



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



MARIA CIDINARIA SILVA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TLPs
(*Thaumatococcus*-Like Proteins) EM DUAS LEGUMINOSAS DA CAATINGA SOB
ESTRESSES ABIÓTICOS**

Recife

2021

MARIA CIDINARIA SILVA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TLPs
(*Thaumatococcus*-Like Proteins) EM DUAS LEGUMINOSAS DA CAATINGA SOB
ESTRESSES ABIÓTICOS**

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

Área de concentração: Biotecnologia
e Bioinformática

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Valesca Pandolfi

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

Dr^a. Gabriella Frosi Albuquerque Figueiroa Faria

Recife

2021

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Alves, Maria Cidinaria Silva

Caracterização estrutural e expressão diferencial de TLPs (*Thaumatococcus*-Like Proteins) em duas leguminosas da Caatinga sob estresses abióticos / Maria Cidinaria Silva Alves - 2021.

142 f. : il.

Orientador: Profa. Dra. Valesca Pandolfi.

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientadora: Dra. Gabriella Frosi Albuquerque Figueiroa Faria

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

Inclui referências.

1. Genética vegetal. 2. Expressão gênica. 3. Plantas – Efeito da seca. I. Pandolf, Valesca (orientadora). II. Benko-Iseppon, Ana Maria (coorientadora). III. Faria, Gabriella Frosi Albuquerque (coorientadora). IV. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-053-2022

MARIA CIDINARIA SILVA ALVES

**CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE TLPs
(*Thaumatococcus*-Like Proteins) EM DUAS LEGUMINOSAS DA CAATINGA SOB
ESTRESSES ABIÓTICOS**

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.

Aprovada em: 26/10/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Valesca Pandolfi
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof^a. Dr^a. Magnolia de Araujo Campos
Universidade Federal de Campina Grande - UFCG

Aos meus pais, Rosineide e Gilvan que são verdadeiros exemplos de caráter e honestidade e sempre me apoiam incondicionalmente.

Aos meus irmãos Flávia, Flávio, Jorge e Walisson, pelo apoio e incentivo.

Às minhas sobrinhas, Isabella Mayara e Lorena Beatriz, os amores da minha vida. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me possibilitar o dom da vida, por ser meu guia, autor do meu destino e um consolo nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Pernambuco e à Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade em cursar este mestrado e pela qualidade elevada do ensino oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela bolsa concedida e o suporte financeiro através do Programa Biologia Computacional que custeou o sequenciamento de *S. scabra* e parte significativa do transcriptoma de *C. pyramidale*. À FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) que financiou parte do transcriptoma de *C. pyramidale*.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Valesca Pandolfi, uma pessoa iluminada e admirável pela sua bondade e competência. Agradeço a orientação, compreensão e paciência durante todo o desenvolvimento deste estudo.

Às minhas coorientadoras Prof^a. Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon e Dr^a. Gabriela Frosi pela orientação e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho durante a pesquisa.

Aos doutores Carolline Pires, Flávia Araújo, Carlos André e Marx Oliveira por me auxiliarem durante o desenvolvimento desse estudo, além dos conhecimentos técnicos, me ensinaram sobre ética e perseverança.

Aos membros da banca, Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto e Profa. Dr^a. Magnolia de Araujo Campos pelas, pela disponibilidade e valiosas contribuições na versão final deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Guida e aos membros do Laboratório de Fisiologia Vegetal (LFV-UFPE) por todo apoio durante o experimento da catingueira e ao Prof. Dr. Édson Kido pela disponibilização da infraestrutura do Laboratório de Genética Molecular (LGM-UFPE) para as validações da expressão diferencial da catingueira.

Aos meus pais, irmãos e sobrinhas por acreditarem em meu potencial, por todo o incentivo nos momentos difíceis e compreensão sobre minha ausência enquanto eu me dedicava à realização deste estudo.

Aos membros do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV-UFPE), em especial a Vanessa Souza, Jaysa Araujo, Elenilson Santos, Palloma Oliveira, Rafael Araujo, Juliana Georgia, Vinicius Amador, Emily Cavalcanti, Sibelle

Dias e Fernanda Alves, por toda ajuda prestada e momentos de alegria e descontração.

Aos amigos que formei nessa caminhada: Ruana Carolina, Thamara Almeida, Fernanda Souza, Djalma Souza, Jael Bezerra e Sr. Romildo, agradeço pela cumplicidade e troca de experiências, vocês tornaram essa caminhada muito mais feliz e prazerosa.

Aos meus amigos Camila Chagas, Mirella Almeida, Rafael Almeida e Felipe Augusto por se preocuparem, me apoiarem e torcerem por mim, sei que sempre poderei contar com vocês e agradeço a Deus por tê-los em minha vida.

A todo corpo docente e discente da Universidade Estadual de Alagoas, em especial aos Professores Ma. Delma Holanda e Me. Lenivaldo Melo, cujos conselhos me guiaram até o caminho onde estou. Vocês são verdadeiras inspirações para mim!

Aos meus alunos e colegas professores das Escolas Ângelo de Abreu e Maria Augusta Silva Melo, por todo incentivo e apoio durante essa jornada.

A todas as pessoas que direta e indiretamente contribuíram para que esse objetivo fosse alcançado com êxito.

Muito Obrigada!

“Sou muito grato às adversidades que apareceram na minha vida, pois elas me ensinaram a tolerância, a simpatia, o autocontrole, a perseverança e outras qualidades que, sem essas adversidades, eu jamais conheceria” (HILL, 2015).

RESUMO

A seca e a salinidade estão entre os fatores de estresse que mais impactam o crescimento e o desenvolvimento das plantas, alterando a dinâmica dos ecossistemas naturais, a diversidade genética e diminuindo a produtividade agrícola. Além disso, os danos causados por esses estresses tendem a ser acentuados devido às mudanças climáticas globais. Tal cenário destaca a importância de estudos envolvendo espécies adaptadas a tais condições, como as leguminosas *Cenostigma pyramidale* e *Stylosanthes scabra*. São espécies com grande potencial na prospecção e análise de genes relacionados à tolerância a estresses abióticos. Proteínas semelhantes às taumatinas (TLPs) estão envolvidas tanto no processo de desenvolvimento como também na resposta da planta a estresses bióticos e abióticos. No presente estudo, nós identificamos, caracterizamos estruturalmente e verificamos o perfil transcricional de genes que codificam TLPs no transcriptoma dessas espécies em resposta a dois tipos de estresse: (a) *C. pyramidale* sob imposição de salinidade (30 min, 2 h e 11 dias após a imposição do estresse) e (b) *S. scabra* 6, 24, 48 h após a supressão de rega e após 6 h de reidratação, inferindo sobre a diversidade genética, características funcionais e padrões de expressão em ambas as espécies. A análise *in silico* permitiu a identificação de 100 TLPs, sendo 36 e 64 TLPs nos transcriptomas radiculares de *C. pyramidale* e *S. scabra*, respectivamente. As sequências candidatas (para ambas as espécies) mostraram similaridade significativa com as TLPs descritas em outras espécies. A análise de expressão via PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) revelou tendências de expressão distintas para as duas espécies, bem como entre os tecidos avaliados (folha e raiz). No entanto, a superexpressão de algumas TLPs pode estar associada com a tolerância de *C. pyramidale* à salinidade e a tolerância de *S. scabra* à restrição de água. As TLPs caracterizadas e diferencialmente expressas nas espécies estudadas representam candidatos promissores para uso biotecnológico e o melhoramento de plantas, com ênfase para leguminosas, visando à obtenção de plantas mais tolerantes à seca e salinidade.

Palavras-chave: Expressão gênica; PR-5; RNA-Seq; Salinidade; Seca.

ABSTRACT

Drought and salinity are among the stress factors that most impact plant growth and development, changing the dynamics of natural ecosystems, genetic diversity and decreasing agricultural productivity. Additionally, the damage caused by these stresses tends to be accentuated due to global climate change. This scenario highlights the importance of studies involving species adapted to such conditions, such as the legume *Cenostigma pyramidale* and *Stylosanthes scabra*. They are species with great potential in prospecting and analyzing genes related to tolerance to abiotic stresses. Thaumatin-like proteins (TLPs) are involved both in the development process and in the plant's response to biotic and abiotic stresses. In the present study, we identified, structurally characterized and verified the transcriptional profile of genes encoding TLPs in the transcriptome of these species in response to two types of stress: (a) *C. pyramidale* under salinity imposition (30 min, 2 h and 11 days after the imposition of stress) and (b) *S. scabra* 6, 24, 48 h after watering suppression and after 6 h of rehydration, inferring on the genetic diversity, functional characteristics and expression patterns in both species. The *in silico* analysis allowed the identification of 100 TLPs, being 36 and 64 TLPs in the roots transcriptomes of *C. pyramidale* and *S. scabra*, respectively. Candidate sequences (for both species) showed significant similarity to TLPs described in other species. Expression analysis via quantitative real-time PCR (RT-qPCR) revealed distinct expression trends for the two species, as well as between the tissues evaluated (leaf and root). However, overexpression of some TLPs may be associated with tolerance of *C. pyramidale* to salinity and tolerance of *S. scabra* to water restriction. The TLPs characterized and differentially expressed in the studied species represent promising candidates for biotechnological use and plant improvement, with emphasis on legumes, aiming to obtain plants that are more tolerant to drought and salinity.

Keywords: Gene expression; PR-5; RNA-Seq; Salinity; Drought.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Figura 1 –	Percepção dos sinais de plantas sob estresses abióticos.	23
Figura 2 –	Modelo esquemático de estresse osmótico desencadeado por estresses causados por salinidade e seca.	24
Figura 3 –	Esquema da regulação dos genes PR após estresses abióticos.	29
Figura 4 –	Mapa de distribuição geográfica de <i>C. pyramidale</i> .	36
Figura 5 –	Morfologia de <i>Cenostigma pyramidale</i> . A. Espécime, B. Folhas, C. Caule, D. Flores, E. Vargem e F. Sementes.	37
Figura 6 –	Mapa de distribuição geográfica de <i>S. scabra</i> .	39
Figura 7 –	Morfologia de <i>Stylosanthes scabra</i> Vogel. A. Espécime, B. Folhas e Flores e C. Sementes.	40
Figura 8 –	Fluxograma das principais etapas de identificação, caracterização e análise de expressão de TLPs.	43

Artigo 1

Figura 1 –	Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na caracterização estrutural e anotação funcional das CpTLPs.	51
Figura 2 –	Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das sequências aminoácidos de Taumatina e das CpTLPs Os resíduos conservados são indicados pelo fundo vermelho e rosa.	56
Figura 3 –	Formação de grupos baseada na distribuição dos motivos conservados entre as 36 CpTLPs. A. Árvore fenética das CpTLPs formada pelo método <i>Neighbor-Joining</i> . B. Padrões de motivo conservados das TLPs de <i>C. pyramidale</i> . Os 20 motivos estão dispostos por cores.	57
Figura 4 –	Fenograma gerado por meio do método <i>Neighbor-Joining</i> de TLPs de <i>C. pyramidale</i> comparativamente com TLPs dos bancos de dados NCBI e UniProt. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso, seguido da espécie vegetal.	58
Figura 5 –	Análise <i>in silico</i> do perfil de expressão das TLPs no transcriptoma (RNA-Seq) da raiz de <i>C. pyramidale</i> gerado após imposição do estresse salino (NaCl 100 mM). A escala	60

	de cores representa o nível de expressão relativa das CpTLPs superexpressas (vermelho), reprimidas (azul) e sem expressão diferencial (cinza).	
Figura 6 –	Expressão gênica de TLPs em <i>C. pyramidale</i> em resposta ao estresse salino. As barras representam a expressão relativa das seis CpTLPs no tecido foliar (A) e radicular (B) após 30 minutos (verde) 2 horas (vermelho) e 11 dias (azul) de estresse salino. * <i>up-regulated</i> e <i>down-regulated</i> ($p < 0,05$).	60
Figura 7 –	Simulações de dinâmica molecular dos modelos teóricos tridimensionais CpTLP2 (magenta), CpTLP3 (verde), CpTLP5 (preto), CpTLP17 (azul claro), CpTLP20 (laranja) e CpTLP31 (roxo). A . RMSD (lado esquerdo) mostrando o desvio dos modelos teóricos após a dinâmica e o RMSF (lado direito) dos modelos representados pela flutuação dos resíduos de aminoácidos em relação ao tempo de 100 ns. B . Representação das CpTLPs correspondentes ao <i>b-factor</i> ou espalhamento dos átomos dos modelos relacionados (quanto mais próximo do vermelho, maior a mobilidade dinâmica dos átomos, e quanto mais próximo do azul, menos mobilidade dinâmica dos átomos); C . Raio de giro (lado esquerdo) mostrando a compactação/dispersão dos modelos e o gráfico da ligação de hidrogênio (lado direito).	63
Figura 8 –	Modelos tridimensionais das TLPs de <i>Cenostigma pyramidale</i> . A . Estrutura antes (verde) e depois (magenta) da simulação em dinâmica molecular com a respectiva distância (em nanômetro) entre os modelos e a posição dos domínios representados por I, II e III. B . O potencial eletrostático de superfície (gerado com APBS) para os modelos tridimensionais teóricos de CpTLPs, a cor vermelha é referente a carga negativa dos resíduos de aminoácidos, a cor azul a carga é referente a carga positiva dos resíduos de aminoácidos.	64
Figura 9 –	Agrupamento de componente principal (2D) de vários instantes da trajetória de simulação (0 a 100 ns) com base nas respectivas coordenadas cartesianas.	65
Figura S1 –	Curvas de eficiência para os alvos obtidas nos ensaios de RT-qPCR nos tecidos foliar (A) e radicular (B).	84
Figura S2 –	Curvas de <i>Melting</i> dos alvos obtidas nos ensaios de RT-qPCR nos tecidos foliar (A) e radicular (B).	85

Artigo 2

Figura 1 –	Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na	91
------------	---	----

	anotação estrutural e funcional de Taumatinas no transcriptoma de <i>S. scabra</i> .	
Figura 2 –	Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das sequências aminoácidos de Taumatina e das SsTLPs Os resíduos conservados são indicados pelo fundo vermelho e rosa.	96
Figura 3 –	Formação de grupos baseada na distribuição dos motivos conservados entre as 64 SsTLPs. A. Árvore fenética das SsTLPs formada pelo método <i>Neighbor-Joining</i> . B. Padrões de motivo conservados das TLPs de <i>S. scabra</i> . Os 16 motivos estão dispostos por cores.	98
Figura 4 –	Fenograma gerado por meio do método <i>Neighbor-Joining</i> de TLPs de <i>S. scabra</i> comparativamente com TLPs dos bancos de dados NCBI e UniProt. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso, seguido da espécie vegetal.	99
Figura 5 –	Análise <i>in silico</i> do perfil de expressão das TLPs no transcriptoma (RNA-Seq) da raiz de <i>S.scabra</i> gerado após imposição do estresse hídrico. A escala de cores representa o nível de expressão relativa das SsTLPs superexpressas (vermelho), reprimidas (azul) e sem expressão diferencial (cinza).	100
Figura 6 –	Expressão gênica de TLPs em <i>S.scabra</i> em resposta ao estresse hídrico. As barras representam a expressão relativa das cinco SsTLPs no radicular após 6 horas (verde), 24 horas (vermelho), 48 horas (azul) de estresse hídrico e 6 horas de reidratação (amarelo escuro). * <i>up-regulated</i> e <i>down-regulated</i> ($p < 0,05$).	101
Figura S1 –	Curvas de eficiência para os genes de referência e alvos obtidos nos ensaios de RT-qPCR no tecido radicular de <i>S. Scabra</i> .	116
Figura S2 –	Curvas de <i>Melting</i> para os genes de referência e alvos obtidos nos ensaios de RT-qPCR no tecido radicular de <i>S. Scabra</i> .	117

