em vermelho, prolina em azul e trealose em verde.	66

Figura 11 – Estruturas gênicas de P5CS, P5CR, MIPS, IMP, CMO, BADH, TPS e TPP identificados no RNA-Seq de <i>V. unguiculata</i> . A representação gráfica do modelo gênico foi otimizada e exibida usando o GSDS.	67
Figura 12 – Motivos de elementos cis-regulatórios referentes aos osmoprotetores analisados. Ligado a estes motivos estão os fatores de transcrição aos quais estão associados: ZF-HD (vermelho) e BHLH (azul). Abaixo de cada motivo se encontram os valores de <i>E-value</i> e a quantidade de sítios de ligação.	68
Figura 13 – Distribuição dos elementos cis-reguladores previstos nas regiões promotoras dos genes de osmoprotetores. O conteúdo e a distribuição dos motivos pelo promotor são representados por retângulos e quadrados coloridos. Os motivos 1 e 2 em negrito na indicam os sítios de ligação associados aos FTs ZF-HD e BHLH respectivamente Os sinais "+" e "-" representam cadeias senso e anti-senso das regiões promotoras analisadas.	69
Figura 14 – Análise comparativa da expressão diferencial de transcritos. (A) DE em desidratação radicular durante 25 minutos e 150 minutos. (B) DE em múltiplos estresses (ferimento + vírus) durante 1 hora e 16 horas, experimento realizado no tecido foliar. As viroses utilizadas foram o vírus do mosaico severo (MV) e poty vírus (PV).	71
Figura 15 – Perfil de expressão <i>in silico</i> dos osmoprotetores de feijão-caupi. Tecido radicular sob desidratação durante 25 e 150 minutos.	73
Figura 16 – Perfil de expressão <i>in silico</i> dos osmoprotetores de feijão-caupi sob múltiplos estresses. Tecido foliar injuriado e inoculado com CPSMV (MS) e CABMV (PV) com 60 minutos e 16 horas de estresse.....	74

LISTA DE TABELAS

DISSERTAÇÃO

Tabela 1 – Produção mundial de feijão-caupi e sua distribuição por continente. 23

ARTIGO 1 – IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE OSMOPROTETORES EM *VIGNA UNGUICULATA* SOB MÚLTIPLOS ESTRESSES

Tabela 1 – Quantitativo de transcritos associados as quatro classes de osmoprotetores encontrados no transcriptoma de *V. unguiculata*..... 50

Tabela 2 – Ponto isoelétrico, peso molecular e localização subcelular dos candidatos à osmoprotetores em *V. unguiculata*. 50

Tabela 3 c *Primers* desenhados e sintetizados para posterior validação pela técnica de RT-qPCR.....
.75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA_Kinase – *Amino Acid Kinase Family*

ABA – *Abscisic Acid*, Ácido abscísico

Aldedh – Família de Aldeídos Dehidrogenases, *Aldehyde dehydrogenase Family*

ALDH F10 – Aldeídos Dehidrogenases Família 10, *Aldehyde dehydrogenase Family 10*

AMADH – Amino aldehyde dehydrogenase

APG – Grupo de Filogenia de Angiospermas, *Angiosperm Phylogeny Group*

ATP – Trifosfato de adenosina

APX – Ascorbato Peroxidase, *Ascorbate Peroxidase*

BADH – Betaína aldeído dehidrogenase, *Betaine-aldehyde dehydrogenase*

BFG – Grupo de Flora do Brasil, *Brazilian Flora Group*

BHLH - Basic helix-loop-helix protein

BLAST – Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local, *Basic Local Alignment Search Tool*

BLOSSUM – Matriz de substituição de blocos de aminoácidos *Blocks of Amino Acid substitution Matrix*

BNF – Fixação Biológica de Nitrogênio, *Biological Nitrogen Fixation*

CABMV -; Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos, *Cowpea Aphid-Born Mosaic Virus*

CAT – Catalase

CPSMV-Cowpea severe mosaic virus, Vírus do Mosaico Severo do Caupi

cDNA – DNA Complementar, *Complementary DNA*

CMO – Colina Monooxygenase, *Choline monooxygenase*

DE – Diferencialmente Expressos

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, *Deoxyribonucleic Acid*

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FC – *Fold Change*

FIG Superfamily – Superfamília de fosfatases dependentes de metal

FT – Fatores de Transcrição, *Transcription Factor*

GB – Glicina betaína

GC% – Porcentagem de Guanina e Citosina

Glyco Transf 20 – Família glicosiltransferase 20, *Glycosyltransferase family 20*

GR – Glutathione Redutase, *Glutathione Reductase*

GSA-DH – Dehidrogenase Glutâmica Semialdeído, *Glutamic Semialdehyde Dehydrogenase*

HAD-like Superfamily – Superfamília de Haloácidos Dehidrogenases, *Haloacid Dehydrogenase Superfamily*

IMP – Inositol monofosfatase, *Inositol monophosphatase*

IITA – Instituto Internacional de Agricultura Tropical, *International Institute of Tropical Agriculture*

LWGP – Grupo de Trabalho de Filogenia de Leguminosas, *Leguminosae Working Group Phylogeny*

MEGA v.7 – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* versão 7

MEME – *Multiple EM for Motif Elicitation*

MIPS – Mio inositol fosfato sintase, *Myo inositol Phosphate Synthase*

miRNAs – Micro RNAs

mRNA – RNA mensageiro

NAD(P)H – Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

NCBI – Centro Nacional para Informação Biotecnológica, *National Center for Biotechnology Information*

NGS – Sequenciamento de Nova Geração, *Next Generation Sequencing*

NJ – *Neighbor-Joining*

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico, *Organisation for Economic Co-operation and Development*

ORF – Fase de Leitura Aberta, *Open Reading Frame*

P5CR – Pirroline 5 carboxilato redutase, *Pyrroline-5-carboxylate reductase*

P5CS – Pirroline 5 carboxilato sintase, *Pyrroline-5-carboxylate synthase*

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase, *Polymerase Chain Reaction*

QAC – Composto Amônio Quaternário

QTL – Locus de Característica Quantitativa, *Quantitative Trait Loci*

rADN – DNA ribossomal

RNA – Ácido Ribonucleico, *Ribonucleic Acid*

RNA-Seq – Sequenciamento do RNA; *RNA Sequencing*

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio, *Reactive Oxygen Species*

RT-qPCR – PCR quantitativa em Tempo Real, *Quantitative Real Time PCR*

SOD – Superóxido Dismutase, *Superoxide Dismutase*

T_m – Temperatura de *melting*

TPP – Trealose 6 fosfato fosfatase, *Trehalose 6-phosphate phosphatase*

T6P – Trealose 6-fosfato, *Trehalose 6-Phosphate*

TPS – Trealose 6 fosfato sintase, *Trehalose-6-phosphate synthase*

UniProt – Banco de Dados Universal de Proteínas, *Universal Protein*

ZF-HD - Homeodomínio de Dedo de Zinco, *Zinc Finger-Homeodomain*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	OBJETIVOS	20
1.1.1	Objetivo Geral	20
1.1.2	Objetivos Específicos.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CLASSIFICAÇÃO, ASPECTOS BIOLÓGICOS E IMPORTÂNCIA DE <i>VIGNA UNGUICULATA</i>	21
2.2	FATORES AMBIENTAIS QUE INTERFEREM NA HOMEOSTASE VEGETAL	25
2.2.1	Viroses que infectam o feijão-caupi no Brasil.....	27
2.2.2	Deficiência hídrica e seus efeitos subjacentes	28
2.3	MECANISMOS DE TOLERÂNCIA AO ESTRESSE HÍDRICO	29
2.4	OSMOPROTETORES.....	32
2.4.1	Prolina	33
2.4.2	Glicina-Betaína.....	34
2.4.3	Mio-inositol	35
2.4.4	Trealose	36
2.5	BIOINFORMÁTICA APLICADA AS ÔMICAS	38
2.6	SEQUENCIAMENTO NGS E ANÁLISE DE DADOS TRANSCRIPTÔMICOS.....	38
3	ARTIGO 1– IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE OSMOPROTETORES EM <i>VIGNA UNGUICULATA</i> SOB MÚLTIPLOS ESTRESSES.....	41
5	CONCLUSÕES GERAIS	110
	REFERÊNCIAS	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

1 INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.], também conhecido como feijão fradinho, é uma leguminosa de cultura anual, com importância significativa no cenário socioeconômico. No Brasil, o cultivo desta espécie está predominantemente situado nas regiões Norte, Nordeste e tem continuamente se expandido para a região Centro-Oeste do país (BEZERRA et al., 2014).

Por apresentar uma rica composição nutricional (FROTA; SOARES; ARÊAS, 2008) e um grande potencial adaptativo a condições climáticas (como por exemplo em longos períodos de estiagem), qualidade do solo e a vários ambientes, o feijão-caupi pode ser considerado uma cultura versátil (FERREIRA et al., 2017). Os seus grãos são comumente utilizados como um dos principais componentes da dieta alimentar de várias famílias, bem como tem gerado empregos diretos e indiretos, principalmente em áreas rurais onde estão localizadas grande parte das famílias de baixa renda (FREIRE-FILHO et al., 2011).

No entanto, assim como outras culturas de interesse agrícola, o feijão-caupi tem sido acometido constantemente por vários estresses. Em condições naturais os vegetais estão a todo momento expostos a diferentes tensões, sejam elas de natureza abiótica originadas por mudanças climáticas e ação humana ou bióticas, ocasionadas por agentes patogênicos como vírus bactérias e protozoários (ENEBE; BABALOLA, 2018; ATKINSON; URWIN, 2012).

No atual cenário agrícola o aparecimento de tais estresses se intensifica e compromete direta e indiretamente a maquinaria celular dos vegetais e conseqüentemente o seu cultivo e produtividade (HUSSAIN et al., 2013; SHARMA et al., 2018). Agentes patogênicos como o vírus do mosaico severo do feijão-caupi (CPSMV) e o vírus do mosaico severo transmitido por afídeos (CABMV) são viroses conhecidas por punir severamente o feijão-caupi colaborando consideravelmente para a diminuição da produção e da qualidade dos grãos (LIMA, 2015).

A seca por sua vez é dos estresses abióticos que comprometem mais severamente a produção agrícola mundial, desta forma proporcionando danos severos de ampla proporção para o cultivo de diversas espécies vegetais de interesse agrícola de todo o globo (RAO; RAGHAVENDRA; REDDY, 2006). Além disso, as mudanças climáticas em paralelo influenciam no aparecimento de vários patógenos, que por sua vez acometem o vegetal já enfraquecido pelos danos ocasionados por outros fatores originados anteriormente.

Contudo, ao longo dos processos evolutivos, as plantas desenvolveram e aperfeiçoaram estratégias para driblar e se adaptar as condições impostas pela escassez hídrica, sendo capazes de realizar diversos processos que respondem sistemicamente ao estresse, com o intuito de

adquirir tolerância e sobreviver até o término do seu ciclo de vida (BARRETO; BARBOSA, 2001).

Entre os diversos mecanismos de tolerância aos estresses, a maquinaria molecular da planta utilizada na modulação da expressão de genes que codificam proteínas induzíveis tem sido eficaz e promissora para melhorar a tolerância a seca em plantas (KU et al., 2013; WANG; VINOCUR; ALTMAN, 2003; ZHANG; CREELMAN; ZHU, 2004). Dentre as proteínas induzíveis a estresses abióticos estão os solutos compatíveis ou osmoprotetores, que são moléculas pequenas, eletricamente neutras, de baixo peso molecular, e atóxicas, que estão intimamente relacionadas com a tolerância a seca nos vegetais (YANCEY, 2001).

Os osmoprotetores (prolina, glicina betaína, mio-inositol e trealose) compreendem uma série de representantes essencialmente importantes para a sobrevivência do vegetal em condições adversas, como seca e salinidade. O acúmulo desses compostos está frequentemente associado a altos níveis de tolerância das plantas ao déficit hídrico, e considerando que seus efeitos benéficos não são geralmente espécie-específicos, a identificação de agentes envolvidos na síntese de osmoprotetores atuantes nas vias de tolerância a estresses compreende uma importante fonte de candidatos para uso em programas de melhoramento genético e outras inferências biotecnológicas (KHAN; AHMAD; KHAN, 2015; MELLACHERUVU; TALAKAYALA; GARLADINE, 2019).

Nesse sentido, levando em consideração que as tensões que acometem os vegetais podem aparecer de forma isolada ou de forma simultânea em condições de campo sendo a última situação mais provável (SUZUKI et al., 2014), o presente trabalho visou identificar genes envolvidos na síntese de osmólitos compatíveis nos transcriptomas do feijão-caupi sob desidratação radicular e estresses combinados (injúria mecânica+inoculação viral), avaliando a diversidade estrutural e funcional, bem como o perfil de expressão diferencial de transcritos que codificam as principais categorias de osmoprotetores atuantes nos estresses aplicados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Analisar genes e transcritos codificantes de osmoprotetores das classes prolina, glicina-betaína, mio-inositol e trealose, inferindo sobre seu perfil de expressão, estrutura e função, mediante a resposta vegetal relacionada ao déficit hídrico e a estresse por injúria mecânica seguida de inoculação com os agentes patogênicos CPSMV e CABMV em *Vigna unguiculata*.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Selecionar genes codificantes de osmoprotetores diferencialmente expressos em feijão-caupi desvendando as possíveis classes atuantes frente a múltiplos estresses;
2. Definir a estrutura gênica e função de proteínas associadas a síntese de osmoprotetores presentes em *V. unguiculata* e em espécies relacionadas, a fim de esclarecer questões evolutivas entre as classes comparado a outros organismos;
3. Analisar o perfil da expressão *in silico* dos transcritos modulados sob as condições de estresse avaliadas;
4. Identificar padrões de conservação em níveis primários, secundários e terciários da forma proteica dos candidatos, analisando aspectos relacionados a estabilidade e função dos modelos proteicos.
5. Estabelecer um painel da estrutura, modulação e aspectos funcionais de proteínas atuantes na síntese de osmoprotetores do feijão-caupi.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Classificação, aspectos biológicos e importância de *Vigna unguiculata*

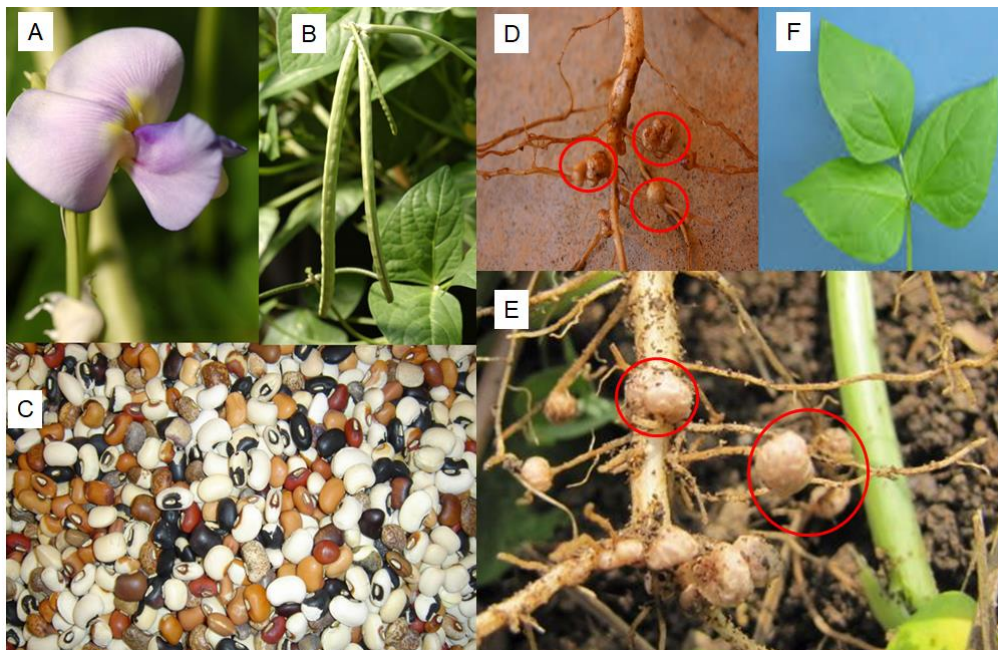
Vigna unguiculata (L.) Walp, é uma espécie representante da família Fabaceae, subfamília Faboideae, tribo Phaseoleae, subtribo Phaseolineae, gênero *Vigna*, seção Catiang (BOUKAR et al., 2019), originalmente domesticada nas regiões tropicais e subtropicais da África (GÓMEZ, 2004), de onde seu cultivo foi disseminado. Sua ampla distribuição por todo o globo fez com que o feijão-caupi pudesse ser cultivado rapidamente em países da América Central, América do Sul e no Sudeste asiático (LEMMA; WORKU; WOLDEMICHAEL, 2009; SINGH; CHAMBLISS; SHARMA, 1997).

As cultivares desta espécie apresentam germinação epigeal, podem crescer de 80 cm a 2 m de altura, a forma das folhas é indispensável tanto na realização das funções biológicas quanto para a diferenciação taxonômica das variedades de feijão-caupi. As folhas estão dispostas de forma trifoliar (Figura 1.F) porém, a depender da cultivar, aspectos como a forma da folha mudará. De acordo com o Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA; <http://genebank.iita.org>), uma das maiores instituições com bancos de germoplasma do feijão-caupi, as folhas desta espécie são classificadas em quatro categorias, sub-globosa, sub-hastato, globosa e hastate/lanceolate (HEUZÉ et al., 2015; POTTORFF et al., 2012).

Algumas cultivares tem a característica de produzir várias flores, nas quais a cor de sua corola se estende de branco amarelado a branco violeta (Figura 1 A). As vagens estão dispostas em pares, formando um V, sendo pendentes e verticais ou eretas (Figura 1.B), contendo cerca 8 a 20 sementes que chegam a pesar entre 80 e 320 mg, de forma arredonda ou em formato de rim. Além disso, podem se diferenciar na textura (lisa, áspera ou amassada), cor (branco, creme, verde, amarelo, vermelho, marrom, preto) e uniformidade (sólida, salpicada ou estampada) (Figura 1.C) (HEUZÉ et al., 2015; SIMION, 2019).

Tendo em vista que a arquitetura do sistema radicular é uma das características importantes presentes em um vegetal, sendo responsável pela aquisição de vários recursos provenientes do solo (LYNCH, 2013; LYNCH; BROWN, 2001), o feijão-caupi detém de um sistema radicular bastante desenvolvido, composto por uma raiz primária e raízes basais, bem como de raízes laterais que se desenvolvem de outras raízes (raízes em forma de torneira, raízes basais e hipocólitos) (LYNCH; VAN BEEM, 1993), Neste contexto, a quantidade e o padrão do ângulo de crescimento das raízes serão variáveis (BASU et al., 2007).

Figura 1. Principais órgãos de *Vigna unguiculata*. (A) flor; (B) vagens; (C) sementes de diferentes cultivares; (D) e (E) raízes com nódulos; (F) folhas



Fontes: OECD (2019); POTTORFF et al. (2012b); SEBIDOS (2015); THE NATIONAL GARDENING ASSOCIATION (2011).

Além de ser potencialmente funcional na captação de nutrientes do substrato, a interação simbiótica que o feijão-caupi exerce com outras bactérias permite a fixação biológica de nitrogênio (BNF), a partir do processo denominado nodulação (Figura 1.D,E), e mesmo que o solo não apresente condições adequadas de cultivo, seu crescimento continua sendo satisfatório (SANGINGA et al., 2003). Além desses atributos, essa espécie colabora para o controle de erosões e para a fertilidade do solo de forma a favorecer o ambiente para o cultivo de outros vegetais (MAGRINI et al., 2016; FOYER et al., 2016), o que a coloca como um componente valioso para a agricultura de subsistência.

O feijão-caupi é um vegetal que apresenta uma rica composição nutricional, sendo considerado como a “carne do homem pobre”, por conter uma quantidade significativa de proteínas, além de minerais, fibras e aminoácidos essenciais (BOUKAR et al., 2019; MURANAKA et al., 2016). A presença de antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados (PUFFA) e polifenóis faz com que o feijão-caupi seja denominado como alimento nutracêutico (PHILLIPS et al., 2003; BAPTISTA et al., 2017).

Mediante os benefícios destacados, juntamente ao seu potencial de suprimento de grãos em condições adversas, seu cultivo se torna interessante para milhões de pessoas, especialmente para países em desenvolvimento localizados nos trópicos (AMORIM et al., 2018).

Atividades como forragem verde, feno, ensilagem, uso como farinha para alimentação animal e, ainda, adubação verde e cobertura do solo, culminaram para a importância socioeconômica desta espécie (ISSA, 2019). Por isso, o feijão-caupi é atualmente uma das leguminosas mais cultivadas no globo, destinada ao comércio nas modalidades de grãos secos, grãos imaturos, como sementes, ou como produto da matéria-prima, impulsionando consideravelmente a economia do país que a cultiva (BORGES et al., 2018).

Segundo dados da FAOSTAT (2019) e da Empresa Nacional de Abastecimento (CONAB, 2018), o feijão-caupi ocupa mundialmente cerca de 10,4 milhões de hectares, distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais da África, América e Ásia (Tabela 1). Porém, no centro do cenário produtivo, Nigéria, Níger e Brasil se destacam como os três principais produtores de feijão-caupi, com a marca de 3.410 kt, 1.959 kt e 749 kt respectivamente. Sua produção desempenha papel expressivo no que se refere a geração de emprego e renda e fortalece a qualidade de vida da população nessas regiões (FREIRE FILHO et al., 2011; SANTOS et al., 2014; TORRES et al., 2015).

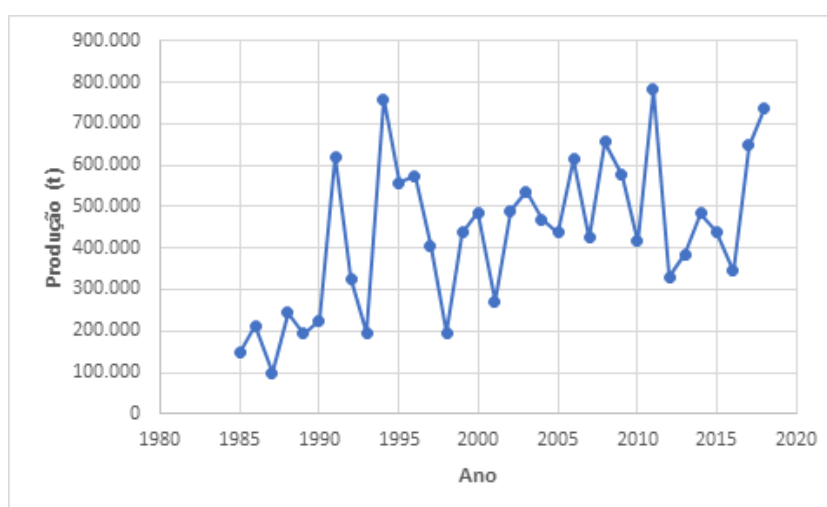
Tabela 1. Produção mundial de feijão-caupi e sua distribuição por continente.

Grão secos, mil toneladas	
Região	Produção
África	7107
Américas	819
Ásia	204
Europa	27
Oceania	(-)
Mundo	8157

Fonte: FAOSTAT (2019); CONAB (2018).

No Brasil, o feijão-caupi é uma espécie tradicionalmente cultivada nas regiões Norte e Nordeste, onde predomina maior parte do seu plantio (LIMA et al., 2012). No entanto, seu cultivo tem sido direcionado também para o Centro-oeste, o que tem resultado em números expressivos quanto a produção anual da cultura (Figura 2).

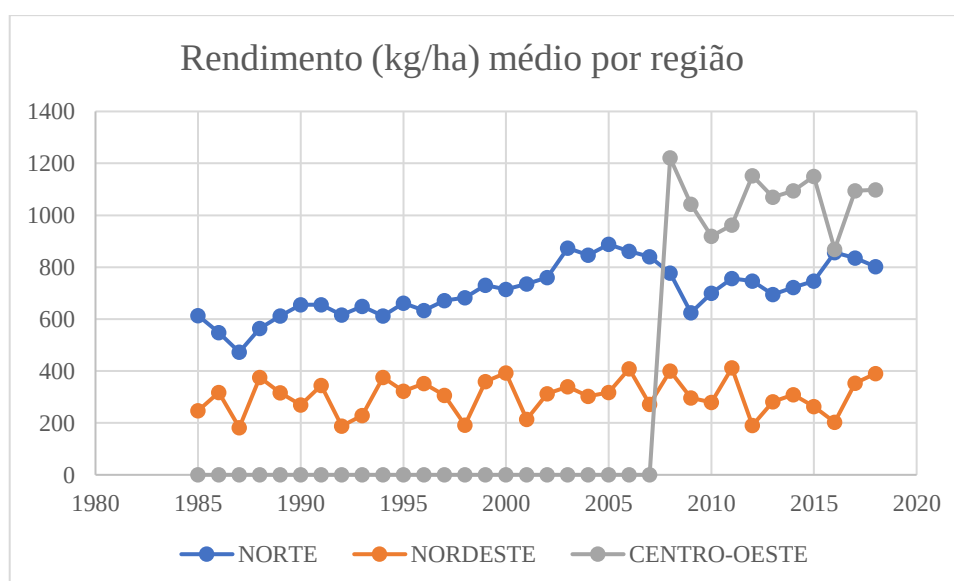
Figura 2. Produção anual de feijão-caupi no Brasil em toneladas, entre os anos de 1985 e 2017



Fonte: (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019).

Partindo do princípio de que o feijão-caupi não apresenta grande dependência de recursos hídricos ou ambientes específicos para o seu cultivo, devido a sua plasticidade fenotípica, a espécie apresenta valor estratégico para a agricultura no Brasil (SINGH, 2006; FREIRE-FILHO et al., 2011). Entretanto, o seu rendimento anual não apresenta uma evolução significativa, exceto na região Centro-oeste, onde o cultivo do feijão-caupi está em expansão (EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO, 2019) (Figura 3).

Figura 3. Produtividade média da cultura do feijão-caupi nas regiões mais produtoras do Brasil



Fonte: EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO (2019).

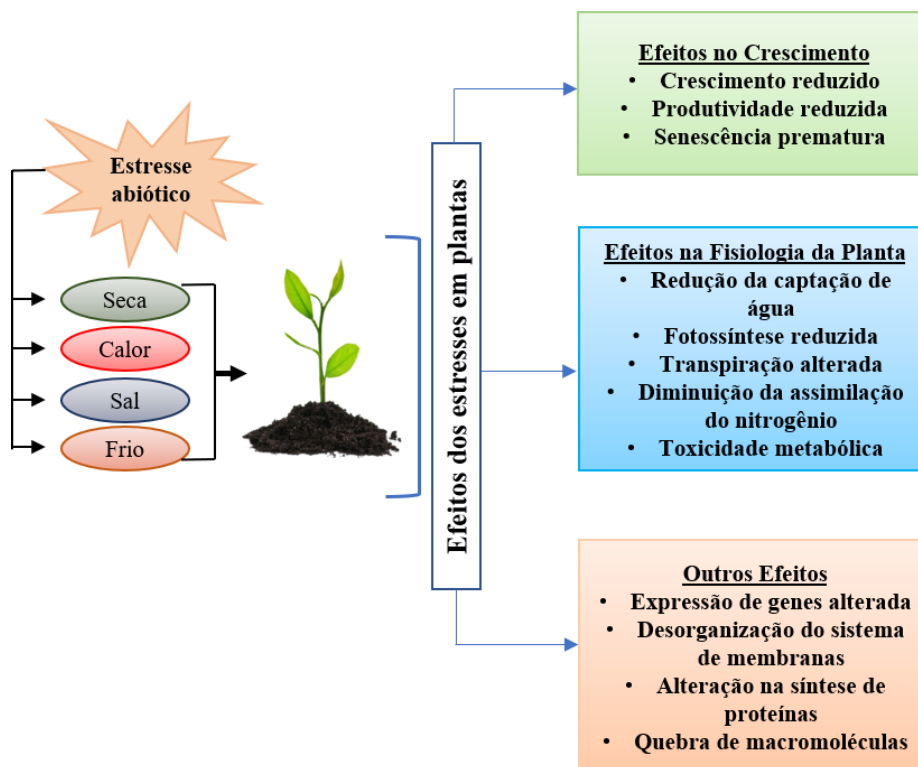
Considerando que a seca é um fator inerente as regiões áridas e semiáridas, o feijão-caupi está constantemente exposto aos efeitos danosos deste tipo de estresse, mesmo sendo uma cultura moderadamente tolerante a tais intempéries (FATOKUN, 2002; ISHIYAKU; ALIYU, 2013). Contudo, programas de melhoramento genético são uma das estratégias viáveis que apoiariam variedades de alto rendimento e bem adaptadas a estas condições, permitindo o cultivo nessas regiões (OLAJIDE; ILORI, 2017).

3.2 Fatores ambientais que interferem na homeostase vegetal

Ao longo da evolução, as plantas são constantemente expostas a condições ambientais desfavoráveis ou estressantes para o seu crescimento e desenvolvimento, sendo essas adversidades divididas em estresses de natureza biótica e abiótica (MADANI; SHEKARI; IMAHORI, 2018).

Os estresses de natureza biótica mediados por organismos vivos, especialmente fungos, vírus, bactérias e nematoides, são os principais responsáveis por causar doenças aos vegetais, infectando diversas partes da planta e ocasionando sintomas deletérios para o organismo. Além disso, esses patógenos são capazes de causar apoptose celular no hospedeiro, podem praticar herbivoria e servir de vetores para a entrada de viroses, que por sua vez, causam lesões locais e danos sistêmicos afetando mecanismos funcionais necessários para o crescimento e desenvolvimento do vegetal (nanismo, clorose e malformações) (SCHUMANN; D'ARCY, 2006).

No que se refere aos estresses abióticos, de forma geral, abrangem tensões dominantes que incluem salinidade, altas e baixas temperaturas, frio, inundações e secas, que constituem fatores limitantes na agricultura (BAGATI; MAHAJAN; NAZIR, 2018). Tais fatores influenciam negativamente na quantidade e qualidade de diversas culturas de interesse agrícola, diminuindo o rendimento das plantas cultivadas em até 70 % (BRAY, 2000; KAUR et al., 2008; THAKUR et al., 2010). Os efeitos nas plantas trazidos por fatores abióticos são diversos, interferindo no crescimento, na fisiologia, e em outros aspectos do vegetal (Figura 4).

Figura 4 Estresses abióticos e respostas ao estresse em plantas

Fonte: Adaptado de BAGATI; MAHAJAN; NAZIR (2018)

Mesmo apresentando um amplo potencial adaptativo a diversas condições ambientais, a produção do feijão-caupi é constantemente limitada por tensões abióticas (DUTRA et al., 2015; MATOS FILHO et al., 2009; SOUZA et al., 2016). A produtividade do sistema agrícola e ecológico depende de uma série de fatores, especialmente da capacidade da planta em tolerar esses estresses, e com o aumento das mudanças climáticas, as tensões são naturalmente fortalecidas e eventos como a seca são constantemente intensificados (ZHANG; LI; ZHU, 2018). Ainda que algumas cultivares apresentem níveis de tolerância distintos com relação aos estresses abióticos, a ausência de recursos hídricos é um fator altamente limitante, principalmente para plantas cultivadas em regiões áridas e semiáridas, que são caracterizadas por períodos de chuvas intensas e um longo período de estiagem (BRITO, 2012).

Diante do exposto, fica evidente que as mudanças climáticas globais e a taxa sem precedentes do surgimento de doenças infecciosas representam grandes problemas ecológicos e agrícolas que influenciam no declínio da taxa de produção de diversas espécies vegetais (ROHR et al., 2011). No que se refere aos agentes patogênicos, os vírus são uma das principais causas de perda de produtividade em todo o mundo, sendo observadas em todos os tipos de plantas com sintomas variáveis (YAMAJI et al., 2012).

3.2.1 Víruses que infectam o feijão-caupi no Brasil

No que se refere as viroses que acometem o feijão-caupi no Brasil, os danos ocasionados pelo *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) e *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) podem ser significativos a depender da cultivar plantada, bem como da época do ano que predomina o seu aparecimento. Ocorrendo a infecção, as perdas podem chegar a mais de 75 % nas lavouras (BOOKER et al., 2005).

O vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV) é um representante da família *Comoviridae*, do gênero *Comovirus*, que geralmente acomete plantas do Caribe, América e África. No Brasil, ele foi relatado primeiramente por Oliveira (1947) no Rio Grande do Sul e, desde então, se disseminou por todo o Brasil, alcançando praticamente todos os estados produtores de feijão-caupi localizados nas regiões Norte e Nordeste (LIMA et al., 2005).

Com sua presença verificada em várias leguminosas, o CPSMV pode infectar o hospedeiro através da transmissão por coleópteros, com destaque para espécies da família *Crysomelidae*. Em geral, os sintomas que aparecem em plantas infectadas são severos, expressos em bolhosidades no limbo foliar, subdesenvolvimento das nervuras principais ocasionando enrugamento e redução do limbo, intenso nanismo, e desta forma, limitando a produção de determinada cultivar (MATTHEWS, HULL, 2002; PIO-RIBEIRO et al., 2005).