LISTA DE TABELAS

Referencial teórico

Tabela 1 –	Classificação, propriedade e fonte de proteínas PR isoladas de diferentes sistemas vegetais.	27
------------	--	----

Artigo 1

Tabela 1 –	Características das CpTLPs. Tamanho da proteína (aa), massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI), índice de hidropaticidade média (GRAVY), domínios transmembranas (TM) e localização subcelular.	54
Tabela 2 –	Resultados dos algoritmos para modelagem e validação dos modelos teóricos das CpTLPs.	62
Tabela S1 –	Genes de referência e alvos (CpTLPs) para reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), com base na literatura e identificados no transcriptoma de <i>C. pyramidale</i> sob estresse salino, respectivamente.	83

Artigo 2

Tabela 1 –	Características das SsTLPs. Tamanho da proteína (aa), massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI), índice de hidropaticidade média (GRAVY), domínios transmembranas (TM) e localização subcelular.	93
Tabela S1 –	Genes de referência e alvos (SsTLPs) para reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), com base na literatura e identificados no transcriptoma de <i>S. scabra</i> sob supressão de rega.	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Aminoácidos
ABA	<i>Abscisic acid</i> ; Ácido abscísico
AFPs	<i>Antifreeze Proteins</i>
AMP	<i>AntiMicrobial Peptides</i> ; Peptídeo antimicrobiano
ARP3	<i>Actin-related protein 3</i>
ATKRS-1	<i>Lysyl-tRNA Synthetase</i> ; At3g11710
Atoc2	<i>Kiwi allergen genes</i> ; <i>thaumatin-like protein</i>
Aux	Auxina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> ; Ferramenta de Busca por Alinhamento Local
CAMTA	<i>Calmodulin-binding transcription activator</i>
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CD-Search	<i>Conserved Domain Search Service</i> ; Serviço de Pesquisa de Domínio Conservado
cDNA	<i>Complement DNA</i> ; DNA complementar
CKS	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CkTLP	<i>Thaumatolike protein de Cynanchum komarovii</i>
CITLP	<i>Thaumatolike protein de Citrullus lanatus</i>
CpTLPs	<i>Thaumatolike proteins de Cenostigma pyramidale</i>
Cys	Cisteína
Di19	<i>Drought-induced protein 19</i>
DM	Dinâmica Molecular
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> ; Ácido desoxirribonucleico
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET	<i>Ethylene</i> ; Etileno
F-Box	<i>F-box protein</i> ; Proteína F-box
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	False Discovery Rate
FMA	Fungos Micorrízicos Arbusculares
GA	Giberelina
GbTLP	<i>Thaumatolike protein de Gossypium barbadense L.</i>

GC	Guanina-Citosina
GhTLP	<i>Thaumatococcus</i> -like protein de <i>Gossypium hirsutum</i>
GmOLP	<i>Osmotin-Like proteins</i> de <i>Glycine max</i>
GRAVY	<i>Grand Average of Hydropathy</i> ; Índice de Hidropaticidade Média
HAG2	<i>Histone acetyltransferase type B catalytic subunit</i>
HMM	<i>Hidden Markov Model</i>
HR	<i>Hypersensitive Response</i> ; Resposta Hipersensitiva
HSFA2	<i>Heat Stress Transcription Factor A-2</i>
JA	<i>Jasmonic acid</i> ; Ácido Jasmônico
kDa	<i>Kilodalton</i>
Mald2	<i>Apple allergen genes; thaumatin-like protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> ; Proteínas-Quinases Ativadas por Mitógenos
MEGA	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis</i> ; Análise Molecular de Genética Evolutiva
MEME	<i>Multiple Em for Motif Elicitation</i>
MIQE	<i>Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments</i> ; Informação Mínima para a Publicação de Experimentos de q-PCR
Mm	Millimolar
MW	Massa Molecular
MYB4	<i>Transcription repressor MYB4</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> ; Centro Nacional para Informação Biotecnológica
NJ	<i>Neighbor Joining</i>
Ns	<i>Nanosegundo</i>
OGA	<i>O-GlcNAcase</i>
Pb	Pares de base
PCA	<i>Principal Components Analysis</i> ; Análise de Componentes Principais
PDB	<i>Protein Data Bank</i>

PI	Ponto Isoelétrico
PR	<i>Pathogenesis-related</i> ; Proteínas Relacionadas à Patogênese
PR-5	<i>Pathogenesis-related 5</i>
PR5-K	<i>PR5-like receptor kinases</i>
RegEx	<i>Expressão Regular</i>
REST	<i>Relative Expression Software Tool</i> ; Ferramenta de expressão relativa
RMSD	<i>Root-mean-square deviation</i> ; Desvio quadrático médio
RMSF	<i>root mean square fluctuation</i> ; Flutuação quadrática média
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> ; Ácido Ribonucleico
RNA-Seq	<i>RNA sequencing</i> ; Sequenciamento de RNA
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> ; Espécies Reativas de Oxigênio
RT-qPCR	<i>Real-Time quantitative PCR</i> ; PCR quantitativo em Tempo Real
SA	<i>Salicylic Acid</i> ; Ácido Salicílico
SAC1	<i>Suppressor of Actin</i>
SsTLPs	<i>Thaumatococcus-like proteins de Stylosanthes scabra</i>
sTLPs	<i>small TLPs</i> ; Pequenas <i>Thaumatococcus-like Proteins</i>
TFs	<i>Transcription Factors</i> ; Fatores de Transcrição
TLKs	<i>Thaumatococcus-like Receptor Kinases</i>
TLPs	<i>Thaumatococcus-like proteins</i>
TMV	<i>Tobacco Mosaic Tobamovirus</i> ; Tobamovirus de Tabaco
TRA	<i>Transcriptome Shotgun Assembly</i>
UBQ10	<i>Polyubiquitin 10</i> ; Poliubiquitina 10
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
VqTLP	<i>Thaumatococcus-like protein de Vitis quinquangularis</i>
β -TUB2	<i>Beta-Tubulin</i> ; Beta-Tubulina 2

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	20
2.1	OBJETIVO GERAL	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1	ESTRESSES AMBIENTAIS SOBRE AS PLANTAS: UM ENFOQUE A SECA E A SALINIDADE	21
3.1.1	Seca e salinidade	23
3.2	PROTEÍNAS PR NA DEFESA VEGETAL	26
3.2.1	<i>Thaumatin-Like Proteins (TLPs)</i>	30
3.3	A CAATINGA COMO AMBIENTE NA BUSCA DE GENES DE TOLERÂNCIA A ESTRESSES AMBIENTAIS	33
3.3.1	Leguminosas: além da importância socioeconômica	35
3.3.1.1	<i>Cenostigma pyramidale</i>	36
3.3.1.2	<i>Stylosanthes scabra</i>	38
3.4	A TRANSCRITÔMICA E BIOINFORMÁTICA COMO FERRAMENTAS NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1	ARTIGO 1	45
4.2	ARTIGO 2	86
5	CONCLUSÕES	118
6	SÚMULA CURRICULAR	119
	REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas vêm causando diversas perturbações no meio ambiente. Para as plantas, essas mudanças influenciam na disponibilidade de recursos e condições essenciais para o crescimento e desenvolvimento, além de elevar a vulnerabilidade a estresses (bióticos e abióticos) e agravar seus efeitos (PARMESAN; HANLEY, 2015). Para enfrentar fatores ambientais adversos, as plantas desenvolveram diversos mecanismos fisiológicos. Dentre as principais estratégias, a indução de genes que codificam proteínas de proteção vegetal merece destaque, principalmente aquelas envolvidas na transdução de sinais (LIU et al., 2018; RASHEED et al., 2016; SHU et al., 2018; ZHU, 2016).

As proteínas PR (*Pathogenesis-Related*) destacam-se por serem produzidas sob estresse, sendo classificadas em 17 famílias, de PR-1 a PR-17. Essas proteínas são amplamente utilizadas na compreensão de vias de sinalização de defesa por serem consideradas os componentes principais do sistema inato das plantas (ALI et al., 2018b; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Dentre as proteínas PR, as proteínas da família PR-5 são conhecidas por sua alta similaridade com a taumatina – uma proteína inicialmente descrita em *Thaumatococcus daniellii*, representadas, principalmente, pelas chamadas “proteínas semelhantes à taumatina” (*Thaumatococcus-Like Proteins* – TLPs). As TLPs possuem em média de 207 aminoácidos, massa molecular de 18 a 26 kDa, presença de 16 resíduos de cisteínas que formam oito ligações dissulfeto, tornando-as estáveis sob várias condições de estresse, como calor e pH. Além disso, as TLPs apresentam um motivo de assinatura conservado e um motivo REDDD, ambos presentes na maioria das sequências (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

As TLPs são geralmente induzidas em resposta a estresses bióticos, sendo também responsivas a estresses abióticos e por fatores de desenvolvimento das plantas. Essas proteínas desempenham um papel desde a formação da parede celular até a transdução de sinais e atividades antimicrobianas (CHRISTENSEN et al., 2002). Diversos estudos demonstram o importante papel da modulação da expressão das TLPs frente a estresses bióticos e abióticos, apresentando um padrão de superexpressão nas primeiras horas de estresse, refletindo sua participação na defesa efetiva das plantas (HE et al., 2017; WENG et al., 2014).

Dentre as espécies vegetais conhecidas pela tolerância a estresses ambientais,

compondo o semiárido nordestino, destaca-se a *Cenostigma pyramidale* (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis, uma leguminosa popularmente conhecida como “catingueira”. Essa espécie é endêmica da Caatinga, com potencial uso forrageiro, medicinal e considerada uma das plantas mais versáteis do semiárido (ALVIANO et al., 2008; LORENZI, 2016; MAIA, 2004; VILELA et al., 2021).

Outra leguminosa comumente encontrada na Caatinga é a *Stylosanthes scabra* Vogel. A estilosantes é um subarbusto nativo da América do Sul utilizado como forrageira em diversos países, principalmente devido à elevada tolerância a ambientes com solos pobres e baixa disponibilidade hídrica (CALLES; ESCHULTZE-KRAFT, 2016). Plantas de estilosantes apresentam capacidade de produzir altas quantidades de massa verde, mesmo enfrentando condições ambientais extremas (MARQUES et al., 2018).

Tendo em vista a tolerância dessas espécies frente aos estresses abióticos, apresentam-se como excelentes modelos vegetais na busca e na análise de genes associados aos referidos estresses. Com este propósito, as abordagens “ômicas”, através do emprego de técnicas de alto rendimento, a exemplo do RNA-Seq, são fundamentais na identificação de genes (ou moléculas) envolvidos nos processos moleculares associados ao crescimento, ao desenvolvimento e à tolerância a estresses em várias plantas.

Com a bioinformática, essas metodologias moleculares têm se consolidado como indispensáveis na mineração e análise funcional do grande número sequências e informações biológicas. Nesse sentido, o presente estudo objetivou analisar a estrutura de genes codificantes de TLPs nos transcriptoma de *C. pyramidale* sob salinidade e *S. scabra* sob supressão de rega, analisando suas características estruturais, funcionais, padrões de expressão diferencial frente aos estresses em tela.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar transcritos da família das TLPs nos transcriptomas radiculares de *Cenostigma pyramidale* e *Stylosanthes scabra* em resposta ao estresse salino e supressão de rega, respectivamente, com vistas à caracterização estrutural e funcional para entendimento de seu papel biológico e possível uso biotecnológico e no melhoramento genético vegetal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e caracterizar transcritos da superfamília de TLPs (*Thaumatococcus*-Like Proteins) no transcriptoma radicular de *C. pyramidale* e de *S. Scabra*, em resposta ao estresse salino e supressão de rega, respectivamente.
- Caracterizar estruturalmente as sequências de TLPs de ambas as espécies, com base nos seus os motivos e domínios conservados, para a realização de estudos comparativos com sequências de genes previamente caracterizados;
- Estabelecer o perfil de expressão *in silico* de transcritos de TLPs com base nas diferentes bibliotecas de RNA-Seq disponíveis para as espécies em estudo;
- Validar o perfil de expressão das TLPs candidatas nas duas espécies, sob efeito dos estresses avaliados através de RT-qPCR.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 ESTRESSES AMBIENTAIS EM PLANTAS: ENFOQUE PARA A SECA E A SALINIDADE

As plantas estão sob constante efeito de uma ampla gama de fatores ambientais, caracterizados como estresses abióticos e bióticos, geralmente em combinação, levando a grandes perdas da agricultura a cada ano. Os estresses bióticos são causados especialmente por vírus, bactérias, fungos, nematoides, insetos e aracnídeos. Ao passo que o estresse abiótico é imposto às plantas por fatores não bióticos, como salinidade, luz solar, temperatura extremas, enchentes e seca (GULL, LONE, WANI, 2019; SHARMA et al., 2020), entre outros.

Na perspectiva fisiológica, o estresse é a condição ocasionada por fatores que tendem a alterar o equilíbrio fisiológico e bioquímico da planta (NILSEN; ORCUTT, 1996). Tal condição pode figurar um fator positivo, ajudando a planta a perceber o ambiente externo, harmonizar-se com ele e, assim, estimular seu crescimento e desenvolvimento. Por outro lado, quando a condição de estresse afeta negativamente seu metabolismo, crescimento e desenvolvimento, tem-se o fator de desequilíbrio negativo (LICHTENTHALER, 2003). Patógenos, pragas agrícolas e ervas daninhas causam perdas médias que variam de 17% a 30% (SAVARY et al., 2019). Da mesma forma, estima-se que o impacto dos principais estresses abióticos (por exemplo, altas temperaturas, seca, deficiência e toxicidade de nutrientes para as plantas) resulte em uma perda anual de 51%-82% da produção agrícola em todo o mundo (OSHUNSANYA et al., 2019).

A vulnerabilidade das plantas aos estresses bióticos e abióticos está aumentando com o advento das mudanças climáticas, agravando os seus efeitos. Mudanças climáticas influenciam na disponibilidade dos recursos, alterando as condições ideais para o crescimento e desenvolvimento vegetal (PARMESAN; HANLEY, 2015). Portanto, tornam-se fatores determinantes para o declínio da produtividade em diversas culturas ao redor do mundo. A recorrência de combinações desses estresses afeta também as espécies arbóreas, principalmente em decorrência do seu longo ciclo de vida, cuja importância ecológica e econômica é destacada pela contribuição direta e indireta na perda de áreas florestais e na diminuição da biodiversidade. Fatores como alta temperatura e seca também podem aumentar a

incidência de doenças e surtos de pragas, afetando o crescimento e o desenvolvimento vegetal (TESHOME; ZHARARE; NAIDOO, 2020).

Em regiões semiáridas, por exemplo, espécies adaptadas a ambientes secos, salinizados e quentes são frequentes, embora ainda exista uma lacuna acerca das características fisiológicas e de adaptabilidade em condições de estresse da maioria dessas espécies (MATIAS, 2019). Entender os mecanismos moleculares das plantas sob estresses é de extrema importância para o desenvolvimento de culturas mais tolerantes, visando à melhoria da eficiência da produção agrícola (ALI et al., 2018a; RUGGIERO et al., 2017; VASSEUR et al., 2014).