Por sua vez, o CABMV pertence ao gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*, e infecta células parenquimatosas do hospedeiro, podendo ser transmitido facilmente por inoculação mecânica via extrato de planta infectado ou naturalmente através de insetos vetores, como *Aphis gossypii*, que infecta células parenquimatosas. Após infectadas, as plantas exibem diversos sintomas como: formação de mosaico, deformação foliar, inchaço e espessamento e endurecimento do pericarpo (NARITA, 2007; OLIVEIRA et al., 2013). Além disso, a área foliar do vegetal é reduzida, interferindo diretamente na taxa fotossintetizante do hospedeiro e influenciando na formação e no desenvolvimento do fruto, espessamento e enrijecimento do pericarpo e redução do conteúdo da cavidade pulpar, estão entre os danos que podem aparecer no fruto, tornando a espécie depreciada e indesejada no cenário comercial (NASCIMENTO et al., 2006).

Dentre as espécies vegetais que podem servir como hospedeiras estão representantes da família Passifloraceae e Fabaceae, além de casos pontuais de outras famílias, a exemplo de *Arachis hypogea* L., *Glycine max* L., e certas variedades de feijão (*Phaseolus vulgaris* L. e *V. unguiculata*) (BARROS et al., 2007; NARITA, 2007).

3.2.2 Deficiência hídrica e seus efeitos subjacentes

Estresses abióticos são responsáveis por ocasionar várias tensões biológicas ao vegetal, sendo a seca uma das principais tensões. O impacto da deficiência de recursos hídricos no cultivo de plantas tem sido evidenciado ao longo dos anos. Em 2012, por exemplo, o fenômeno climático La Niña impulsionou a seca norte-americana, reduzindo em 30 % a produção do milho nos EUA (BOYER et al., 2013). No sul da China, em 2015, uma forte onda de calor acarretou em danos consideráveis que reduziram a produção primária bruta (YUAN et al., 2016).

Dependendo da severidade e do tempo da deficiência hídrica, o estresse pode ocasionar a desidratação ou dessecação de órgãos específicos ou na planta como um todo (ZHANG; BARTELS, 2018). A desidratação pode alterar aspectos fisiológicos e bioquímicos influenciando na taxa de fotossíntese e no equilíbrio osmótico e oxidativo das células, danificando quantitativamente e qualitativamente a colheita (CHAKRABORTY; DUTTA; CHAKRABORTY, 2002; RAO; CHAITANYA, 2016; SINGH et al., 2015; UPADHYAYA; PANDA, 2004; UPADHYAYA; PANDA; DUTTA, 2008).

De acordo com Larcher (2000), o organismo passa por fases características durante o estresse. A fase de resposta, retrata o início do estresse, ocorrendo um desvio na condição favorável. A fase de restituição é caracterizada como o estágio de resistência, na qual o organismo tenta se adaptar ao estresse, e dependendo da duração do estresse, seu prolongamento leva o vegetal a entrar na fase final, estando debilitado o suficiente para ser acometido por outras adversidades, causando sua morte prematura. Caso não haja o prolongamento do estresse, o vegetal entra na fase de regeneração, na qual suas funções biológicas são estabelecidas parcialmente ou por completo.

Estresses abióticos primários, como a seca, acarretam tensões secundárias, como o estresse oxidativo (CARVALHO; AMÂNCIO, 2019). A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em proporções adequadas está relacionada a processos importantes, que envolvem funções biológicas relevantes no metabolismo, na geração de energia por adenosina trifosfato (ATP), na fertilização, ativação de genes e no mecanismo de defesa do organismo (DIETZ, 2008; GAPPER; DOLAN, 2006). Entretanto, durante o estresse hídrico pode ocorrer uma produção exacerbada de radicais livres, conduzindo danos oxidativos aos componentes celulares, como o DNA, RNA, proteínas e lipídios, acarretando na morte celular (FANG; XIONG, 2015; HUSSAIN et al., 2019).

Além da quebra do equilíbrio redox das plantas, a escassez de água também promove o estresse osmótico, caracterizado como uma tensão secundária e um sinal primário ocasionado

pela seca (ZHU, 2016). Neste período, a ausência hídrica ocasiona a mudança de volume nas células, o mesmo altera o potencial de pressão (que equivale ao turgor) e o potencial osmótico (concentração). Essas alterações acarretam em danos nas membranas e em vários outros componentes da célula (SOPORY, 2019).

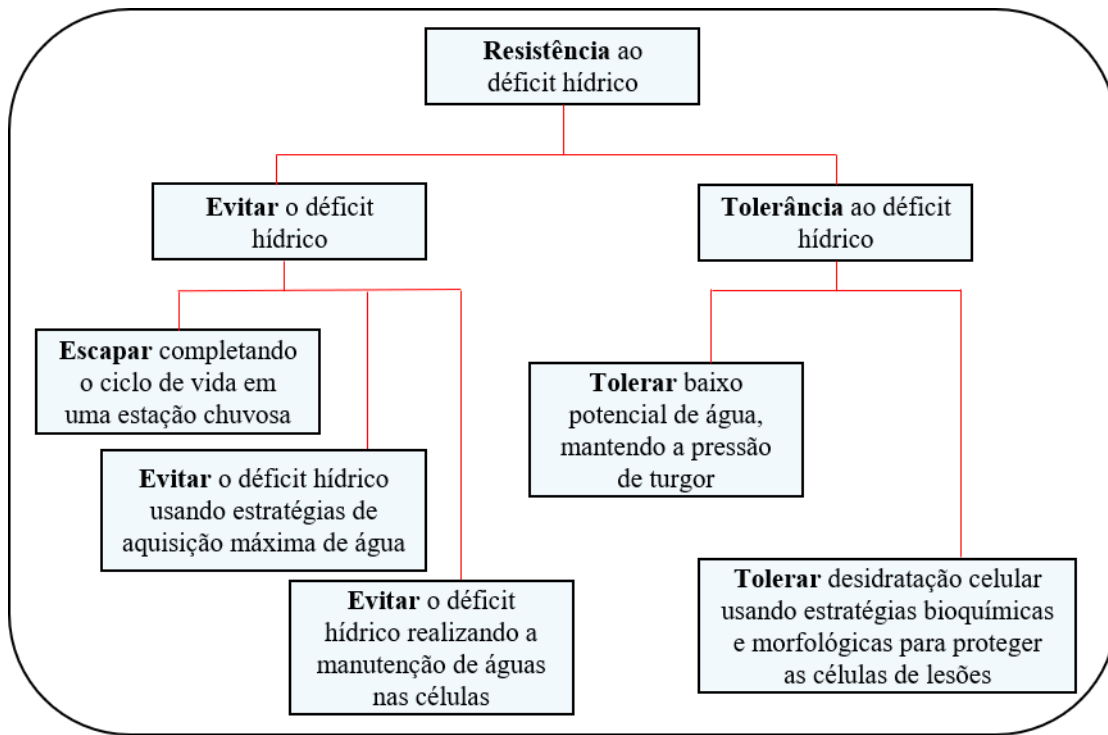
No cenário atual, as mudanças climáticas induzidas pelo efeito estufa influenciam nos padrões de temperatura e precipitação, aumentando globalmente as condições severas de seca (MIYAN, 2015), e consequentemente, acarretando em diversas tensões que ameaçam várias culturas agrícolas, entre elas, o feijão-caupi. Contudo, frente a esses estresses, os vegetais desenvolveram e aprimoraram ao longo do seu processo evolutivo mecanismos para tolerar e se adaptar a esses ambientes com poucos recursos hídricos (BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995; DAI, 2013).

3.3 Mecanismos de tolerância ao estresse hídrico

As plantas expostas a várias condições estressantes desencadeiam uma rede de resposta às mudanças adversas em seu ambiente. A princípio, uma cascata de eventos é iniciada, envolvendo várias mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo das plantas com o intuito de combater e adaptar-se à situação de estresse, mantendo a homeostase (HASEGAWA; BRESSAN, 2000; HAZEN; WU; KREPS, 2003; SHAO et al., 2007; AGRAWAL et al., 2011).

Tendo em vista que a raiz é o principal órgão de captação e reserva de água, ela se torna o primeiro órgão a sofrer e perceber os efeitos da deficiência hídrica, tornando-a importante ferramenta para a tolerância ao estresse (ABOBATTA, 2019). Estes efeitos danosos podem posteriormente se alastrar para outros órgãos do vegetal ou serem sessados antes mesmo de afetar outras partes do vegetal.

Em situações mais severas, onde o ambiente é predominantemente seco, os vegetais dispõem de estratégias que possibilitam a evasão, o retardo ou a tolerância ao estresse (Figura 5), mantendo as taxas de perda de captação de água equilibradas (DODD; RYAN, 2016; VERSLUES et al., 2006). Na evasão do estresse, espécies com o ciclo de vida curto conseguem escapar dos danos ocasionados pela seca. Por outro lado, algumas espécies precisam utilizar mecanismos de dormência, impedindo a germinação até que o solo esteja apto para tal processo (IZANLOO et al., 2008).

Figura 5 Estratégias de resistência ao déficit hídrico

Fonte: DODD; RYAN (2016).

O retardo ou prevenção corresponde a plantas que utilizam de seu sistema radicular bem desenvolvido para aumentar a captação de água pelo solo para posterior armazenamento no tecido vegetal, plantas conhecidas como suculentas são um exemplo de espécies que empregam esse tipo de estratégia (DODD; RYAN, 2016). O fechamento estomático de forma precoce também se caracteriza como uma estratégia de prevenção da planta para manter o potencial hídrico próximo ao de condições fisiológicas normais (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Com o aumento da severidade do estresse, as plantas dificilmente conseguem manter o potencial hídrico ideal para a sua sobrevivência, bem como o equilíbrio osmótico e a produção de (ROS), que são alterados consideravelmente. Contudo, as plantas tolerantes a seca utilizam estratégias de ajuste osmótico, além da produção de moléculas que estabilizam proteínas, diminuindo e/ou impedindo a oxidação de lipídios e outros componentes celulares (SAKHILISAR; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, 2016).

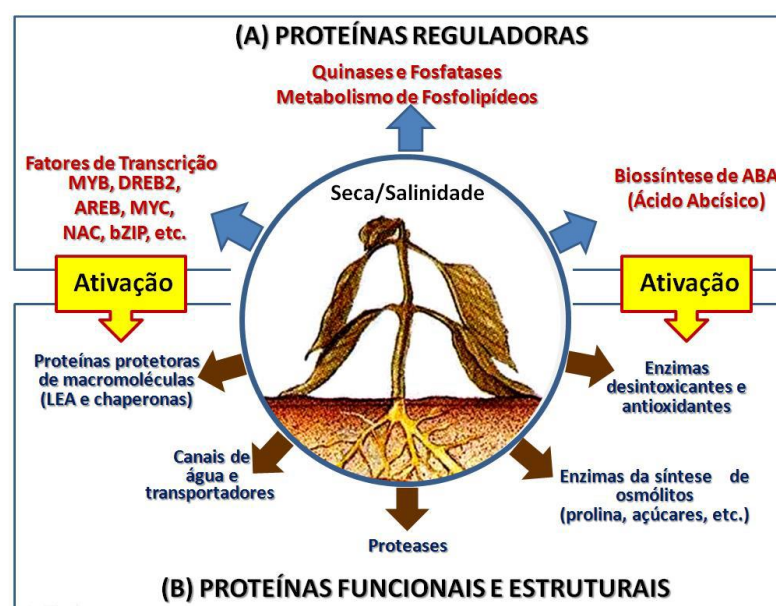
Para a aquisição de uma resposta evasiva ou de tolerância ao estresse por déficit hídrico, as plantas necessitam de mecanismos que só são acessados a partir da expressão diferencial de genes específicos atuantes nesse processo (SMIRNOFF, 2014). A nível genômico, essas respostas moleculares conferem uma intensa regulação de múltiplas transduções de sinais, afim de ativar a rede de resposta para a sobrevivência do vegetal (TRIPATHY et al., 2019).

A regulação desta rede de sinais tem como maior enfoque a regulação transcricional, envolvida em modificações e remodelações da cromatina, e recrutamento de elementos cis regulatórios, que estão próximos a regiões codificadoras de genes e estão intimamente relacionados a um grupo de proteínas denominadas fatores de transcrição (FTs) (KUMAR et al., 2018).

A partir do desenvolvimento de diversos estudos fisiológicos e/ou moleculares foi possível realizar a categorização de dois grupos de proteínas codificadas por genes envolvidos na resposta ao estresse hídrico, as proteínas reguladoras e as funcionais (Figura 6). As proteínas regulatórias, assim como os FTs, são atuantes na orquestração molecular, induzindo ou reprimindo moléculas. Este grupo também compreende quinases, fosfatases, ácido abscísico (ABA) e elementos regulatórios (SEKI et al., 2002; ROYCHOUDHURY; DATTA; DATTA, 2011; BENKO-ISEPPON et al., 2011).

Por sua vez, as proteínas funcionais estão envolvidas diretamente na resposta ao estresse e este grupo compreende proteínas antioxidantes e desintoxicantes, bem como enzimas que participam da síntese de osmólitos compatíveis. Essas proteínas são algumas das mais importantes a participar da maquinaria contra os efeitos danosos do ambiente, em especial salinidade e seca (REIS et al., 2012).

Figura 6. Principais grupos de genes envolvidos na resposta a estresses abióticos, como seca e salinidade. (A) proteínas envolvidas na cascata de sinalização, (B) proteínas funcionais, envolvidas diretamente na resposta ao estresse.



Fonte: BENKO-ISEPPON et al. (2011)

A rede de sinais que são regulados para serrar diretamente os danos oxidativos na célula recrutam genes que induzem a atividade de enzimas antioxidantes, como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX) e glutathione redutase (GR), que apresentam um papel significativo na eliminação de ROS produzidas como consequência do estresse (KAVAS et al., 2013; SHI et al., 2014; YANG et al., 2017), convertendo-as em sua forma estável (ZUO; ZHANG, 2011). Outro importante recurso induzido pela cascata de sinalização são genes que codificam proteínas sintetizadoras de osmoprotetores, que são moléculas de grande importância para a sobrevivência do vegetal, além de alguns osmólitos atuarem como elementos antioxidantes (SERRAJ; SINCLAIR, 2002).

Os osmoprotetores também atuam impedindo lesões em membranas, estabilizando proteínas, e principalmente, regulando o ajuste osmótico celular. Dessa forma, o meio hídrico é regulado entre o interior e o exterior da célula, equilibrando o potencial de turgor, e o seu acúmulo inturgesce a célula, impedindo o escape de água e ofertando mais tempo de vida as células até o vegetal retornar ao seu estado de homeostase (ALVES; SETTER, 2004; BOHNERT; JENSEN, 1996; HARE; CRESS; VAN STADEN, 1998). Adicionalmente, possuem a função de minimizar ou evitar a desidratação no interior das células, apresentando eficácia na aquisição de tolerância em condições de extremo estresse osmótico. Portanto, essas moléculas figuram como importantes alvos biotecnológicos, e seu entendimento é essencial para a produção de organismos melhorados e tolerantes a diversos estresses abióticos (CLAUSSEN, 2005).

3.4 Osmoprotetores

De forma geral, osmoprotetores são compostos orgânicos pequenos, eletricamente neutros e altamente solúveis, com baixa toxicidade. Podem se acumular em grandes quantidades nas células, equilibrando o meio intracelular com o ambiente externo quando em uma condição osmótica desfavorável. Devido à sua alta solubilidade e pouca interferência nas vias metabólicas celulares, eles também são conhecidos como solutos (AHN; PARK; PARK, 2011).

Essas moléculas funcionais fornecem várias adaptações no meio celular como resposta a imposição de diversos estresses ambientais, sendo responsáveis por aumentar as chances de sobrevivência de um determinado organismo. Isso ocorre principalmente em condições de seca e salinidade, em que ambos os estresses proporcionam desequilíbrio osmótico, onde estes solutos são expressivamente atuantes (TIWARI et al., 2010; LANG, 2007). Diversos estudos relatam a sua eficácia em condições distintas de déficit hídrico (FILIPPOU et al., 2014; LI et al., 2012; PARIDA et al., 2008; SHAHBAZ et al., 2013).

Os osmoprotetores podem ser classificados em três categorias: aminoácidos (prolina, ectoína), compostos de amônia (glicina-betaína, poliaminas, b-alanina betaína) e açúcares e açúcares polióis (trealose, mio-inositol, sorbitol, manitol, frutano) (ASHRAF; FOOLAD, 2007), e todos desempenham papéis cruciais na resposta ao estresse abiótico, impulsionando a produção agrícola de determinada cultivar (JAIN, 2013; REGUERA; PELEG; BLUMWALD, 2012).

3.4.1 Prolina

A prolina é considerada um soluto compatível que responde a várias tensões relacionadas a osmose em grande parte dos vegetais. O acúmulo deste aminoácido é realizado durante tensões abióticas, como seca, salinidade, baixa temperatura, entre outros. A prolina confere múltiplas funções no que se refere a seca, contribuindo na manutenção do nível osmótico na célula, além de regular intracelularmente o potencial redox (REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014; PINTÓ-MARIJUAN; MUNNÉ-BOSCH, 2013).

Quanto a sua biossíntese, foi delineada primeiramente em *Escherichia coli* (VOGEL; DAVIS, 1952), porém, no que refere as plantas, existem duas vias pelas quais é possível sintetizar a prolina, a do glutamato e a da ornitina. Quando se trata de estresse osmótico, a sua principal via é a do glutamato (GUAN et al., 2020).

Inicialmente, a síntese da prolina é realizada em regiões cloroplastidiais, bem como de forma livre no citoplasma, onde estão localizadas as enzimas atuantes em sua síntese (SENGUPTA et al., 2016), e o início deste processo ocorre a partir do ácido glutâmico. A realização deste processo requer a participação de algumas enzimas que catalisam a reação. A delta1-pirrolina-5-carboxilato-sintase (P5CS) é a enzima que catalisa a primeira reação, sendo responsável pela conversão do glutamato em delta-1-pirrolina 5-carboxilato (P5C) (LIANG et al., 2013). Reações como essa são limitantes para a síntese da prolina, caracterizando o gene P5CS de grande importância para a tolerância ao estresse (WANG et al., 2017).

Em seguida, a enzima delta1-pirrolina-5-carboxilato-redutase (P5CR) catalisa a segunda reação convertendo P5C em prolina, codificada por um único gene, o P5CR (ARMENGAUD et al., 2004). Por sua vez, o gene P5CS é codificado pelos genes P5CS1 e P5CS2, além de ser regulado epigeneticamente por vários fatores, como o ácido abscísico ABA (Figura 7b) (ÁBRAHÁM et al., 2003; KESARI et al., 2012; ZHANG et al., 2013).

O acúmulo de prolina está intimamente relacionado a resposta ao estresse osmótico, sendo derivado de fatores abióticos como seca, salinidade e baixas temperaturas (BOHNERT; NELSON; JENSEN, 1995). Especificamente em seca, a síntese de prolina já foi relatada como

precursora de tolerância nos transgênicos *Glycine max* (DE RONDE et al., 2004), *Petunia hybrida* (YAMADA et al., 2005), *Cicer arietinum* (BHATNAGAR-MATHUR et al., 2009) e *Triticum aestivum* (VENDRUSCOLO et al., 2007).

A atuação dos genes que codificam as enzimas catalisadoras da biossíntese de prolina (P5CS e P5CR) tem se mostrado eficiente na tolerância de organismos a determinadas condições ambientais (HONGBO; ZONGSUO; MINGAN, 2006; MOLINARI et al., 2007). De acordo com Uchida et al. (2002), o gene P5CS apresentou expressão elevada em arroz, quando tratado com H₂O₂. P5CR e P5CS foram regulados positivamente em *Brassica napus* sob tratamento com sal e ABA (XUE; LIU; HUA, 2009).

Além disso, foi observada que a expressão de P5CS leva ao aumento no nível de prolina e a uma melhor tolerância no tabaco (KAVI KISHOR; SREENIVASULU, 2014) e no trigo (VENDRUSCOLO et al., 2007). Recentemente, Dudziak e colaboradores (2019) induziram o estresse osmótico expondo sementes de trigo ao polietileno glicol (PEG), no qual foi possível observar a rápida resposta do vegetal, que refletiu na superexpressão imediata de P5CS e P5CR após 3 horas de estresse. Os autores concluíram que o principal mecanismo subjacente a biossíntese de prolina em resposta a seca é a regulação a nível transcricional.

3.4.2 Glicina-Betaina

A glicina-betaina (GB) é um dos osmólitos extensivamente estudados para aquisição de tolerância a estresses abióticos (CHEN; MURATA, 2002, 2008, 2011). Caracterizado como um composto amônio-quaternário (QAC) não tóxico para as células (CLELAND et al., 2004; MCDONNELL; JONES, 1988), pode ser encontrado em vários organismos, incluindo bactérias, plantas e até animais superiores (PRASAD; PARDHA SARADHI, 2004).

O acúmulo de GB confere diversas funções nos vegetais em condições fisiológicas normais, bem como em situações de estresses abióticos (GIRI, 2011; MASOOD et al., 2015; YANG et al., 2008). Durante a perda de água proveniente de estresses como seca e salinidade, GB atua equilibrando o meio osmótico, melhorando o estado de água no tecido e protegendo membranas biológicas de danos oxidativos (CHEN; MURATA, 2011).

A depender do seu precursor, a biossíntese de GB pode sofrer variações (SAKAMOTO; MURATA, 2000). Em plantas, o processo de síntese ocorre em duas etapas, a partir da oxidação da colina. Na primeira etapa, a colina é catalisada pela enzima colina monooxigenase (CMO) dependente de Fe, que contém o motivo de ligação Rieske, característico de enzimas oxigenases (BROUQUISSE et al., 1989; BURNET; LAFONTAINE; HANSON, 1995; RATHINASABAPATHI et al., 1997). Já a segunda etapa é mediada pela enzima betaina

aldeído desidrogenase (BADH), uma desidrogenase dependente NAD⁺ (FITZGERALD; WATERS; HENRY, 2009; WOOD et al., 1996), que converte aldeído de betaína em glicina-betaína (Figura 7a).

A atuação de genes como CMO e BADH é indispensável para a síntese de GB. Em estudos anteriores, estes genes apresentaram indução em diversos estresses abióticos, como salinidade (MCCUE; HANSON, 1992), estresse térmico (MITSUYA et al., 2011), frio (XING; RAJASHEKAR, 2001) e seca (LI et al., 2016; RUSSELL; RATHINASABAPATHI; HANSON, 1998). Além disso, foi verificado que o acúmulo de GB a partir da inserção do gene BADH pode melhorar ou facilitar a fotossíntese de vegetais sob estresse hídrico, protegendo componentes e funções essenciais da membrana do tilacóide (BAKER, 2008; ZHAO et al., 2007).

3.4.3 Mio-inositol

Conhecido por ser um hexitol de seis ciclos de ciclohexano, o mio-inositol é um estereoisômero entre os nove existentes na natureza. O metabolismo do inositol é importante para diversas funções relacionadas ao crescimento e desenvolvimento vegetal, como também para a formação da membrana e biogênese da parede celular (LACKEY et al., 2003; DASTIDAR et al., 2006), figurando como precursor e substrato para muitos compostos contendo inositol, incluindo fosfoinositídeos e fosfatos de inositol, além de oligossacarídeos da família rafinose (ORP), que se acumulam em plantas durante condições estressantes (PETERS et al., 2007).

A síntese do mio-inositol ocorre em duas etapas. No primeiro momento, L-myo-inositol 1-fosfato sintase (MIPS) converte D-glicose 6-fosfato em L-mio-inositol 1-fosfato. Em seguida, L-mio-inositol 1-fosfato é desfosforilado para a formação do mio-inositol em sua forma livre, esta reação ocorre a partir da enzima L-Myoinositol 1-fosfato dependente de Mg⁺⁺ fosfatase (IMP) (Figura 7c) (LOEWUS; LOEWUS, 1983; LOEWUS; MURTHY, 2000).

A superexpressão dos genes MIPS e IMP conferiu tolerância em espécies submetidas a estresses abióticos e alguns estudos exploraram o potencial destes genes em exemplares transgênicos. Zhai e colaboradores (2016) observaram que a batata doce (*Ipomoea batatas*) transformada com o gene IbMIPS1 apresentou tolerância a seca e salinidade. O gene que codifica IMP e o cDNA correspondente foram isolados e clonados do grão de bico (CaIMP), este foi testado quanto a sua função em mutantes de *Arabidopsis*, sendo observado melhora na tolerância ao estresse abiótico durante a germinação e o crescimento de mudas, enquanto que

em *Arabidopsis* com deficiência de IMP foi verificado que o mesmo aumentou a sensibilidade ao estresse nas mesmas condições (SAXENA et al., 2013).

Além da função osmoprotetora, o mio-inositol possui papel importante na germinação das sementes, nutrição mineral, transporte de açúcar, metabolismo de carboidratos, formação da parede celular, entre outros (STYER, 2000), o que torna evidente a importância do estudo deste osmólito para a geração de plantas transgênicas tolerantes a estresses abióticos ou outras adversidades.

3.4.4 Trealose

A trealose é um composto não redutor de dissacarídeo com duas moléculas de glicose, podendo ser encontrado em todos os organismos, exceto em vertebrados (ELBEIN, 1974). Em vegetais, este açúcar é detentor de funções importantes frente a estresses vegetais, principalmente em plantas sob desidratação (ALI; ASHRAF, 2011; DUMAN et al., 2011; GARCIA et al., 1997). Sua primeira descrição ocorreu em *Myrothamnus flabellifolius* (DRENNAN et al., 1993) e *Selaginella tamariscina* (LIU; CHIEN; LIN, 2008), consideradas plantas de ressurreição.

Como um composto osmoprotetor, a trealose possui a capacidade de estabilizar proteínas e membranas lipídicas desidratadas (FERNANDEZ et al., 2010). Adicionalmente, apresenta-se como uma molécula sinalizadora, com características antioxidantes, bem como possui papel como elicitadora para outros genes envolvidos na desintoxicação e resposta a estresses (BAE et al., 2005). Este osmólito possui a capacidade de alterar o nível de expressão gênica de fatores de transcrição, participar de modificações da parede celular e do metabolismo do nitrogênio (ACOSTA-PERES et al., 2020) e ser utilizado como fonte de energia para alguns organismos (LÓPEZ-GÓMEZ; LLUCH, 2012).

Considerando seu papel no que se refere a estresses abióticos, a trealose vem sendo amplamente estudada (GARG et al., 2002; TANG et al., 2018; WANG; OUYANG; WANG, 2019; ACOSTA-PERES et al., 2020), especialmente acerca da indução de genes que codificam enzimas da sua síntese. TPS é o gene que codifica a enzima trealose 6-fosfato sintase e possui o papel de catalisar a formação de trealose-6-fosfato (T6P) a partir de UDP-glicose e glicose-6-fosfato. Em seguida, T6P é desfosforilado pela trealose-6-fosfato fosfatase, codificada pelo gene (TPP), formando a trealose livre (Figura 7c) (WINGLER, 2002).

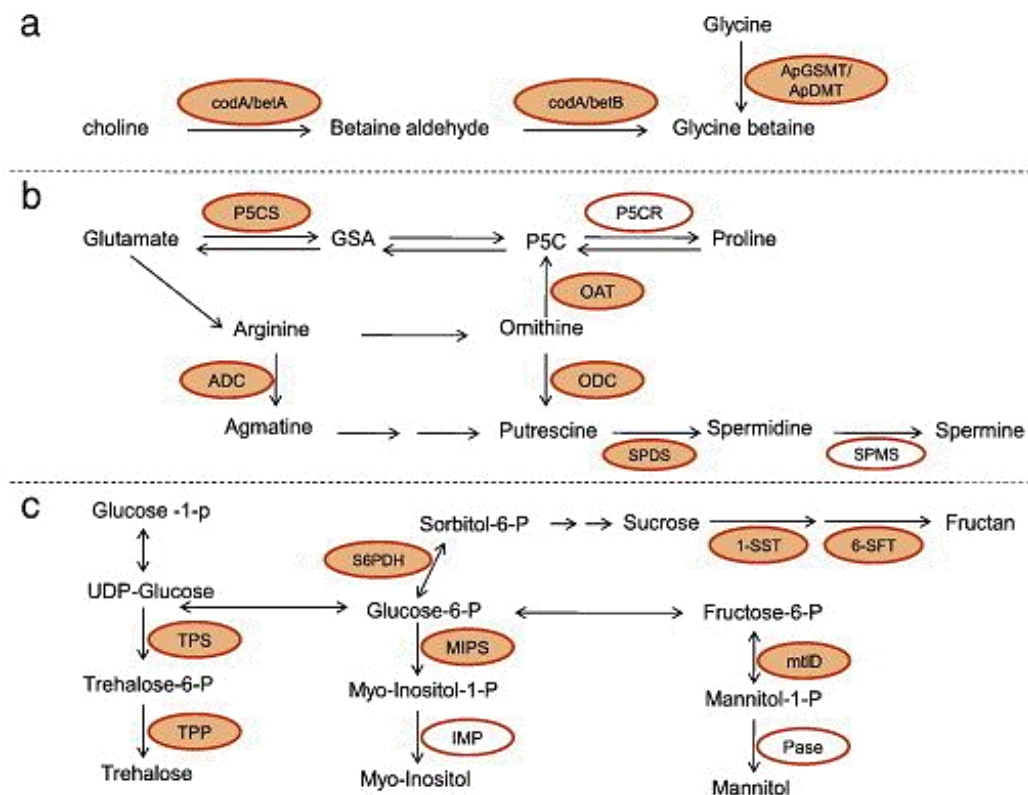
A expressão do gene TPS1 em batata, tabaco e milho ocasionou um acúmulo maior de trealose, e conseqüentemente, conferiu tolerância ao estresse por desidratação (LEE et al., 2003; KONDRÁK et al., 2012; LIU et al., 2015). Resultados semelhantes foram observados para o

gene TPS1 de *Arabidopsis*, *Gossypium* e *Oryza sativa*, que aumentou a tolerância destes vegetais à seca, frio e salinidade, (AVONCE et al., 2004; LI et al., 2011; WANG et al., 2016b).

No que se refere ao gene TPP, estudos como o de Nuccio e colaboradores (2015), em arroz, demonstraram que a indução de TPP1 melhorou a tolerância à desidratação. Em *Arabidopsis thaliana*, o gene AtTPPD foi superexpresso preferencialmente em raízes sob condições de estresse salino, melhorando a tolerância do vegetal e confirmando a eficiência de TPP frente a esse tipo de estresse (KRASENSKY et al., 2014).

A investigação dos mecanismos moleculares dos genes TPS e TPP é essencial para ampliar o conhecimento e entendimento de estratégias contra adversidades ambientais, bem como sua aplicação na engenharia genética poderá auxiliar no desenvolvimento de espécies tolerantes a diversos estresses (ABDELGAWAD; KHALLAL, 2014; WANG; OUYANG; WANG, 2019).

Figura 7 Visão geral esquemática das vias de biossíntese. (a) glicina betaína, (b) prolina e (c) metabolismo dos açúcares



Fonte: KHAN; AHMAD; KHAN, (2015).

3.5 Bioinformática aplicada as ômicas

As ômicas se apresentam como uma área da biologia molecular que possui a capacidade holística no contexto da célula, tecido ou organismo, sendo responsável por integrar dados de genes (genômica), transcritos (transcriptômica), proteínas (proteômica) e metabólitos (metabolômica) em uma amostra biológica, de forma a compreender amplamente sistemas biológicos complexos. No entanto, as ômicas continuam se expandindo, e recentemente, conseguem abranger também a investigação sobre a organização da cromatina por abordagens de epigenoma (BOKSZCZANIN et al., 2015; BENKO-ISEPPON et al., 2017; MEENA et al., 2017; VAILATI-RIBONI; PALOMBO; LOOR, 2017).

Com a evolução da biologia molecular e das tecnologias de sequenciamento, o aumento no volume de dados foi inevitável. Tendo em vista a quantidade de dados que precisam ser armazenados, recuperados, processados, anotados e validados, o conhecimento abrangente sobre ferramentas de bioinformática se torna cada vez mais indispensável (YADAV, 2015). Tida como um dos principais pilares para a análise e interpretação dos dados ômicos, a bioinformática engloba novas estatísticas, métodos, algoritmos e implementações de *software*, e juntamente com os avanços na computação de alto desempenho, têm contribuído para a aceleração do desenvolvimento biotecnológico (DE CARVALHO et al., 2019).

De forma geral, a bioinformática é definida como o emprego de ferramentas computacionais com o intuito de desvendar problemas biológicos, na qual várias áreas de conhecimento estão envolvidas (VERLI, 2014). As ferramentas computacionais permitem desvendar *in silico* a estruturas de proteínas, genes e sequências, entre outros aparatos do sistema biológico de um determinado organismo (KAUFMAN, 2004).

A bioinformática associada as abordagens ômicas trouxe uma mudança de paradigma na pesquisa relacionada ao comportamento das plantas no que se refere a várias perturbações ambientais e ampliou consideravelmente o conhecimento sobre diversos aspectos relacionados à tolerância aos estresses abióticos e bióticos (BAGATI; MAHAJAN; NAZIR, 2018). Além disso, proporcionou redução no tempo e nos esforços financeiros para a geração de dados globais, bem como trouxe novas oportunidades e desafios para biólogos e profissionais de diversas áreas (MISRA et al., 2019; HASIN; SELDIN; LUISIS, 2017).

3.6 Sequenciamento NGS e análise de dados transcriptômicos

O surgimento de técnicas de sequenciamento foi essencial na análise genômica de diversos organismos. Sanger; Nicklen e Coulson (1977) foram os primeiros a desenvolver este tipo de tecnologia. Entretanto, as primeiras análises de sequenciamento apresentavam

limitações com relação ao tempo de desenvolvimento, precisão e custo benefício (LIU et al., 2012). Pensando nestas limitações e na melhoria das pesquisas de doenças humanas, novas tecnologias com produtividade aprimorada e baixo custo foram desenvolvidas, conhecidas como “*Next Generation Sequencing* (NGS) ”ou“ Tecnologias de sequenciamento de alto rendimento”, modificando o paradigma no campo dos diagnósticos clínicos (MARDIS, 2011; HAIMOVICH, 2011; WADAPURKAR; VYAS, 2018).

O sequenciamento NGS é responsável por realizar uma análise massiva e robusta relacionada a alta taxa de transferência de amostras, características que o destacam entre as demais técnicas de sequenciamento desenvolvidas (OKONIEWSKI; MILLER, 2006). Comparado a metodologia de *microarrays* de DNA, o Sequenciamento de RNA (RNA-Seq), confere menos ruído de fundo, maior faixa de dinâmica para detecção, além de revelar diretamente a identidade da sequência, característica essencial para a análise de genes desconhecidos e novas isoformas transcricionais, sendo uma tecnologia com alto nível de reprodutibilidade e que permite a análise e visualização de um grande conjunto de dados a partir de ferramentas computacionais (HRDLICKOVA; TOLOUE; TIAN, 2017; AGARWAL et al., 2010). Tendo em vista a evolução deste tipo de técnica em conjunto com a grande demanda de estudos transcriptômicos (ABDEL-GHANY et al., 2016; WANG et al., 2016a), o RNA-Seq tem sido uma abordagem extensivamente utilizada atualmente para detecção e quantificação de perfis de transcrição conhecidos e novos (HRDLICKOVA; TOLOUE; TIAN, 2017).

A transcriptômica é uma área das ômicas que abrange o conjunto completo de transcritos (mRNAs) de um organismo durante situações pontuais (células e tecidos em diferentes estágios de desenvolvimento ou em condições de estresse comparativamente a controles não estressados), revelando informações fundamentais da estrutura, expressão e regulação de genes e permitindo inferências sobre seu papel nos processos biológicos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). A associação de estudos transcriptômicos com abordagens de sequenciamento adequadas e profundas, como o RNA-Seq, se apresenta como uma alternativa promissora para analisar o potencial dos osmoprotetores (KIDO et al., 2019). Esta associação além de ser econômica, contribui a partir do seu alto rendimento, revelando melhor os genes e isoformas responsivos ao estresse, padrões complexos de expressão gênica, elementos cis reguladores, RNAs não codificadores e cascatas moleculares ativadas (ZHAO et al., 2014).

Por fim, a utilização do RNA-Seq é associada com a avaliação da expressão gênica por PCR quantitativa por transcrição reversa (RT-qPCR) visando a validação de alvos moleculares promissores para aplicação em programas de melhoramento genético vegetal ou inferências biotecnológicas, uma vez que a RT-qPCR é considerada uma técnica padrão “ouro” para

estudos de expressão gênica, devido à sua alta sensibilidade, especificidade, reprodutibilidade e ampla faixa dinâmica (KAUFMAN, 2004; KUBISTA et al., 2006).

4 ARTIGO I

Artigo a ser submetido à Revista *Genetics and Molecular Biology*

IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE OSMOPROTETORES EM *VIGNA UNGUICULATA* SOB MÚLTIPLOS ESTRESSES

Ayug Bezerra Lemos¹, Roberta Lane de Oliveira Silva², Marx de Oliveira Lima¹, João Pacífico Bezerra Neto¹, Ana Maria Benko-Iseppon^{1*}

¹Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Genética, Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Recife, Pernambuco, Brasil

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Laboratório de Microbiologia, Petrolina, Pernambuco, 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.benko.iseppon@pq.cnpq.br

Resumo

Foi realizada a prospecção de 209 transcritos associados aos osmoprotetores prolina (46), glicina-betaína (12), mio-inositol (43) e trealose (108) no transcriptoma de *Vigna unguiculata* sob múltiplos estresses. A caracterização físico-química indicou que a maioria dos osmoprotetores candidatos estavam localizados no citoplasma e nos cloroplastos, corroborando ao verificado na literatura, que sugere que os mesmos exercem a função de equilíbrio osmótico e diminuição de ROS dentro das células vegetais. A identificação de padrões conservados (domínios e motivos característicos) e construção de árvores fenéticas apontou altos níveis de conservação dessa família gênica entre as espécies vegetais analisadas. 31 genes osmoprotetores ancoraram nos 11 cromossomos do genoma de referência do feijão-caupi. Os genes TPP, TPS, MIPS e P5CS apresentaram mais de uma cópia do mesmo gene, indicando possíveis eventos de duplicação independentes. A análise das sequências promotoras permitiu

identificar dois elementos cis-regulatórios associados aos fatores de transcrição HD-ZIP e bHLH, importantes para a regulação de osmoprotetores em situações de estresses. O perfil transcricional indicou que a maioria das classes de osmoprotetores atua no processo de defesa/tolerância em feijão-caupi sob múltiplos estresses, especialmente sob déficit hídrico em tempos tardios (150 minutos).

1 Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] é uma leguminosa de significativa importância socioeconômica para o sistema agroindustrial, sendo cultivada predominantemente nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Essa espécie tem sido utilizada como componente da dieta alimentar de famílias de baixa renda por se tratar de um grão rico em proteínas, minerais e fibras (Frota et al., 2008). No entanto, assim como ocorre em outras culturas de interesse agrícola, o feijão-caupi tem sido afetado pela ação de diversos estresses bióticos e abióticos, os quais têm comprometido diretamente seu cultivo e produtividade.

A produção de solutos compatíveis é conhecida como um dos mecanismos para driblar os efeitos nocivos causados por tais estresses. Essas substâncias são trocadas pelo excesso de sais inorgânicos na célula, permitindo que tanto a concentração interna de sais quanto o volume celular sejam ajustados. A grande vantagem do acúmulo desses solutos é que eles não perturbam a funcionalidade das macromoléculas celulares, como ocorre com os sais inorgânicos (Rathinasabapathi, 2000; Yancey, 2001). O acúmulo desses compostos tem sido associado a altos níveis de tolerância de plantas, sendo que seus efeitos benéficos não sejam geralmente espécie-específicos. Desta forma, a identificação de genes e enzimas envolvidas na síntese de solutos compatíveis atuantes nas vias de resistência/tolerância aos diversos estresses compreende uma importante fonte de candidatos para uso em programas de melhoramento genético ou para inferências biotecnológicas.

Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo identificar genes envolvidos na síntese de osmólitos compatíveis no transcriptoma do feijão-caupi sob desidratação radicular e estresses combinados (injúria+inoculação viral), avaliando a diversidade estrutural e o perfil de expressão diferencial de transcritos que codificam as principais categorias de osmoprotetores (prolina, glicina betaína, mio-inositol e trealose) atuantes no estresse aplicado.

2 Metodologia

2.1 Material vegetal, desenho experimental e aplicação dos estresses

2.1.1 Imposição do estresse de desidratação radicular

Sementes de *Vigna unguiculata*, cv. Pingo de Ouro, foram tratadas com 0,05% (w/v) Thiram (tetramethylthiuram disulfide) e germinadas durante dois dias a $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ de temperatura e umidade relativa de $65\% \pm 5\%$. As mudas foram transferidas para um sistema hidropônico (Rodrigues et al., 2012) com solução nutritiva aerada e balanceada com pH 6,6 (Hoagland e Arnon, 1950), em um delineamento experimental em blocos casualizados, com três réplicas biológicas. Cada réplica biológica foi composta de dois indivíduos. As plântulas foram colocadas em suportes, de modo que as raízes das mudas ficassem completamente imersas na solução.

As plântulas foram cultivadas por três semanas (estágio de desenvolvimento V3) em casa de vegetação sob um fotoperíodo natural de aproximadamente 13/11 h ciclo claro/escuro, temperatura de $30 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa (RH). Após esse período, o tratamento de desidratação radicular foi iniciado retirando a solução nutritiva das plantas tratadas (Figura Suplementar 1A). Raízes e folhas foram coletados após 25 min (doravante chamado de RD25), 75 min (doravante chamado de RD75) e 150 min (doravante chamado de RD150) após a remoção da solução. Os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até a extração do RNA. Para cada período de tempo, as respectivas

plantas controles foram mantidas na solução nutritiva em ambiente separado e coletadas no mesmo período.

2.1.2 Ensaio de injúria mecânica e inoculação das viroses

Os experimentos de injúria mecânica e inoculação com CABMV (Vírus-do-mosaico-do-feijão-caupi transmitido por afídeo) ou CPSMV (Vírus do Mosaico Severo do feijão-caupi) foram realizados sob condições controladas, em casa de vegetação no IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco). Para o ensaio com CABMV, utilizou-se o genótipo resistente IT85F-2687 (Rocha et al., 1996; Oliveira et al., 2012) e para CPSMV, utilizou-se o genótipo BR-14 Mulato (Cardoso et al, 1990). O procedimento experimental foi conduzido de maneira semelhante e independente. Ambos os genótipos foram semeados por três semanas (estágio de desenvolvimento V3), sob fotoperíodo natural e temperatura variando entre 28 e 32°C (Figura Suplementar 2A).

Para permitir a penetração do vírus no interior do vegetal, as folhas componentes dos trifólios mais jovens foram, previamente, injuriadas mecanicamente com carborundum (carbeto de silício). Posteriormente, ocorreu a aplicação do inóculo viral.

Para cada ensaio, foram executados dois tempos de coleta após injúria | inoculação: 60 minutos e 16 horas, sendo um respectivo controle absoluto para cada tratamento. Os tecidos foliares foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em -80 °C, até posterior extração do RNA. Para cada controle e tratamento implementados, o desenho experimental foi fatorial 2x2 (cultivar vs extensão do período pós inoculação), com três RBs, sendo cada RB composta por cinco plantas. A fim de evitar o impacto de compostos voláteis usados pelas plantas para sua comunicação, cada tratamento foi realizado em área isolada.

A expressão gênica diferencial dos dois ensaios envolvendo vírus foi composta por uma combinação de dois estresses: injúria mecânica e inoculação viral. Os vírus vegetais são incapazes de iniciar um processo infeccioso sem assistência (de um organismo vetor ou devido

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

2.2 Construção das bibliotecas de RNA-Seq

A extração de RNA total do material vegetal referente aos experimentos das viroses foi realizada a partir do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega), seguindo as instruções do fabricante, com pequenas modificações [quantidade de material vegetal (200 mg) e tempo das centrifugações (2 minutos)]. Para a extração das amostras do experimento de desidratação radicular foi utilizada a associação do protocolo CTAB-Acetato (Zhao et al., 2012) e do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) utilizando aproximadamente 200 mg de tecido radicular por amostra. Na execução dos protocolos acima mencionados foi realizado tratamento de DNase visando eliminar a contaminação com DNA genômico. A integridade das amostras foi verificada em gel de agarose 1,5 % corado com Blue-Green Loading Dye (LGC Biotechnology), em corrida a 60 V por 90 minutos. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) e fluorímetro Qubit (Life Technologies).

2.3 Sequenciamento

Parte dos RNAs purificados (contendo aproximadamente 4 µg) foram enviados para a construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento via plataforma Illumina HiSeq2500, *paired-end*, em empresa especializada, e o restante (1 µg) foi utilizado para a síntese de cDNA, realizada empregando-se o GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo

instruções do fabricante. Após a disponibilização dos dados do sequenciamento, foi realizada a montagem do transcriptoma utilizando o programa Trinity (Grabherr et al., 2011) e a análise estatística dos genes diferencialmente expressos a partir do programa EdgeR (Robinson et al., 2010). As proteínas atuantes na síntese de osmoprotetores foram mineradas e caracterizadas através de ferramentas de bioinformática, como descrito abaixo.

2.2 Identificação e caracterização de proteínas atuantes na síntese de osmoprotetores em *V. unguiculata*

Inicialmente foram realizadas buscas por sequências correspondentes as proteínas que participam da síntese das quatro classes de osmoprotetores no UniProt (Universal Protein Resource; <http://www.uniprot.org>), com foco em sequências com anotação curada manualmente pelo repositório. As sequências foram alinhadas via BLASTp (proteína-proteína) contra o GenBank no NCBI (Benson et al., 2013) visando obter sequências adicionais das proteínas vegetais atuantes na síntese de osmoprotetores. Todas as sequências catalogadas foram utilizadas como “sondas” na busca por candidatos nos transcriptomas de *V. unguiculata*.

A mineração das sequências alvo nos transcriptomas do feijão-caupi foi conduzida via tBLASTn, adotando-se um ponto de corte (*cut-off*) para *e-value* igual ou inferior a e^{-5} . A ferramenta TransDecoder (<https://github.com/TransDecoder/TransDecoder/wiki>) foi utilizada para traduzir os transcritos anotados no feijão-caupi como possíveis proteínas de síntese de osmoprotetores. As proteínas traduzidas foram analisadas quanto a presença e conservação de domínios, utilizando o Batch CD-Search Tool (Marchler-Bauer et al., 2011).

Os transcritos selecionados foram submetidos à ferramenta BLAST (Altschui et al., 1990) contra o genoma de referência de *V. unguiculata*, depositado na plataforma Phytozome v12.1 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) visando confirmar sua anotação biológica e possíveis funções. As sequências traduzidas foram utilizadas também para a determinação das características físico-químicas dos osmoprotetores identificados, tais como ponto isoelétrico e

peso molecular via JvirGel (Hiller et al., 2003) e da ferramenta online CELLO v.2.5 (Yu et al., 2006) para localização subcelular.

2.3 Análises Fenéticas

As sequências candidatas de cada proteína referente ao seu respectivo osmoprotetor foram submetidas a alinhamentos múltiplos no pacote MEGA v.7 utilizando o algoritmo de alinhamento do ClustalW (Kumar et al., 2016), com visualização gerada via ferramenta Jalview 2.11 (Waterhouse et al., 2009), destacando padrões conservados relativos as sequências. Ainda com o pacote MEGA v.7 foram gerados dendrogramas para cada categoria de osmoprotetor, constituindo análises fenéticas com base no método Neighbor-Joining, com *bootstrap* de 1000 amostragens.

2.4 Genômica Estrutural

A partir do alinhamento dos transcritos contra o genoma do feijão-caupi no Phytozome, foi utilizada a ferramenta Phytomine para identificar os *loci* associados aos transcritos, incluindo a localização cromossômica associada a cada categoria de osmoprotetor. Para desvendar o padrão de estrutura gênica dos transcritos, foi utilizada a ferramenta *Gene structural Display server 2.0* (GSDS) (Hu et al., 2015). A análise e identificação de elementos cis-regulatórios dos candidatos foi realizada no MEME suíte (Bailey et al., 2009). As ferramentas MEME (Bailey et al., 1994) e TOMTOM (Gupta et al., 2007), acoplado ao banco de dados JASPAR, foram utilizadas para atribuir um determinado fator de transcrição associado ao elemento cis-regulatório encontrado.

2.5 Perfil de expressão *in silico*

Para a análise de expressão diferencial foram considerados valores de *Log-fold-change* (Log2FC) de transcritos que apresentaram valores de *p-value* e FDR menores ou iguais a 0,05. Para a análise quantitativa dos transcritos diferencialmente expressos, foi construído um diagrama de Venn que permitiu realizar uma comparação entre os diferentes transcritos e

tratamentos, por meio da ferramenta VENN 2.1 (Oliveiros., 2007). Para a construção do perfil de expressão *in silico* foram utilizados os valores de Log2FC dos transcritos identificados em cada biblioteca, submetendo os dados a uma análise de agrupamento hierárquico por meio do *software* CLUSTER 3.0 (Eisen et al. 1998). Os *heatmaps* gerados os candidatos foram visualizados pelo programa TreeView (Page 1996).

2.6 Desenho de *primers*

O desenho de *primers* foi realizado a partir dos programas PerlPrimer (Marshall, 2004), *Primer 3 Plus* (Rozen e Skaletsky, 2000) e *Primer-BLAST* do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), considerando os seguintes parâmetros: conteúdo de GC 50 %, tamanho do fragmento entre 70 e 200 pb, temperatura de *Melting* entre 40 e 60° e junção exon-exon.

3 Resultados

3.1 Identificação e caracterização de osmoprotetores nos transcriptomas de *V. unguiculata* sob desidratação radicular

3.1.1 Mineração de dados transcriptômicos

A busca por sequências de osmoprotetores nos bancos de dados Uniprot e NCBI resultou no total de 664 sondas. Dessas, 133 são sequências de duas proteínas associadas a síntese de Prolina, 218 de duas proteínas atuantes na síntese de Trealose, 197 de duas proteínas para sintetizar Glicina-betaína e 116 de duas proteínas para síntese de Mio-inositol. Após a busca por transcritos via tBLASTn contra os transcriptomas de *V. unguiculata* foram obtidos 1006 transcritos representantes das quatro classes de osmoprotetores. Estes transcritos foram traduzidos em suas respectivas ORFs, totalizando 1325 transcritos selecionados para a análise de domínio conservado.

3.1.2 Caracterização de domínios conservados

De acordo com a análise realizada no Batch-CD-Search, para o osmoprotetor prolina foram identificados 44 transcritos com o domínio ‘AA_kinase’ + ‘Aldeh’ da enzima Pirroline 5 carboxilato sintase (P5CS) e dois com domínio ‘P5CR_Dimer’ + ‘F420_oxido’, referente a Pirroline 5 carboxilato redutase (P5CR). Os representantes de glicina-betaína apresentaram cinco transcritos com o domínio ‘ALDH_F10_BADH’ e sete com o domínio ‘Rieske_RO_Alpha_CMO’ + ‘RHO_alpha_C_CMO-like’ para as enzimas Betaína aldeído dehidrogenase (BADH) e Colina Monooxygenase (CMO), respectivamente.

O açúcar mio-inositol apresentou 11 transcritos com o domínio ‘FIG Superfamily’ para Inositol monofosfatase (IMP) e 32 para o domínio ‘NAD_binding_5_superfamily’ de Mio inositol fosfato sintase (MIPS). Para trealose, o domínio ‘HAD like Superfamily’ de Trealose 6-fosfato fosfatase (TPP) foi identificado em 30 transcritos. Por sua vez, o domínio ‘Glyco Transf 20’ exclusivo da enzima Trealose 6-fosfato sintase (TPS*) foi encontrado em 22 transcritos, enquanto domínios TPS fusionados com o domínio TPP foram identificados em 56 candidatos.

O total de domínios identificados para os transcritos de cada enzima foram divididos quanto a sua integridade, podendo apresentar-se de forma íntegra ou incompleta na região amino (N), carboxi (C) ou amino e carboxi (NC) terminal (Tabela 1.).

Tabela 1. Quantitativo de transcritos associados as quatro classes de osmoprotetores encontrados no transcriptoma de *V. unguiculata*.

Osmoprotetor	Enzimas	Candidatos recuperados	Domínios completos	Incompletos N-terminal	Incompletos C-terminal	Incompletos NC-terminal
Prolina	P5CS	44	3	11	12	18
	P5CR	2	1	-	-	1
Glicina-betaína	BADH	5	5	-	-	-
	CMO	7	5	-	2	-
Myo-inositol	IMP	11	4	4	3	-
	MIPS	32	-	12	17	3
Trealose	TPP	30	7	10	11	2
	TPS	56	36	4	16	-
	*TPS	22	-	-	12	10

*TPS corresponde a sequências exclusivas do domínio TPS.

3.1.3 Ponto isoelétrico, peso molecular e localização subcelular

Com relação às características físico-químicas, as proteínas sintetizadoras de osmoprotetores de *V. unguiculata* apresentaram peso molecular abaixo de 60 kDa, destacando-se acima deste valor as proteínas P5CS e TPS, representantes dos osmoprotetores prolina e trealose. O ponto isoelétrico variou de 4,42 até 10,25, com a maioria transcritos apresentando ponto isoelétrico abaixo de 6,0. De acordo com a predição da localização subcelular, os transcritos foram localizados principalmente nas regiões citoplasmáticas e cloroplastidiais (Tabela 2).

Tabela 2. Ponto isoelétrico, peso molecular e localização subcelular dos candidatos à osmoprotetores em *V. unguiculata*.

Osmoprotetor	Subclasse	p.I. (pH)	M.W. (kDa)	Localização subcelular
Prolina	P5CR	9.47	28.49	Citoplasma/Mitocôndria
	P5CS	4.88 a 9.52	20.42 a 66.90	Citoplasma/Cloroplastos
Glicina-betaína	BADH	5.00	54.35 a 56.74	Citoplasma
	CMO	7.73 a 9.34	21.64 a 60.22	Extracelular
Mio-inositol	IMP	4.42 a 5.88	20.51 a 31.05	Cloroplastos
	MIPS	4.51 a 9.24	20.78 a 42.28	Citoplasma
Trealose	TPP	6.81 a 10.25	22.22 a 43.51	Citoplasma/Núcleo
	TPS	5.41 a 8.11	29.46 a 106.04	Citoplasma/M. Plasmática/Núcleo
	*TPS	5.47 a 9.75	23.64 a 60.35	Citoplasma/Mitocôndria

3.1.4 Análise de motivos conservados

A partir dos alinhamentos múltiplos foi possível identificar padrões conservados entre os transcritos de *V. unguiculata* para cada proteína. Dois candidatos das proteínas MIPS apresentaram o domínio catalítico típico de oxidoredutases “GxGGxxG” e outros dois domínios “LWTANTERY” e “NGSPQNTFVPGL”, sendo o último domínio (M-C) observado apenas em Vu.MIPS1 (Figura 1).

Os alinhamentos com candidatos de IMP para a categoria de mio-inositol revelaram a presença de três motivos, o motivo “GEET” apresentando troca de aminoácido de T₂₁ por G, e os outros dois motivos “DPLDGT” e “WDxAAG” que se apresentaram altamente conservados em *V. unguiculata* e nas demais espécies relacionadas (Figura 2).

A BADH pertencente ao osmoprotetor glicina-betaína quando alinhada apresentou três motivos conservados, “QLFIDGE” na região N-terminal da sequência, o decapeptídeo “VTLELGGKSP” com uma troca de aminoácido na posição T₂₅₃ por S, e o tripeptídeo “SKL” conservado em Vu.BADH1 e Vu.BADH4. Além disso, alguns candidatos (Vu.BADH2 e 3) apresentaram troca de aminoácido L₄₉₈ por M e Vu.BADH5 em S₄₉₆ por K. Foi observada também uma posição crítica para a síntese de glicina-betaína, sinalizada com uma seta vermelha no alinhamento ocupado por uma isoleucina (I) (Figura 3).

Para a segunda enzima que catalisa a síntese de glicina-betaína, VuCMO2 foi o único candidato para CMO em *V. unguiculata* presente no alinhamento, para este, foi identificado o domínio Rieske [2Fe-2S] CxHx15–17Cx2H e o motivo Fe-binding G/Dx3–4Dx2Hx4–5H, característicos dos domínios Rieske_RO_Alpha_CMO e RHO_alfa_C_CMO-like, respectivamente (Figura 4).

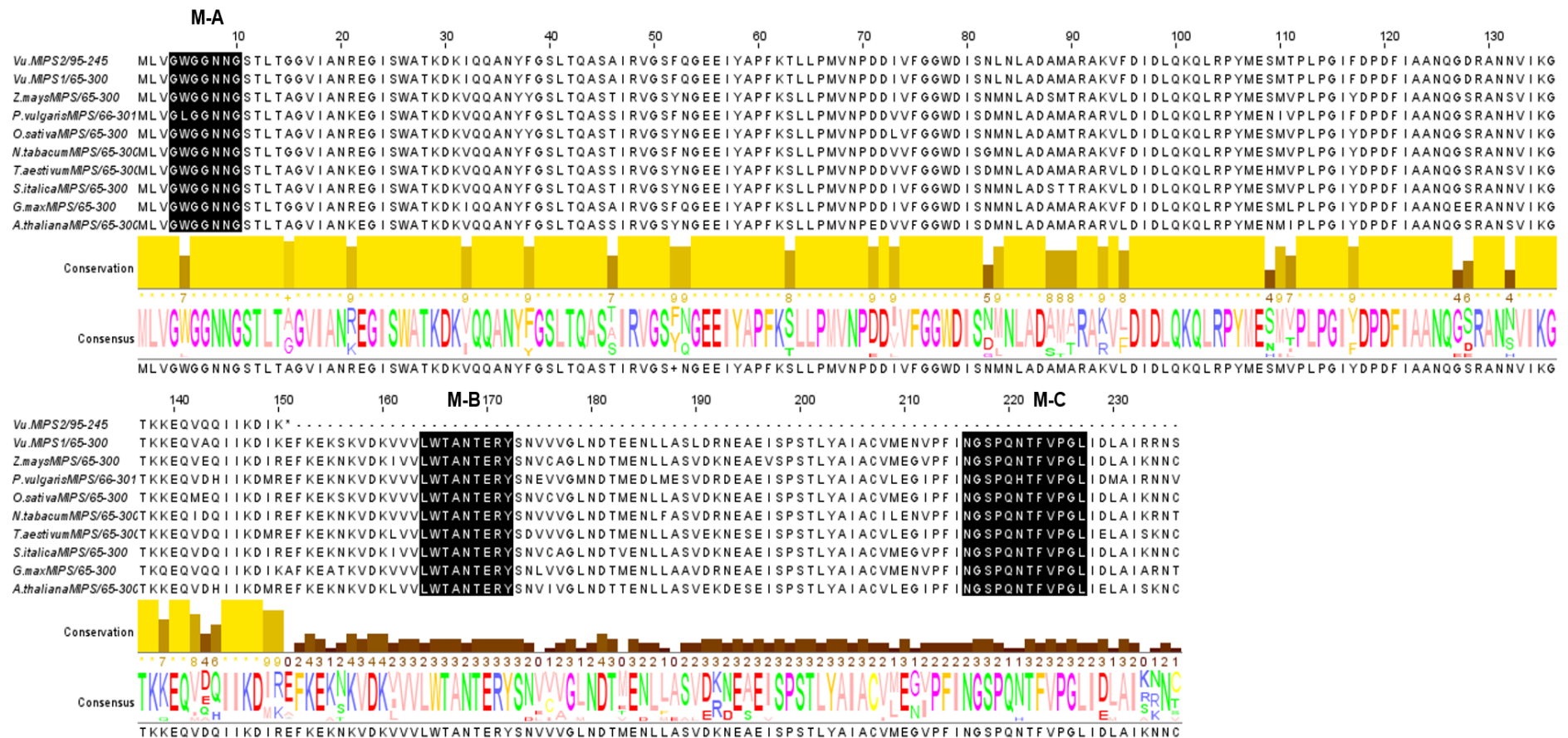


Figura 1. Alinhamento múltiplo de seqüências ortólogas de proteínas MIPS. O bloco preto indica a assinatura conservada GWGGNNG, presente nas MIPS de todas as espécies alinhadas. Foram utilizadas seqüências de *Zea mays*, *Phaseolus vulgaris*, *Oryza sativa*, *Nicotiana tabacum*, *Triticum aestivum*, *Setaria italica*, *Glycine max* e *Arabidopsis thaliana*.

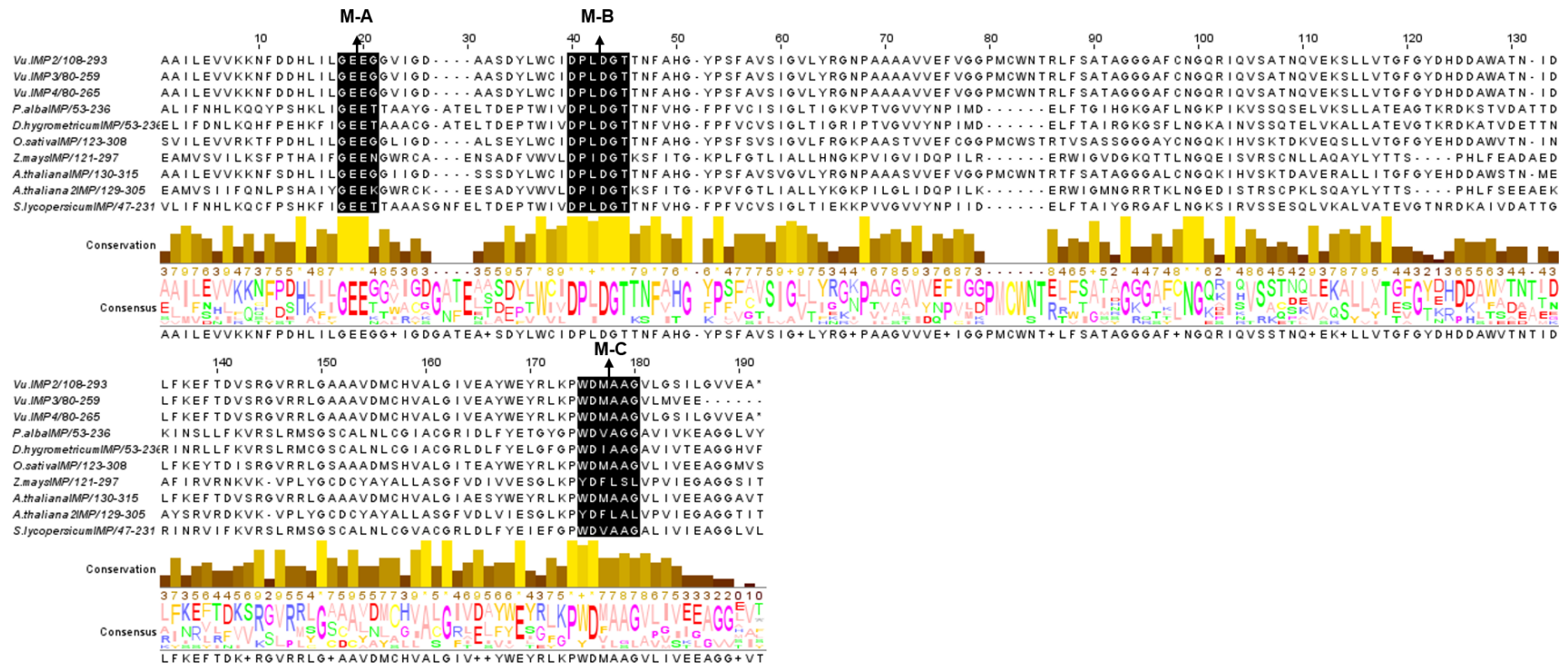


Figura 2. Alinhamento múltiplo de seqüências ortólogas de proteínas IMP. Foram encontrados três motivos conservados catalíticos marcados em caixas pretas: “M-A” motivo GEET, “M-B” motivo DPLDGT, e “M-C” motivo WDxAG. Foram utilizadas seqüências de *Populus alba*, *Dorcoceras hygrometricum*, *O. sativa*, *Z. mays*, *A. thaliana* e *Solanum lycopersicum*.

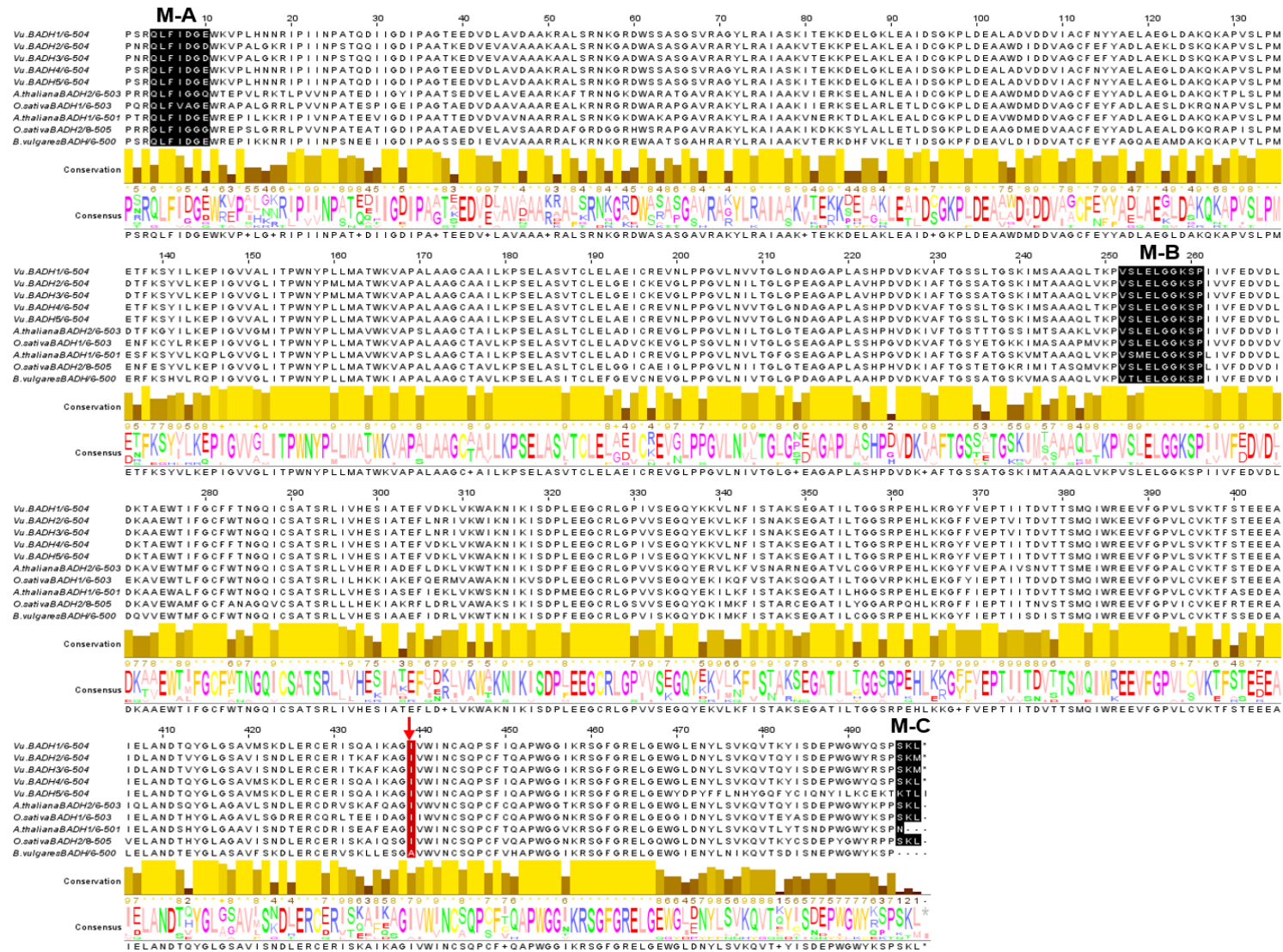


Figura 3. Alinhamento com sequências ortólogas de BADH. **M-A** indica o motivo relacionado ao sinal cloroplastidial, **M-B** decapeptídeo conservado, e **M-C** o sinal peroxissomal. Em vermelho encontra-se o aminoácido crítico na produção de GB. Foram utilizados de *A. thaliana*, *O. sativa* e *Beta vulgaris*.