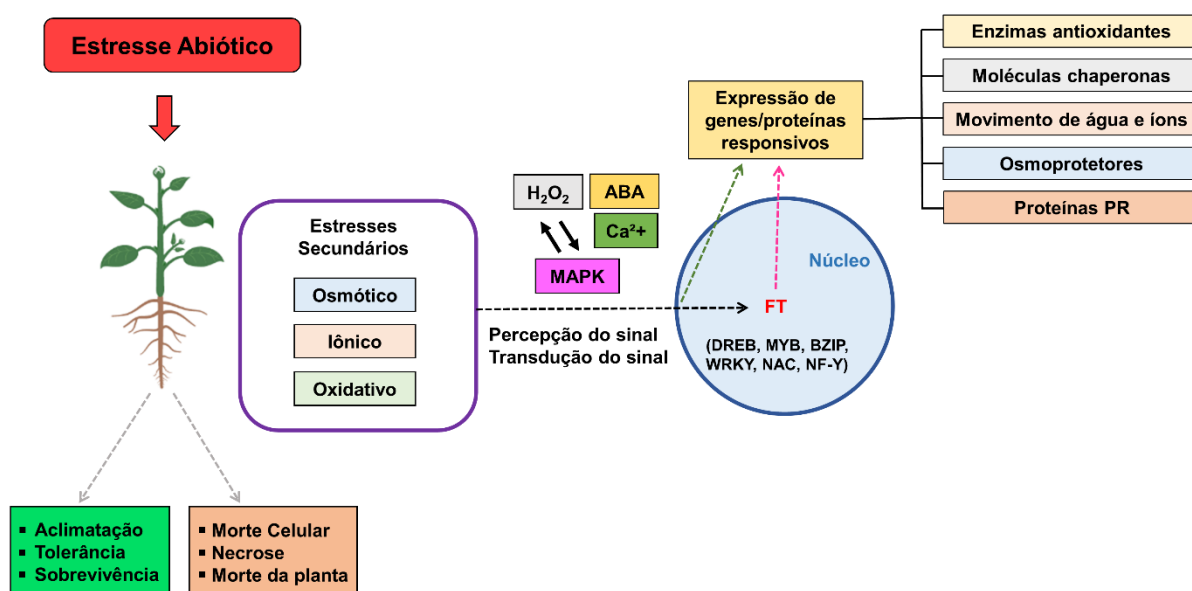
Para a sobrevivência em condições ambientais adversas, as plantas desenvolveram um mecanismo de resposta. De modo geral, os estímulos externos são percebidos pela planta, a qual responde através de modificações bioquímicas e fisiológicas apropriadas (SHARMA et al., 2020). A percepção do estímulo ocorre a nível de sensores da superfície celular (ou citoplasma) e transferidos (por vias de transdução de sinais) para a maquinaria transcricional, no núcleo (VERMA et al., 2013).

Os estresses abióticos podem desencadear outros estresses nas plantas, estes chamados de estresses secundários, compreendendo estresse iônico, osmótico e oxidativo. O déficit hídrico leva ao estresse osmótico, enquanto o estresse salino ocasiona o estresse osmótico e o estresse iônico, além de induzir o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que leva ao estresse oxidativo (ASHRAF et al., 2018; ZHU, 2016). Embora as ROS serem danosas à célula, a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) também desempenha um papel na sinalização celular, ativando a cascata de sinalização das proteínas MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) e regulando a expressão de genes relacionados a estresses (DUMANOVIĆ et al., 2021; VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016).

A resposta das plantas aos estresses abióticos é mediada por hormônios vegetais. Alterações nos níveis de hormônios como ácido abscísico (ABA), ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) são utilizadas para propagar o sinal de estresse, assim como sinais elétricos, cálcio e ROS, dentre outros. Durante estresses abióticos, as plantas produzem o ABA e induzem alterações morfofisiológicas como o fechamento de estômatos e ativação de fatores de transcrição (TFs) como NAC, MYB e MYC, induzindo regulação de genes de estresse. Além disso, em resposta a estresses abióticos a sinalização por hormônios vegetais

induz um padrão de respostas cruzadas, formando um esquema complexo de regulação de genes pelos hormônios (Figura 1) (CHOUDHURY et al., 2017; SAH; REDDY; LI, 2016; VERMA; RAVINDRAN; KUMAR, 2016; ZHU, 2016).

Figura 1 - Percepção dos sinais de plantas sob estresses abióticos.



Fonte: Adaptado de Gomes-Neto (2021).

Genes responsivos a estresses abióticos têm sido associados à tolerância, tais como, fatores de transcrição relacionados às vias de sinalização de hormônios vegetais e proteínas chaperonas, dentre outros. Tais genes responsivos podem desempenhar funções fundamentais, como atuar na proteção da célula sob estresses, transdução de sinais, regulação da expressão de novos genes, além da produção de enzimas e proteínas de rotas metabólicas essenciais (GUJJAR; AKHTAR; SINGH, 2014; LIU et al., 2018; RASHEED et al., 2016; SHU et al., 2018; ZHU, 2016).

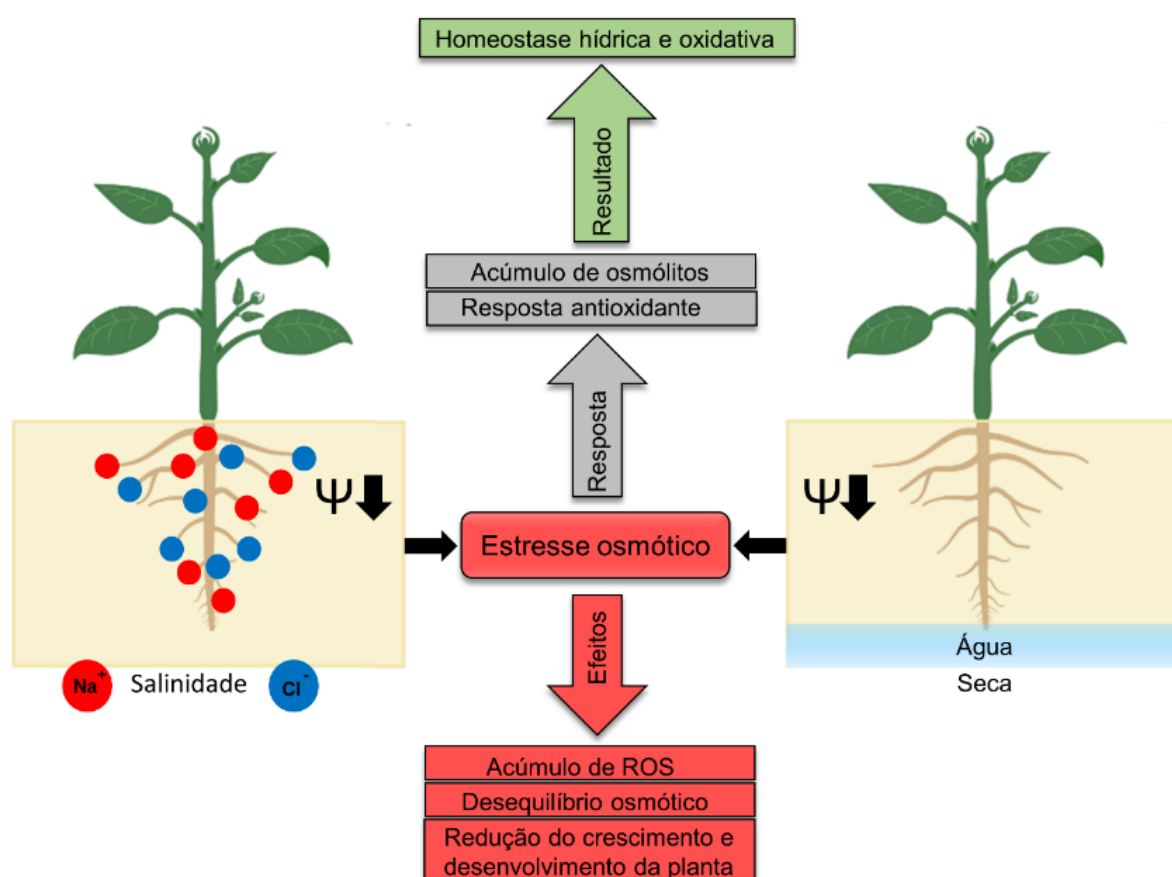
3.1.1 Seca e salinidade

Os estresses provocados pela seca e a salinidade estão entre os principais fatores abióticos que negativamente afetam a produção agrícola, reduzindo o rendimento das lavouras, tanto qualitativa quanto quantitativamente. Perdas causadas por esses estresses (além, por exemplo, de inundações e estresse oxidativo devido à exposição ao ozônio) passam de 170 bilhões de dólares por ano (RAZZAQ et al., 2021). Devido às crescentes mudanças climáticas, os impactos desses estresses

tendem a ser cada vez mais impactantes (THORNE; HARTLEY; MAATHUIS, 2020). Juntos, esses estresses promovem redução do potencial hídrico do solo, exercendo estresse osmótico, devido à concentração de soluto ou baixa disponibilidade de água, respectivamente (Figura 2) (JIMÉNEZ-ARIAS et al., 2021).

De um modo geral, os estresses provocam uma resposta sistêmica nas plantas, envolvendo genes de diferentes órgãos e tecidos, visto que o mecanismo de tolerância requer diversas alterações fisiológicas (BARTLETT et al., 2016).

Figura 2 - Modelo esquemático de estresse osmótico desencadeado por estresses causados por salinidade e seca.



Fonte: Adaptado de Jiménez-Arias et al. (2021).

A salinização do solo é um problema mundialmente importante, com efeitos diretos sobre a produtividade das culturas. Afeta mais de um terço das terras irrigadas no mundo. Dentre as principais causas da salinização do solo estão os sistemas de drenagem e irrigação de baixa qualidade e os níveis crescentes de água subterrânea com alto teor de sal (ZHAO et al., 2020). Seus efeitos sobre as plantas incluem:

alteração dos processos metabólicos, desorganização da membrana, desequilíbrio nutricional, estresse hídrico e toxicidade iônica, devido à absorção excessiva de íons como sódio (Na^+) e cloreto (Cl^-), além do estresse oxidativo devido à geração de ROS (ISAYENKOV, 2012; ISAYENKOV; MAATHUIS, 2019).

No estresse salino, o acúmulo de altos níveis de Na^+ no citosol e o estresse osmótico induzem o fechamento dos estômatos para evitar a perda de água, limitando as trocas gasosas, comprometendo a fotossíntese e, portanto, reduzindo o crescimento e desenvolvimento das plantas (CHAVES; FLEXAS; PINHEIRO, 2009). A senescência e a morte celular programada também são processos relacionados com a toxicidade iônica que podem ser induzidos pelo estresse salino (SILVEIRA et al., 2010).

A principal estratégia usada pelas plantas para manter o ajuste do equilíbrio osmótico envolve o acúmulo de diferentes tipos osmólitos, tais como a prolina, glicina-betaina e açúcares, porém esse mecanismo é ativado diante de diversas condições (AL-YASI et al., 2020; ZHAO et al., 2020). A prolina desempenha uma função essencial no ajuste osmótico sob estresse salino, além atuar na estabilização de proteínas e estruturas de membrana e como sequestrador de ROS para atenuar o estresse oxidativo (BEN REJEB; ABDELLY; SAVOURÉ, 2014; MANSOUR; ALI, 2017). Sob estresse salino, o acúmulo de glicina-betaina também está relacionado ao ajuste do equilíbrio osmótico em condições de desidratação, atuando na redução do estresse oxidativo e à estabilização das membranas, além de proteger enzimas (CHEN; MURATA, 2011).

A deficiência hídrica também afeta o crescimento e o desenvolvimento das plantas por meio de alterações dos processos fisiológicos, bioquímicos e moleculares (HE et al., 2020). Essas alterações resultam em processos como fechamento estomático e redução da evaporação foliar, para restringir a transpiração, conservar a turgidez e a desidratação (HE et al., 2020; HESSINI et al., 2019). As plantas também reduzem a fotossíntese, devido ao fechamento estomático e à redução da síntese da clorofila, resultando no acúmulo de biomassa e repressão do crescimento celular, além de promover o acúmulo de ROS (HE et al., 2020; SHER et al., 2017).

As plantas respondem e se adaptam à seca tanto ao nível celular quanto molecular, como pelo acúmulo de osmólitos e de proteínas específicas, estas envolvidas na tolerância ao estresse (SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006).

Assim como sob salinidade, as plantas sob estresse hídrico também utilizam o acúmulo de prolina e glicina-betaína para reajuste osmótico, para estabilizar as membranas, manter o turgor e para atenuar o estresse oxidativo (PER et al., 2017; RAJASHEKER et al., 2019).

Diversos genes podem influenciar na modulação da expressão (indução ou repressão) de proteínas e metabólitos envolvidos nas respostas fisiológicas das plantas quando sob deficiência hídrica. (BARTELS; SUNKAR, 2005; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SEKI, 2003; YAMAGUCHI-SHINOZAKI; SHINOZAKI, 2005). Além disso, diversos genes induzidos em resposta à seca também são induzidos sob estresse salino, indicando a íntima relação entre ambas as condições (BENKO-ISEPPON et al., 2011).

Entre os genes induzidos, destacam-se aqueles codificadores das proteínas PR. Essas proteínas são expressas em condições normais das plantas, no entanto, são superexpressas quando as plantas são submetidas a condições de estresses, sendo consideradas importantes no seu sistema inato e, portanto, fundamentais para o melhor entendimento das vias de sinalização em resposta ao estresse.

3.2 PROTEÍNAS PR NA DEFESA VEGETAL

Proteínas PR constituem uma superfamília de proteínas relacionadas à patogênese (PR - *Pathogenesis related proteins*) classificadas em 17 subfamílias (nomeadas PR-1 a PR-17) e identificadas em diferentes espécies de plantas, incluindo tabaco, tomate, *Arabidopsis*, cevada, entre outras (Tabela 1) (ALI et al. 2018b).

Tabela 1- Classificação, propriedade e fonte de proteínas PR isoladas de diferentes sistemas vegetais.

Subfamília	Espécie	Nº. de acesso do gene	Atividade	Referência
PR-1	<i>Nicotiana tabacum</i>	YOO707	Antifúngica	Antoniw et al. (1980)
PR-2		M59443.1	β -1,3-glucanases	
PR-3		X77111.1	Quitinase (Classe I, II, IV, V, VI, VII)	Van Loon (1982)
PR-4		NW_015888419.1	Quitinases (Classe I, II)	
PR-5	<i>Solanum lycopersicum</i>	NW_015793016	Proteínas semelhantes à taumatina (TLPs)	Green e Ryan (1972)
PR-6		NW_004196001.1	Inibidor de proteinase	
PR-7		NC_015445.2	Endoproteinase	Vera e Conejero (1988)
PR-8	<i>Crocus sativus</i>	NC_026660.1	Quitinase (Classe III)	Metraux et al. (1988)
PR-9	<i>Nicotiana tabacum</i>	EC 1.11.1.7	Peroxidase	Lagrimini et al. (1987)
PR-10	<i>Corycium crispum</i>	NC_026940.1	Proteínas semelhantes a ribonuclease	Somssich et al. (1986)
PR-11	<i>Nicotiana tabacum</i>	gi 899342	Quitinase (Classe I)	Melchers et al. (1994)
PR-12	<i>Raphanus raphanistrum</i>	NC_025209.1	Defensina	Terras et al. (1995)
PR-13	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 1181531	Thionina	Epplé et al. (1995)
PR-14	<i>Hordeum vulgare</i>	gi 1045201	Proteína de transferência de lipídios (LTPs)	García-Olmedo et al. (1995)
PR-15		gi 2266668	Oxalato oxidase	
PR-16		gi 1070358	Semelhante à oxidase	Wei et al. (1998)
PR-17	<i>Nicotiana tabacum</i>	-	Antifúngica / antiviral	Okushima et al. (2000)

Fonte: Adaptado de Ali et al. (2018b).

Inicialmente as PR foram associadas à defesa vegetal contra vários fitopatógenos (Sharma et al 2021). Exemplos de PR com atividades antifúngicas incluem as PR-1, PR-2, PR-4, PR-5 e PR-12 (BAKARE; GOKUL; KEYSTER, 2021; DAI et al., 2016; LIU et al., 2020; RAJNINEC et al., 2021; SANTOS-SILVA et al., 2021), as PR-9, PR-12 e PR-14 com propriedades antibacteriana (JIANG et al., 2015; SATHOFF; SAMAC, 2019; YANCHEVSKAYA et al., 2018) e as PR-10, PR-13 e PR-14 com atividade antiviral (AVULA et al., 2021; ELSHARKAWY; ELSAWY; ISMAIL, 2021; MANGAL et al., 2020). Nos últimos anos, a atividade de algumas subfamílias de PRs também têm sido extensivamente estudadas devido ao seu importante papel na tolerância à estresses abióticos (Sinha et al. 2020; Wu et al. 2016).

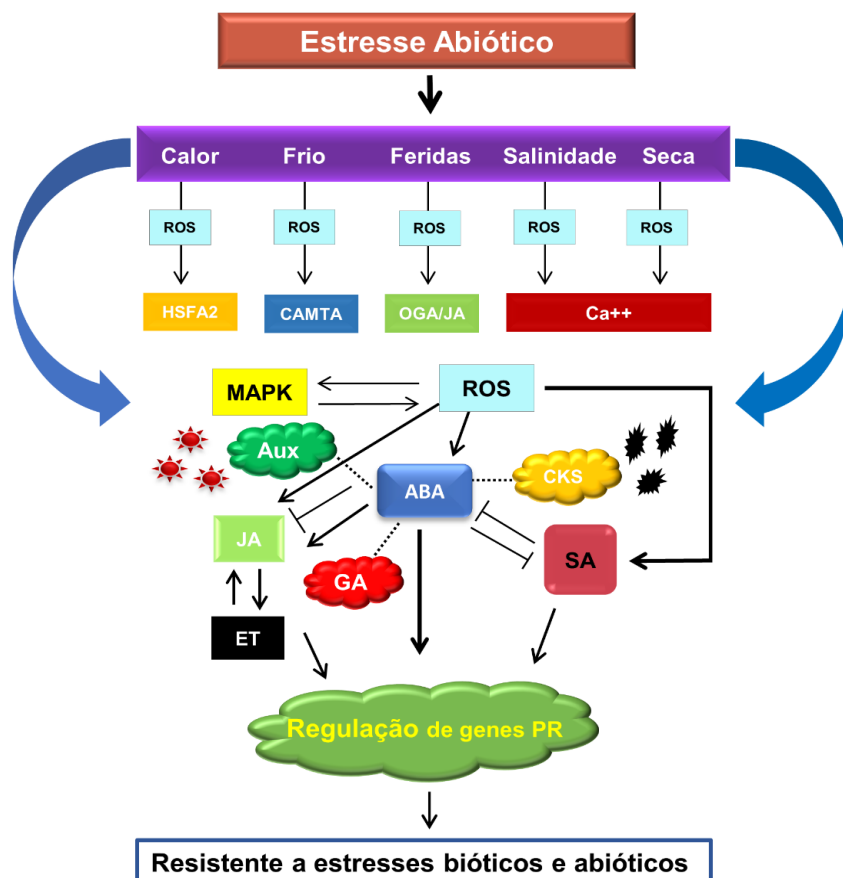
Proteínas PR têm sido relatadas como sendo constitutivamente expressas, com grande relevância no desenvolvimento das plantas (IQBAL et al., 2020; WANG et al., 2007; WU et al., 2016), como também induzidas por fatores bióticos e/ou abióticos (ALI et al., 2018b; AL-YASI et al., 2020; BAKARE; GOKUL; KEYSTER, 2021). Como componentes fundamentais no sistema inato das plantas, o estudo com proteínas PR são fundamentais para uma melhor compreensão das vias de sinalização em resposta ao estresse (ALI et al., 2018b).

A modulação da expressão das proteínas PR é dependente de componentes de sinalização, a exemplo do ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno (BOCCARDO et al., 2019). Além disso, fatores de transcrição e outros hormônios vegetais também possuem um papel na codificação dessas proteínas, tais como a auxina (Aux), giberelina (GA), CAMTA, HSFA2, proteínas CKs, MAPK e OGA (Figura 3), as quais variam em composição, quantidade e tempo de exposição, de acordo com espécie e tipo de estresse (ALI et al., 2018b; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Plantas transgênicas superexpressando proteínas PR mostram maior resistência à microrganismos fitopatogênicos, como também maior tolerância à estresses abióticos. Segundo Chye et al. (2005), plantas transgênicas de batata super expressando genes PR-2 e PR-3 mostraram resistência a patógenos fúngicos, além de apresentarem maior crescimento radicular, quando comparadas às plantas não transgênicas. A transformação de *Arabidopsis* com o gene GhTLP19 promoveu aumentou a tolerância a seca, com maior desenvolvimento de tricomas (LI et al., 2020). Plantas de arroz transgênicos superexpressando o gene JIOsPR10 resultou no aumento da tolerância ao fungo *M. oryzae* como também resultou em fenótipo de tolerância à seca e ao estresse salino (Wu et al. 2016). Segundo os autores, a

tolerância se deu em função da modulação diferencial de várias proteínas relacionadas ao estresse, principalmente, do estresse oxidativo, metabolismo de carboidratos e defesa da planta.

Figura 3 – Esquema da regulação dos genes PR após estresses abióticos.



Fonte: Adaptado de Ali et al. (2018b).

De modo geral, proteínas PR apresentam baixa massa molecular (6–43 kDa), resistência a proteases e estabilidade sob variações de pH e temperatura (VAN LOON et al., 1994; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Também podem ser divididas em ácidas e básicas. As proteínas ácidas geralmente são secretadas no espaço extracelular, por vias específicas, sendo que as básicas são transportadas para o vacúolo, por uma sequência de extensão localizada na extremidade C-terminal (TAKEDA et al., 1991).

Com relação a estresses ambientais, a expressão de genes PR ainda não é totalmente compreendida em nível molecular. No entanto, estudos relatam o envolvimento de várias vias de sinalização na regulação da expressão de genes

PR após estresse abiótico (ALI et al., 2018b). Conforme Singh et al. (2013), estresses salino e oxidativo aumentam significativamente a expressão de genes PR, como verificado em *Arabidopsis*. Os genes PR de *Brassica juncea* foram significativamente induzidos por estresses hormonais (ABA, JA e SA) e pelo patógeno *Erysiphe cruciferarum* (ALI et al., 2017). No arroz, a regulação positiva do gene PR-10 foi relatada em estresses causados seca e sal (WU et al., 2016). Além disso, os níveis de mRNA do gene PR-4 foram regulados positivamente após frio, salinidade e fermento (KIM et al., 2014).

Diante do exposto, a expressão de genes PR (principalmente das quitinase, glucanase, TLP, defensina e tionina) associados à defesa vegetal destacam-se como excelentes alvos moleculares a serem utilizados no desenvolvimento de culturas cada vez mais tolerantes (ALI et al., 2017, 2018; ARCHAMBAULT; STRÖMVIK, 2011; DAI et al., 2016; EL-KEREAMY et al., 2011; FOUNTAIN et al., 2010; JIANG et al., 2015).

3.2.1 *Thaumatococcus*-Like Proteins (TLPs)

As proteínas da família PR-5 são conhecidas pela alta similaridade de sequência com a taumatina, uma proteínas de sabor doce, inicialmente descritas em *Thaumatococcus daniellii*, planta nativa do Oeste Africano. Em função disso, são chamadas de proteínas semelhantes à taumatina (TLPs) (CHRISTENSEN et al., 2002; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Apesar de amplamente descritas em plantas, as TLPs também estão presentes em diversos organismos (SHATTERS et al., 2006), incluindo nematoides (KITAJIMA; SATO, 1999), insetos (BRANDAZZA et al., 2004) e fungos (GRENIER et al., 1999; SAKAMOTO et al., 2006). Em plantas, as TLPs são encontradas em angiospermas, gimnospermas e briófitas (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

De forma geral, as proteínas da família TLP possuem um motivo de fenda ácida (*cleft acidic*), composto por cinco resíduos de aminoácidos conservados: arginina, ácido glutâmico e três resíduos de ácido aspártico (REDDD), o qual atua na ligação ao seu receptor específico, durante atividade antifúngica. Apresentam massa molecular entre 18 a 26 kDa (em geral), e tamanho médio de 207 aminoácidos, incluindo a presença de 16 resíduos de cisteína, responsáveis pela formação de oito ligações dissulfeto, tornando-as mais estáveis, principalmente sob variações de calor e pH (BREITENEDER, 2004; GHOSH; CHAKRABARTI, 2008; LIU; STURROCK;

EKRAMODDOULLAH, 2010; RETHINASAMY; DATTA; MUTHUKRISHNAN, 1999).

Sequências menores de TLPs (*small* TLPs; sTLPs), com massa molecular de ~17 kDa, com apenas 10 resíduos de cisteína conservados e cinco ligações dissulfeto, foram identificadas em monocotiledôneas, coníferas e fungos (GREENSTEIN et al., 2006; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

A maioria das sequências das TLPs apresenta o seguinte motivo de assinatura conservado: G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-[GQ]-X(2,3)-C (JESÚS-PIRES et al., 2020; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; ZHAO; SU, 2010). A estrutura terciária é formada por três domínios conservados distintos, formando uma fenda central, localizada entre os domínios I e II, responsáveis por sua atividade antimicrobiana (LEONE et al., 2006). Apesar da alta conservação de cisteínas e da atividade antimicrobiana, normalmente as TLPs não são classificadas como peptídeos antimicrobianos (AMPs) já que, tradicionalmente, os AMPs são proteínas menores, possuindo de 12 a 50 aminoácidos (SANTOS-SILVA et al., 2020).

Nas plantas, as TLPs podem estar acumuladas no espaço extracelular e nos vacúolos para atuar em resposta a defesa (SAMAC et al., 2011; SHARMA et al., 2020; TACHI et al., 2009). Em alguns estudos, as TLPs acumuladas nos vacúolos são reconhecidas como osmotinas ou OLPs (*osmotin-like proteins*) devido a sua atuação na resposta ao estresse osmótico (PETRE et al., 2011) ou zeamatina devido a espécie na qual foi inicialmente identificada (*Zea mays*) (MALEHORN et al., 1994), no entanto, a classificação das TLPs utiliza a sequência de aminoácidos (sequência primária) como critério e não há diferenças claras entre as sequências de TLPs de eucariotos (JESÚS-PIRES et al., 2020). Além disso, análises filogenéticas revelaram que apesar de algumas TLPs possuírem funções diferentes, elas não são separadas por clados filogenéticos distintos (SHATTERS et al., 2006). Deste modo, o uso dos termos osmotinas e OLPs é desaconselhável (JESÚS-PIRES et al., 2020).

As TLPs são geralmente induzidas em resposta ao estresse biótico, embora muitas sejam induzidas por outras condições de estresse e/ou fatores de desenvolvimento. Estudos têm revelado que as TLPs desempenham um papel desde a rigidificação da parede celular até a transdução de sinais e atividades antimicrobianas (CHRISTENSEN et al., 2002), sendo identificadas e analisadas em diversos organismos, incluindo *Arabidopsis thaliana* e *Oryza sativa* (SHATTERS et al., 2006), *Brachypodium distachyon* e *Hordeum vulgare* (IQBAL et al., 2020), *Cucumis melo* (L.) (LIU et al., 2020), *Citrullus lanatus* (Thunb.) (ZHANG et al., 2018), *Glycine*

max (L.) (HAYASHI et al., 2014), e *Vitis vinifera* (L.) (YAN et al., 2017).

Nas últimas décadas, estudos com TLPs em vegetais têm revelado que essas proteínas mostram expressão diferencial quando a planta está sob efeito de estresses (biótico e/ou abiótico). Sob estresse biótico, o padrão de expressão das TLPs é elevado nas primeiras horas, sugerindo uma resposta mais efetiva de defesa (HE et al., 2017; WENG et al., 2014), inibindo o crescimento do fitopatógeno (YAN et al., 2017; ZHANG et al., 2018). Liu e colaboradores (2020) verificaram que das 28 TLPs analisadas em melão (*C. melo*), a maioria delas mostrou-se significadamente induzida após inoculação com fungo fitopatogênico *Podosphaera xanthii*. Este estudo também revelou algumas TLPs reprimidas, sugerindo efeitos sobre eventos fisiológicos diferentes, tal como no desenvolvimento da planta. Em melancia (*C. lanatus*), o gene CITLP27 inibiu significativamente o crescimento de vários patógenos fúngicos, como *Fusarium verticillioides* e *Didymella bryoniae* (ZHANG et al., 2018). *Arabidopsis* transgênica expressando uma TLP de uva (VqTLP29) foi associada a maior resistência ao fungo *Erysiphe necator* e à bactéria *Pseudomonas syringa*. Além disso, a resposta imune associada ao fechamento estomático em decorrência do ataque de patógenos foi reforçada nas linhagens transgênicas (YAN et al., 2017).

A *Cynanchum komarovii* (uma planta do deserto adaptada a seca), sob estresses abióticos (Metil Jasmonato, ABA, SA, NaCl e seca), apresentou maior expressão do de CkTLP, sugerindo a participação das TLPs na resposta de diferentes estresses abióticos (WANG et al., 2011). Similarmente, sob condições de estresse salino, houve maior indução de TLPs no tecido foliar da soja (TACHI et al., 2009), como aumentou a tolerância de *Arabidopsis* transgênica sob condição de estresse por seca, promovendo o desenvolvimento dos tricomas em *Arabidopsis* (LI et al., 2020). O fragmento TACA (A/G) do promotor PR5, combinado com Di19 (*Drought-induced protein 19*), resultou no aumento da expressão de PR-5 e da tolerância a seca em *Arabidopsis* (LIU et al., 2013).

A regulação das TLPs ocorre através de vários sinais de hormônios vegetais e fatores de transcrição, o que sugere sua participação nos processos de crescimento e desenvolvimento das plantas, como a formação de órgãos florais e desenvolvimento de fibra (LI et al., 2020; NEALE et al., 1990). Iqbal et al. (2020) avaliaram a expressão de TLPs de *Hordeum vulgare* e relataram que algumas HvTLPs (HvTLP14, 17 e 18) foram diferencialmente expressas durante a germinação (16-96 h) indicando seu possível papel envolvimento na germinação de sementes e no processo de maltagem.

Alguns estudos também revelaram que as proteínas TLPs demonstraram função anticongelante, como as AFPs (*antifreeze proteins*) - atividade esta, reportada em centeio, durante aclimação ao frio (HIILOVAARA-TEIJO et al., 1999; YU; GRIFFITH, 1999). Outro exemplo inclui uma TLP da larva de *Dendroides canadenses* (besouro), a qual mostrou interagir com as proteínas AFPs, formando complexos maiores que as AFPs sozinhas (WANG; DUMAN, 2006).

TLPs também atuam como alergênicos de frutas, como a Mald2 na maçã (*Malus domestica*) (HSIEH; MOOS; LIN, 1995) - posteriormente descrita como Atoc2 no kiwi (*Actinidia chinensis*) (GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ et al., 2002); uma TLP de uva (*Vitis vinifera*) (PASTORELLO et al., 2003) e outra de banana (*Musa acuminata*) (LEONE et al., 2006).