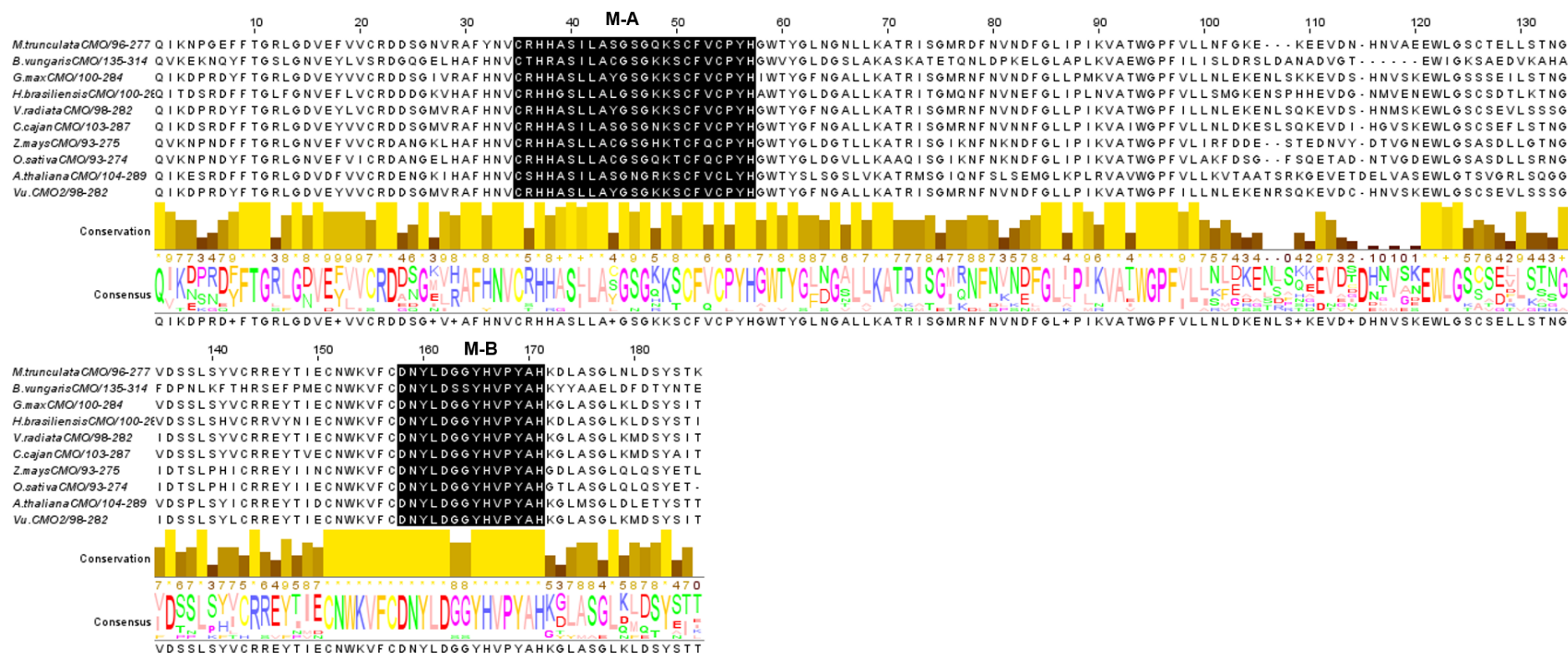


Figura 4. Alinhamento das sequências de CMO. **M-A** indica a sequência motivo localizada no domínio Rieske [2Fe-2S] e **M-B** indica o motivo mononuclear não heme de ligação ao ferro. Foram utilizados de *Cajanus cajan*, *Medicago truncatula*, *Vigna radiata*, *Hevea brasiliensis*, *O. sativa*, *A. thaliana*, *B. vulgaris*, *Z. mays* e *G.max*

O alinhamento dos candidatos de P5CS identificou o motivo A representado por um sítio de ligação de ATP localizado na região N-terminal, também foi observado o motivo B como zíper de leucina com troca de aminoácido S₁₂₄ e A₁₂₅ por AG. Em seguida, o motivo C que é descrito como domínio Glu-5-Kinase e o motivo D domínio de ligação NAD(P)H. Todos os motivos característicos desta subclasse foram encontrados em feijão-caupi, exceto pelo domínio GSA-DH geralmente localizado na região C-terminal na sequência (Figura 5).

O alinhamento de P5CR permitiu a identificação de quatro assinaturas conservadas entre os organismos vegetais analisados (Figura 6). O motivo A é apresentado como dobra de Rossmann “GxxGxG”, o motivo B marca um dos elementos de ligação de nucleotídeos representado pela sequência de aminoácidos “RxMxN”, o motivo C corresponde ao núcleo de dimerização, caracterizado por um *loop* com um motivo de sequência “GSxPA”. Por fim, o motivo D localizado na região C-terminal destaca a sequência consenso “S-P / G-G-T-T”.

Para trealose, foram identificados três motivos catalíticos conservados [Dxxx(T/V), (S/T) Gx e Kx16-30(G/S) (D/S) xxx(D/N)] que compartilham aminoácidos característicos para TPP (Figura 7). Para TPS, foram identificados resíduos conservados sinalizados com triângulos invertidos. Vu.TPS1, Vu.TPS3, Vu.TPS4, Vu.TPS5, Vu.TPS6 foram os candidatos que apresentaram o domínio TPS (Glyco_transf_20) fusionado ao domínio TPP (HAD-Like Superfamily), estes candidatos estão sinalizados com um triângulo ao lado direito em sua identificação no alinhamento. Outro grupo de proteínas *TPS de *V. unguiculata* continha apenas os resíduos específicos do domínio TPS (Figura 8).

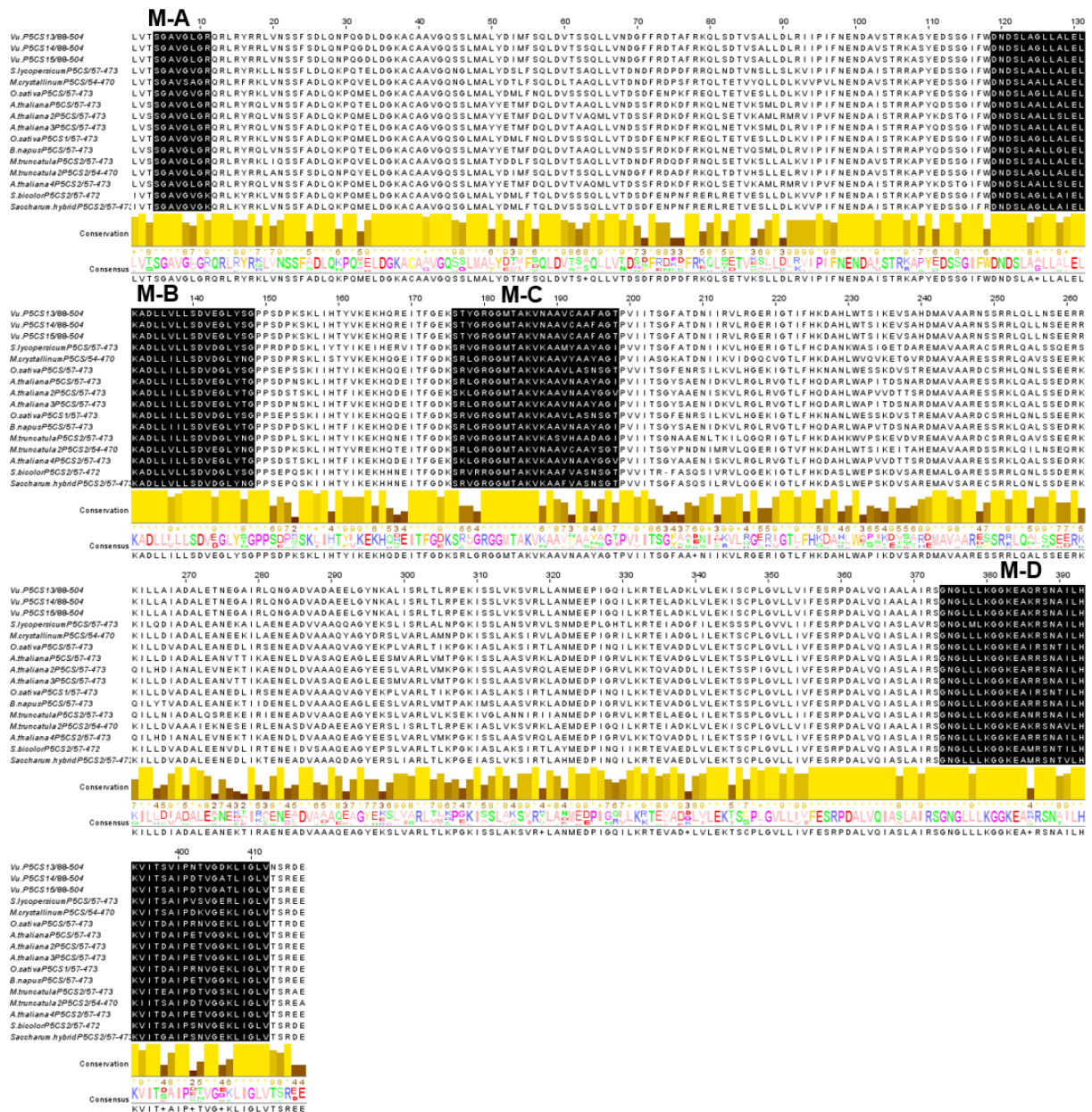


Figura 5. Alinhamento das sequências de P5CS. M-A indica o motivo conservado ATP Sítio de Ligação, M-B é marcado como motivo Leucina Zipper, M-C indica o motivo Glu-5-Kinase e M-D o domínio de ligação NAD(P)H. Foram utilizadas sequências de *S. lycopersicum*, *O. sativa*, *A. thaliana*, *Brassica napus*, *M. truncatula*, *Sorghum bicolor*, *Mesembryanthemum crystallinum* e *Saccharum hybrid*.

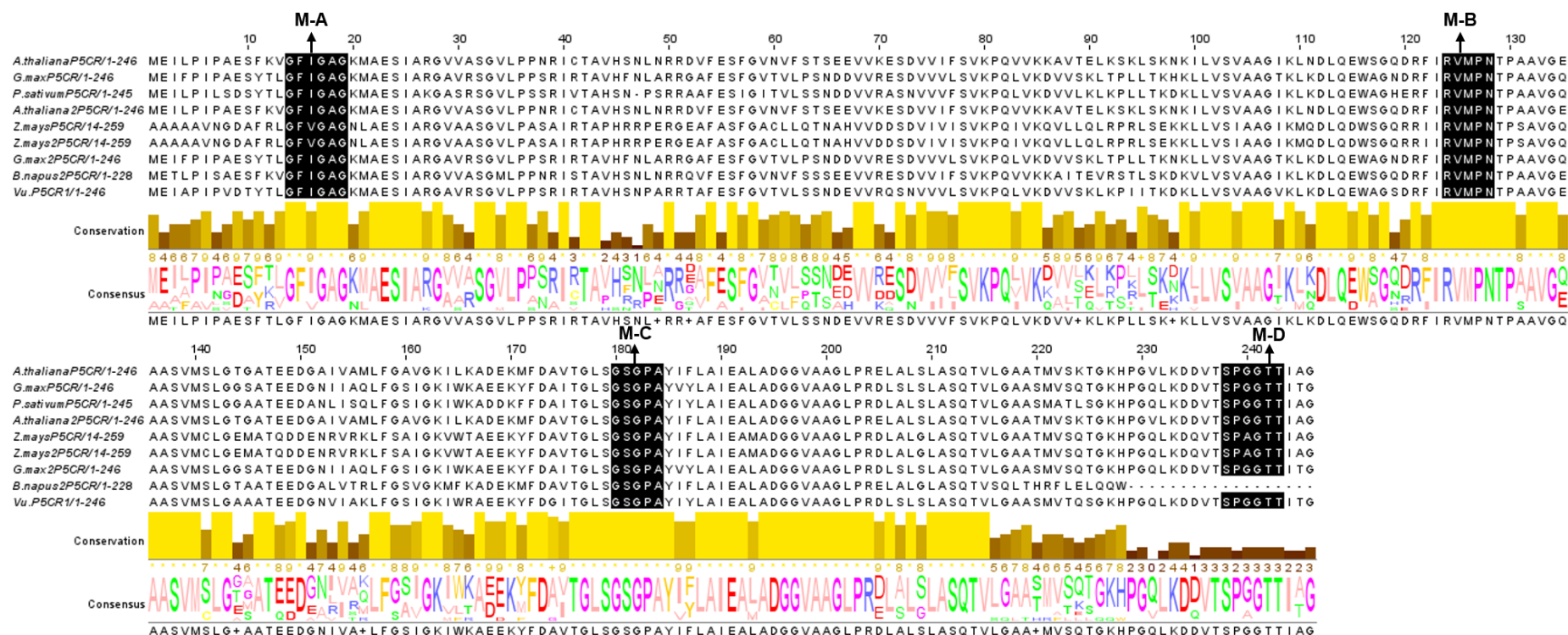


Figura 6. Alinhamento das sequências de P5CR. O primeiro motivo (M-A) indica o motivo conservado Rossmann fold. (M-B) indica o motivo de ligação nucleotídica, (M-C) representa o núcleo de dimerização, e (M-D) representa a sequência consenso conservada. Foram utilizadas sequências de *Pisum sativo*, *Z. mays*, *G. max*, *B. napus* e *A. thaliana*.

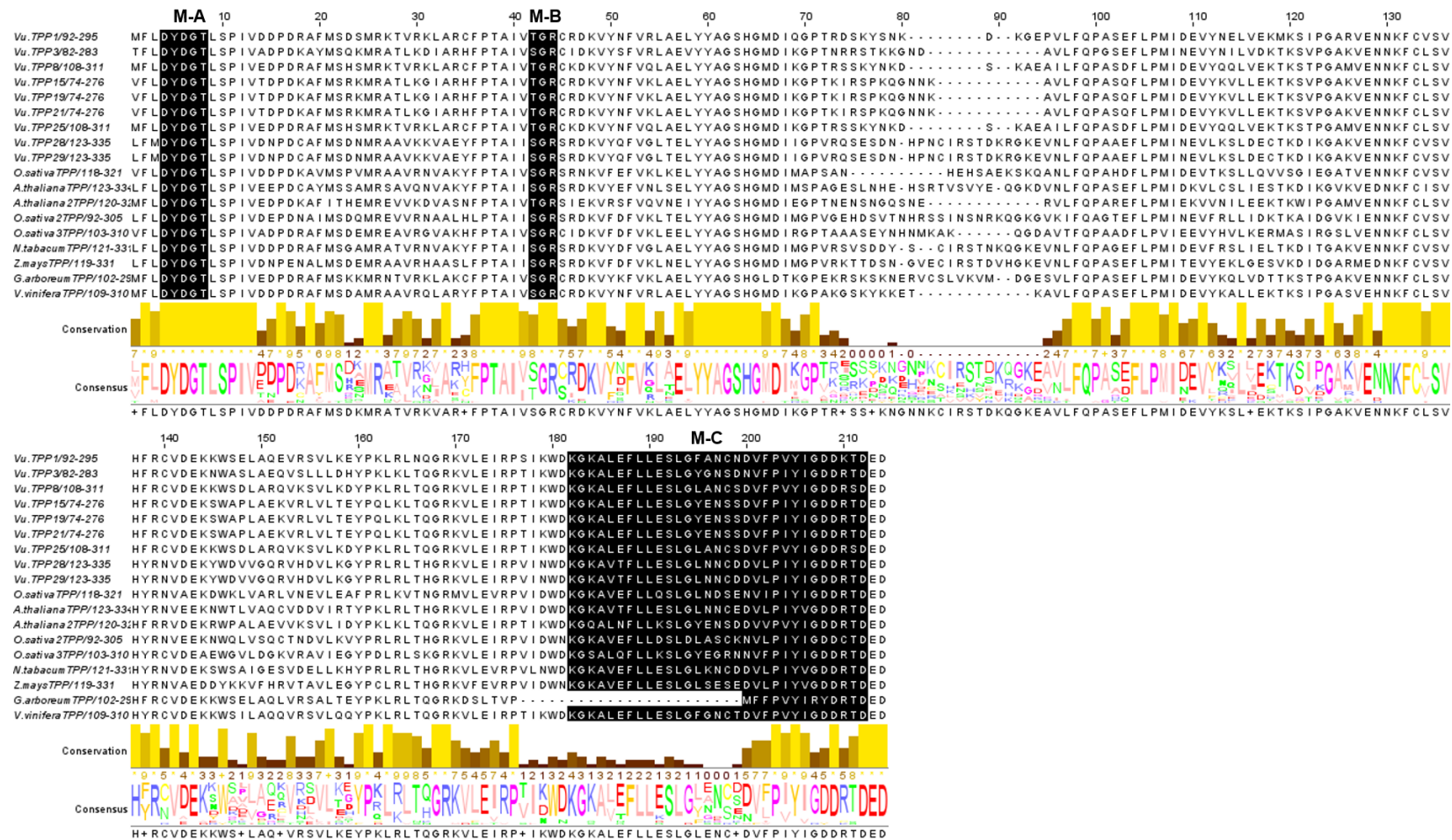
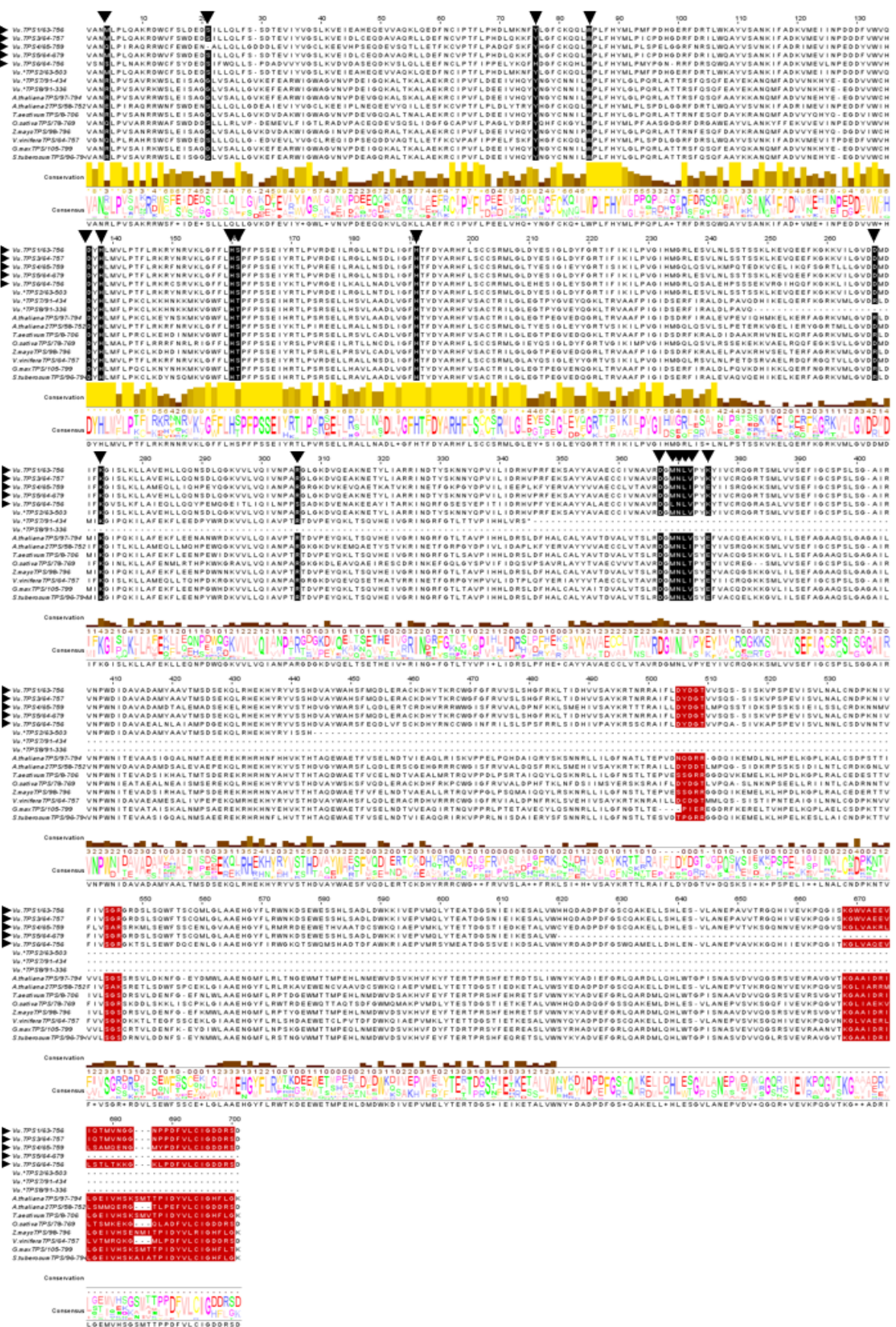


Figura 7. Alinhamento das sequências de TPP. As três caixas pretas no alinhamento (M-A, M-B e M-C) indicam os motivos conservados característicos das enzimas TPP.

Foram utilizadas sequências de: *O. sativa*, *Z. mays*, *N. tabacum*, *Vitis vinifera*, *A. thaliana* e *Gossypium arboreum*.



com os domínios TPS e TPP fusionados. Foram utilizadas sequências de: *A. thaliana*, *G. max*, *V. vinifera*, *O. sativa*, *Z. mays*, *T. aestivum* e *Solanum tuberosum*.

3.4 Análises fenéticas

O dendrograma construído a partir do método de Neighbor Joining (NJ) para osmoprotetores de *V. unguiculata* inclui sequências de osmoprotetores previamente descritas no bando de dados Uniprot e NCBI.

Para a família MIPS de mio-inositol, pode-se observar que os candidatos de *V. unguiculata* são mais similares com MIPS de *G. max* contendo um valor de suporte significativo (*bootstrap* >95), provavelmente a formação deste grupo ocorreu por esta espécie vegetal, assim como feijão-caupi, pertencer à mesma família taxonômica (Fabaceae). MIPS de *O. sativa*, *Zea mays* e *Setaria italica* formaram um cluster agrupando MIPS da família Poaceae (Figura 9 a).

Por sua vez, IMP apresentou dois grupos no qual os candidatos de *V. unguiculata* foram mais similares com os representantes de *A. thaliana*, alocada na família Malvaceae das dicotiledônias e mais próxima a família Fabaceae no contexto taxonômico. De forma geral, os valores de suporte foram significativos para a maioria das espécies, podendo indicar que IMP apresenta-se altamente conservada entre as espécies de monocotiledôneas e dicotiledônias (Figura 9 b).

Para glicina-betaína, os cinco candidatos BADH de *V. unguiculata* se agruparam com *M. truncatula* e *M. sativa* com um alto valor de suporte, agrupando BADH de espécies vegetais da família Fabaceae. Este mesmo padrão foi conservado nos demais candidatos agrupando BADHs de acordo com a divisão taxonômica: *Beta vulgares* e *Spinacia oleraceae* (Amaranthaceae), *O. sativa* e *Triticum urartur* (Poaceae) e *A. thaliana* (Brassicaceae) (Figura 9 c). Os dois candidatos CMO de *V. unguiculata* mostraram ser similares com CMO de *V. radiata* e os demais ramos seguiram os padrões taxonômicos observados em BADH (Figura 9 d).

No dendrograma construído para prolina, os três candidatos referentes a proteína P5CS de *V. unguiculata* se agruparam a jusante da P5CS de espécies da família Fabaceae (*Glycine soja*, *Arachis hypogaea* e *G. max*) com alto valor de suporte, igualmente aos demais valores nos ramos terminais (Figura 9 e). Com relação a P5CR, o único candidato formou *cluster* com proteínas P5CR de *G. max*. Assim como nos demais dendrogramas, o arranjo desta fenética também foi dividido de forma taxonômica (Figura 9 f).

O dendrograma construído para TPP mostra a formação de dois candidatos de *V. unguiculata* (1 e 2). No ramo 1, candidatos de *V. unguiculata* se agruparam com *G. arboreum*, representante da família Malvaceae, que por sua vez, pertence às Malvaceae, grupo irmão da Fabaceae, onde está alocada a família Fabaceae. No ramo 2, as duas TPPs de *V. unguiculata* formaram *cluster* com *M. truncatula*, ambos são da mesma família taxonômica (Figura 9 g).

No que se refere ao dendrograma de TPS, foi possível observar, além da clara divisão taxinômica, a formação de dois grupos contendo proteínas TPS que apresentaram domínio TPS fusionado com TPP (TPS+TPP) e proteínas TPS com o domínio TPP ausente (TPS) (Figura 9 h).

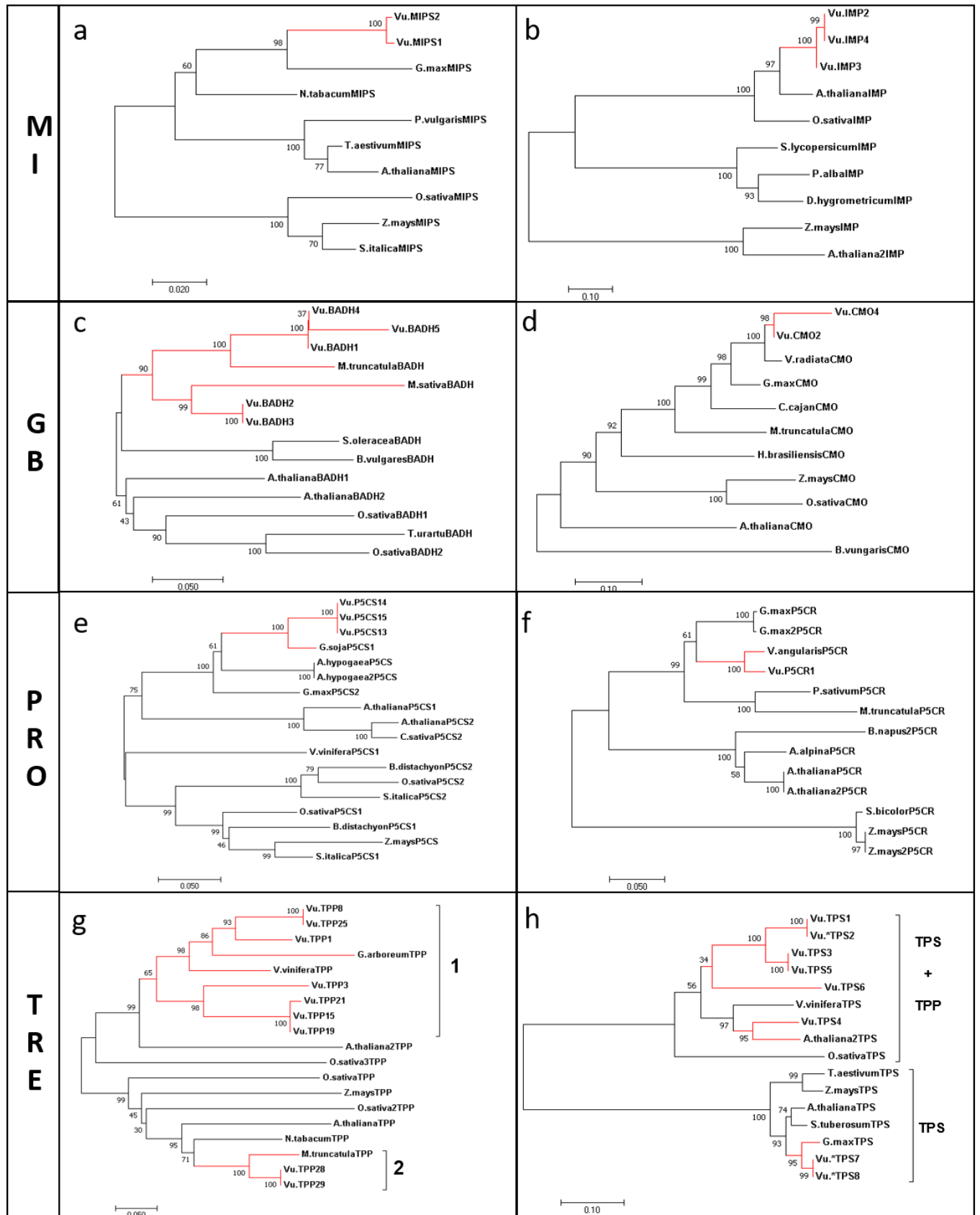


Figura 9. Dendrogramas com as relações entre as proteínas da síntese de osmoprotetores de diversas espécies vegetais. Ramos em vermelho indicam a localização dos candidatos de *Vigna* na árvore. Mio-inositol (MI) (a-

MIPS, b- IMP), Glicina-betaína (**GB**) (c-BADH, d-CMO), Prolina (PRO) (e-P5CS, f-P5CR), Trealose (TRE) (g-TPP e h-TPS). Números nas bases dos ramos referem-se aos valores de *bootstrap*.

3.4 Ancoragem no genoma de *V. unguiculata*, estrutura gênica e identificação de promotores

A ancoragem no genoma de referência de *V. unguiculata* revelou a distribuição de 31 genes relacionados aos osmoprotetores, exceto para os cromossomos 4 e 6 (Figura 10). Esta abordagem permitiu identificar quatro loci referentes a P5CS para prolina, com a maioria dos candidatos de feijão-caupi ancorados nos braços longo do cromossomo 1 e 8, e os demais, organizados no braço curto dos cromossomos 5 e 10. O único candidato de P5CR está localizado no braço longo do cromossomo 1, região mais próxima do centrômero. Para glicina-betaína, quatro candidatos ancoraram no braço longo do cromossomo 3 e um candidato foi localizado em um locus do braço curto do cromossomo 9. CMO foi localizada em um locus do braço longo do cromossomo 3, na região próxima do telômero.

Todos os candidatos a MIPS (representados em amarelo) foram localizados em dois loci, o primeiro localizado no braço longo do cromossomo 1, próximo a região dos telômeros, bem como no braço curto do cromossomo 3 (Figura 10).

De forma geral, os candidatos de trealose (TPS e TPP) ancoraram em 17 loci (Figura 10). Os candidatos a enzima TPP estão localizados próximos a regiões teloméricas no braço curto e no braço longo do cromossomo 1, mas também se encontram no braço curto do cromossomo 3. Os demais candidatos ancoraram nos braços longos dos cromossomos 8, 9, 10 e 11, em regiões próximas ao centrômero, próximas aos telômeros e na região telomérica do cromossomo, respectivamente, com um total de sete loci para TPP em *Vigna*.

Por sua vez os candidatos de TPS ancoraram em 10 loci de *V. unguiculata* (Figura 10). O cromossomo 2 apresenta dois loci, um no braço curto, próximo ao centrômero, e o segundo, no braço longo. No cromossomo 3, representantes de TPS ancoraram em três loci, o primeiro no braço curto, os outros dois loci no braço longo, em extremidades diferentes, um próximo ao

centrômero, e o outro próximo ao centrômero. Os cromossomos 5 e 7 continham representantes de TPS ancorados nos braços longos de sua estrutura, sendo o locus do cromossomo 7 localizado próximo do telômero. O cromossomo 9 apresentou um loci referente a TPS no braço curto, próximo a região centromérica. Por fim, no cromossomo 11 foram encontrados 2 loci para o gene TPS, próximos a regiões do centrômero, o primeiro no braço curto e o segundo no braço longo.

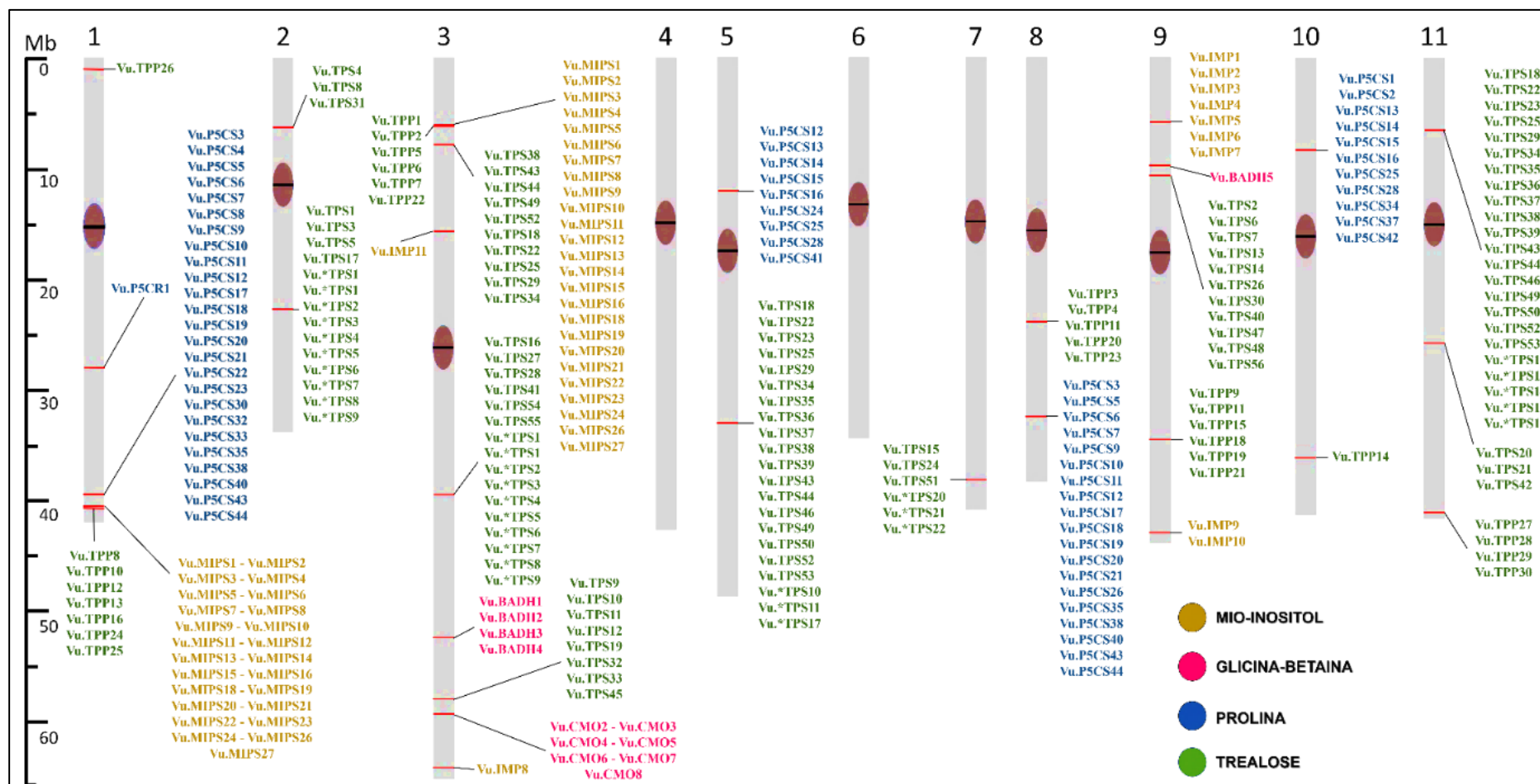


Figura 10. Distribuição dos genes das quatro categorias de osmoprotetores nos cromossomos virtuais da espécie *V. unguiculata*. A posição dos genes ou *clusters* ancorados aos osmoprotetores são indicadas em vermelho. As cores dos círculos determinam as categorias de osmólitos: amarelo para mio-inositol, vermelho para glicina-betaína, azul para prolina e verde para trealose.

A análise de estrutura gênica fornecida pela ferramenta GSDS foi realizada para os transcritos que ancoraram no genoma de feijão-caupi identificados na tabela 1. O esquema representativo (Figura 11) apresenta a diversidade estrutural dos osmoprotetores.

Para prolina, P5CS apresentou quatro estruturas de tamanhos distintos, porém, ambas continham 20 éxons, exceto pelo candidato Vigun08g152000 que apresentou 17 éxons, e P5CR contém apenas sete éxons. O gene que codifica a proteína MIPS de feijão-caupi apresentou duas estruturas, ambas com 10 éxons. Com relação a IMP, quatro estruturas foram identificadas, contendo de oito a 11 éxons. Os genes BADH e CMO, representantes de glicina-betaína, continham 15 e 10 éxons, respectivamente. Referente a trealose, o gene TPP apresentou entre 9 e 11 éxons, enquanto em TPS o número de éxons variou entre três e 17 éxons.

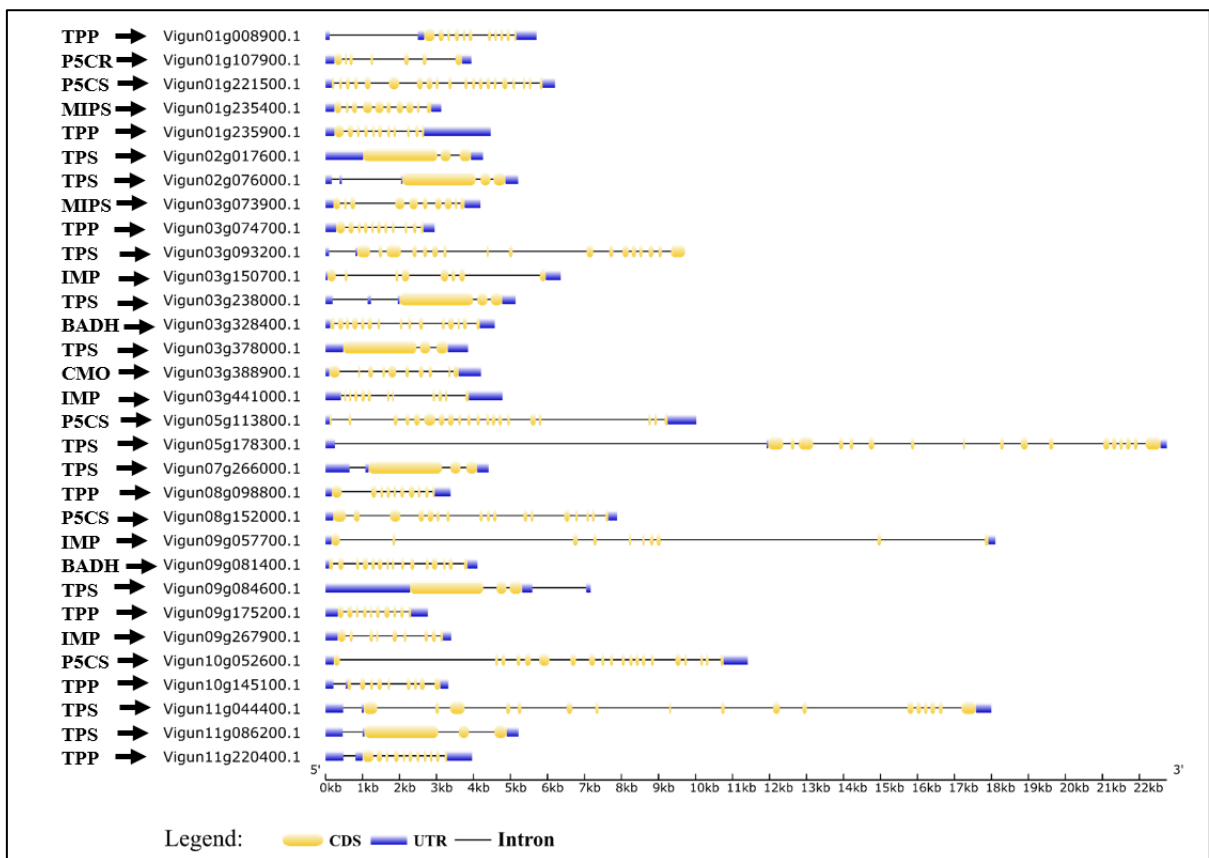


Figura 11. Estruturas gênicas de P5CS, P5CR, MIPS, IMP, CMO, BADH, TPS e TPP identificados no RNA-Seq de *V. unguiculata*. A representação gráfica do modelo gênico foi otimizada e exibida usando o GSDS.

Foram identificados 10 elementos cis-regulatórios em feijão-caupi. No entanto, apenas dois apresentaram valores significativos e dentro dos parâmetros confiáveis. O primeiro motivo alvo contém 17 sítios de ligação, e o segundo, 82 sítios (Figura 12). Para estes elementos foram identificados os FTs ZF-HD e BHLH associados aos motivos-alvo 1 e 2, respectivamente.

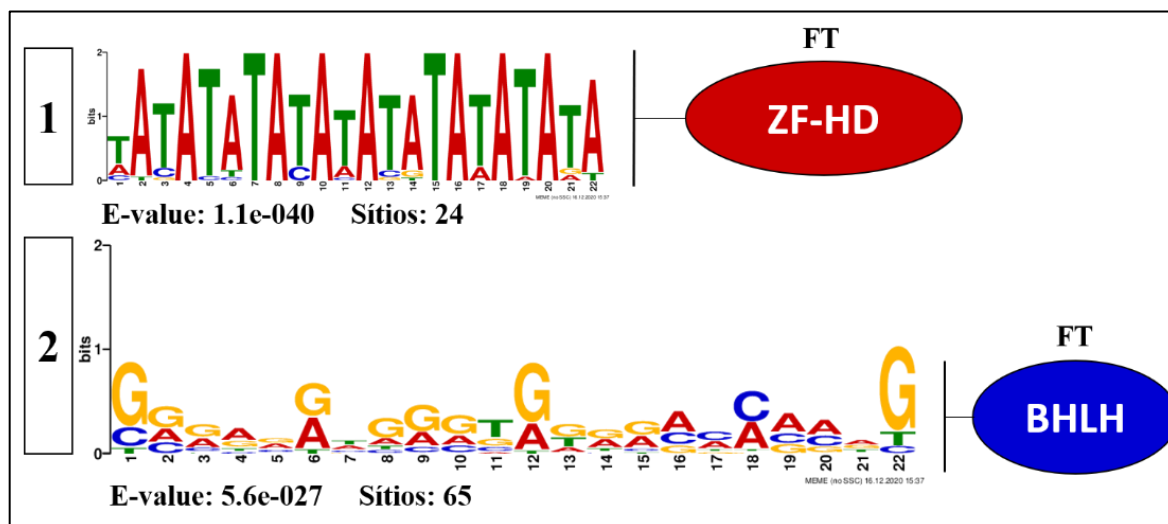


Figura 12. Motivos de elementos cis-regulatórios referentes aos osmoprotetores analisados em feijão-caupi. Ligado a estes motivos estão os fatores de transcrição ZF-HD (vermelho) e BHLH (azul). Abaixo de cada motivo se encontram os valores de *E-value* e a quantidade de sítios de ligação.

Os sítios de ligação relacionados aos dois elementos cis-regulatórios encontrados na análise foram distribuídos ao longo das sequências utilizadas, sendo possível observar que BHLH foi mais abundante, com 65 posições para os 31 genes das quatro categorias de osmoprotetores, sendo mais representativo em candidatos de trealose e mio-inositol. Para ZF-HD, foram observados 24 sítios de ligação e padrão de distribuição similar a BHLH (Figura 13).

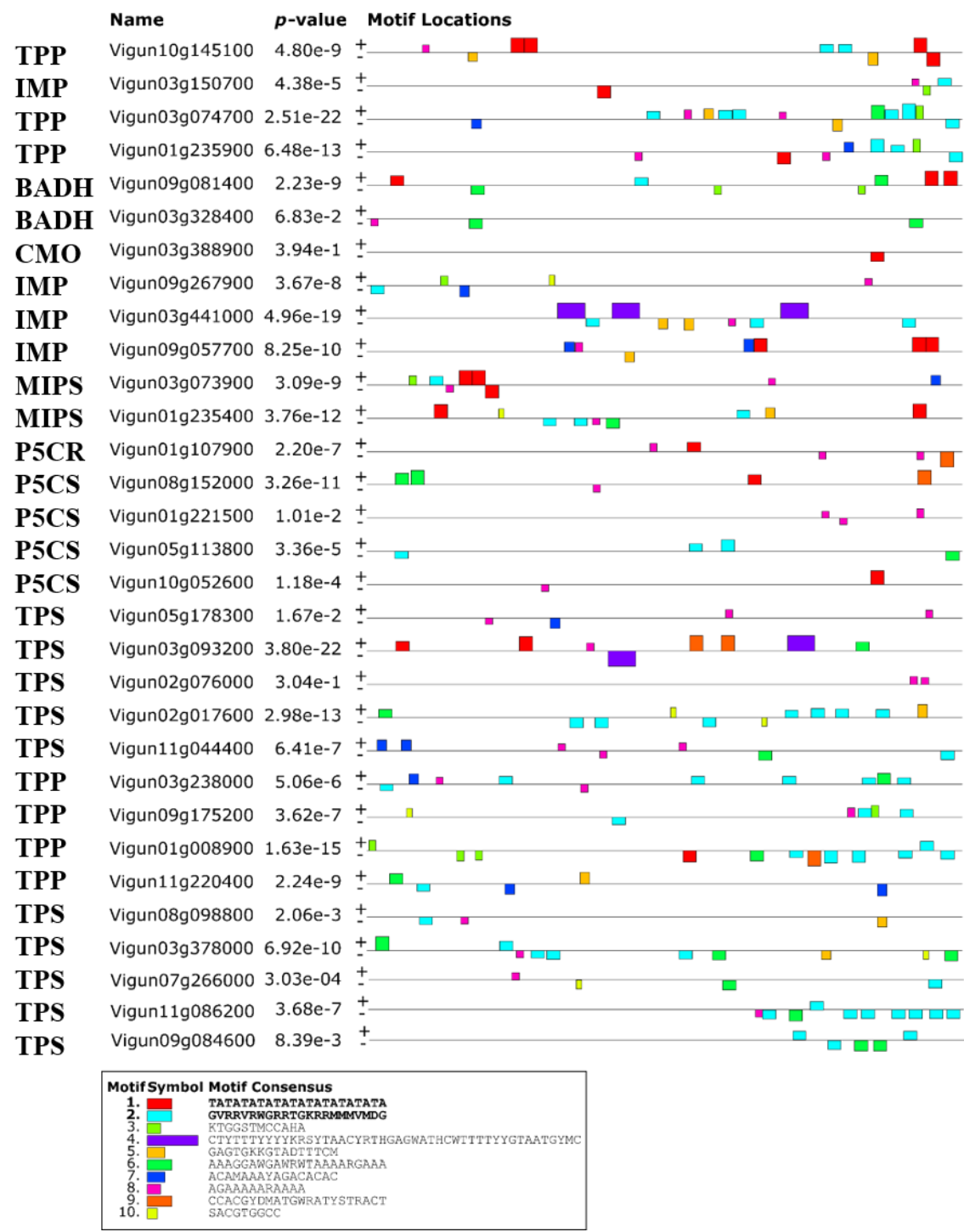


Figura 13. Distribuição dos elementos cis-reguladores previstos nas regiões promotoras dos genes de osmoprotetores. O conteúdo e a distribuição dos motivos pelo promotor são representados por retângulos e quadrados coloridos. Os motivos 1 e 2 (em negrito na legenda) indicam os sítios de ligação associados aos FTs ZF-HD e BHLH, respectivamente. Os sinais "+" e "-" representam cadeias senso e antissenso das regiões promotoras analisadas.

3.5 Perfil de expressão *in silico* de osmoprotetores

A partir dos valores de Log2FC obtidos na comparação das bibliotecas, bem como considerando os suportes estatísticos, foi possível determinar o comportamento transcricional dos osmoprotetores nas diferentes bibliotecas, tecidos e tempos experimentais analisados.

Com relação à desidratação radicular, foi observado que existe uma relação equilibrada entre o quantitativo de transcritos diferencialmente expressos (D.E.) verificado no tempo inicial (29 transcritos) e tardio (28 transcritos). Além disso, 23 transcritos estavam presentes nos dois tempos de estresse (Figura 14A). As classes mais representativas para essas bibliotecas foram trealose (com 50 transcritos) e prolina (com 12 transcritos).

Vale ressaltar que os osmoprotetores identificados nas bibliotecas de estresses combinados (injúria+inoculação viral) foram quantitativamente inferiores em comparação aos verificados nas bibliotecas de desidratação radicular (Figura 14B). Nas bibliotecas de CPSMV, nove e dez transcritos foram exclusivos com 60 minutos e 16 horas de estresse, respectivamente, e apenas dois transcritos são compartilhados nos dois tempos (Figura 14B). Para CABMV, 15 e seis transcritos foram exclusivos com 60 minutos e 16 horas de estresse, respectivamente, e dois foram comuns aos dois tempos (Figura 14B). As classes mais representativas foram trealose, prolina e mio-inositol, com 32, 6 e 8 transcritos, respectivamente.

Quando analisado o perfil global, verificou-se que poucos transcritos foram compartilhados entre os diferentes tempos e viroses, com um transcrito sendo comum nos tempos iniciais das duas viroses e dois nos tempos mais tardios. Nenhum transcrito foi compartilhado em todas as situações avaliadas (Figura 14).

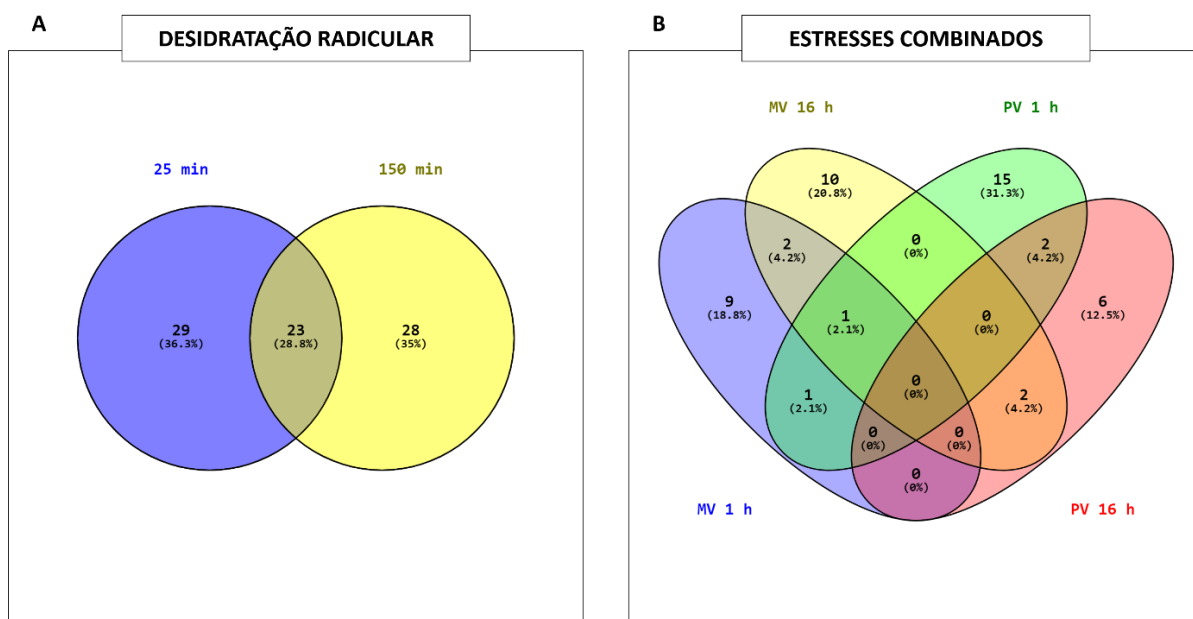


Figura 14. Análise comparativa da expressão diferencial de transcritos. A – DE em desidratação radicular durante 25 minutos e 150 minutos. B – DE em estresses combinados (injúria+inoculação viral) durante 1 hora e 16 horas. Mosaico severo (MV) e potyvírus (PV).

Como observado na figura 15, que corresponde ao *heatmap* para desidratação radicular, grande parte dos transcritos foi induzida no tempo de 150 minutos, a exemplo dos transcritos VuEH.TPS47, VuEH.TPP27, VuEH.MIPS3 VuEH.IMP2, VuEH.P5CS6 das classes trealose, mio-inositol e prolina que apresentaram Log2FC de 11, 10, 8, 5 e 4, respectivamente, indicando elevada indução em resposta ao estresse. Além disso, foram identificados 46 candidatos reprimidos e nove induzidos no tempo de 25 minutos, além de 22 transcritos com expressão não significativa e três que estavam ausentes nessa biblioteca, porém, presentes com o estresse prologado. Para o tempo de 150 minutos, 20 candidatos foram reprimidos, 33 foram induzidos, 24 apresentaram expressão não significativa e três estavam ausentes na biblioteca (Figura 15).

No que se refere as bibliotecas de estresses combinados, representantes da trealose (TPP e TPS), mio-inositol (MIPS) e prolina (P5CS) apresentaram mais candidatos induzidos, enquanto que representantes de CMO (Glicina-betaína) apresentaram expressão constitutiva no mapa de calor (Figura 16). BADH (Glicina-betaína) e IMP (Mio-inositol), apesar de D.E., não apresentaram grande variação de expressão entre os tempos de 60 minutos e 16 horas de estresse

nas duas viroses (Figura 16). Em contraste, MIPS (Mio-inositol) foi claramente mais responsivo ao CPSMV com 16 horas de estresse, a exemplo dos transcritos VuME.MIPS2 e VuME.MIPS22 com Log2FC de 11 e 6, respectivamente. Para a trealose, TPP apresentou indução mais acentuada nos tempos iniciais das duas viroses, especialmente na biblioteca de CABMV. Por sua vez, TPS apresentou picos de indução na biblioteca de CPSMV com 16 horas de estresse, enquanto que para CABMV parece responder mais precocemente, como observado para os transcritos VuME.TPS2, VuME.TPS3e VuME.TPS4.

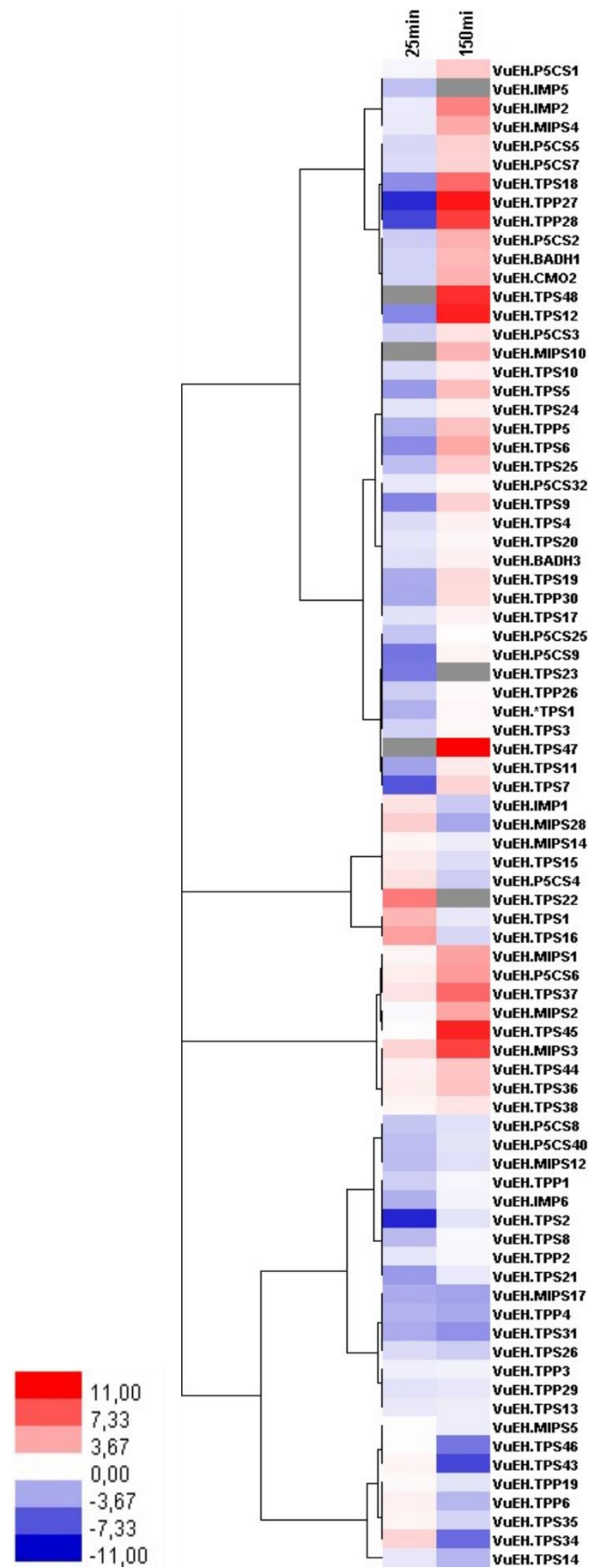


Figura 15. Perfil de expressão *in silico* dos osmoprotetores de feijão-caupi sob desidratação radicular com 25 e 150 minutos de estresse.

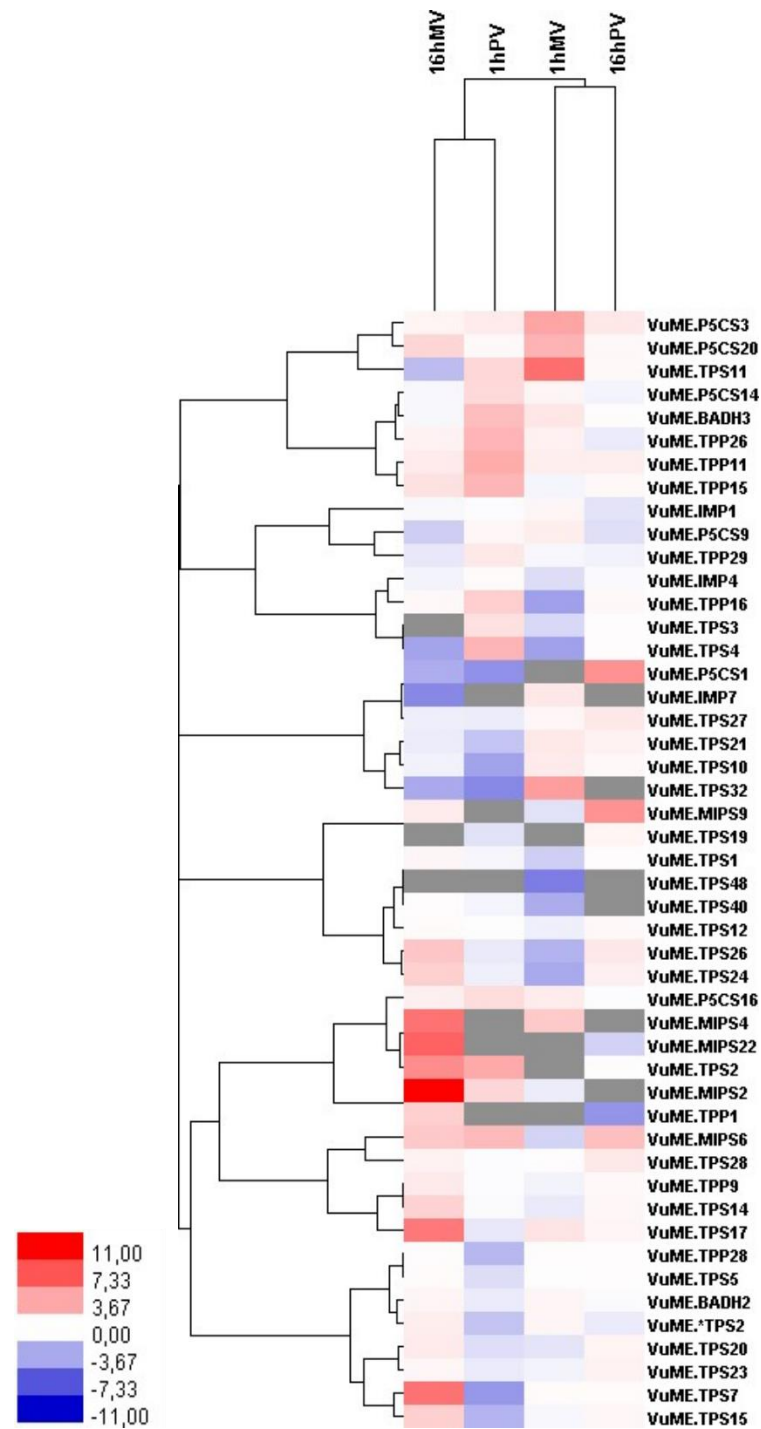


Figura 16. Perfil de expressão *in silico* dos osmoprotetores de feijão-caupi sob estresses combinados. Tecido foliar injuriado e inoculado com CPSMV (MS) e CABMV (PV) com 60 minutos e 16 horas de estresse.

3.6 Desenho de *Primers*

Foram desenhados 11 pares de *primers* para genes alvos D.E. específicos para feijão-caupi e representativos de cada classe de osmoprotetor analisada (Tabela 3).

Tabela 3. *Primers* desenhados e sintetizados para validação por RT-qPCR.

ID	Sequence Sense	Tm		Sequence Antisense	Tm		% GC	Produto (pb)
		°C	% GC		°C	% GC		
Vu.P5CS25	CAGAATGGAGCTGATGTTGC	57.15	50.00	CAGGACGAGTTTGTCTGCAA	58.42	50.00		183
Vu.P5CS32	ATTCCTGTTCTGGGTCATGC	57.87	50.00	CCAACCTTTTCGCTACCAAGT	58.11	50.00		168
Vu.P5CS2	TTCAGCCAGCTTGATGTGAC	58.47	50.00	TTTCTGAAGCCAGCATCCC	57.73	52.63		74
Vu.IMP5	GGATTCAAGTGAGCGCAACT	58.84	50.00	AAACACCAGCAGCCATATCC	58.23	50.00		237
Vu.TPS3	ACTGCACGACTGGATGAATC	57.98	50.00	CGCAACTGCTTCTCTGAATC	57.20	50.00		191
Vu.TPP30	TGGCCCTTCTATTGGTTCTC	56.62	50.00	TGGCCCTTCTATTGGTTCTC	56.90	50.00		184
Vu.TPP29	GATCCGACCTGTGATTAAGT	56.16	47.62	AATTGTTTAGCCCAAGTGAATC	56.88	40.91		73
Vu.TPP26	TCTGATAAGCAGGGTCTTGG	56.62	50.00	TGTACACTCTTTGAGCAACC	55.62	45.00		98
Vu.BADH1	CGGTTTAGGATCTGCCGTAA	57.41	50.00	CGACCAAAGCCACTACGTTT	58.78	50.00		150
Vu.CMO2	ATCCACGGAGCAGATAAAGG	57.08	50.00	CCCATGATAAGGGCAGACAA	57.27	50.00		184
Vu.MIPS2	CTGCTTCCAATGGTAAACCC	56.67	50.00	CAGGGAGTGGAGTCATGGA	58.00	57.89		154

4 Discussão

4.1 Características físico-químicas e localização subcelular

De modo geral, as proteínas das quatro categorias de osmoprotetores de *V. unguiculata* apresentaram ponto isoelétrico (p.I.) e peso molecular (M.W.) semelhantes ao reportado na literatura para outras espécies vegetais. A P5CR, proteína do osmoprotetor prolina, apresentou um M.W. semelhante ao encontrado para P5CR de *A. thaliana* (Gilbert et al.,2014), entretanto, o p.I. diferiu comparativamente ao verificado neste estudo. MA e colaboradores (2008)

analisaram a P5CR de *T. aestivum* e observaram o p.I. de 8.43, corroborando ao resultado aqui encontrado. Ainda sobre o osmólito prolina, os candidatos de P5CS de feijão-caupi apresentaram resultados semelhantes ao observado nos trabalhos de Wang et al. (2008) e Li et al. (2018) quanto ao p.I. e M.W.

Para glicina-betaína, representantes de BADH e CMO de *V. unguiculata* apresentaram resultados de p.I e M.W. similares aos relatados por Xu et al. (2018). Em MIPS, proteína de mio-inositol, foi apresentado o p.I e M.W. semelhantes aos encontrados em *Physcomitrella patens* e *Selaginella moellendorffii*, pertencentes aos grupos das briófitas e pteridófitas, respectivamente (Hazra, 2015). Vu.MIPS2 foi o único transcrito com o p.I. mais elevado que a média observada entre os candidatos analisados nessa classe. Para trealose, TPP e TPS apresentaram variação quanto ao p.I e M.W, padrão encontrado recentemente no trabalho de Wang, Ouyang e Wang (2019) em *Brachypodium distachyon*.