Adicionalmente, algumas TLPs apresentam um domínio intracelular quinase (na região C-terminal) formando as “TLPKs”, também conhecidas como PR5-K. A primeira TLPK reportada foi em Arabidopsis, cuja similaridade com as proteínas TLPs sugeriram alvos patogênicos semelhantes, embora o mecanismo exato de ação dos TLPKs ainda não seja conhecido (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010). Recentemente foram identificadas TLKs nos genomas de cinco culturas de cereais: *Brachypodium distachyon* (planta modelo para gramíneas forrageiras e cereais) cevada (*Hordeum vulgare*), arroz (*Oryza sativa*), sorgo (*Sorghum bicolor*) e trigo (*Triticum aestivum*) (SHARMA et al., 2020).

Para realização de estudos de identificação e caracterização de genes TLPs em plantas, espécies adaptadas a ambientes extremos são promissoras, principalmente aquelas tolerantes à altas temperaturas, solos salinizados e com baixa disponibilidade hídrica.

3.3 A CAATINGA COMO AMBIENTE NA BUSCA DE GENES DE TOLERÂNCIA A ESTRESSES AMBIENTAIS

A Caatinga é considerada um dos grandes biomas brasileiros correspondendo a cerca de 11% do território nacional (912.529 Km²) sendo a maior parte da região semiárida do nordeste brasileiro, incluindo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (LEAL et al., 2005; TABARELLI et al., 2018).

Apresenta extrema heterogeneidade de topografia, clima, solos e vegetação

(SILVA et al., 2017; VELLOSO et al., 2002), contribuindo significativamente para o surgimento de diferentes formações vegetais (LEAL et al., 2005).

A vegetação é constituída principalmente de arbustos e árvores de pequeno porte, bem como muitas plantas suculentas, apresentando anatomia, morfologia e mecanismos fisiológicos adaptados para prosperar em um ambiente hostil imposto por chuvas irregulares e secas prolongadas (precipitação de <1800 mm/ano, com períodos de 5 a 6 meses recebendo menos que 100 mm (QUEIROZ et al., 2017).

A diversidade de plantas angiospermas é notavelmente alta na Caatinga, representadas por 3.347 espécies, 962 gêneros e 153 famílias das quais, 526 espécies e 29 gêneros são endêmicas. Esses números revelam uma relação espécie/área, proporcionalmente maior do que a da floresta amazônica, ou seja, uma média de 4 espécies por mil km² na Caatinga e 2,5 espécies/ mil km² na Amazônia (FERNANDES; CARDOSO; QUEIROZ, 2020). Dentre as famílias de plantas, as Leguminosae (Fabaceae) e Euphorbiaceae são as mais ricas em espécies (490 espécies/ 112 gêneros e 199 espécies / 27 gêneros, respectivamente) e, considerando espécies endêmicas, essas também são as mais representadas, seguidas pelas famílias Cactaceae, Bromeliaceae, Malvaceae e Apocynaceae (FERNANDES, CARDOSO; QUEIROZ, 2020).

Apesar da riqueza desse bioma, a caatinga destaca-se como um dos biomas mais afetados pelas mudanças climáticas globais, visto que o aumento das temperaturas e da aridez tendem a reduzir a dinâmica dos ecossistemas naturais, afetando a distribuição e diversidade das espécies. Segundo SILVA et al. (2019), espécies de plantas endêmicas da Caatinga são altamente vulneráveis, até mesmo a cenários conservadores de mudanças climáticas futuras. Além disso, os baixos índices pluviométricos, associado às altas taxas de evaporação (condição predominante em diversas áreas), têm levado à prática de irrigação, acelerando o processo de salinização dos solos (ZHAO et al., 2020).

Consequentemente, a frequência e duração da seca, o aumento da temperatura associados à práticas insustentáveis de manejo do solo têm potencializado o processo de erosão, assoreamento dos rios, comprometendo a biodiversidade deste bioma, contribuindo para o processo de desertificação (DEMARTELAERE et al., 2021; MARENGO et al., 2017; SANTOS et al., 2011).

Neste sentido, espécies altamente adaptadas às condições estressantes do semiárido chamam a atenção pelas condições extremas de estresse que conseguem

suportar, portanto, são espécies promissoras em estudos visando a prospecção de categorias de moléculas (ou genes) relacionados à tolerância a fatores de estresses ambientais, especialmente, seca e salinidade. Estudos dessa natureza exaltam a importância do potencial biotecnológico da riqueza desse bioma exclusivamente brasileiro.

3.3.1 Leguminosas: além da importância socioeconômica

A família Leguminosae ocupa a terceira posição entre as maiores famílias de angiospermas (LPWG, 2013; 2017). Sua ampla distribuição geográfica (incluindo regiões temperadas, tropicais e subtropicais) ressalta a capacidade de adaptação desta importante família aos mais diferentes ambientes (KNOTHE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020). No Brasil ocorrem 220 gêneros e 2.830 espécies, estando entre as famílias mais ricas na maioria dos biomas brasileiros, predominantemente na Amazônia e Caatinga (GIULIETTI et al., 2005; PEREIRA et al., 2019; RODRIGUES et al., 2020).

Membros desta família apresentam uma grande diversidade de hábito de crescimento, desde ervas perenes até árvores de grande porte (SILVEIRA; MIOTTO, 2013). Muitas espécies de leguminosas são amplamente conhecidas pela sua importância socioeconômica, a exemplo do amendoim (*Arachis hypogaea* L.), da ervilha (*Pisum sativum*), do feijão (*Phaseolus vulgaris*), do grão-de-bico (*Cicer arietinum*), da lentilha (*Lens culinaris*), e da soja (*Glycine max*). Outras leguminosas, embora menos conhecidas, são amplamente utilizadas para fins madeireiro (BALDIN; MARCHIORI, 2014; SANTOS et al., 2017), forrageiro (LISTA et al., 2019; MUIR et al., 2019), medicinal (VILELA et al., 2021; NGHONJUYI et al., 2016) e ornamental (MASLOVA et al., 2018; MOREIRA et al., 2018).

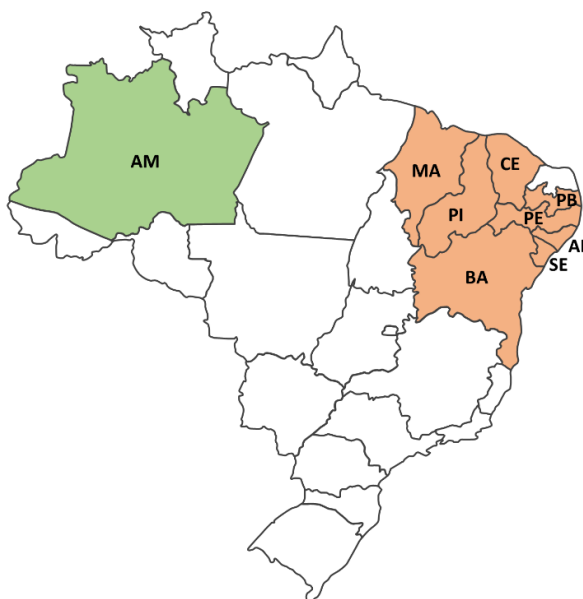
Dentre as espécies notavelmente adaptadas às condições ambientais do semiárido nordestino destacam-se duas leguminosas, sendo uma arbórea, a *Cenostigma pyramidale* e uma arbustiva, a *Stylosanthes scabra*. Tendo em vista a tolerância dessas espécies frente à deficiência hídrica e salinidade, essas plantas apresentam-se como excelentes modelos vegetais na busca e análise de genes associados aos referidos estresses.

3.3.1.1 *Cenostigma pyramidade*

Cenostigma pyramidale (Tul.) E. Gagnon & G. P. Lewis (sinônimo *Caesalpinia pyramidalis* Tul., *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz), é uma Leguminosa, pertencente à subfamília Caesalpinioideae (WARWICK; LEWIS, 2009), popularmente conhecida como “catingueira” e, portanto, considerada um dos símbolos desse bioma. Apresenta ampla distribuição no Nordeste brasileiro, abrangendo os estados de Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Sergipe; sendo também encontrada na região Norte, no estado do Amazonas, embora a ocorrência seja rara (Figura 4) (PEREIRA-FILHO et al., 2018).

Ocorre em diversos ambientes, desde várzeas úmidas (com porte arbóreo de até 10 m altura) como em áreas semiáridas (de porte arbustivo, geralmente até 2 m de altura) (MAIA, 2004; CARVALHO, 2014).

Figura 4 – Mapa de distribuição geográfica de *C. pyramidale*.



Fonte: Pereira-Filho et al. (2018).

Morfologicamente, *C. pyramidale* apresenta folhas bipinadas, com folíolos alternos ou opostos (MAIA, 2004) de coloração rosada, quando novas, tonando-se verdes (ARAÚJO et al., 2008). As flores são amarelas e o caule geralmente apresenta uma casca acinzentada, é curto, estreito e lenticelado. O fruto é um legume do tipo deiscente, de coloração castanho claro e composto por 5 a 7 sementes (castanho-

escuro ou verde-escuro) (Figura 5).

Figura 5 – Morfologia de *Cenostigma pyramidale*. **A.** Espécime, **B.** Folhas, **C.** Caule, **D.** Flores, **E.** Vagem e **F.** Sementes.



Fonte: NEMA (2019).

A floração da catingueira ocorre entre a estação seca e chuvosa, com a brotação iniciando nos primeiros indícios de chuva, cujo ciclo se completa, aproximadamente, 30 dias após início do período chuvoso (BRAGA, 1976; MAIA, 2004; QUEIROZ, 2009). É considerada uma das leguminosas mais versáteis do semiárido brasileiro, tendo em vista seu elevado potencial madeireiro, forrageiro e medicinal (ALVIANO et al., 2008; LIMA et al., 2014; LORENZI, 2016; VILELA et al., 2021).

A madeira apresenta grandes quantidades de celulose e lignina, sendo utilizada na geração de carvão, mourões, coque metalúrgico e até álcool combustível, também sendo empregada na produção de corantes e inseticidas (MAIA, 2004; SILVA et al., 2009). O alto teor proteico torna a catingueira uma espécie amplamente utilizada para a alimentação animal, principalmente durante a estação de seca, quando submetidas a processo de fenação, já que normalmente a planta perde suas folhas nesse período (ALVES et al., 2007; DANTAS et al., 2009). A presença de biflavonoides, flavonoides, triterpenos e fenilpropanoides exalta seu uso terapêutico, onde as flores, folhas e cascas (infusões) são indicadas no tratamento de hepatites, anemias, gastrite, cólica, diarreia, azia estomacal, dor, bronquite e asma, entre outras doenças (ALVIANO et al., 2008; VILELA et al., 2021).

A catingueira possui impressionante capacidade de adaptação às condições ambientais adversas, especialmente à altas temperaturas, luminosidade, salinidade e déficit hídrico (DOMBROSKI et al., 2011; MAIA, 2004). Apresenta baixo potencial hídrico na estação seca, mantendo altos valores de condutância estomática, possibilitando transpiração mesmo em horários mais quentes, indicando um eficiente ajustamento osmótico, visto que o sistema radicular não alcança os lençóis freáticos profundos (ARAÚJO et al., 2008; DOMBROSKI et al., 2011).

Com base nas suas propriedades fisiológicas, essa espécie tem sido alvo de vários estudos, incluindo: a biologia reprodutiva (LEITE; MACHADO, 2009), quebra de dormência de sementes (ALVES et al., 2007), influência da precipitação na densidade e na dominância populacional (ANDRADE et al., 2009) e nas relações hídricas durante estação seca (ARAÚJO et al., 2008; DOMBROSKI et al., 2011). Estudos recentes reportaram que em associação de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), a espécie tende a alterar o metabolismo bioquímico sob influência de diferentes tipos de estresse abióticos, tanto sob hidratação (FROSI et al., 2016a) como sob deficiência hídrica (FROSI et al., 2016b), assim como sob efeito de estresse por salinidade (FROSI et al., 2018, 2021; LIMA et al., 2021).

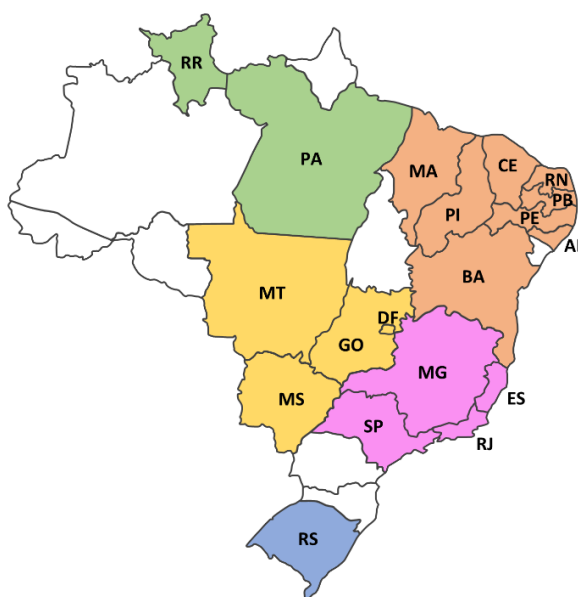
3.3.1.2 *Stylosanthes scabra*

O gênero *Stylosanthes* Sw. (stylo; Papilionoideae) é conhecido por incluir espécies fixadoras de nitrogênio e tolerantes à seca (MARQUES et al., 2018). É um gênero altamente diverso e polimórfico, composto por cerca de 50 espécies tropicais

e subtropicais, distribuídas principalmente neotrópicos (COSTA; SARTORI; POTT, 2008; MARQUES et al., 2018). O Brasil é considerado o centro de diversidade do gênero, com espécies ocorrendo em todos os biomas, compreende 32 espécies sendo 13 endêmicas (SANTOS-GARCIA et al., 2012; STACE; CAMERON, 1984; GISSI, 2020). Cinco espécies deste gênero, *S. scabra*, *S. seabrana*, *S. hamata*, *S. guianensis* e *S. viscosa*, são predominantemente utilizadas como forrageiras de trópicos úmidos a semiáridos (CHANDRA; PATHAK; BHATT, 2006), com capacidade de restaurar a fertilidade e melhorar as propriedades físicas do solo, além de fornecer cobertura vegetal permanente.

Popularmente conhecida no Brasil como trifólio e alfafa-do-nordeste, *Stylosanthes scabra* Vogel destaca-se por apresentar tolerância à seca (NAGAICH et al., 2013) e desenvolvimento sob solos pobres, ácidos, de superfície arenosa, sendo amplamente indicada como forrageira (CALLES; SCHULTZE-KRAFT, 2016; RESENDE et al., 2006). Apresenta ampla distribuição, ocorrendo em diferentes regiões brasileiras, incluindo o Norte (Pará e Roraima), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí e Rio Grande do Norte), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) e Sul (Rio Grande do Sul) (Figura 6) (MELO et al., 2018).