Com relação a predição da localização subcelular, vários estudos relataram a preferência destes osmoprotetores em se acumularem naturalmente em diferentes componentes do citoplasma e no cloroplasto (Rhodes e Hanson, 1993; Zulfiqar et al., 2019). No citoplasma, os osmoprotetores exercem o papel de equilibrar o meio osmótico celular, bem como de proteger as organelas citoplasmáticas de uma possível degradação (Ranganayakulu et al., 2013). Cloroplastos, mitocôndria e membrana plasmática são caracterizados por serem locais chave para a geração de ROS (Gill e Tujela, 2010), desta forma, os osmoprotetores encontrados nesses compartimentos podem estar exercendo a função de balanceamento de ROS de forma a evitar ou diminuir possíveis danos oxidativos.

4.2 Domínios e motivos conservados

Domínios são unidades estruturais funcionais que podem conter um ou mais motivos conservados a nível de sequência e estrutura e a sua identificação é de suma importância para reforçar a caracterização funcional de várias proteínas alvo (Cannataro et al., 2009). Nesse

contexto, as MIPS são altamente conservadas em diversas espécies vegetais, compartilhando domínios catalíticos chaves, responsáveis por catalisar a reação redox, gerando a formação de inositol a partir de G6P (Abid et al., 2012). Estudos anteriores indicam que a presença dos três domínios em MIPS descritos em *V. unguiculata* e nas sequências das demais espécies são essenciais para a atividade de ligação de NAD⁺ e catálise da proteína (Kleizer e Eisenberg, 2002; Abid et al., 2012). Para as sequências da proteína IMP, os três locais ativos da enzima identificados no alinhamento figuram como essenciais para a ligação de metal e substrato a IMP (Zhang., 2017).

Para BADH, o primeiro motivo descrito como “QLFIDGE” apresenta-se como um indício da sua localização cloroplastidial, assim como relatado por Weretilnyk e Hanson, (1990). A sequência “VTLELGKSP” é caracterizada como um decapeptídeo (Lamark et al., 1991) que se encontra presente e conservado entre as sequências ortólogas de BADH, com alteração de uma treonina (T) por uma serina (S) na posição 253. Na região C-terminal encontra-se o motivo “SKL”, relacionado com o direcionamento das proteínas ao peroxissomo (Reumann, 2004) também observado em feijão-caupi (Figura 3).

O estudo de DÍAS et al. (2012) revelou através da técnica de cristalografia de uma BADH de espinafre, que a posição 441 corresponde a um aminoácido crítico para a síntese de glicina-betaína, envolvendo uma alanina (A) ou uma Cisteína (C). Em Vu.d_BADH1 de *V. unguiculata* este aminoácido crítico é ocupado por uma isoleucina na posição 439, sendo indicativo de que esta proteína só terá atividade de Amino aldehyde dehydrogenase (AMADH) com ausência de atividade de BADH, como observado por Kopěčný et al. (2013).

As duas regiões conservadas encontradas na CMO do feijão-caupi foram verificadas anteriormente para a CMO de *Citrullus lanatus* e este padrão de conservação tem sido relatado como essencial para o seu funcionamento (Mason e Cammack 1992; Rathinasabapathi et al., 1997; Hibino et al., 2002; Xu et al., 2018).

No caso da P5CS, o zíper de leucina identificado no presente estudo está envolvido na preservação da estrutura terciária da enzima (Huet et al., 1992). O domínio conservado Glu-5-Kinase está intimamente relacionado à fosforilação do glutamato para formar glutamil fosfato, o qual é reduzido pelo domínio GSA-DH (Wang et al., 2014). Além disso, o domínio de ligação NAD(P)H foi identificado anteriormente nos estudos de Savouré et al. (1995), Su et al. (2011) e Wang et al. (2017).

A P5CR apresentou quatro motivos, onde o primeiro motivo identifica a dobra de Rossmann “GxxGxG” composta por três fitas β paralelas ligadas por duas α -hélices (Rossmann et al., 1974). O segundo motivo “RxMxN” além de formar uma alça conservada no sítio ativo, possui um resíduo de metionina que funciona como contribuinte para um ambiente hidrofóbico (Forlani et al., 2015). O terceiro motivo “GSxPA” contribui para a formação da bolsa do sítio ativo junto com os resíduos dos motivos dois e quatro, bem como ajuda na estabilidade do núcleo do sítio ativo, padrão também encontrado no trabalho de Forlani et al. (2015).

As assinaturas conservadas encontradas em TPP são marcadas por três motivos importantes para o funcionamento desta enzima. os quais comportam aminoácidos essenciais para o sítio de ligação ao substrato e sítio de catalisação. Além disso, o Asp4 localizado no primeiro motivo corresponde ao local de sítio ativo, compondo o domínio fosfohidrolase, característico desta família proteica. No segundo motivo (S/T)GX contém uma serina ou uma treonina que se presume formar uma ligação de hidrogênio a um átomo de oxigênio fosforil, o terceiro compreende resíduos que servem como ligantes metálicos (Rao et al., 2006). Nas proteínas TPS de *V. unguiculata* foram identificados resíduos conservados importantes para a ligação glucose-6-fosfato (Glc6P) e uridina difosfoglucoose (UDP-Glc) (Avonce et al., 2006; Wang et al., 2019).

Estudos anteriores relatam que os domínios TPS e TPP se fundiram em algum momento da história evolutiva desta família gênica, formando TPS com dois domínios fusionados

(Blázquez et al., 1995). Em feijão-caupi, foi observado que os candidatos Vu.TPS1, Vu.TPS3, Vu.TPS4, Vu.TPS5 e Vu.TPS6 apresentaram os motivos conservados da enzima TPP, o que indica esta característica evolutiva. Entretanto, também foram identificados candidatos sem a presença do domínio TPP, representados por Vu.*TPS2, Vu.*TPS7 e Vu.*TPS8 (Figura 10). Desta forma, as TPS de *V. unguiculata* foram categorizadas entre as que continham o domínio TPS e TPP (classe I) e as que não possuem o domínio TPP (classe II), divisão já relatada para TPS em *B. distachyon* (Wang et al., 2019) e *A. thaliana* (Leyman et al., 2001).

4.3 Análises fenéticas

Os dendrogramas referentes a IMP, MIPS, BADH, CMO, P5CR e P5CS seguiram o padrão relacionado às respectivas famílias taxonômicas. MA et al. (2019) construíram uma árvore filogenética a partir do método de *Neighbor-Joining* utilizando 70 representantes de MIPS de 36 espécies e foi evidenciada a segregação dos genes MIPS em grupos taxonômicos distintos, principalmente no que se refere as monocotiledôneas e dicotiledôneas, resultado também reportado por Abreu e Aragão (2007). Por sua vez, as IMPs de *V. unguiculata* estão mais relacionadas com às de *A. thaliana*, espécie mais próxima no contexto taxonômico observado no dendrograma.

A subfamília BADH caracterizada como aldeído desidrogenase da família 10 (ALDH10) está presente e conservada em diversos organismos (fungos, protistas, proteobactérias e plantas). No trabalho de Muñoz-Clares et al. (2014) foi observado que para a BADH de plantas terrestres (Embryophyta) formaram um grupo monofilético bem suportado, assim como verificado para plantas com sementes e as angiospermas. Em feijão-caupi, como o número de candidatos dessa classe foi relativamente pequeno, foi possível observar uma segregação taxonômica clara entre as BADHs de monocotiledôneas (Poaceae) e dicotiledônias (Amaranthaceae, Brassicaceae e Fabaceae).

Como mostrado na fenética realizada com as proteínas CMO, as espécies de monocotiledôneas (*O. sativa* e *Z. mays*) se mostraram intimamente relacionadas, o mesmo foi observado para as espécies pertencentes as dicotiledônias, que também foram fortemente agrupadas, com exceção de *A. thaliana* (Brassicaceae) e *B. vulgares* (Amaranthaceae). Mesmo sendo observada separação de acordo com a classificação taxonômica, os valores de suporte para todos os nós indicam que as sequências de CMO são bastante similares entre as espécies. Luo e colaboradores (2012) também observaram esse padrão para CMO de *O. sativa*.

Trabalhos como os de Turchetto-Zolet, Margis-Pinheiro e Margis, (2009) e de Wang et al. (2017), mais recentemente, abordaram a diversidade de P5CS em espécies vegetais e evidenciaram que sequências de P5CS foram separadas em dois grupos, com sequências pertencentes a espécies de monocotiledôneas e o outro grupo com dicotiledôneas. O mesmo perfil foi observado para o dendrograma construído para P5CS de *V. unguiculata*. Além disso, foi possível observar também a formação de dois grupos para espécies de *Poales* em monocotiledôneas. Um *cluster* contendo sequências P5CS1, e o outro, com sequências P5CS2. Em sequências de dicotiledônias, P5CS1 e P5CS2 de *A. thaliana* formaram dois *clusters*, porém, intimamente relacionados, como observado por Turchetto-Zolet e colaboradores (2009).

As duas cópias do gene P5CS (P5CS1 e P5CS2) foram identificadas e acredita-se que suas funções sejam distintas (Vendruscolo et al., 2007; Verdoy et al., 2006). O padrão de expressão entre elas é variável, em *A. thaliana* por exemplo, P5CS1 foi induzido por estresse, enquanto que P5CS2 apresentou indução em células em divisão (Strizhov et al., 1997). Mutantes de P5CS1 reduziram o crescimento e alteraram os níveis de ROS, sugerindo hipersensibilidade ao sal, estresse osmótico e baixo potencial hídrico (Székely et al., 2008). Por sua vez, em *O. sativa*, P5CS1 foi induzido por estresse abiótico (sal, desidratação, frio) em diversos órgãos, enquanto P5CS2 foi expresso em plantas maduras e induzido por NaCl e manitol (HUR et al 2004).

Em nosso trabalho, o dendrograma apresentou três candidatos de *V. unguiculata* (Vu.P5CS13, Vu.P5CS14 e Vu.P5CS15) fortemente agrupados com a P5CS1 de *G. soja*. Além de ambas serem da mesma família taxonômica, este resultado sugere que P5CS1 seja a cópia atuante em *V. unguiculata* sob estresse hídrico, sendo um resultado esperado tendo em vista que P5CS1 está intimamente relacionado com a resposta a estresses abióticos.

Com a P5CR de *V. unguiculata* (Vu.P5CR1) ocorreu a formação de um *cluster* com candidatos da família Fabaceae (*V. angularis* e *G. max*) com alto valor de suporte, o mesmo foi observado para outros *clusters* agrupados de acordo com a classificação taxonômica que comportam dois grupos de monocotiledôneas e dicotiledôneas, agrupamento relatado por Li e colaboradores (2015) para P5CR de *Lolium perene*.

Para trealose, as TPP de feijão-caupi foram separadas em dois grupos, um fortemente relacionado com *Gossypium arboreum*, pertencente à família Malvaceae, e próximo taxonomicamente da família Fabaceae, e no outro grupo, Vu.TPP28 e 29 formaram *cluster* com *M. truncatula*. Para os demais, o valor de suporte foi diminuindo de acordo com a distância taxonômica. Sequências de monocotiledôneas não formaram *clusters* e seguiram separadas das dicotiledônias.

Diab et al. (2013) avaliando seis sequências de TPPs de *Triticum durum*, observaram alto grau de confiança no agrupamento de sequências de *T. durum* com *O. sativa*. Em contraste, as TPPs de *A. thaliana* e *A. lyrata* ficaram separadas, embora ambas pertençam a família Brassicaceae, além de algumas sequências de *Z. mays* que não formaram *cluster*. Os dados mencionados acima corroboram ao encontrado para TPPs de *V. unguiculata*, indicando que essas sequências aparentemente não são similares dentro de um grande clado, como Rosids. Por este motivo, as duas sequências TPP de *A. thaliana* não formaram *cluster* e sequências de espécies de dicotiledônias sofreram segregação em dois grupos, juntamente com algumas TPPs de feijão-caupi e de *O. sativa*.

Com relação às sequências de TPS, o agrupamento indicou claramente uma segregação relacionada não somente pela similaridade entre os táxons como também pela divergência evolutiva entre classes I e II da subfamília TPS. Vu.*TPS2, Vu.*TPS7 e Vu.*TPS8 são representantes de *V. unguiculata* que apresentaram apenas o domínio TPS (Glyco_transfer_20) em sua estrutura, e portanto, aparentemente pertencem a classe II. Além disso, esses transcritos formaram *cluster* que não continham o domínio TPP (HAD_like), exceto Vu.*TPS2. Os demais candidatos (Vu.TPS1, Vu.TPS3, Vu.TPS4, Vu.TPS5 e Vu.TPS6) formaram outro grupo com que continham os dois domínios (TPS+TPP), agrupando com a subfamília TPS classe I. Diversos estudos reportaram espécies vegetais que apresentavam a mesma divisão entre as classes I e II da subfamília TPS, a exemplo de *S. tuberosum*, *Saccharum spp. hybrid*, *Populus trichocarpa*, *A. thaliana* e *O. sativa* (Xu et al., 2017; Hu et al., 2020; Yang et al., 2012). Esta divisão faz sentido tendo em vista que as duas classes apresentam características que as diferem no número de cópias, padrões de expressão, funções enzimáticas e fisiológicas (Yang et al., 2012).

4.4 Ancoragem de osmoprotetores no genoma de *V. unguiculata*

Em um estudo anterior com osmoprotetores de soja, Kido e colaboradores (2013) utilizaram tecnologia NGS para a construção de bibliotecas transcriptômicas de soja sob déficit hídrico e estresse biótico e conseguiram identificar 36 genes diferencialmente expressos associados a biossíntese de prolina (P5CS e P5CR), glicina-betaína (BADH e CMO), trealose (TPS1 e TPPB) e mio- inositol (INSP1), os quais foram mapeados em 25 loci correspondentes do genoma de soja. Embora a soja seja tetraploide e o caupi seja diploide, um número semelhante foi identificado (31 genes-candidatos) associados as quatro categorias de osmoprotetores (prolina, glicina-betaína, mio-inositol e trealose). Portanto, tal fato se justifica, pois o genoma de soja compreende um alopoliploide com níveis significativos de redundância, resultando em várias cópias de alguns genes (Schmutz et al., 2010).

A ação da enzima P5CS é essencial para que ocorra o acúmulo de prolina em plantas sob estresses abióticos, principalmente salinidade e seca. Ao longo do processo evolutivo deste gene, os domínios catalíticos proB e proA que anteriormente eram separados foram fusionados e tornaram a P5CS uma enzima bifuncional, que está associada as duas primeiras reações de catalização na biossíntese da prolina (Delauney e Verma et al., 1993). Em algumas espécies vegetais, o gene que codifica a ação de P5CS apresenta duas cópias (P5CS1 e P5CS2) que foram isoladas e suas funções foram entendidas como distintas (Vendruscolo et al., 2007; Verdy et al., 2006). Em *V. unguiculata*, foram identificados quatro loci com genes homólogos, dois nomeados como PROLINA-MULTI (cromossomo 1 e 8) e dois como GPR // GK (cromossomo 5 e 10). Os quatros genes continham os domínios catalíticos proB (EC 2.7.2.11) e proA (EC 1.2.1.41), indicando que os mesmos provavelmente são bifuncionais. A enzima P5CR que catalisa a última reação para a síntese da prolina é codificada apenas por um gene em *V. unguiculata*, assim como reportado em *A. thaliana* (Funck et al., 2012).

No entanto, ainda não está claro o motivo da presença de quatro genes que codificam a enzima P5CS em *V. unguiculata*. Este mesmo fenômeno foi observado no genoma de outros representantes da família Fabaceae, como *P. vulgaris* e *G. max*, ambos depositados no Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Possíveis homólogos de P5CS identificados em alguns organismos podem ser resultado de duplicação independente por seleção de purificação para o domínio catalítico a jusante de seleção direcional em vários locais que favorecem o organismo, atuando no papel fisiológico da enzima e aperfeiçoando a regulação do metabolismo da prolina (Rai e Penna 2013).

Glicina-betaína é um composto quartenário dentro do grande grupo dos osmoprotetores, encontrado em diversos alimentos. Em plantas acumuladoras de GB, sua síntese é realizada em resposta ao déficit hídrico e estresse salino, além de outros estresses abióticos (Mccue e Hanson, 1990; Rhodes e Hanson, 1993; Kishitani et al., 1994). As primeiras etapas da biossíntese de GB

são catalizadas por CMO, e em segundo momento por BADH, para a produção de GB em sua forma livre. Em arroz, mesmo sendo uma espécie não acumuladora de GB, o gene CMO foi ancorado em um locus do cromossomo 6, e duas cópias de um gene BADH no cromossomo 4 e 8 (International Rice Genome Sequencing Project, 2005).

Como proposto por Díaz-Sánchez et al., (2012) e Munoz-Clares et al., (2014), a duplicação do gene BADH e a mudança de um aminoácido (Ala/Cys441) garantem a atividade BADH em algumas isoenzimas ALDH10. No entanto, a ausência deste padrão limita o acúmulo de GB em plantas. Neste cenário, a atividade de CMO seria deletéria em organismos sem atividade BADH, estando presente apenas em organismos acumuladores de GB, porém, o gene CMO foi identificado também em espécies não acumuladoras (Mitsuya et al., 2011; Joseph et al., 2013). Esta informação pode indicar que (i) os genes CMO não são expressos ou expressos em baixos níveis, (ii) proteínas CMO não são funcionais ou (iii) participam de outra via metabólica que não a de síntese de GB (Carrillo-Campos et al., 2018).

A enzima CMO identificada em *V. unguiculata* ancorou em um único locus gênico no cromossomo 3, enquanto BADH apresentou duas cópias do mesmo gene nos cromossomos 3 e 9. Por BADH de *V. unguiculata* não apresentar o resíduo de alanina ou cisteína na posição 441 no alinhamento, pode ser um indicativo que esta espécie não consegue acumular GB, como observado em *O. sativa* e outras espécies.

Dentro da categoria dos açúcares poliois, os mio-inositois são retratados como moléculas importantes para diversos processos de desenvolvimento e de resposta à estresses em plantas (Yancey, 2005; Majee et al., 2004; Basak et al., 2017). Para a sua síntese, as enzimas MIPS e IMP são cruciais para o processo de formação de inositol e seus derivados. Presente na maquinaria da síntese de mio-inositol, a enzima MIPS figura como peça chave para a formação de inositol e fosfoinositídeos, e em algumas plantas, é verificada a presença de vários genes

MIPS, possivelmente para suprir uma grande demanda de requisitos fisiológicos específicos (Abreu e Aragão, 2007; Kaur et al., 2008).

Análises com MIPS em várias famílias taxonômicas indicaram a presença de dois ou três homólogos desse gene em angiospermas (Hazra et al., 2019), o que provavelmente se deve a eventos de duplicação seguidos de divergência funcional, como observado em *A. thaliana*, que dispõe de três genes MIPS distintos funcionalmente (Fleet et al., 2018). Em grão de bico, Majee et al. (2011) identificaram dois genes MIPS, sugerindo que o gene CaMIPS2 evoluiu através de duplicação. Em *V. unguiculata*, foram identificados dois genes MIPS homólogos localizados no cromossomo 1 e 3, sugerindo que o gene MIPS provavelmente sofreu duplicação nesta espécie, assim como verificado em outras espécies vegetais.

Os candidatos da enzima IMP em *V. unguiculata* ancoraram em quatro loci no genoma da espécie, sendo o locus do cromossomo 9 o que apresentou um quantitativo maior de candidatos. Os demais loci relacionados a IMP provavelmente são genes homólogos que atuam em outras vias metabólicas como as de biossíntese de histidinol (Vu.IMP9 e Vu.IMP10) e na regulação de outros compostos (Vu.IMP8 e Vu.IMP11).

Em *A. thaliana* foram identificados três genes IMP que se expressam em vários tecidos vegetais, uma IMPL2 purificada foi caracterizada como um fosfato de histidinol ativo que participa da via biossintética de histidina, enquanto IMP e IMPL1 tem a capacidade de catalizar a hidrólise de inositol e galactose-fosfato na célula vegetal, sendo IMP também um segundo mensageiro envolvido na sinalização e síntese de L-galactose (Nourbakhsh et al., 2015).

Os candidatos da trealose ancoraram em diversos loci no genoma de *V. unguiculata*. Devido ao dinamismo metabólico referente ao desenvolvimento vegetal das plantas, os níveis de trealose-6-fosfato (T6P) precisam ser controlados precisamente (Figuerola e Lunn, 2016; Vandesteene et al., 2012; Figuerola et al., 2016; Yadav et al., 2014). Essa enzima participa da regulação de açúcar e amido, além de atuar em outras vias de sinalização, inclusive as mediadas

por hormônios vegetais. T6P figura como um intermediário na via de biossíntese da trealose e seus níveis são modulados por homólogos de TPS e TPP (Zang et al., 2011). Em *V. unguiculata*, foram identificados sete loci associados a TPP, sendo 10 associados a TPS. Esta grande quantidade de cópias, principalmente para TPS já é bem relatada em outras espécies vegetais, como *B. distachyon*, *A. thaliana* e *S. tuberosum* (Wang et al., 2019; Vandesteene et al., 2012; Xu et al., 2017).

Sabendo que estes dois genes exercem diversas funções importantes no desenvolvimento e defesa da planta (Cai et al., 2009; Márquez-Escalante et al., 2006; Zhang et al., 2017; Lyu et al., 2013), o aumento na sua demanda é inevitável, como reflexo disto, várias cópias de TPS e TPP são encontradas no genoma de diversas espécies. No genoma de *A. thaliana*, *Z. mays* e *O. sativa* foram identificados 10 genes TPP e 11 TPS, 11 TPP e 14 TPS e nove TPP e 11 TPS, respectivamente (Leyman et al., 2001; Ramon e Rolland, 2007; Henry et al., 2014; Pramanik e Imai, 2005; Zang et al., 2011), números similares aos encontrados em *V. unguiculata*.

Os candidatos de TPS classe II (*TPS) ancoraram juntamente com TPS classe I (TPS) nos cromossomos 2, 3, 5, 7 e 11. O mesmo não foi observado para candidatos de TPS classe I, que apresentaram loci exclusivos, localizados nos cromossomos 2, 3, 9 e 11 do genoma de *V. unguiculata*. O fato de TPS classe I se sobressair de TPS classe II também foi observado em outras angiospermas (Delorge et al., 2015), sugerindo que as TPS da classe I estão associadas a um maior número de processos biológicos. Além disso, estes genes são distintos não só no número de cópias como também no padrão de expressão, nas funções fisiológicas e na atividade enzimática, comparativamente às TPS classe II (Jin et al., 2016).

4.5 Estrutura gênica

Apesar da heterogeneidade das estruturas gênicas de P5CS, a quantidade de éxons foi conservada entre as estruturas, exceto por Vigun08g152000 que teve número de éxons inferior

aos demais (17 éxons). Estes resultados são semelhantes ao encontrado por Dolcimasculo et al., (2019), que identificaram genes P5CS que continham de 20 a 21 éxons nos genomas de *Coffea arabica*, *C. canephora* e *C. eugenoides*. Padrões estruturais semelhantes foram identificados para P5CS de *B. napus* e *A. thaliana* (Wang et al., 2014), indicando que as P5CS são altamente conservadas e podem apresentar características funcionais comuns entre essas espécies.

O gene que codifica a proteína MIPS de feijão-caupi contém duas cópias, ambas com 10 éxons. De acordo com uma análise dinâmica realizada com genes MIPS de algodão e mais 44 MIPS de outras plantas, foi relatado apenas um éxon nas algas unicelulares *C. merolae* e *Ostreococcus tauri*, enquanto que plantas superiores apresentaram 10 éxons (Ma et al., 2019), similarmente ao encontrado para MIPS de feijão-caupi. Este fato pode indicar a presença de processos evolutivos que influenciaram na divisão do único éxon de MIPS de algas unicelulares para os 10 éxons encontrados em *V. unguiculata*.

Os genes BADH e CMO, representantes de glicina-betaína, continham 15 e 10 éxons respectivamente, este quantitativo foi observado para o gene BADH identificado no genoma de *A. thaliana* e para a CMO de *Atriplex centralasiatica* (Joseph et al., 2013). Ambas as espécies pertencem a táxons distantes de *V. unguiculata*, principalmente *A. centralasiatica* (Dicotiledônea), mas têm em comum a adaptação a áreas mais secas e à salinidade, indicando que BADH e CMO aparentemente são genes afetados por processos adaptativos e convergência.

No que se refere à trealose, o gene TPP identificado no genoma de *V. unguiculata* apresentou estruturas contendo de nove a 11 éxons, enquanto que em TPS, o número de éxons variou de estruturas com 3 e 17 éxons. O gene TPP identificado em *Brachypodium distachyon* apresentou estruturas que variaram entre seis e 10 éxons (Wang et al., 2019), resultado semelhante ao encontrado em feijão-caupi. A conservação da estrutura do gene TPP nestas duas espécies pode indicar que o mesmo atua de forma semelhante nos dois organismos vegetais.

A heterogeneidade encontrada nos genes TPS de feijão-caupi indica que é muito provável que estes genes tenham se dividido em subcategorias. Este padrão foi verificado em 53 genes TPS dispostos no genoma de *Gossypium raimondii* (15), *G. arboreum* L. (14) e *G. hirsutum* L. (24), que foram divididos em dois grupamentos de acordo com a filogenia e a heterogeneidade das estruturas gênicas. O grupo um de TPS continha genes com 17 a 18 éxons e a classe dois foi composta por 3 éxons (MU et al., 2016), similarmente ao observado em genes TPS de *B. distachyon* (Wang et al., 2019).

Os genes P5CR de feijão-caupi apresentaram sete éxons e os genes que codificam IMP de mio-inositol de oito a 11 éxons. Até o momento, não foram identificados estudos que abordam a estrutura dos genes P5CR e IMP em feijão-caupi, ressaltando a relevância dos resultados aqui apresentados.

4.6 Identificação de promotores associados a regulação de osmólitos

A resposta vegetal a estresses abióticos requer a produção de proteínas funcionais importantes, como as que atuam na síntese de osmoprotetores, e proteínas que atuam nas vias regulatórias, como as quinases e os fatores de transcrição (Saibo et al., 2009). Sabe-se que a expressão gênica pode ser ativada por diversas vias, e que a atuação de FTs no reconhecimento de elementos cis-reguladores (promotores), compreende o principal mecanismo de determinação da expressão de osmoprotetores (Kido et al., 2019).

Neste contexto, a identificação de elementos cis-regulatórios pode revelar como ocorre o recrutamento de proteínas responsivas a diversas condições de estresse abiótico e/ou biótico, e a existência de sequências de qualidade e genomas de plantas completamente anotados podem favorecer a compreensão de sua função como componentes de uma grande rede transcricional (Priest et al., 2009).

ZF-HD é um ativador transcricional independente de ABA que reconhece uma sequência de 14 pb (CACTAAATTGTCAC). Foi relado como atuante na resposta a estresses

abióticos, como a desidratação (Tran et al., 2007). Além disso, ZF-HD e o FT NAC foram induzidos em *A. thaliana* e aumentaram a expressão de genes responsivos à desidratação (ERD) precocemente, o que sugere que estes dois FTs podem atuar de forma cooperativa na transcrição do gene ERD1 (Tran et al., 2007). Sun et al. (2018) relataram que BHLH, segundo FT identificado neste estudo, atua como regulador de vários processos celulares envolvidos na resposta a estresses bióticos e abióticos em animais. Em plantas, foram descritos como responsivos a ferimentos, seca, sal e baixas temperaturas.

As proteínas TPP, TPS, MIPS e IMP foram os candidatos que mais apresentaram regiões de ligação em associação com os dois motivos identificados (Figura 13C). Sabendo que a interação FT/sítio de ligação influencia diretamente na atividade transcricional (Levine e Tijan, 2003), os genes que codificam TPP, TPS, IMP e MIPS possivelmente possuem sua transcrição altamente regulada pelos FTs ZF-HD e BHLH.

4.7 Perfil transcricional de osmoprotetores em *V. unguiculata*

4.7.1 Desidratação radicular

Estudos relacionados ao acúmulo de prolina indicam que a regulação temporal e espacial do gene P5CS é essencial para a biossíntese desta molécula (TROVATO et al., 2019). Neste sentido, a presença de transcritos de P5CS induzidos no transcriptoma do feijão-caupi sugere o início do acúmulo de prolina na espécie, visto que nos primeiros momentos do processo de biossíntese da prolina, a P5CS figura como a primeira enzima a catalisar a reação.

Transcritos referentes ao mio-inositol (MIPS e IMP) em feijão-caupi foram em sua maioria induzidos com 150 minutos de estresse, assim como observado para os dois transcritos de glicina-betaína (BADH e CMO). O padrão de expressão de enzimas da biossíntese de mio-inositol ainda não é bem relatado na literatura. Jia et al. (2019) verificaram que poucas IMPs vegetais foram exploradas quanto ao seu papel durante estresses abióticos. Resultados anteriores envolvendo ensaios em grão-de-bico, arroz e tabaco indicaram que as IMPs destas

espécies estão relacionadas a estresses abióticos como salinidade, frio e desidratação (Saxena et al., 2013; Zhang et al., 2017; Joshi-Sasha e Reddy, 2015).

Saxena et al. (2013) identificaram em grão de bico uma IMP que apresentou regulação positiva frente a estresses ambientais, com destaque para desidratação, resultado obtido a partir de técnicas que avaliam a atividade enzimática através de ensaios colorimétricos, assim como sua expressão gênica por RT-qPCR. Boominathan et al. (2004) e Kaur et al. (2008) relataram a indução de genes que codificam a proteína MIPS sob desidratação e pelo estímulo de ácido abscísico (ABA).

No que se refere ao acúmulo de GB, algumas plantas não conseguem sintetizar este osmólito justamente pela troca de aminoácido no ponto crítico para a sua síntese (Figura 5). Em contrapartida, BADH poderá apresentar atividade AMADH (Fitzgerald et al., 2009), a qual está envolvida em vários processos biológicos, inclusive na resposta a estresses abióticos através da síntese de GABA (Missihoun et al., 2011), o que pode justificar o fato da BADH está sendo regulada positivamente em nosso estudo com 150 minutos de desidratação radicular.

Trabalhos que abordam o perfil de expressão de TPS e TPP relatam sua indução em tempos precoces de estresse. Recentemente, Acosta-Pérez et al. (2020), avaliando linhagens resistentes e suscetíveis de milho submetidas a estresse hídrico durante 72 horas, reportaram a indução de TPS e TPP após 30 minutos de estresse nas linhagens resistentes, e após 2 e 4 horas nas linhagens susceptíveis. Resultado similar foi relatado por Jiang et al. (2010) com TPS de trigo para estresse salino e por frio. Em contraste, as TPS e TPP de feijão-caupi identificadas em nosso estudo foram, em sua maioria, reprimidas no tempo inicial e induzidas com 150 minutos.

4.7.2 Estresses combinados (injúria+inoculação viral)

As enzimas prolina e trealose além de atuarem no equilíbrio osmótico da célula, também são responsáveis por eliminar ROS, evitando ou diminuindo danos oxidativos da célula (Okuma

et al., 2004; Luo et al., 2008). A injúria foliar utilizada em nosso ensaio visando facilitar a penetração dos vírus pode ter incitado a espécie a produzir ROS em resposta ao ferimento, somado aos efeitos danosos ocasionados pelos patógenos. Este cenário pode acarretar em um aumento adicional nos níveis de ROS, e consequentemente, pode justificar a indução observada nas bibliotecas de RNA-Seq para os transcritos dessas classes de osmoprotetores.

A atuação de MIPS na tolerância vegetal a estresses abióticos já tem sido amplamente reportada na literatura (Joshi et al., 2013; Kaur et al., 2013; Tan et al., 2013; Goswami et al., 2014). No entanto, existem poucos relatos acerca de sua participação na resposta a estresses bióticos. Iqbal e colaboradores (2002) verificaram a superexpressão de MIPS em genótipos resistentes de soja a *Fusarium solani*, ao passo que nos genótipos susceptíveis os níveis de expressão dessas enzimas diminuiu com a aplicação do estresse. Recentemente, Zhai et al. (2016) relataram que o aumento dos níveis de inositol ocasionado pela superexpressão de MIPS resultou em diminuição nos níveis de H₂O₂ e aumento de características antioxidantes em plantas transgênicas de batata doce acometida por nematoides.

A indução dos osmoprotetores prolina, mio-inositol e trealose em feijão-caupi injuriado e acometido por viroses, em especial para CPSMV, sugere que o estresse abiótico associado (injúria) a um fator biótico (inoculação com vírus) pode favorecer o acúmulo destes compostos na espécie. No entanto, é importante ressaltar que o número de transcritos diferencialmente expressos nas bibliotecas de estresses combinados foi inferior ao observado nas bibliotecas de desidratação radicular.

5 Conclusão

O presente trabalho forneceu resultados importantes para a compreensão de características estruturais e funcionais de osmoprotetores (prolina, glicina-betaína, mio-inositol e trealose) em feijão-caupi sob múltiplos estresses, apresentando candidatos promissores para aplicação em abordagens biotecnológicas ou programas de melhoramento genético da espécie.