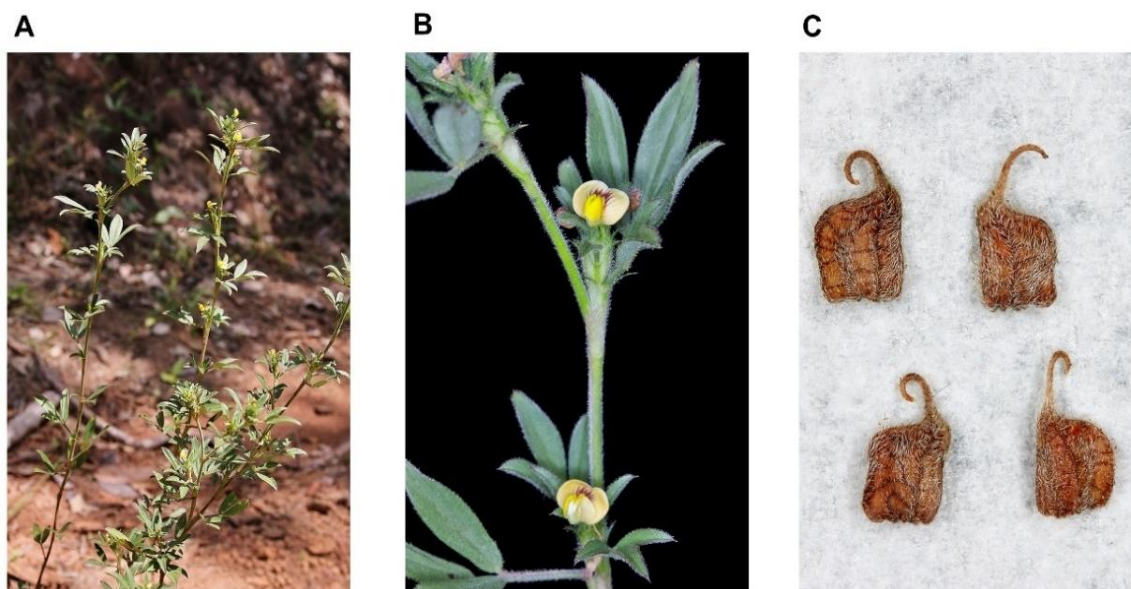
Figura 6 – Mapa de distribuição geográfica de *S. scabra*.



Fonte: Melo et al. (2018).

S. scabra é um subarbusto de hábito ereto, cujo porte pode variar de 20 a 150 cm de altura. Os ramos geralmente são escabrosos e viscosos, com folhas trifolioladas, cujos folíolos apresentam em média de 8 a 21 mm de comprimento e 2 a 7 mm de largura. De raiz principal aprumada e lenhosa e caule lenhoso, apresenta inflorescência semelhante à espiga, com flores de coloração amarela (Figura 7).

Figura 7 – Morfologia de *Stylosanthes scabra* Vogel. **A.** Espécime, **B.** Folhas e Flores e **C.** Sementes.



Fonte: Mercadante (2017).

Os frutos desta espécie são do tipo lomento (Figura 7C), apresentando sementes elipsoides assimetricamente reniformes, com extremidade proeminente (amareladas ou enegrecidas) (MELO et al., 2018) e de reprodução por autofecundação (STACE; CAMERON, 1984). O florescimento e frutificação dessa espécie ocorrem simultaneamente entre os meses de abril a junho e de agosto a fevereiro, com germinação e crescimento lentos (FORTUNA-PEREZ; SILVA; TOZZI, 2011).

S. scabra apresenta grande potencial de propagação natural, ocorrendo espontaneamente à margem de estradas, capoeiras e áreas alteradas da Caatinga, em mata de cipó e campos rupestres, principalmente em matas pouco densas e solos arenosos (MELO et al., 2018). Além disso, foi coletada em área de restinga aberta, em dunas, às margens de lagoas ou em bordas de florestas estacionais decíduais (SÃO-MATEUS et al., 2013). Os ramos finos e as folhas são muito utilizados como forragem na Austrália e em outros países com climas tropicais, sendo considerado

uma das leguminosas forrageiras mais utilizadas economicamente (HALL, GLATZLE, 2004). Nos últimos anos essa espécie tem sido predominantemente utilizada em centros de pesquisa agrícola no Brasil, Austrália e países do sul da Ásia, com vistas no melhoramento para utilização como pastagem e adubo verde, especialmente em regiões de baixa precipitação (CHANDRA, 2013; MARQUES et al., 2018).

Contudo, plantas naturalmente adaptadas a ambientes extremos, a exemplo da catingueira e da estilosantes representam uma riqueza vegetal ainda não explorada, principalmente em estudos envolvendo a prospecção de genes importantes na determinação da tolerância aos principais fatores de estresse como seca e salinidade. Para caracterização de genes associados a tolerância em plantas como estas, assim como em outras espécies, a transcriptômica aliada a bioinformática torna-se indispensável. Por meio dessa associação é possível identificar genes, analisar os níveis de expressão gênica em diversos tratamentos e inferir função a partir da modulação desses genes.

3.4 A TRANSCRITÔMICA E BIOINFORMÁTICA COMO FERRAMENTAS NA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

Estudos de transcriptômica permitem a avaliação do conjunto completo de transcritos, analisando os padrões de expressão gênica em células e tecidos, em situações de análise específicas (comparando controle e estressado). Neste sentido, análises de transcriptomas são fundamentais para a identificação de elementos funcionais do genoma, na determinação de padrões de modificações pós-traducionais e inferência sobre seu papel nos processos biológicos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Entre as abordagens utilizadas na transcriptômica, o sequenciamento de RNA através de tecnologias de alto desempenho (RNA-Seq) destaca-se como uma das ferramentas mais promissoras. Nessa abordagem, cada molécula é sequenciada , gerando sequências curtas de uma extremidade (*single-end*) ou em ambas as extremidades (*paired-end*) , podendo ser obtidas por diferentes tipos de montagens, como a montagem baseada em referência (utilizando um genoma de referência), a montagem *de novo* (que encontra sobreposições entre as leituras) ou uma combinação de ambas as montagens (KUKURBA; MONTGOMERY, 2015).

A tecnologia de RNA-Seq possui alta acurácia na quantificação da expressão,

precisa de menores quantidades de RNA, permite a prever localização de éxons, íntrons e sítios de *splicing* alternativo, além de identificar as extremidades 5' e 3' dos genes e detectar genes níveis baixos de expressão (MARGUERAT; WILHELM; BÄHLER, 2008; WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Devido a isso, essa abordagem vem sendo utilizada em estudos de expressão gênica em muitas culturas importantes, como o arroz (XIA et al., 2017), cana-de-açúcar (PEREIRA-SANTANA et al., 2017), feijão (O'ROURKE et al., 2014), milho (LIU et al., 2015), uva (SHANGGUAN et al., 2017) e soja (ZENG et al., 2019).

Adicionalmente, tão importante quanto a geração e identificação de um transcriptoma, e de seus respectivos genes, é a quantificação da expressão diferencial, ou seja, atribuir a cada gene um perfil transcricional frente a um fator de estresse, assim como conhecer quais genes participam desde a transdução de sinais até a modulação da sua expressão.

Desta forma, as metodologias de sequenciamento juntamente com as ferramentas da bioinformática têm gerado um grande número de dados biológicos, assim como têm permitido a identificação de genes diferencialmente expressos, inclusive de transcritos raros (MANZONI et al., 2018; MOCHIDA; SHINOZAKI, 2010). Essas informações têm sido fundamentais para a compreensão dos mecanismos de sinalização transcricional, traducional e pós-traducional regulados em plantas frente a diferentes tipos estresses. Tais informações são de extrema importância no desenvolvimento de estratégias visando o aumento da tolerância/resistência das plantas (MOCHIDA; SHINOZAKI, 2010).

Ao longo dos anos, os dados gerados pela transcriptômica e outras ômicas têm aumentado exponencialmente, tornando-se inviável lidar com esses dados manualmente (SANTOS-SILVA et al., 2020). Assim, as sequências de múltiplas origens têm sido depositadas em bancos de dados, constituindo servidores privados e/ ou repositórios públicos (MANZONI et al., 2018; SANTOS-SILVA et al., 2020). Tal como o UniProt - *Universal Protein Resource* (<https://www.uniprot.org/>), exemplo de bancos de dados biológicos e considerado um recurso abrangente para sequência de proteínas e dados de anotação funcional.

Os bancos de dados também são importantes quando se busca a identificação de genes em transcriptomas. Dentre os métodos mais utilizados para este fim destacam-se: BLAST, HMM e REGEX. O primeiro método consiste no alinhamento de sequências-sondas (*seed-sequences*) do gene alvo em banco de dados públicos

contra o banco de dados da espécie estudada (transcriptoma, genoma, etc. (ALTSCHUL et al., 1990). No segundo método é utilizada a ferramenta HMMER, buscando padrões no domínio conservado, por meio do algoritmo de Hidden Markov Modelo (HMM) (PORTO; PIRES; FRANCO, 2017). O terceiro método é utilizado para análise de expressão regular (REGEX) (THOMPSON, 1968), com padrões de peptídeos desenvolvidos previamente.

Uma vez selecionadas as sequências candidatas, as características podem ser avaliadas, por exemplo, investigados os domínios e motivos conservados, ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MW), localização subcelular e a construção e análise do modelo tridimensional para conferir à proteína uma função biológica específica, além disso, é possível observar a expressão gênica e compreender a função molecular das sequências candidatas frente as condições experimentais analisadas. Um fluxograma dessas etapas é apresentado na Figura 8 (SANTOS-SILVA et al., 2020).

Figura 8 – Fluxograma das principais etapas de identificação, caracterização e análise de expressão de TLPs.



Os dados de expressão diferencial (obtidos através do RNA-Seq e devidamente processados por meio de ferramentas de análise *in silico*) necessitam ser validados. Diante da variedade de métodos atualmente disponíveis para este fim, a PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) tem sido amplamente utilizado na quantificação

da expressão de amostras biológicas, sob influência de diferentes condições experimentais (AGARWAL et al., 2013; SINICROPI et al. 2007; VANHAUWAERT et al., 2014). A alta sensibilidade, especificidade, exatidão e precisão da técnica, bem como sua simplicidade e velocidade de processamento prático, tornam a RT-qPCR o método mais indicado a ser utilizado para validação de dados de expressão (BUSTIN, 2002; WONG; MEDRANO, 2005).

Em conjunto, as metodologias descritas são fundamentais para o conhecimento de quais genes são expressos em resposta a determinado tipo de estresse, assim como quantificar sua expressão. A partir dessas informações é possível traçar o perfil de expressão de um conjunto de genes intimamente associados ao estresse em questão, constituindo uma fonte valiosa a ser disponibilizada para programas de melhoramento vegetal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO 1

Caracterização e análise de expressão de *Thaumatin-Like Proteins* de *Cenostigma pyramidale* sob estresse salino

Maria Cidinaria Silva Alves¹, Carolline de Jesús-Pires¹, Flávia Czekalski Araújo¹; Gabriella Frosi², Carlos André dos Santos-Silva¹, Marx Oliveira de Lima², Ana Maria Benko-Iseppon¹, Valesca Pandolfi^{1*}

¹ Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

² Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada.

*Autor correspondente: telefone: +55 81 21267816; e-mail: valesca.pandolfi@ufpe.br.

Resumo: Estresses abióticos são um desafio constante para as plantas. Para enfrentá-los, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa. As proteínas semelhantes à taumatinas (TLPs) são fundamentais contra diversos estresses bióticos e abióticos, e desempenham o papel de sinalizadores de atividades transdução e antimicrobianas. A catingueira (*Cenostigma pyramidale*) é uma planta amplamente encontrada no bioma Caatinga, conhecida por ser altamente tolerante a restrição hídrica e salinidade. O presente estudo teve como objetivo identificar e caracterizar as TLPs no transcriptoma da *C. pyramidale* sob estresse salino. Foi possível identificar 36 CpTLPs que apresentaram os domínios característicos da família das TLPs, um peptídeo sinal na região N-terminal, massa molecular entre 20,6 e 24,5 kDa e ponto isoelétrico de 4,11 a 9,64. O alinhamento múltiplo revelou a conservação de 16 cisteínas, um motivo de assinatura e um motivo "REDDD", todos característicos das TLPs. A modelagem tridimensional das seis sequências analisadas revelou a presença de três domínios típicos das TLPs e na dinâmica molecular a maioria dessas sequências demonstraram estabilidade durante a simulação. A análise de expressão diferencial (via RT-qPCR) foi realizada nos tempos 30 min, 2 h e 11 dias após imposição de estresse salino, nos tecidos foliar e radicular. Foi possível observar a superexpressão de quatro TLPs (CpTLP2, CpTLP5, CpTLP20 e CpTLP31), bem como

verificar expressão diferencial distinta entre os tecidos avaliados, indicando que os genes CpTLPs analisados estão associados à tolerância da catingueira à salinidade.

Introdução

As plantas enfrentam uma variedade de estresses ambientais ao longo de seu ciclo de vida. Esses estresses são caracterizados em bióticos, causados especialmente por patógenos, tais como bactérias, fungos, nematoides e vírus, e abióticos, causados por temperatura, deficiência hídrica, salinidade, etc. (GULL, LONE, WANI, 2019; SHARMA et al., 2020). A seca e a salinidade destacam-se entre os principais fatores de estresse abióticos que afetam as áreas agrícolas no mundo (CRAMER et al., 2011).

Solos salinos são encontrados em todos os continentes, impactando a agricultura, os recursos hídricos e o meio ambiente (ZHAO et al., 2020). O processo de acúmulo de sais decorre de causas naturais e/ou ação antrópica. O clima também tem efeito sobre a salinização, principalmente em regiões áridas e semiáridas, tendo em vista as elevadas taxas de evaporação (OMUTO et al., 2020). O estresse salino afeta a planta inteira, em todos os níveis (morfológico, fisiológico e bioquímico) em todos os estágios de crescimento (desde a germinação até a fase de maturação), resultando na redução da produção de biomassa (NAWAZ et al., 2010).

Apesar dos grandes avanços na pesquisa envolvendo o estresse salino em plantas nas últimas décadas, muitos dos processos básicos (ex. captação, sequestro e transporte de íons associados à salinidade) que contribuem para a tolerância em plantas ainda permanecem parcialmente compreendidos (ISAYENKOV; MAATHUIS, 2019).

Uma das estratégias usadas pelas plantas em resposta a fatores de estresse envolve a síntese de proteínas PR (*Pathogenesis-related protein*), as quais foram classificadas em 17 famílias (PR-1 à PR-17) (ALI et al., 2018; SELS et al., 2008). As TLPs (*Thaumatin-like proteins*) pertencem à família PR-5, cuja nomenclatura se deve à alta similaridade com uma proteína de sabor doce - uma taumatina, isolada de *Thaumatococcus daniellii* (planta nativa do oeste africano) (CHRISTENSEN et al., 2002; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006; WEL; LOEVE, 1972).

A maioria das TLPs apresenta a sequência consenso G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-[GQ]-X(2,3)-C (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; ZHAO;

SU, 2010), além de um motivo composto por cinco resíduos de aminoácidos conservados, sendo uma arginina (R), um ácido glutâmico (E) e três resíduos de ácido aspártico (D), (motivo REDDD), formando um domínio definido de fenda ácida (*cleft acidic*), responsável pela atividade antifúngica (ZHAO; SU 2010). A massa molecular dessa varia de 18 - 26 kDa, com uma média de 207 aminoácidos, sendo 16 resíduos de cisteínas ligadas por pontes de dissulfeto, tornando-as estáveis sob várias condições de estresse, como calor e pH (BREITENEDER, 2004; GHOSH; CHAKRABARTI, 2008; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; RETHINASAMY; DATTA; MUTHUKRISHNAN, 1999).

Tendo em vista seu envolvimento na defesa vegetal, conferindo maior resistência à fitopatógenos e tolerância à fatores abióticos, as TLPs têm sido caracterizadas e testadas em várias espécies de plantas. Exemplos incluem *Arabidopsis thaliana* (SHATTERS et al., 2006), *Arachis diogeni* (SINGH et al., 2013), *Cucumis melo* (L.) (LIU et al., 2020), *Citrullus lanatus* (Thunb.) (ZHANG et al., 2018), *Glycine max* (L.) (HAYASHI et al., 2014), *Hordeum vulgare* (IQBAL et al., 2020), *Oryza sativa* (L.) (SHATTERS et al., 2006) e *Vitis vinifera* (L.) (YAN et al., 2017). Essas proteínas são expressas durante o crescimento e desenvolvimento vegetal (NAWROT et al., 2021), com também são induzidas em resposta a fatores de estresse bióticos e abióticos (MUOKI et al., 2021, RAJAM et al., 2007; TACHI et al., 2009; FAILLACE et al. 2021). Experimentos conduzidos com plantas transgênicas expressando TLPs revelaram maior tolerância à deficiência hídrica (WEBER et al., 2009; PARKHI, et al. 2009) e à salinidade (SINGH et al., 2013; KUMAR et al., 2016). A indução de genes que codificam proteínas PR em plantas em resposta a uma ampla variedade de estresses reforça sua importância como excelentes candidatos na obtenção de plantas tolerantes a múltiplos estresses (ALI et al., 2018).

A exploração da diversidade, juntamente com uma maior compreensão dos mecanismos de tolerância a salinidade a nível molecular são evidentes. Neste sentido, espécies adaptadas a ambientes hostis, com pouca disponibilidade hídrica e solos salinos representam uma riqueza genética essencial para este propósito. Tendo em vista as múltiplas funções desempenhadas pelas TLPs, entre diferentes espécies de plantas e estresses, a caracterização e expressão dessas proteínas em plantas tolerantes ao estresse salino são fundamentais.

Cenostigma pyramidale (Tul.) L.P. Queiroz, é uma planta lenhosa, da família das leguminosas, endêmica da Caatinga e uma das espécies mais representativas

desse bioma. Utilizada, principalmente, para fins medicinais e forrageiros (ALVIANO et al., 2008; DANTAS et al., 2009; LORENZI, 2016; VILELA et al., 2021), estudos recentes revelaram que em associação com fungos micorrízicos arbusculares (FMAs), a catingueira apresentou respostas bioquímicas que indicaram tolerância em condições de seca (FROSI et al., 2016) e salinidade (FROSI et al., 2017; LIMA et al., 2021). No estudo de LIMA et al. (2021), os autores observaram que no tecido foliar, a catingueira apresentou capacidade de remobilizar o conteúdo de Na^+ rapidamente e recuperou a concentração de K^+ horas após o início da imposição do estresse salino. Além disso, Froisi et al. (2017) relataram que esta espécie mantém o equilíbrio iônico sob estresse salino, indicando a tolerância da catingueira a salinidade.

O presente estudo teve como objetivo identificar TLPs no transcriptoma radicular de *C. pyramidale* sob estresse salino, caracterizando a estrutura gênica, a localização subcelular, os motivos conservados, a estrutura tridimensional e análise fenética. O perfil de expressão de TLPs dessa espécie também foi avaliado em diferentes tecidos, sob condição de estresse salino.

Material e Métodos

Material Vegetal e imposição do estresse

O experimento foi realizado em Casa de Vegetação na Universidade Federal de Pernambuco, localizada em Recife, Brasil. As sementes de *C. pyramidale* foram gentilmente fornecidas pelo Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental (NEMA) - UNIVASF / Petrolina-PE, Brasil. Sementes de *C. pyramidale* foram desinfestadas em hipoclorito de sódio 1% e germinadas em bandejas contendo areia lavada esterilizada. Após 20 dias, as plantas foram transplantadas para potes com capacidade de 300 mL e mantidas em casa de vegetação com umidade relativa de 40%–60%, temperatura média de 34 ± 2 °C e luz natural. Após seis meses de cultivo, as plantas foram submetidas ao estresse salino, através da irrigação com 300 mL de solução salina (NaCl 100 mM). Plantas controle permaneceram com irrigação com água. As plantas (controle e estressadas) foram coletadas após 30 minutos, 2 horas e 11 dias (máximo de estresse). Foram coletadas três réplicas biológicas por tempo de estresse. As amostras foram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente armazenadas a -80 °C.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído do tecido radicular e foliar de *C. pyramidale*, utilizando os protocolos CTAB (CHANG; PURYEAR; CAIRNEY, 1993) e através do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega), respectivamente. Após o tratamento com DNase (DNA-free™ Kit DNase Treatment & Removal (Invitrogen-Ambion)), as amostras de RNA foram avaliadas em eletroforese em gel de agarose a 1,5% e quantificadas em Fluorímetro (Qubit®-Life Technologies). Alíquotas de 1 µL de RNA (em todos os tratamentos e controle, incluindo 3 réplicas biológicas) foram convertidas em cDNA, através do kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega), seguindo as instruções do fabricante.

Identificação das sequências CpTLPs no transcriptoma de *C. pyramidale*

As sequências de TLPs de *C. pyramidale* (CpTLPs) foram obtidas do banco de transcriptoma (RNA-Seq) da referida espécie (FROSI et al., 2021b). A identificação das CpTLPs foi realizada utilizando três métodos (SANTOS-SILVA et al., 2020). O primeiro método consistiu no alinhamento de sequências-sondas (*seed-sequences*) de TLPs disponíveis no banco de dados público UniProt (<https://www.uniprot.org/>) contra o banco de dados de RNA-Seq da catingueira por meio da ferramenta BLAST. No segundo método foi utilizada a ferramenta HMMER (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011), buscando padrões no domínio conservado, por meio do algoritmo de *Hidden Markov Modelo* (HMM). O terceiro método foi realizado usando expressão regular (RegEx), com os padrões de peptídeos desenvolvido por nosso grupo de pesquisa.

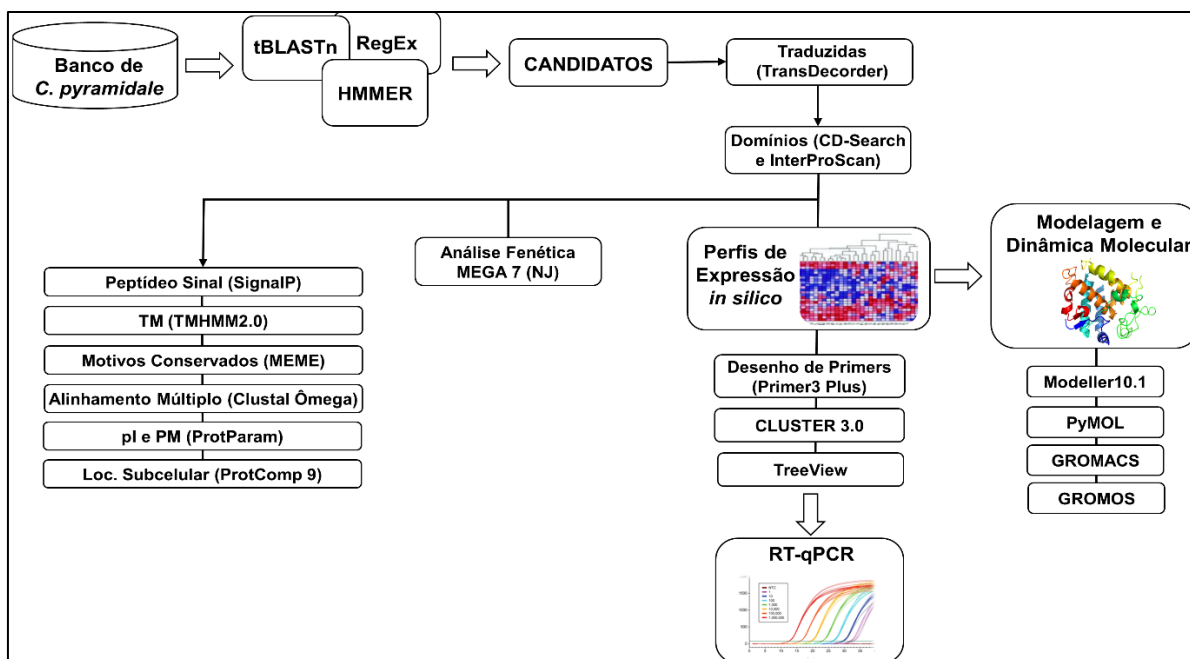
As sequências candidatas (CpTLPs) foram traduzidas por meio da ferramenta Transdecoder (<http://transdecoder.sf.net.>) e os domínios conservados foram identificados por meio do Batch CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) e InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>). A presença de peptídeo sinal e domínios transmembrana (TM) foram previstos pelas ferramentas SignalP 5.0 (PETERSEN et al., 2011) e TMHMM 2.0 (KROGH et al., 2001), respectivamente.

Caracterização e análise fenética

As CpTLPs com domínio completo foram analisadas quanto ao tamanho, ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MW) e hidrofobicidade, através da grande média de hidropaticidade - GRAVY (*grand average of hydropathy*) preditos no ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>). A localização subcelular foi predita com o auxílio do programa *ProtComp 9.0* (Softberry Inc., Mount Kisco, NY, USA).

Utilizando a ferramenta *Clustal Omega* (SIEVERS; HIGGINS, 2014) foi realizado um alinhamento múltiplo com uma sequência de taumatina de *Thaumatococcus daniellii* (Benth.) para identificação de padrões conservados. Os motivos conservados foram preditos por meio da ferramenta *MEME 5.0.3* (<http://meme-suite.org/tools/meme>), conforme os parâmetros sugeridos por LIU et al. (2020) e visualizados no *software* TBtools (CHEN et al., 2020). A classificação das subfamílias das CpTLPs foi realizada comparando-as com TLPs de outras espécies, por similaridade. A árvore fenética foi construída pelo método de *Neighbor-Joining* e *bootstrap* de 1000 repetições, com auxílio do programa *MEGA v.7* (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e visualizados por meio da ferramenta iTol (LETUNIC; BORK, 2016). A estrutura secundária foi obtida a partir do pacote JNet Secondary Structure Prediction (COLE; BARBER; BARTON, 2008).

Figura 1 - Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na caracterização estrutural e anotação funcional das CpTLPs.



Análise de expressão *in silico*

Os dados do transcriptoma de *C. pyramidale* do tecido radicular foram baixados do banco de dados NCBI *Transcriptome Shotgun Assembly* (TSA) em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GIYP000000000> para analisar os níveis de expressão dos genes CpTLPs (FROSI et al., 2021b). A construção do perfil de expressão *in silico* foi baseada na análise dos valores de *Fold Change* (FC) dos transcritos (tratamento versus controle), a partir do programa EdgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010). Transcritos com $-1 > FC > 1$, *p-value* e *FDR* $\leq 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos e submetidos ao *software* CLUSTER 3.0 (READ et al., 2001), para a análise de agrupamentos através do método *Hierarchical Clustering Analysis* (EISEN et al., 1998), cujos resultados foram apresentados em um painel de expressão, gerado pelo programa TreeView (SALDANHA, 2004) e dispostos em *heatmap*.

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

Para cada transcrito diferencialmente expresso *in silico* foram desenhados *primers*, através do programa Primer3 Plus (UNTERGASSER et al., 2007) e Primer-

BLAST (YE et al., 2012), com os seguintes parâmetros: conteúdo de GC 50%, tamanho do *amplicon* entre 80 e 150 pb, temperatura de *melting* entre 40 °C e 60 °C e desenhados na junção éxon-éxon.

As reações de qPCR foram realizadas em equipamento LineGene 9660 FQD-96A (Bioer), utilizando o sistema de detecção SYBR Green. As reações foram preparadas em triplicatas biológicas e técnicas. O volume das reações foi ajustado para 10 µL, contendo 5 µL do Go-Taq qPCR Master Mix 2x (Promega), 1 µL de cDNA (1/10), 0,3 µL de cada primer (5 µM), 0,1 µL de *Carboxy-X-Rhodamine* (CXR) e 3,3 µL de H₂O. As condições de ciclagem foram 95 °C por 2min, seguido por 40 ciclos à 95 °C por 15s, 60 °C por 60s. A curva de *melting* foi gerada com a temperatura de amplificação variando de 65 – 95 °C.

As eficiências de amplificações foram determinadas a partir das curvas padrão geradas por diluições seriadas de cDNA (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000) em triplicatas técnicas e calculadas por meio da equação $E=10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$ (RASMUSSEN, 2001). A expressão relativa foi avaliada pelo programa REST (*Relative Expression Software Tool*, v.2.0.13; PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Para normalização, os genes ARP3, SAC1 e HAG2 foram usados como referência para o tecido radicular, sendo que para o tecido foliar foram utilizados os genes ARP3, MYB4 e ATKRS-1 como referência (Tabela S1) (FROSI et al., 2021a). As análises de RT-qPCR seguiram as recomendações sugeridas pelo MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009).

Modelagem comparativa

Para fins de modelagem tridimensional (3D), foram selecionados como *templates* modelos tridimensionais experimentalmente validados no *Protein Data Bank* (PDB-<https://www.rcsb.org/>) mediante usando a ferramenta BLASTp objetivando encontrar o modelo que melhor se adequasse (maior identidade de sequência e cobertura) na construção dos modelos teóricos correspondentes de cada sequência de TLP selecionada. Usando o *software* Modeller (v.10.1) (WEBB; SALI, 2014), 1.000 modelos teóricos foram gerados para cada sequência de TLP. Os modelos que melhor solucionaram o mínimo energético pela união consenso das soluções que melhor satisfazem as restrições especiais da modelagem pela métrica energética DOPE-Score (*Discrete Optimized Protein Energy*) (SHEN; SALI, 2006) que acessa a energia

do modelo e indica a estrutura provável.

Neste sentido, a validação dos modelos teóricos seguiu considerando caracterização estereoquímica e do dobramento dos modelos teóricos. Foi utilizado, portanto, o servidor DOE-MBI/SAVES6.0 mediante o PROCHECK para averiguar regiões críticas e choques estereoquímicos dos modelos (LASKOWSKI et al. 1993). Em seguida, o servidor PROSA-Web: *Protein Structure Analyses* foi utilizado para avaliar o dobramento dos modelos mediante a métrica Z-score (WIEDERSTEIN, SIPPL 2007; SIPPL 1993). A ferramenta QmeanDisCo foi utilizada para acessar a estimativa da qualidade global dos modelos teóricos (STUDER et al. 2020).

A caracterização físico-química das interações biomoleculares solvente-soluto foi feita utilizando o servidor APBS-PDB2PQR *software suite* (<http://server.poissonboltzmann.org>). Para o preparo da simulação dos modelos foi utilizado o algoritmo PDB2PQR os parâmetros de pKa foram calculados usando o algoritmo PROPKA para a assinatura dos estados de protonação para o pH 7 e o campo de forças utilizado foi Charmm (BROOKS et al., 2009). A estimativa da energia de solvatação foi calculada pela equação de Poisson-Boltzmann que simplifica o modelo à energias de solvatação polares. Características estruturais dos modelos de TLPs com base em locais conservados foram acessadas comparando modelos 3D usando o *software* PyMOL (*The PyMOL Molecular Graphics System*, Versão 2.0 Schrödinger, LLC).

Simulação em dinâmica molecular (DM) e Análise de componente principal (PCA)

As simulações foram realizadas com o pacote GROMACS 2019.4. As TLPs modeladas na etapa anterior foram posicionadas no centro de uma caixa cúbica e solvatada, usando o modelo de água SPC (*Simple Point*) (BERENDSEN et al., 1981) com cargas pontuais assimiladas em concentração fisiológica pela adição de íons NaCl (0.15 M), com o sistema tendo sua energia minimizada após a adição dos íons sob o campo de forças do tipo “*all atoms*” GROMOS 53a6 (OOSTENBRINK et al., 2004) otimizados para energia usando 50.000 passos e todas as simulações atomísticas foram realizadas para 100 ns, em pressão (1 atm) e temperatura (300K) para uma simulação em condições isotérmica-isobárica. O método LINCS (HESS et al., 2008) foi usado para restringir ligações envolvendo átomos de hidrogênio. A integração foi realizada pelo algoritmo *leapfrog* (HOCKNEY, 1970) com tempo de

integração de 2-fs.