6 Agradecimentos

As instituições de suporte, a Embrapa Soja (Londrina PR) e o Instituto Agronômico de Pernambuco, pelo local e a disponibilidade para a realização dos experimentos de imposição aos estresses em Vigna. Aos órgãos de apoio à pesquisa FACEPE (Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco), e a rede InterSys pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

- Abid, G., Sassi, K., Muhovski, Y., Jacquemin, J. M., Mingeot, D., Tarchoun, N., & Baudoin, J. P. (2012). Comparative expression and cellular localization of myo-inositol phosphate synthase (MIPS) in the wild type and in an EMS mutant during common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seed development. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(3), 780-793.
- Abreu, E. F., & Aragão, F. J. (2007). Isolation and characterization of a myo-inositol-1-phosphate synthase gene from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) expressed during seed development and environmental stress. *Annals of Botany*, 99(2), 285-292.
- Acosta-Pérez, P., Camacho-Zamora, B. D., Espinoza-Sánchez, E. A., Gutiérrez-Soto, G., Zavala-García, F., Abraham-Juárez, M. J., & Sinagawa-García, S. R. (2020). Characterization of trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase genes and analysis of its differential expression in maize (*Zea mays*) seedlings under drought stress. *Plants*, 9(3), 315.
- Alscher, R. G., Donahue, J. L., & Cramer, C. L. (1997). Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 224-233.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.

- Ariel, F. D., Manavella, P. A., Dezar, C. A., & Chan, R. L. (2007). The true story of the HD-Zip family. *Trends in plant science*, 12(9), 419-426.
- Avonce, N., Leyman, B., Mascorro-Gallardo, J. O., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Iturriaga, G. (2004). The Arabidopsis trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant physiology*, 136(3), 3649-3659.
- Bailey, T. L., Boden, M., Buske, F. A., Frith, M., Grant, C. E., Clementi, L., Ren, J., W.Li, W., & Noble, W. S. (2009). MEME SUITE: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research*, 37(suppl_2), W202-W208.
- Bailey, T. L., & Elkan, C. (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in bipolymers.
- Barna, B., & Király, L. (2005). Host-pathogen relations: diseases caused by viruses, subviral organisms, and phytoplasmas. *Plant toxicology*, (Ed. 4), 519-553.
- Basak, P., Maitra-Majee, S., Das, J. K., Mukherjee, A., Ghosh Dastidar, S., Pal Choudhury, P., & Lahiri Majumder, A. (2017). An evolutionary analysis identifies a conserved pentapeptide stretch containing the two essential lysine residues for rice L-myo-inositol 1-phosphate synthase catalytic activity. *PloS one*, 12(9), e0185351.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2012). GenBank. *Nucleic acids research*, 41(D1), D36-D42.
- Blazquez, M. A., Santos, E., Flores, C. L., Martínez-Zapater, J. M., Salinas, J., & Gancedo, C. (1998). Isolation and molecular characterization of the Arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal*, 13(5), 685-689.

- Boominathan, P., Shukla, R., Kumar, A., Manna, D., Negi, D., Verma, P. K., & Chattopadhyay, D. (2004). Long term transcript accumulation during the development of dehydration adaptation in *Cicer arietinum*. *Plant Physiology*, 135(3), 1608-1620.
- Cai, Z., Peng, G., Cao, Y., Liu, Y., Jin, K., & Xia, Y. (2009). Trehalose-6-phosphate synthase 1 from *Metarhizium anisopliae*: clone, expression and properties of the recombinant. *Journal of bioscience and bioengineering*, 107(5), 499-505.
- Cannataro, M., dos Santos, R. W., & Sundnes, J. (2009, May). Bioinformatics' challenges to computer science: Bioinformatics tools and biomedical modeling. In *International Conference on Computational Science* (pp. 807-809). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Cardoso, M. J., Freire Filho, F. R., & Athayde Sobrinho, C. (1990). BR 14 MULATO: nova cultivar de feijão macassar para o Estado do Piauí. EMBRAPA-UEPAE de Teresina.
- Carrillo-Campos, J., Riveros-Rosas, H., Rodríguez-Sotres, R., & Munoz-Clares, R. A. (2018). Bona fide choline monooxygenases evolved in Amaranthaceae plants from oxygenases of unknown function: Evidence from phylogenetics, homology modeling and docking studies. *PloS one*, 13(9), e0204711.
- Chaves, M. M., Flexas, J., & Pinheiro, C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, 103(4), 551-560.
- Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4(2), 215-223.
- Delorge, I., Figueroa, C. M., Feil, R., Lunn, J. E., & Van Dijck, P. (2015). Trehalose-6-phosphate synthase 1 is not the only active TPS in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal*, 466(2), 283-290.
- Diab, A. A., Nada, A. M., & Ashoub, A. (2013). Molecular cloning, expression, sequence analysis and in silico comparative mapping of trehalose 6-phosphate gene from

- Egyptian durum wheat. *International Journal of Biotechnology and Molecular Biology Research*, 4(1), 9-23.
- Díaz-Sánchez, Á. G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., Rudiño-Piñera, E., Montiel, C., Martínez-Castilla, L. P., & Muñoz-Clares, R. A. (2012). Amino acid residues critical for the specificity for betaine aldehyde of the plant ALDH10 isoenzyme involved in the synthesis of glycine betaine. *Plant physiology*, 158(4), 1570-1582.
- Dolcimasculo, F., de Souza, S. G. H., Ribas, A., Vieira, L. G. E., & dos Santos, T. B. (2019). IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE IN SILICO DO GENE P5CS (Δ 1-PIRROLINA-5-CARBOXILATO SINTETASE) EM COFFEA SSP. *X Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*.
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart A., et al. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research*, 47(D1), D427-D432.
- Eisen, M., & DeHoon, M. (1998). Cluster 3.0 Manual. *University of Tokyo: Human Genome Center*.
- Figueroa, C. M., Feil, R., Ishihara, H., Watanabe, M., Kölling, K., Krause, U., Höhne, M., Encke, B., Plaxton, W. C., Zeeman, S. C., Li, Z., et al. (2016). Trehalose 6-phosphate coordinates organic and amino acid metabolism with carbon availability. *The Plant Journal*, 85(3), 410-423.
- Figueroa, C. M., & Lunn, J. E. (2016). A tale of two sugars: trehalose 6-phosphate and sucrose. *Plant Physiology*, 172(1), 7-27.
- Fitzgerald, M. A., McCouch, S. R., & Hall, R. D. (2009). Not just a grain of rice: the quest for quality. *Trends in plant science*, 14(3), 133-139.

- Fleet, C. M., Yen, J. Y., Hill, E. A., & Gillaspay, G. E. (2018). Co-suppression of AtMIPS demonstrates cooperation of MIPS1, MIPS2 and MIPS3 in maintaining myo-inositol synthesis. *Plant molecular biology*, 97(3), 253-263.
- Forlani, G., Makarova, K. S., Ruszkowski, M., Bertazzini, M., & Nocek, B. (2015). Evolution of plant δ 1-pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. *Frontiers in plant science*, 6, 567.
- Funck, D., Winter, G., Baumgarten, L., & Forlani, G. (2012). Requirement of proline synthesis during Arabidopsis reproductive development. *BMC plant biology*, 12(1), 1-12.
- Gill, S. S., & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant physiology and biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., Koncz, C., Zilberstein, A. (1998). Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology*, 38(5), 755-764.
- Goswami, L., Sengupta, S., Mukherjee, S., Ray, S., Mukherjee, R., & Majumder, A. L. (2014). Targeted expression of L-myo-inositol 1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka confers multiple stress tolerance in transgenic crop plants. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, 23(3), 316-330.
- Grabherr, M. G., Haas, B. J., Yassour, M., Levin, J. Z., Thompson, D. A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q. (2011). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology*, 29(7), 644.
- Hazra, A., Dasgupta, N., Sengupta, C., & Das, S. (2019). MIPS: Functional dynamics in evolutionary pathways of plant kingdom. *Genomics*, 111(6), 1929-1945.

- Henry, C., Bledsoe, S. W., Siekman, A., Kollman, A., Waters, B. M., Feil, R., Stitt, M., Lagrimini, L. M. (2014). The trehalose pathway in maize: conservation and gene regulation in response to the diurnal cycle and extended darkness. *Journal of experimental botany*, 65(20), 5959-5973.
- Hibino, T., Waditee, R., Araki, E., Ishikawa, H., Aoki, K., Tanaka, Y., & Takabe, T. (2002). Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41352-41360.
- Hiller, K., Schobert, M., Hundertmark, C., Jahn, D., & Munch, R. (2003). JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic acids research*, 31(13), 3862-3865.
- Hoagland, D. R., & Arnon, D. I. (1950). The water-culture method for growing plants without soil. *Circular. California agricultural experiment station*, 347(2nd edit).
- Hu, B., Jin, J., Guo, A. Y., Zhang, H., Luo, J., & Gao, G. (2015). GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, 31(8), 1296-1297.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., & Verma, D. P. (1992). A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9354-9358.
- Hu, X., Wu, Z. D., Luo, Z. Y., Burner, D. M., Pan, Y. B., & Wu, C. W. (2020). Genome-wide analysis of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family and expression profiling of ScTPS genes in sugarcane. *Agronomy*, 10(7), 969.
- Hur, J., Jung, K. H., Lee, C. H., & An, G. (2004). Stress-inducible OsP5CS2 gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*, 167(3), 417-426.
- International, R. G. S. P. (2005). The map-based sequence of the rice genome. *Nature*, 436(7052), 793.
- Iqbal, M., Afzal, A., Yaegashi, S., Ruben, E., Triwitayakorn, K., Njiti, V., Ahsan, R., Wood, A.J., Lightfoot, D. (2002). A pyramid of loci for partial resistance to *Fusarium solani* f.

- sp. glycines maintains Myo-inositol-1-phosphate synthase expression in soybean roots. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(8), 1115-1123.
- Jiang, W., Fu, F. L., Zhang, S. Z., Wu, L., & Li, W. C. (2010). Cloning and characterization of functional trehalose-6-phosphate synthase gene in maize. *Journal of Plant Biology*, 53(2), 134-141.
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y., Liang, K., Ke, Q., Lin, W., Huang, J. (2019). The function of inositol phosphatases in plant tolerance to abiotic stress. *International journal of molecular sciences*, 20(16), 3999.
- Jin, Q., Hu, X., Li, X., Wang, B., Wang, Y., Jiang, H., Mattson, N., Xu, Y. (2016). Genome-wide identification and evolution analysis of trehalose-6-phosphate synthase gene family in *Nelumbo nucifera*. *Frontiers in plant science*, 7, 1445.
- Joseph, S., Murphy, D., & Bhave, M. (2013). Glycine betaine biosynthesis in saltbushes (*Atriplex* spp.) under salinity stress. *Biologia*, 68(5), 879-895.
- Joshi, R., Ramanarao, M. V., & Baisakh, N. (2013). Arabidopsis plants constitutively overexpressing a myo-inositol 1-phosphate synthase gene (SaINO1) from the halophyte smooth cordgrass exhibits enhanced level of tolerance to salt stress. *Plant physiology and biochemistry*, 65, 61-66.
- Kaur, H., Shukla, R. K., Yadav, G., Chattopadhyay, D., & Majee, M. (2008). Two divergent genes encoding L-myo-inositol 1-phosphate synthase1 (CaMIPS1) and 2 (CaMIPS2) are differentially expressed in chickpea. *Plant, Cell & Environment*, 31(11), 1701-1716.
- Kaur, H., Verma, P., Petla, B. P., Rao, V., Saxena, S. C., & Majee, M. (2013). Ectopic expression of the ABA-inducible dehydration-responsive chickpea L-myo-inositol 1-phosphate synthase 2 (CaMIPS2) in Arabidopsis enhances tolerance to salinity and dehydration stress. *Planta*, 237(1), 321-335.

- Kido, É. A., Ferreira-Neto, J. R. C., da Silva, M. D., Santos, V. E. P., da Silva Filho, J. L. B., & Benko-Iseppon, A. M. (2019). Osmoprotectant-related genes in plants under abiotic stress: expression dynamics, in silico genome mapping, and biotechnology. In *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 1-40). Springer, Cham.
- Kido, E. A., Neto, J. R. F., Silva, R. L., Belarmino, L. C., Neto, J. P. B., Soares-Cavalcanti, N. M., Pandolfi, V., D Silva, M., Nepomuceno, A. L., Benko-Iseppon, A. M. (2013). Expression dynamics and genome distribution of osmoprotectants in soybean: identifying important components to face abiotic stress. *BMC bioinformatics*, 14(1), 1-11.
- Kishitani, S., Watanabe, K., Yasuda, S., Arakawa, K., & Takabe, T. J. P. C. (1994). Accumulation of glycinebetaine during cold acclimation and freezing tolerance in leaves of winter and spring barley plants. *Plant, Cell & Environment*, 17(1), 89-95.
- Khan, M. S., Ahmad, D., & Khan, M. A. (2015). Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. *Electronic Journal of Biotechnology*, 18(4), 257-266.
- Kleiger, G., & Eisenberg, D. (2002). GXXXG and GXXXA motifs stabilize FAD and NAD (P)-binding Rossmann folds through C α -H $\cdots$ O hydrogen bonds and van der Waals interactions. *Journal of molecular biology*, 323(1), 69-76.
- Kopečný, D., Končítíková, R., Tylichová, M., Vigouroux, A., Moskalíková, H., Soral, M., ... & Moréra, S. (2013). Plant ALDH10 Family. *Journal of Biological Chemistry*, 288(13), 9491-9507.
- Kozłowski, L. P. (2016). IPC—isoelectric point calculator. *Biology direct*, 11(1), 1-16.

- Lamark, T., Kaasen, I., Eshoo, M. W., Falkenberg, P., McDougall, J., & Strøm, A. R. (1991). DNA sequence and analysis of the bet genes encoding the osmoregulatory choline—glycine betaine pathway of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 5(5), 1049-1064.
- Leyman, B., Van Dijck, P., & Thevelein, J. M. (2001). An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in plant science*, 6(11), 510-513.
- Levine, M., & Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature*, 424(6945), 147-151.
- Li, C., Shuqiang, W., Lei, H., Yongqiang, Q., Huali, Z., Haibo, X., & Zhenyuan, S. (2015). Gene cloning and expression of the pyrroline-5-carboxylate reductase gene of perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Horticultural Plant Journal*, 1(2), 113-120.
- Li, C., Ng, C. K. Y., & Fan, L. M. (2015). MYB transcription factors, active players in abiotic stress signaling. *Environmental and Experimental Botany*, 114, 80-91.
- Luo, D., Niu, X., Yu, J., Yan, J., Gou, X., Lu, B. R., & Liu, Y. (2012). Rice choline monooxygenase (OsCMO) protein functions in enhancing glycine betaine biosynthesis in transgenic tobacco but does not accumulate in rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Plant cell reports*, 31(9), 1625-1635.
- Luo, Y., Li, W. M., & Wang, W. (2008). Trehalose: protector of antioxidant enzymes or reactive oxygen species scavenger under heat stress?. *Environmental and Experimental Botany*, 63(1-3), 378-384.
- Lyu, J. I., Min, S. R., Lee, J. H., Lim, Y. H., Kim, J. K., Bae, C. H., & Liu, J. R. (2013). Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 112(2), 257-262.
- Ma, R., Song, W., Wang, F., Cao, A., Xie, S., Chen, X., Jin, X., Li, H. (2019). A cotton (*Gossypium hirsutum*) myo-inositol-1-phosphate synthase (GhMIPS1D) gene promotes

- root cell elongation in Arabidopsis. *International journal of molecular sciences*, 20(5), 1224.
- Majee, M., Maitra, S., Dastidar, K. G., Pattnaik, S., Chatterjee, A., Hait, N. C., Das, K. P., Majumder, A. L. (2004). A novel salt-tolerant L-myo-inositol-1-phosphate synthase from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice: molecular cloning, bacterial overexpression, characterization, and functional introgression into tobacco-conferring salt tolerance phenotype. *Journal of Biological Chemistry*, 279(27), 28539-28552.
- Majee, M., & Kaur, H. (2011). L-Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase (MIPS) in Chickpea: Gene Duplication and Functional Divergence. *Gene Duplication*, 225.
- Marchler-Bauer, A., Lu, S., Anderson, J. B., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., DeWeese-Scott, C., ... & Bryant, S. H. (2010). CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research*, 39(suppl_1), D225-D229.
- Márquez-Escalante, J. A., Figueroa-Soto, C. G., & Valenzuela-Soto, E. M. (2006). Isolation and partial characterization of trehalose 6-phosphate synthase aggregates from *Selaginella lepidophylla* plants. *Biochimie*, 88(10), 1505-1510.
- Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15), 2471-2472.
- Mason, J. R., & Cammack, R. (1992). The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annual review of microbiology*, 46(1), 277-305.
- McCue, K. F., & Hanson, A. D. (1990). Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends in Biotechnology*, 8, 358-362.
- Missihoun, T. D., Schmitz, J., Klug, R., Kirch, H. H., & Bartels, D. (2011). Betaine aldehyde dehydrogenase genes from Arabidopsis with different sub-cellular localization affect stress responses. *Planta*, 233(2), 369-382.

- Mitsuya, S., Kuwahara, J., Ozaki, K., Saeki, E., Fujiwara, T., & Takabe, T. (2011). Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley. *Planta*, 234(6), 1215-1226.
- Mu, M., Lu, X. K., Wang, J. J., Wang, D. L., Yin, Z. J., Wang, S., Fan, W. L. & Ye, W. W. (2016). Genome-wide Identification and analysis of the stress-resistance function of the TPS (Trehalose-6-Phosphate Synthase) gene family in cotton. *BMC genetics*, 17(1), 1-11.
- Muñoz-Clares, R. A., Riveros-Rosas, H., Garza-Ramos, G., González-Segura, L., Mújica-Jiménez, C., & Julián-Sánchez, A. (2014). Exploring the evolutionary route of the acquisition of betaine aldehyde dehydrogenase activity by plant ALDH10 enzymes: implications for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine. *BMC plant biology*, 14(1), 1-16.
- Nourbakhsh, A., Collakova, E., & Gillasp, G. E. (2015). Characterization of the inositol monophosphatase gene family in Arabidopsis. *Frontiers in plant science*, 5, 725.
- Nuccio, M. L., Wu, J., Mowers, R., Zhou, H. P., Meghji, M., Primavesi, L. F., Paul, M. J., Chen, X., Gao, Y., Haque, E., et al. (2015). Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. *Nature biotechnology*, 33(8), 862-869.
- Okuma, E., Murakami, Y., Shimoishi, Y., Tada, M., & Murata, Y. (2004). Effects of exogenous application of proline and betaine on the growth of tobacco cultured cells under saline conditions. *Soil Science and Plant Nutrition*, 50(8), 1301-1305.
- Oliveira, C. R. R. D., Freire Filho, F. R., Nogueira, M. D. S. D. R., Barros, G. B., Eiras, M., Ribeiro, V. Q., & Lopes, Â. C. D. A. (2012). Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo Cucumber mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus e Cowpea severe mosaic virus. *Bragantia*, 71(1), 59-66.

- Oliveros, J. C. (2018). An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams (2007–2015).
- Page, R. D. (1996). Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics*, 12(4), 357-358.
- Ponnu, J., Wahl, V., & Schmid, M. (2011). Trehalose-6-phosphate: connecting plant metabolism and development. *Frontiers in Plant Science*, 2, 70.
- Pramanik, M. H. R., & Imai, R. (2005). Functional identification of a trehalose 6-phosphate phosphatase gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant molecular biology*, 58(6), 751-762.
- Priest, H. D., Filichkin, S. A., & Mockler, T. C. (2009). Cis-regulatory elements in plant cell signaling. *Current opinion in plant biology*, 12(5), 643-649.
- Rai, A. N., & Penna, S. (2013). Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. *Molecular biology reports*, 40(11), 6429-6435.
- Ramon, M., & Rolland, F. (2007). Plant development: introducing trehalose metabolism. *Trends in plant science*, 12(5), 185-188.
- Ranganayakulu, G. S., Veeranagamallaiah, G., & Sudhakar, C. (2013). Effect of salt stress on osmolyte accumulation in two groundnut cultivars (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting salt tolerance. *African Journal of plant science*, 7(12), 586-592.
- Rao, K. N., Kumaran, D., Seetharaman, J., Bonanno, J. B., Burley, S. K., & Swaminathan, S. (2006). Crystal structure of trehalose-6-phosphate phosphatase-related protein: Biochemical and biological implications. *Protein Science*, 15(7), 1735-1744.
- Rathinasabapathi, B., Burnet, M., Russell, B. L., Gage, D. A., Liao, P. C., Nye, G. J., Scott, P., Golbeck, J. H., Hanson, A. D. (1997). Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group

- characterization and cDNA cloning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(7), 3454-3458.
- Reumann, S. (2004). Specification of the peroxisome targeting signals type 1 and type 2 of plant peroxisomes by bioinformatics analyses. *Plant physiology*, 135(2), 783-800.
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139-140.
- Rocha, M. M., Lima, J. A. A., FREIRE FILHO, F. R., & LIMA, V. (1996). Resistencia de caupi de tegumento branco a algumas estirpes de comovirus, potyvirus e cucumovirus. In *Embrapa Meio-Norte-Resumo em anais de congresso (ALICE)*. In: REUNIAO NACIONAL DE PESQUISA DE CAUPI, 4., 1996, Teresina. Resumos. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1996. p. 100-101.
- Rodrigues, F. A., Marcolino-Gomes, J., Carvalho, J. D. F. C., Nascimento, L. C. D., Neumaier, N., Farias, J. R. B., ... & Nepomuceno, A. L. (2012). Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genetics and molecular biology*, 35(1), 304-314.
- Rhodes, D., & Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology*, 44(1), 357-384.
- Rossmann, M. G., Moras, D., & Olsen, K. W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature*, 250(5463), 194-199.
- Rozen, S., & Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics methods and protocols* (pp. 365-386). Humana Press, Totowa, NJ.

- Saibo, N. J., Lourenço, T., & Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany*, 103(4), 609-623.
- Savouré, A., Jaoua, S., Hua, X. J., Ardiles, W., Van Montagu, M., & Verbruggen, N. (1995). Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters*, 372(1), 13-19.
- Saxena, S. C., Salvi, P., Kaur, H., Verma, P., Petla, B. P., Rao, V., Kamble, N., Majee, M. (2013). Differentially expressed myo-inositol monophosphatase gene (CaIMP) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad substrate specificity and improves seed germination and seedling growth under abiotic stresses. *Journal of experimental botany*, 64(18), 5623-5639.
- Schmutz, J., Cannon, S. B., Schlueter, J., Ma, J., Mitros, T., Nelson, W., Hyten, D. L., Song, Q. S., Thelen J. J., Cheng, J. C., et al. (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *nature*, 463(7278), 178-183.
- Strizhov, N., Ábrahám, E., Ökrész, L., Blickling, S., Zilberstein, A., Schell, J., Koncz, C., Szabados, L. (1997). Differential expression of two P5CS genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by ABA1, ABI1 and AXR2 in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 12(3), 557-569.
- Su, M., Li, X. F., Ma, X. Y., Peng, X. J., Zhao, A. G., Cheng, L. Q., Chen, S.Y., Liu, G. S. (2011). Cloning two P5CS genes from bioenergy sorghum and their expression profiles under abiotic stresses and MeJA treatment. *Plant Science*, 181(6), 652-659.
- Sun, X., Wang, Y., & Sui, N. (2018). Transcriptional regulation of bHLH during plant response to stress. *Biochemical and biophysical research communications*, 503(2), 397-401.

- Szabados, L., & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in plant science*, 15(2), 89-97.
- Szekely, G., Abraham, E., Cseplo, A., Rigó, G., & Zsigmond, L. (2008). Csizsar J Ayaydin F., Strizhov N., Jasik J., Schmelzer E., Koncz C., Szabados L. Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J*, 53, 11-28.
- Tan, J., Wang, C., Xiang, B., Han, R., & Guo, Z. (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide mediated cold-and dehydration-induced myo-inositol phosphate synthase that confers multiple resistances to abiotic stresses. *Plant, Cell & Environment*, 36(2), 288-299.
- Tran, L. S. P., Nakashima, K., Sakuma, Y., Osakabe, Y., Qin, F., Simpson, S. D., Maruyama, K., Fujita, Y., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2007). Co-expression of the stress-inducible zinc finger homeodomain ZFHD1 and NAC transcription factors enhances expression of the ERD1 gene in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49(1), 46-63.
- Trovato, M., Forlani, G., Signorelli, S., & Funck, D. (2019). Proline metabolism and its functions in development and stress tolerance. In *Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants* (pp. 41-72). Springer, Cham.
- Turchetto-Zolet, A. C., Margis-Pinheiro, M., & Margis, R. (2009). The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. *Molecular genetics and genomics*, 281(1), 87-97.
- UniProt Consortium. (2012). Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic acids research*, 41(D1), D43-D47.
- Valliyodan, B., & Nguyen, H. T. (2006). Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants. *Current opinion in plant biology*, 9(2), 189-195.

- Vandesteene, L., López-Galvis, L., Vanneste, K., Feil, R., Maere, S., Lammens, W., Rolland, F., Lunn, J. E., Avonce, N., Beeckman, T. et al. (2012). Expansive evolution of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene family in Arabidopsis. *Plant physiology*, 160(2), 884-896.
- Vendruscolo, E. C. G., Schuster, I., Pileggi, M., Scapim, C. A., Molinari, H. B. C., Marur, C. J., & Vieira, L. G. E. (2007). Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. *Journal of plant physiology*, 164(10), 1367-1376.
- Verdoy, D., Coba de la Peña, T., Redondo, F. J., Lucas, M. M., & Pueyo, J. J. (2006). Transgenic *Medicago truncatula* plants that accumulate proline display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to osmotic stress. *Plant, cell & environment*, 29(10), 1913-1923.
- Wang, C. P., Lin, B., Zhang, Y. Q., Lin, Y. H., Liu, A. H., & Hua, X. J. (2014). The evolutionary fate of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) genes in allotetraploid *Brassica napus*. *Journal of Systematics and Evolution*, 52(5), 566-579.
- Wang, G., Zhang, J., Wang, G., Fan, X., Sun, X., Qin, H., Xu, N., Zhong, M., Qiao, Z., Tang, Y., et al. (2014). Proline responding1 plays a critical role in regulating general protein synthesis and the cell cycle in maize. *The Plant Cell*, 26(6), 2582-2600.
- Wang, L., Guo, Z., Zhang, Y., Wang, Y., Yang, G., Yang, L., Wang, R., Xie, Z. (2017). Characterization of LhSorP5CS, a gene catalyzing proline synthesis in Oriental hybrid lily Sorbonne: molecular modelling and expression analysis. *Botanical studies*, 58(1), 1-8.
- Wang, S., Ouyang, K., & Wang, K. (2019). Genome-wide identification, evolution, and expression analysis of TPS and TPP gene families in *Brachypodium distachyon*. *Plants*, 8(10), 362.

- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Science Mathematics Bioinformatics*, 25, 189-1191.
- Weretilnyk, E. A., & Hanson, A. D. (1990). Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2745-2749.
- Xu, Y., Wang, Y., Mattson, N., Yang, L., & Jin, Q. (2017). Genome-wide analysis of the *Solanum tuberosum* (potato) trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family: evolution and differential expression during development and stress. *BMC genomics*, 18(1), 1-15.
- Yadav, U. P., Ivakov, A., Feil, R., Duan, G. Y., Walther, D., Giavalisco, P., Piques, M., Carillo, P., Hubberten H., Stitt, M., et al. (2014). The sucrose–trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: specificity and mechanisms of sucrose signalling by Tre6P. *Journal of experimental botany*, 65(4), 1051-1068.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology*, 208(15), 2819-2830.
- Yang, H. L., Liu, Y. J., Wang, C. L., & Zeng, Q. Y. (2012). Molecular evolution of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family in *Populus*, *Arabidopsis* and rice. *PloS one*, 7(8), e42438.
- Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., & Hwang, J. K. (2006). Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 64(3), 643-651.
- Zang, B., Li, H., Li, W., Deng, X. W., & Wang, X. (2011). Analysis of trehalose-6-phosphate synthase (TPS) gene family suggests the formation of TPS complexes in rice. *Plant molecular biology*, 76(6), 507-522.

- Zhai, H., Wang, F., Si, Z., Huo, J., Xing, L., An, Y., He, S., Liu, Q. (2016). A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, Ib MIPS 1, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. *Plant Biotechnology Journal*, 14(2), 592-602.
- Zhang, Z., Li, J., Li, F., Liu, H., Yang, W., Chong, K., & Xu, Y. (2017). OsMAPK3 phosphorylates OsbHLH002/OsICE1 and inhibits its ubiquitination to activate OsTPP1 and enhances rice chilling tolerance. *Developmental cell*, 43(6), 731-743.
- Zhang, R. X., Qin, L. J., & Zhao, D. G. (2017). Overexpression of the OsIMP gene increases the accumulation of inositol and confers enhanced cold tolerance in tobacco through modulation of the antioxidant enzymes' activities. *Genes*, 8(7), 179.
- Zhang, L., & Becker, D. (2015). Connecting proline metabolism and signaling pathways in plant senescence. *Frontiers in Plant Science*, 6, 552.
- Zhao, L., Ding, Q., Zeng, J., Wang, F. R., Zhang, J., Fan, S. J., & He, X. Q. (2012). An improved CTAB-ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis*, 23(6), 647-650.
- Zhao, X., Peng, Y., Zhang, J., Fang, P., & Wu, B. (2018). Identification of QTLs and Meta-QTLs for Seven Agronomic Traits in Multiple Maize Populations under Well-Watered and Water-Stressed Conditions. *Crop Science*, 58(2), 507-520.
- Zulfiqar, F., Akram, N. A., & Ashraf, M. (2020). Osmoprotection in plants under abiotic stresses: New insights into a classical phenomenon. *Planta*, 251(1), 1-17.

5 Conclusões Gerais

- Foram caracterizados 209 candidatos homólogos a enzimas associadas a síntese de osmoprotetores em *V. unguiculata* o que possibilitou gerar um banco de sequências curadas destes genes para uso em projetos de melhoramento genético e biotecnologia da espécie;
- Os candidatos analisados quanto aos domínios e motivos conservados apresentaram em geral alto grau de conservação com relação aos seus;
- As proteínas BADH apresentaram uma Isoleucina na posição crítica para a síntese de glicina-betaína indicando que provavelmente *V. unguiculata* não sintetiza essa enzima;
- A análise fenética com de genes de prolina, mio-inositol e glicina-betaína apontou para o agrupamento das sequências de *V. unguiculata* com outras espécies do gênero Fabaceae, comprovando a similaridade e conservação das mesmas;
- A variação na estrutura gênica verificada nos osmoprotetores de *V. unguiculata* corrobora ao observado em estudos anteriores, e as estruturas de P5CR e IMP aparentemente são achados inéditos uma vez que ainda não há relatos sobre esse tema;
- Os fatores de transcrição ZF-HD e BHLH possivelmente estão relacionados com a regulação de genes que atuam na biossíntese de osmoprotetores em *V. unguiculata*;
- O perfil transcricional dos osmoprotetores de feijão-caupi sob desidratação radicular indica sua atuação em uma resposta mais tardia (150 minutos) de estresse, considerando-se os tempos analisados;
- Os candidatos referentes a trealose (TPP e TPS) foram os mais representativos na resposta ao estresse por desidratação radicular em *V. unguiculata*;
- Os resultados contribuíram para um melhor entendimento das características moleculares das quatro classes de osmoprotetores bem como indicaram sua participação na defesa/tolerância da espécie *V. unguiculata*, apresentando potencial para aplicação desses candidatos no melhoramento genético da cultura como também em outras leguminosas de importância agrícola.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-GHANY, S. E. et al. A survey of the sorghum transcriptome using single-molecule long reads. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2016.
- ABDELGAWAD, Z. A. et al. Accumulation of trehalose mediates salt adaptation in rice seedlings. **Am Eurasian J Agric Environ Sci**, v. 14, n. 12, p. 1450-1463, 2014.
- ABOBATTA, W. F. Drought adaptive mechanisms of plants—a review. **Adv Agr Environ Sci**, v. 2, n. 1, p. 42-45, 2019.
- ABRAHÁM, E. et al. Light-dependent induction of proline biosynthesis by abscisic acid and salt stress is inhibited by brassinosteroid in *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, v. 51, n. 3, p. 363-372, 2003.
- ACOSTA-PÉREZ, P. et al. Characterization of Trehalose-6-phosphate Synthase and Trehalose-6-phosphate Phosphatase Genes and Analysis of its Differential Expression in Maize (*Zea mays*) Seedlings under Drought Stress. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 315, 2020.
- AGARWAL, A. et al. Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 383, 2010.
- AGRAWAL, G. K. et al. Plant organelle proteomics: collaborating for optimal cell function. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 30, n. 5, p. 772-853, 2011.
- AHN, C.; PARK, U.; PARK, P. B. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 4, p. 669-674, 2011.
- ALI, Q.; ASHRAF, M. Exogenously applied glycinebetaine enhances seed and seed oil quality of maize (*Zea mays L.*) under water deficit conditions. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, n. 2, p. 249-259, 2011.
- ALVES, A. A. C.; SETTER, T. L. Absciscic acid accumulation and osmotic adjustment in cassava under water deficit. **Environmental and Experimental Botany**, v. 51, n. 3, p. 259-271, 2004.

AMORIM, L. L. B. et al. Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. **Plant Methods**, v. 14, n. 1, p. 88, 2018.

AQSA, T. et al. Foliar application of proline for salt tolerance of two wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. **World Applied Sciences Journal**, v. 22, n. 4, p. 547-554, 2013.

ARMENGAUD, P. et al. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 3, p. 442-450, 2004.

ASHRAF, M.; FOOLAD, M. R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. **Environmental and Experimental Botany**, v. 59, n. 2, p. 206–216, 2007.

ATKINSON, N. J.; URWIN, P. E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 10, p. 3523-3543, 2012.

AVONCE, N. et al. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. **Plant Physiology**, v. 136, n. 3, p. 3649-3659, 2004.

BAE, H. et al. Exogenous trehalose alters *Arabidopsis* transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism, and plant defense. **Physiologia Plantarum**, v. 125, n. 1, p. 114-126, 2005.

BAGATI, S. et al. “Omics”: A Gateway Towards Abiotic Stress Tolerance. In: **Abiotic stress-mediated sensing and signaling in plants: An omics perspective**. Springer, Singapore, 2018. p. 1-45.

BAKER, N. R. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 59, p. 89-113, 2008.

BAPTISTA, A. et al. Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterranea* L. Verdc) from Mozambique. **Journal of Food Measurement and**

Characterization, v. 11, n. 2, p. 442-450, 2017.

BARRETO, A. F.; BARBOSA, J. K. A. Mecanismos de resistência à seca que possibilitam a produção em condições do semi-árido nordestino. **Simpósio Brasileiro de Captação de Água de Chuva no Semi-árido**, v. 3, 2001.

BASTOS, E. A. A Cultura do feijão-caupi no Brasil. **Embrapa Meio-Norte-Livro técnico (INFOTECA-E)**, 2016.

BASU, P. et al. Ethylene modulates genetic, positional, and nutritional regulation of root plagiogravitropism. **Functional Plant Biology**, v. 34, n. 1, p. 41-51, 2007.

BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112-1134, 2011.

BENKO-ISEPPON, A. M. et al. Mendel e suas exceções à luz das ômicas e da biologia de sistemas. In: Francisco J. L. Aragão; José Roberto Moreira. Mendel: 150 anos depois. Embrapa Edições (Brasília, DF), ISBN 978-85-7035-705-2. 502 pp, 2017.

BEZERRA, M. A. F. et al. Cultivo de feijão-caupi em Latossolos sob o efeito residual da adubação fosfatada. **Revista Caatinga**, v. 27, n. 1, p. 109-115, 2014.

BHATNAGAR-MATHUR, P. et al. Genetic engineering of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with the P5CSF129A gene for osmoregulation with implications on drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 591-606, 2009.

BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. G. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. **Trends in Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 89-97, 1996.

BOHNERT, H. J.; NELSON, D. E.; JENSEN, R. G. Adaptations to environmental stresses. **The Plant Cell**, v. 7, n. 7, p. 1099, 1995.

BOKSZCZANIN, K. L. et al. Identification of novel small ncRNAs in pollen of tomato. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 714, 2015.

BOUKAR, O. et al. Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] Breeding. In: **Advances in Plant Breeding Strategies: Legumes**. Springer, Cham, 2019. p. 201-243.

BOYER, J. S. et al. The U.S. drought of 2012 in perspective: A call to action. **Global Food Security**, v. 2, n. 3, p. 139–143, 2013.

BRAY, E. A. Response to abiotic stress. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**, p. 1158-1203, 2000.

BRITO, L.T.L. et al. Produtividade da água de chuva em culturas de subsistência no semiárido pernambucano. **Engenharia Agrícola**, v. 32, n. 1, p. 102-109, 2012.

BROUQUISSE, R. et al. Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. **Plant Physiology**, v. 90, n. 1, p. 322-329, 1989.

BURNET, M.; LAFONTAINE, P. J.; HANSON, A. D. Assay, purification, and partial characterization of choline monooxygenase from spinach. **Plant Physiology**, v. 108, n. 2, p. 581-588, 1995.

CABIB, E.; LELOIR, L. F. The biosynthesis of trehalose phosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 231, n. 1, p. 259-275, 1958.

CARVALHO, L. C.; AMÂNCIO, S. Cutting the Gordian Knot of abiotic stress in grapevine: From the test tube to climate change adaptation. **Physiologia Plantarum**, v. 165, n. 2, p. 330-342, 2019.

CHAKRABORTY, U.; DUTTA, S.; CHAKRABORTY, B. N. Response of tea plants to water stress. **Biologia Plantarum**, v. 45, n. 4, p. 557-562, 2002.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, n. 3, p. 250-257, 2002.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress

in plants. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 9, p. 499-505, 2008.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications. **Plant, Cell & Environment**, v. 34, n. 1, p. 1-20, 2011.

CLAUSSEN, W. Proline as a measure of stress in tomato plants. **Plant Science**, v. 168, n. 1, p. 241-248, 2005.

CLELAND, D. et al. Glycine betaine as a cryoprotectant for prokaryotes. **Journal of Microbiological Methods**, v. 58, n. 1, p. 31-38, 2004.

DAI, A. Increasing drought under global warming in observations and models. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 1, p. 52-58, 2013.

DASTIDAR, K. G. et al. An insight into the molecular basis of salt tolerance of L-myo-inositol 1-P synthase (PcINO1) from *Porteresia coarctata* (Roxb.) Tateoka, a halophytic wild rice. **Plant Physiology**, v. 140, n. 4, p. 1279-1296, 2006.

DE CARVALHO, L. M. et al. Bioinformatics applied to biotechnology: A review towards bioenergy research. **Biomass and Bioenergy**, v. 123, p. 195-224, 2019.

DE RONDE, J. A. et al. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, n. 11, p. 1211–1224, 2004.

DIETZ, K. Redox signal integration: from stimulus to networks and genes. **Physiologia Plantarum**, v. 133, n. 3, p. 459-468, 2008.

DODD, I. C.; RYAN, A. C. Whole-Plant Physiological Responses to Water-Deficit Stress. **eLS**, p. 1-9, 2016.

DOS REIS, S. P.; LIMA, A. M.; DE SOUZA, C. R. B. Recent molecular advances on downstream plant responses to abiotic stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 7, p. 8628-8647, 2012.

DRENNAN, P. M. et al. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw. **Journal of plant physiology**, v. 142, n. 4, p. 493-496, 1993.

DUDZIAK, K. et al. Analysis of wheat gene expression related to the oxidative stress response and signal transduction under short-term osmotic stress. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

DUMAN, F. et al. Effects of exogenous glycinebetaine and trehalose on cadmium accumulation and biological responses of an aquatic plant (*Lemna gibba* L.). **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 217, n. 1-4, p. 545-556, 2011.

DUTRA, A. F. et al. Parâmetros fisiológicos e componentes de produção de feijão-caupi cultivado sob deficiência hídrica. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v. 10, n. 2, p. 189-197, 2015.

ELBEIN, A. D. The metabolism of α, α -trehalose. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 30, p. 227-256, 1974.

ENEBE, M. C.; BABALOLA, O. O. The influence of plant growth-promoting rhizobacteria in plant tolerance to abiotic stress: a survival strategy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 102, n. 18, p. 7821-7835, 2018.

FANG, Y.; XIONG, L. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 4, p. 673-689, 2015.

FAOSTAT, “Production – Crops – Production quantity – Cow peas, dry – 2017”, *FAO Statistics online database*, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Statistics Division, Rome, 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/>> Acesso em 10 Jul 2019.

FATOKUN, C. A. **Challenges and Opportunities for Enhancing Sustainable Cowpea**

Production. IITA, 2002.

FERNANDEZ, O. et al. Trehalose and plant stress responses: friend or foe?. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 7, p. 409-417, 2010.

FERREIRA, A. C. T. et al. Water and salt stresses on germination of cowpea (*Vigna unguiculata* cv. BRS Tumucumaque) seeds. **Revista Caatinga**, v. 30, n. 4, p. 1009-1016, 2017.

FILIPPOU, P. et al. Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. **Environmental and Experimental Botany**, v. 97, p. 1-10, 2014.

FITZGERALD, T. L.; WATERS, D. L. E; HENRY, R. J. Betaine aldehyde dehydrogenase in plants. **Plant Biology**, v. 11, n. 2, p. 119-130, 2009.

FOYER, C. H. et al. Neglecting legumes has compromised human health and sustainable food production. **Nature Plants**, v. 2, n. 8, p. 1-10, 2016.

FREIRE-FILHO et al. FEIJÃO-CAUPI NO BRASIL. **1st edition. Embrapa Meio-Norte**, 2011.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. **Embrapa Meio-Norte-Livro Científico (ALICE)**, 2011.

FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; ARÊAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 2, p. 470-476, 2008.

GAPPER, C.; DOLAN, L. Control of plant development by reactive oxygen species. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 341-345, 2006.

GARCIA, A. B. et al. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. **Plant Physiology**, v. 115, n. 1, p. 159-169, 1997.

GARG, A. K. et al. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 25, p. 15898-15903, 2002.

GIRI, J. Glycinebetaine and abiotic stress tolerance in plants. **Plant Signaling & Behavior**, v. 6, n. 11, p. 1746-1751, 2011.

GÓMEZ, C. Introduction: Economic and Social Impact. **COWPEA: Post-Harvest Operations**, p. 61, 2004.

GUAN, C. et al. Proline Biosynthesis Enzyme Genes Confer Salt Tolerance to Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) in Cooperation With Polyamines Metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 46, 2020.

HAIMOVICH, A. D. Methods, challenges, and promise of next-generation sequencing in cancer biology. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 84, n. 4, p. 439, 2011.

HARE, P. D[†]; CRESS, W. A[‡]; VAN STADEN, J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. **Plant, Cell & Environment**, v. 21, n. 6, p. 535-553, 1998.

HASEGAWA, P. M. et al. Plant cellular and molecular responses to high salinity. **Annual Review of Plant Biology**, v. 51, n. 1, p. 463-499, 2000.

HASIN, Y.; SELDIN, M.; LUSIS, A. Multi-omics approaches to disease. *Genome biology*, v. 18, n. 1, p. 1-15, 2017.

HAZEN, S. P.; WU, Y.; KREPS, J. A. Gene expression profiling of plant responses to abiotic stress. **Functional & Integrative Genomics**, v. 3, n. 3, p. 105-111, 2003.

HEUZÉ, Valérie et al. Cowpea (*Vigna unguiculata*) drilling. 2015.

HONGBO, S.; ZONGSUO, L.; MINGAN, S. Osmotic regulation of 10 wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes at soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 47, n. 2, p. 132-139, 2006.

HRDLICKOVA, R.; TOLOUE, M.; TIAN, B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 8, n. 1, p. e1364, 2017.

HUSSAIN, H. A. et al. Interactive effects of drought and heat stresses on morpho-physiological attributes, yield, nutrient uptake and oxidative status in maize hybrids. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

HUSSAIN, S. et al. Germination and growth response of three wheat cultivars to NaCl salinity. **Soil Environ**, v. 32, n. 1, p. 36-43, 2013.

IMAHORI, Y. Postharvest stress treatments in fruits and vegetables. In: **Abiotic Stress Responses in Plants**. Springer, New York, NY, 2012. p. 347-358.

ISHIYAKU, M. F. et al. Field evaluation of cowpea genotypes for drought tolerance and Striga resistance in the dry savanna of the North-West Nigeria. **International Journal of Plant Breeding and Genetics**, v. 7, n. 1, p. 47-56, 2013.

IZANLOO, A. et al. Different mechanisms of adaptation to cyclic water stress in two South Australian bread wheat cultivars. **Journal of Experimental Botany**, v. 59, n. 12, p. 3327-3346, 2008.

JAIN, M. Emerging role of metabolic pathways in abiotic stress tolerance. **J. Plant Biochem. Physiol**, v. 1, n. 108, p. 10.4172, 2013.

KAUFMAN, J. Healthcare and life sciences standards overview-technology for life: NC symposium on biotechnology and bioinformatics. In: **Proceedings. Eighth International Conference on Information Visualisation**. IEEE, 2004. p. 31-41.

KAUR, G. et al. Cold stress injury during the pod-filling phase in chickpea (*Cicer arietinum* L.): Effects on quantitative and qualitative components of seeds. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v. 194, n. 6, p. 457-464, 2008.

KAVAS, M. et al. Effect of drought stress on oxidative damage and antioxidant enzyme activity in melon seedlings. **Turkish Journal of Biology**, v. 37, n. 4, p. 491-498, 2013.

KAVI KISHOR, P. B.; SREENIVASULU, N. Is proline accumulation per se correlated with stress tolerance or is proline homeostasis a more critical issue? **Plant, Cell & Environment**, v. 37, n. 2, p. 300-311, 2014.

KESARI, R. et al. Intron-mediated alternative splicing of *Arabidopsis* P5CS1 and its association with natural variation in proline and climate adaptation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 23, p. 9197-9202, 2012.

KHAN, M. S.; AHMAD, D.; KHAN, M. A. Utilization of genes encoding osmoprotectants in transgenic plants for enhanced abiotic stress tolerance. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 18, n. 4, p. 257-266, 2015.

KIDO, É. A. et al. Osmoprotectant-Related Genes in Plants Under Abiotic Stress: Expression Dynamics, In Silico Genome Mapping, and Biotechnology. In: **Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Springer, Cham, 2019. p. 1-40.

KONDRÁK, M. et al. Effects of yeast trehalose-6-phosphate synthase 1 on gene expression and carbohydrate contents of potato leaves under drought stress conditions. **BMC Plant Biology**, v. 12, n. 1, p. 74, 2012.

KRASENSKY, J. et al. The redox-sensitive chloroplast trehalose-6-phosphate phosphatase AtTPPD regulates salt stress tolerance. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 9, p. 1289-1304, 2014.

KU, Y. et al. Drought stress and tolerance in soybean. **A Comprehensive Survey of International Soybean Research—Genetics, Physiology, Agronomy and Nitrogen**

Relationships, p. 209-237, 2013.

KUBISTA, M. et al. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 2-3, p. 95-125, 2006.

KUMAR, S. et al. Plant responses to drought stress: Physiological, biochemical and molecular basis. In: **Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants**. Springer, Singapore, 2018. p. 1-25.

LACKEY, K. H.; POPE, P. M.; JOHNSON, M. D. Expression of 1L-myoinositol-1-phosphate synthase in organelles. **Plant Physiology**, v. 132, n. 4, p. 2240-2247, 2003.

LANG, F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, n. sup5, p. 613S-623S, 2007.

LARCHER, W. Temperature stress and survival ability of Mediterranean sclerophyllous plants. **Plant Biosystems**, v. 134, n. 3, p. 279-295, 2000.

LEE, S. et al. Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2003.

LEMMA, G. et al. Moisture and planting density interactions affect productivity in cowpea (*Vigna unguiculata*). **Journal of Agronomy**, v. 8, n. 4, p. 117-123, 2009.

LI, G. et al. Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) expression and betaine production in Sugarbeet cultivars with different tolerances to drought stress. **Sugar Tech**, v. 18, n. 4, p. 420-423, 2016.

LI, H. et al. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene OsTPS1 enhances abiotic stress tolerance in rice. **Planta**, v. 234, n. 5, p. 1007-1018, 2011.

LIANG, X. et al. Proline mechanisms of stress survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 19, n. 9, p. 998-1011, 2013.

LIMA, J. A. A. et al. Biological stability of a strain of Cowpea severe mosaic virus over 20

years. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 1, p. 105-111, 2012.

LIU, M.; CHIEN, C.; LIN, T.. Constitutive components and induced gene expression are involved in the desiccation tolerance of *Selaginella tamariscina*. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 4, p. 653-663, 2008.

LIU, L. et al. Comparison of next-generation sequencing systems. **BioMed Research International**, v. 2012, 2012.

LIU, Y. et al. *Saccharomyces cerevisiae* gene TPS1 improves drought tolerance in *Zea mays* L. by increasing the expression of SDD1 and reducing stomatal density. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 120, n. 2, p. 779-789, 2015.

LOEWUS, F. A.; LOEWUS, M. W. Myo-inositol: its biosynthesis and metabolism. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 34, n. 1, p. 137-161, 1983.

LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v. 150, n. 1, p. 1-19, 2000.

LÓPEZ-GÓMEZ, M.; LLUCH, C. Trehalose and abiotic stress tolerance. In: **Abiotic Stress Responses in Plants**. Springer, New York, NY, 2012. p. 253-265.

LYNCH, J. P. Steep, cheap and deep: an ideotype to optimize water and N acquisition by maize root systems. **Annals of Botany**, v. 112, n. 2, p. 347-357, 2013.

LYNCH, J. P.; BROWN, K. M. Topsoil foraging—an architectural adaptation of plants to low phosphorus availability. **Plant and Soil**, v. 237, n. 2, p. 225-237, 2001.

LYNCH, J.; VAN BEEM, J. J. Growth and architecture of seedling roots of common bean genotypes. **Crop Science**, v. 33, n. 6, p. 1253-1257, 1993.

MADANI, B.; MIRSHEKARI, A.; IMAHORI, Y. Physiological responses to stress. In: **Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables**. Woodhead Publishing, 2019. p. 405-423.

MAGRINI, M. et al. Why are grain-legumes rarely present in cropping systems despite their environmental and nutritional benefits? Analyzing lock-in in the French agrifood system. **Ecological Economics**, v. 126, p. 152-162, 2016.

MARDIS, E. R. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**, v. 470, n. 7333, p. 198-203, 2011.

MASOOD, A. et al. Glycine betaine: role in shifting plants toward adaptation under extreme environments. In: **Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies**. Springer, New Delhi, 2016. p. 69-82.

MATOS FILHO, C. H. A. et al. Potencial produtivo de progênies de feijão-caupi com arquitetura ereta de planta. **Ciência Rural**, v. 39, n. 2, p. 348-354, 2009.

MCCUE, K. F.; HANSON, A. D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. **Plant Molecular Biology**, v. 18, n. 1, p. 1-11, 1992.

MCDONNELL, E.; JONES, R. G W. Glycinebetaine biosynthesis and accumulation in unstressed and salt-stressed wheat. **Journal of Experimental Botany**, v. 39, n. 4, p. 421-430, 1988.

MEENA, K. K. et al. Abiotic stress responses and microbe-mediated mitigation in plants: the omics strategies. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, p. 172, 2017.

MELLACHERUVU, S.; TALAKAYALA, A.; GARLADINNE, M. Crop Improvement of Cereals Through Manipulation of Signaling Pathways in Response to Drought Stress. In: **Plant Signaling Molecules**. Woodhead Publishing, 2019. p. 125-139.

MISRA, B. B. et al. Integrated omics: tools, advances and future approaches. *Journal of molecular endocrinology*, v. 62, n. 1, p. R21-R45, 2019.

MITSUYA, S. et al. Isolation and characterization of a novel peroxisomal choline monooxygenase in barley. **Planta**, v. 234, n. 6, p. 1215-1226, 2011.

MIYAN, M. A. Droughts in Asian least developed countries: Vulnerability and sustainability. **Weather and Climate Extremes**, v. 7, p. 8-23, 2015.

MOLINARI, H. B. C. et al. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, v. 130, n. 2, p. 218-229, 2007.

MURANAKA, S. et al. Genetic diversity of physical, nutritional and functional properties of cowpea grain and relationships among the traits. **Plant Genetic Resources**, v. 14, n. 1, p. 67-76, 2016.

NUCCIO, M. L. et al. Expression of trehalose-6-phosphate phosphatase in maize ears improves yield in well-watered and drought conditions. **Nature Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 862-869, 2015.

OECD. Safety Assessment of Foods and Feeds Derived from Transgenic Crops, Volume 3. In: **Safety Assessment of Foods and Feeds Derived from Transgenic Crops, Volume 3**. Novel Food and Feed Safety. París: OECD Publishing, 2019. v. 3p. 91–114.

OKONIEWSKI, M. J.; MILLER, C. J. Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 276, 2006.

OLAJIDE, A. A.; ILORI, C. O. Effects of drought on morphological traits in some cowpea genotypes by evaluating their combining abilities. **Advances in Agriculture**, v. 2017, 2017.

PARIDA, A. K. et al. Differential responses of the enzymes involved in proline biosynthesis and degradation in drought tolerant and sensitive cotton genotypes during drought stress and recovery. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 5, p. 619-627, 2008.

PETERS, S. et al. Protection mechanisms in the resurrection plant *Xerophyta viscosa* (Baker): Both sucrose and raffinose family oligosaccharides (RFOs) accumulate in leaves in response to water deficit. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 8, p. 1947–1956, 2007.

PHILLIPS, R. Dixon et al. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v.

82, n. 2-3, p. 193-213, 2003.

PINTÓ-MARIJUAN, M.; MUNNÉ-BOSCH, S. Ecophysiology of invasive plants: osmotic adjustment and antioxidants. **Trends in Plant Science**, v. 18, n. 12, p. 660-666, 2013.

POERSCH-BORTOLON, L. Balvedi et al. Gene expression analysis reveals important pathways for drought response in leaves and roots of a wheat cultivar adapted to rainfed cropping in the Cerrado biome. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 4, p. 629-645, 2016.

POTTORFF, M. et al. Leaf morphology in Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]: QTL analysis, physical mapping and identifying a candidate gene using synteny with model legume species. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 234, 2012.

PRASAD, K. V. S. K.; SARADHI, P. P. Enhanced tolerance to photoinhibition in transgenic plants through targeting of glycinebetaine biosynthesis into the chloroplasts. **Plant Science**, v. 166, n. 5, p. 1197-1212, 2004.

RAO, D. E.; CHAITANYA, K. V. Photosynthesis and antioxidative defense mechanisms in deciphering drought stress tolerance of crop plants. **Biologia Plantarum**, v. 60, n. 2, p. 201-218, 2016.

RAO, K.; RAGHAVENDRA, A.; REDDY, K. **Physiology and molecular biology of stress tolerance**. Springer: Dordrecht, Netherlands, 2006.

RATHINASABAPATHI, B. et al. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: prosthetic group characterization and cDNA cloning. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 7, p. 3454-3458, 1997.

REGUERA, M.; PELEG, Z.; BLUMWALD, E. Targeting metabolic pathways for genetic engineering abiotic stress-tolerance in crops. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1819, n. 2, p. 186-194, 2012.

REJEB, K. B.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face

stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278-284, 2014.

ROHR, J. R. et al. Frontiers in climate change–disease research. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 26, n. 6, p. 270-277, 2011.

ROYCHOUDHURY, A.; DATTA, K.; DATTA, S. K. Abiotic stress in plants: from genomics to metabolomics. **Omics and Plant Abiotic Stress Tolerance**. Bentham Science Publishers, Chicago, p. 91-120, 2011.

RUSSELL, B. L.; RATHINASABAPATHI, Bala; HANSON, Andrew D. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and amaranth. **Plant Physiology**, v. 116, n. 2, p. 859-865, 1998.

SAKAMOTO, A.; MURATA, N. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 342, p. 81-88, 2000.

SALEHI-LISAR, S. Y.; BAKHSHAYESHAN-AGDAM, H. Drought stress in plants: causes, consequences, and tolerance. In: **Drought Stress Tolerance in Plants, Vol 1**. Springer, Cham, 2016. p. 1-16.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANGINGA, N. et al. Sustainable resource management coupled to resilient germplasm to provide new intensive cereal–grain–legume–livestock systems in the dry savanna. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 100, n. 2-3, p. 305-314, 2003.

SANTOS, J. A. S. et al. Desempenho agronômico e divergência genética entre genótipos de feijão-caupi cultivados no ecótono Cerrado/Pantanal. **Bragantia**, v. 73, n. 4, p. 377-382, 2014.

SAXENA, S. C. et al. Differentially expressed myo-inositol monophosphatase gene (CaIMP) in chickpea (*Cicer arietinum* L.) encodes a lithium-sensitive phosphatase enzyme with broad

substrate specificity and improves seed germination and seedling growth under abiotic stresses. **Journal of Experimental Botany**, v. 64, n. 18, p. 5623-5639, 2013.

SCHERM, H.; CHAKRABORTY, S. Climate change and plant disease management. **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 399-426, 1999.

SCHUMANN, G. L. et al. **Essential Plant Pathology**. American Phytopathological Society (APS Press), 2006.

SEBIDOS, R. **Cover crops for improving soil quality of degraded upland soils | HubPages**. Disponível em: <<https://hubpages.com/education/water-conservation-in-degraded-uplands-through-cover-crops>>. Acesso em: 7 jul. 2020.

SEKI, M. et al. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. **Functional & Integrative Genomics**, v. 2, n. 6, p. 282-291, 2002.

SENGUPTA, A. et al. Polyamines: osmoprotectants in plant abiotic stress adaptation. In: **Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies**. Springer, New Delhi, 2016. p. 97-127.

SERRAJ, R.; SINCLAIR, T. R. Osmolyte accumulation: can it really help increase crop yield under drought conditions?. **Plant, Cell & Environment**, v. 25, n. 2, p. 333-341, 2002.

SHAHBAZ, M. et al. Does proline application ameliorate adverse effects of salt stress on growth, ions and photosynthetic ability of eggplant (*Solanum melongena* L.)?. **Scientia Horticulturae**, v. 164, p. 507-511, 2013.

SHAO, H. et al. Understanding molecular mechanism of higher plant plasticity under abiotic stress. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 54, n. 1, p. 37-45, 2007.

SHARMA, A. et al. Jasmonic acid seed treatment stimulates insecticide detoxification in *Brassica juncea* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, p. 1609, 2018.

SHI, Y. et al. Silicon improves seed germination and alleviates oxidative stress of bud seedlings in tomato under water deficit stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 78, p. 27-36, 2014.

SILVA, M. B. O. et al. Desempenho agronômico de genótipos de feijão-caupi. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 41, n. 4, p. 201-210, 2018.

SILVA, N. G. et al. Níveis de compactação do solo e produção do feijão-caupi. 2019.

SIMION, T. Breeding cowpea *Vigna unguiculata* L. Walp for quality traits. **Annals of Reviews and Research**, v. 3, n. 2, p. 555609, 2018.

SINGH, B. B. Cowpea breeding at IITA: Highlights of advances impacts. In: **Congresso Nacional de**. 2006.

SINGH, B. et al. Embracing new-generation ‘omics’ tools to improve drought tolerance in cereal and food-legume crops. **Biologia Plantarum**, v. 59, n. 3, p. 413-428, 2015.

SINGH, B. B. O. L.; CHAMBLISS, O.; SHARMA, B. Recent advances in cowpea breeding. 1997.

SOPORY, S.; KAUL, T. Sentient Nature of Plants: Memory and Awareness. In: **Sensory Biology of Plants**. Springer, Singapore, 2019. p. 621-642.

SOUZA, T. M. A. de et al. Cowpea growth and production under different levels of available water and soil cover. **International Journal of Current Research**, v. 8, p. 39122-39126, 2016.

STYER, J. C. **Regulating inositol biosynthesis in plants: myo-inositol phosphate synthase and myo-inositol monophosphatase**. 2000. Tese de Doutorado. Virginia Tech.

SUZUKI, N. et al. Abiotic and biotic stress combinations. **New Phytologist**, v. 203, n. 1, p. 32-43, 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal 3 ed. **Porto Alegre: Artmed**, v. 719, 2004.

TANG, B. et al. Invertebrate trehalose-6-phosphate synthase gene: genetic architecture,

biochemistry, physiological function, and potential applications. **Frontiers in physiology**, v. 9, p. 30, 2018.

THAKUR, P. et al. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: an overview. **Environmental and Experimental Botany**, v. 67, n. 3, p. 429-443, 2010.

THE NATIONAL GARDENING ASSOCIATION. **Photo of the roots of Southern Peas (*Vigna unguiculata*)**. Disponível em: <<https://garden.org/plants/photo/73597/>>. Acesso em: 7 jul. 2020.

TIWARI, J. K. et al. Effect of salt stress on cucumber: Na⁺-K⁺ ratio, osmolyte concentration, phenols and chlorophyll content. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 32, n. 1, p. 103-114, 2010.

TORRES, F. E. et al. Interação genótipo x ambiente em genótipos de feijão-caupi semiprostrado via modelos mistos. **Bragantia**, v. 74, n. 3, p. 255-260, 2015.

TRIPATHY, S. K. et al. Signal Transduction in Plants under Drought and Salt Stress-An Overview. **Int J Curr Microbiol App Sci**, v. 8, p. 318-25, 2019.

UCHIDA, A. et al. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. **Plant Science**, v. 163, n. 3, p. 515-523, 2002.

UPADHYAYA, H.; PANDA, S. K. Responses of *Camellia sinensis* to drought and rehydration. **Biologia Plantarum**, v. 48, n. 4, p. 597-600, 2004.

UPADHYAYA, H.; PANDA, S. K.; DUTTA, B. K. Variation of physiological and antioxidative responses in tea cultivars subjected to elevated water stress followed by rehydration recovery. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 30, n. 4, p. 457-468, 2008.

VAILATI-RIBONI, M.; PALOMBO, V.; LOOR, J. J. What are Omics Sciences?. In: Periparturient Diseases of Dairy Cows. Springer, Cham, 2017. p. 1-7.

VENDRUSCOLO, E. C. G. et al. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat. **Journal of plant physiology**, v. 164, n. 10, p. 1367-1376, 2007.

VERLI, H. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. 2014.

VERSLUES, P. E. et al. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **The Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 523-539, 2006.

VOGEL, H. J.; DAVIS, B. D. Glutamic γ -semialdehyde and Δ^1 -pyrroline-5-carboxylic acid, intermediates in the biosynthesis of proline^{1, 2}. **Journal of the American Chemical Society**, v. 74, n. 1, p. 109-112, 1952.

WADAPURKAR, R. M.; VYAS, R. Computational analysis of next generation sequencing data and its applications in clinical oncology. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 11, p. 75-82, 2018.

WANG, B. et al. Unveiling the complexity of the maize transcriptome by single-molecule long-read sequencing. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2016.

WANG, C. et al. Delayed germination of *Arabidopsis* seeds under chilling stress by overexpressing an abiotic stress inducible GhTPS11. **Gene**, v. 575, n. 2, p. 206-212, 2016.

WANG, L. et al. Characterization of LhSorP5CS, a gene catalyzing proline synthesis in oriental hybrid lily Sorbonne: molecular modelling and expression analysis. **Botanical Studies**, v. 58, n. 1, p. 1-8, 2017.

WANG, S.; OUYANG, K.; WANG, K. Genome-Wide Identification, Evolution, and Expression Analysis of TPS and TPP Gene Families in *Brachypodium distachyon*. **Plants**, v. 8, n. 10, p. 362, 2019.

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

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57-63, 2009.

WINGLER, A. The function of trehalose biosynthesis in plants. **Phytochemistry**, v. 60, n. 5, p. 437-440, 2002.

WOOD, A. J. et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum (molecular cloning and expression of two related genes). **Plant Physiology**, v. 110, n. 4, p. 1301-1308, 1996.

XING, W.; RAJASHEKAR, C. B. Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 46, n. 1, p. 21-28, 2001.

XUE, X. et al. Proline accumulation and transcriptional regulation of proline biosynthesis and degradation in *Brassica napus*. **Bmb Rep**, v. 42, n. 1, p. 28-34, 2009.

YADAV, D. Relevance of bioinformatics in the era of omics driven research. **Journal of Next Generation Sequencing & Applications**, v. 2, n. 1, p. e102, 2015.

YAMADA, M. et al. Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 417, p. 1975-1981, 2005.

YAMAJI, Y. et al. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. **The Plant Cell**, v. 24, n. 2, p. 778-793, 2012.

YANCEY, P. H. Water stress, osmolytes and proteins. **American Zoologist**, v. 41, n. 4, p. 699-709, 2001.

YANG, G. et al. A ThDREB gene from *Tamarix hispida* improved the salt and drought tolerance of transgenic tobacco and *T. hispida*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 113, p. 187-197, 2017.

YANG, X. et al. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine leads to increased tolerance of photosynthesis to salt stress in transgenic tobacco plants. **Plant Molecular Biology**, v. 66, n. 1-2, p. 73, 2008.

YUAN, W. et al. Severe summer heatwave and drought strongly reduced carbon uptake in Southern China. **Scientific Reports**, v. 6, p. 18813, 2016.

ZHAI, H. et al. A myo-inositol-1-phosphate synthase gene, Ib MIPS 1, enhances salt and drought tolerance and stem nematode resistance in transgenic sweet potato. **Plant Biotechnology Journal**, v. 14, n. 2, p. 592-602, 2016.

ZHANG, C. Y. et al. DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*). **Genet Mol Res**, v. 12, n. 2, p. 1269-1277, 2013.

ZHANG, H.; LI, Y.; ZHU, J. Developing naturally stress-resistant crops for a sustainable agriculture. **Nature Plants**, v. 4, n. 12, p. 989-996, 2018.

ZHANG, J. Z.; CREELMAN, R. A.; ZHU, J. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold, and drought tolerance in crops. **Plant Physiology**, v. 135, n. 2, p. 615-621, 2004.

ZHANG, Q.; BARTELS, D. Molecular responses to dehydration and desiccation in desiccation-tolerant angiosperm plants. **Journal of Experimental Botany**, v. 69, n. 13, p. 3211-3222, 2018.

ZHAO, S. et al. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. **PloS One**, v. 9, n. 1, p. e78644, 2014.

ZHAO, X. X. et al. Effect of glycinebetaine on function of thylakoid membranes in wheat flag leaves under drought stress. **Biologia Plantarum**, v. 51, n. 3, p. 584-588, 2007.

ZHU, J. Abiotic stress signaling and responses in plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313-324, 2016.

ZUO, Y; ZHANG, F. Soil and crop management strategies to prevent iron deficiency in crops. **Plant and Soil**, v. 339, n. 1-2, p. 83-95, 2011.