Para estabelecer as principais mudanças conformacionais dos sistemas durante a simulação em dinâmica molecular, foi realizada uma PCA das trajetórias da DM utilizando o pacote GROMACS (anaeig). A técnica foi realizada para átomos de carbono α durante o período de 100 ns. As coordenadas cartesianas de tais átomos foram usadas para gerar a matriz de covariância e os dois primeiros componentes foram usados para gerar o resultado gráfico.

Resultados

Identificação e caracterização de CpTLPs candidatas

Após a análise de redundância, 36 transcritos de TLPs foram obtidos no transcriptoma de *C. pyramidale* (Tabela 1). Desses, 8 sequências apresentaram o domínio GH64-TLP-SF (que inclui hidrolases glicosídicas), 16 possuíam o domínio Thaumatin (relacionadas à atividade antifúngica) e 12 apresentaram o domínio TLP-PA (similar ao domínio taumatina e presente em proteínas antifúngicas/alergênicas).

Todas as 36 CpTLPs apresentaram peptídeo sinal N-terminal, sendo a maioria das CpTLPs (86%) localizadas na região extracelular, enquanto 5 (CpTLP 13-16 e CpTLP26) mostraram localização vacuolar. Os resultados de predição dos domínios transmembrana (TM) mostraram que 18 das 36 CpTLPs não possuíam domínios TM, enquanto 12 possuem um domínio TM e 6 possuíam dois domínios TM. As proteínas maduras (sem o peptídeo sinal) apresentaram entre 201 a 238 aminoácidos (aa), com tamanho médio de 219 aa, massa molecular entre 20,6 kDa (CpTLP36) a 24,5 kDa (CpTLP25) e ponto isoelétrico (pI) variando de 4,11 (CpTLP35) a 9,64 (CpTLP3) (Tabela 1).

Tabela 1 – Tamanho da proteína (aa), massa molecular (MW), ponto isoelétrico (pI), índice de hidropaticidade média (GRAVY), domínios transmembranas (TM) e localização subcelular das CpTLPs.

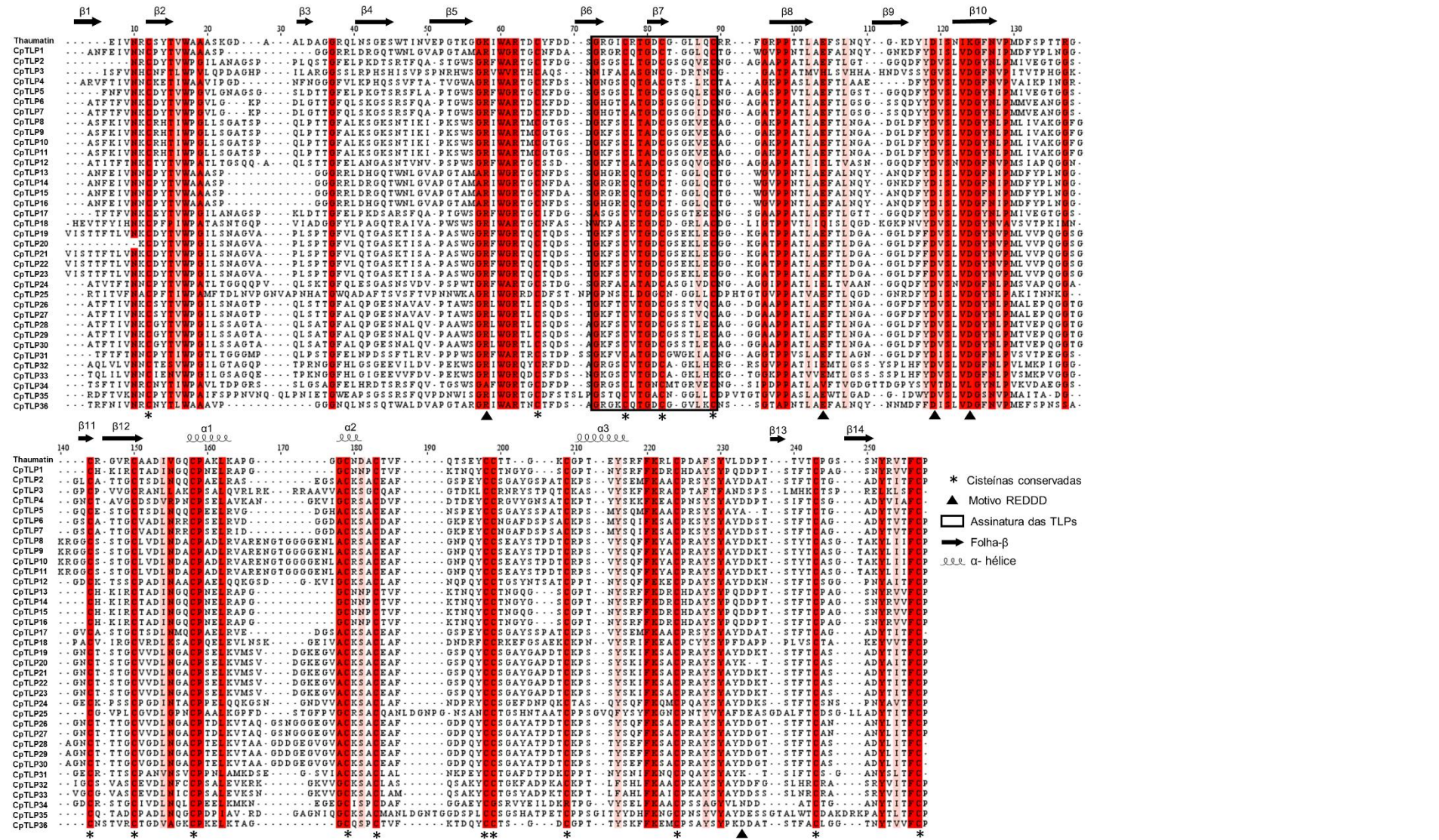
Gene	Transcript-ID	Caraterística das Proteínas					Localização Subcelular
		Nº de aa	MW (kDa)	pI	TM	GRAVY	
CpTLP1	TR102219 c1_g2_i3	202	22,81	9,06	0	-0,041	Extracelular
CpTLP2	TR139251 c0_g1_i1	210	21,64	4,24	0	-0,194	Extracelular
CpTLP3	TR176183 c0_g1_i1	218	23,53	9,64	0	-0,169	Extracelular
CpTLP4	TR176633 c0_g1_i1	212	21,87	7,49	1	-0,043	Extracelular

Gene	Transcript-ID	Caraterística das Proteínas					Localização Subcelular
		Nº de aa	MW (kDa)	pI	TM	GRAVY	
CpTLP5	TR177565 c0_g2_i3	212	22,07	4,49	0	-0,219	Extracelular
CpTLP6	TR177599 c0_g1_i1	214	21,04	5,05	2	-0,272	Extracelular
CpTLP7	TR177599 c0_g1_i2	214	21,07	5,05	2	-0,254	Extracelular
CpTLP8	TR178646 c1_g2_i1	230	23,20	8,56	1	-0,148	Extracelular
CpTLP9	TR178646 c1_g2_i2	230	23,20	8,56	0	-0,148	Extracelular
CpTLP10	TR178646 c1_g2_i4	230	23,11	8,56	0	-0,141	Extracelular
CpTLP11	TR178646 c1_g2_i5	230	23,20	8,56	2	-0,148	Extracelular
CpTLP12	TR22640 c0_g1_i1	221	22,48	4,62	1	-0,261	Extracelular
CpTLP13	TR23739 c0_g1_i1	202	21,32	7,02	0	-0,444	Vacúolo
CpTLP14	TR23739 c0_g1_i2	202	21,27	8,17	0	-0,44	Vacúolo
CpTLP15	TR23739 c0_g1_i3	202	21,25	7,94	0	-0,438	Vacúolo
CpTLP16	TR23739 c0_g1_i4	202	21,26	7,02	0	-0,427	Vacúolo
CpTLP17	TR254272 c0_g1_i1	215	22,36	4,22	1	-0,127	Extracelular
CpTLP18	TR254557 c1_g1_i1	223	23,76	8,11	0	-0,041	Extracelular
CpTLP19	TR256045 c0_g2_i1	226	21,96	5,10	2	-0,021	Extracelular
CpTLP20	TR256045 c0_g2_i3	214	21,93	5,10	2	-0,01	Extracelular
CpTLP21	TR256045 c0_g2_i4	226	21,96	5,10	1	-0,021	Extracelular
CpTLP22	TR256045 c0_g2_i7	226	21,96	5,10	1	-0,021	Extracelular
CpTLP23	TR256045 c0_g2_i8	226	21,96	5,10	2	-0,021	Extracelular
CpTLP24	TR288718 c0_g1_i1	224	22,83	4,54	1	-0,277	Extracelular
CpTLP25	TR301707 c0_g1_i1	238	24,57	4,44	0	-0,151	Extracelular
CpTLP26	TR320277 c0_g1_i1	226	22,13	4,38	1	-0,059	Extracelular
CpTLP27	TR320277 c0_g1_i2	226	22,13	4,38	1	-0,059	Extracelular
CpTLP28	TR320277 c0_g2_i1	226	22,25	4,31	0	0,091	Extracelular
CpTLP29	TR320277 c0_g2_i2	226	22,25	4,31	0	0,091	Extracelular
CpTLP30	TR320277 c0_g2_i3	226	22,25	4,31	0	0,091	Extracelular
CpTLP31	TR58119 c0_g1_i1	218	23,00	5,06	0	-0,153	Extracelular
CpTLP32	TR62217 c0_g1_i2	220	22,35	8,97	1	0,008	Extracelular
CpTLP33	TR93325 c0_g1_i1	220	22,61	8,28	1	0,053	Extracelular
CpTLP34	TR95948 c0_g1_i1	217	22,42	4,60	1	-0,133	Extracelular
CpTLP35	TR96328 c0_g1_i1	237	24,04	4,11	0	-0,271	Extracelular
CpTLP36	TR97443 c0_g1_i1	201	20,67	7,89	0	-0,209	Vacúolo

Alinhamento múltiplo e motivos conservados das CpTLPs

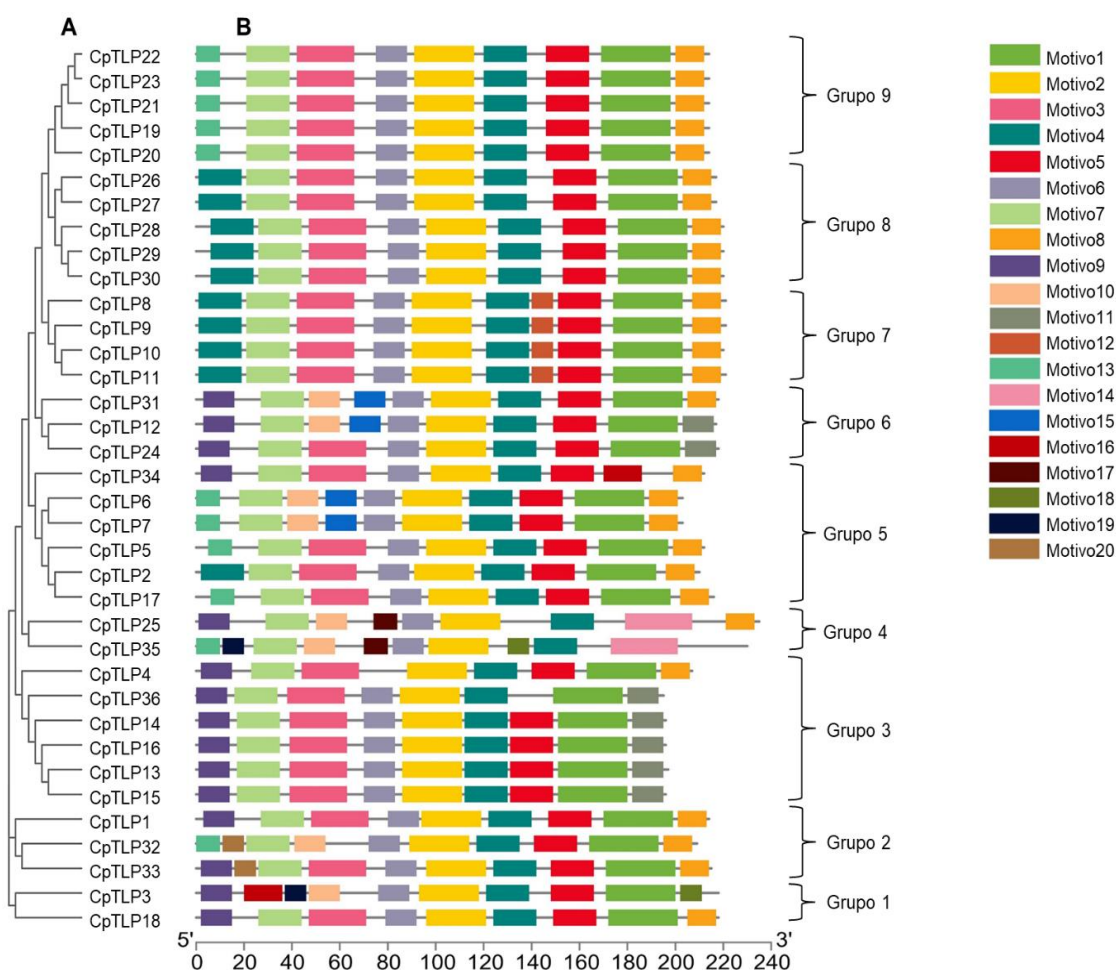
O resultado do alinhamento revelou que todas as CpTLPs apresentaram os 16 resíduos de cisteínas (C) conservados (Figura 2). Além disso, o motivo REDDD [Arginina (R), ácido glutâmico(E), e três resíduos de ácido aspártico(D)] também foi encontrado conservado na maioria das CpTLPs. A CpTLP3 também não apresentou o motivo REDDD conservado, a região é constituída por arginina, histidina, glicina e

dois ácidos aspárticos. A CpTLP34 apresentou variação da posição dos resíduos, enquanto a CpTLP5, CpTLP20 e CpTLP31 também não apresentaram o motivo REDDD conservado, em substituição, na CpTLP5 a região do quinto aminoácido (D) possui uma Alanina (A) e nas CpTLP20 e CpTLP31 a região possui uma lisina (K). Na CpTLP18, a região do ácido glutâmico (E) foi substituída por Glutamina (Q). No alinhamento também foi identificado o motivo de assinatura típico da família das TLPs. A predição da estrutura secundária das CpTLPs indicou que as sequências apresentam de onze a quatorze folhas- β , além de duas até três α -hélices (Figura 2).



Em geral, as regiões conservadas das proteínas indicam a base de suas funções. Para analisar as características funcionais e a diversidade estrutural, os grupos e motivos padrões entre as CpTLPs foram investigados (Figura 3). Essa análise revelou um total de nove grupos (Figura 3A) representados por 20 motivos (Figura 3B), oito dos quais altamente conservados. Mais de 80% (31 dos 36) das CpTLPs apresentaram os motivos 1, 2, 4, 5, 6 e 7, sendo que 28 delas também apresentaram os motivos 3 e 8. Alguns grupos exibiram motivos únicos, a exemplo dos grupos 2 e 4 (com os motivos 20 e 19, respectivamente), ao passo que alguns motivos foram mais representativos em determinados grupos, como o motivo 12 no grupo sete. Embora exista diferença dos motivos entre os grupos, os integrantes do mesmo grupo tendem a demonstrar padrões de motivos semelhantes, como CpTLP6 e CpTLP7, CpTLP10 e CpTLP11, CpTLP20 e CpTLP23, indicando que as funções entre eles podem ser semelhantes.

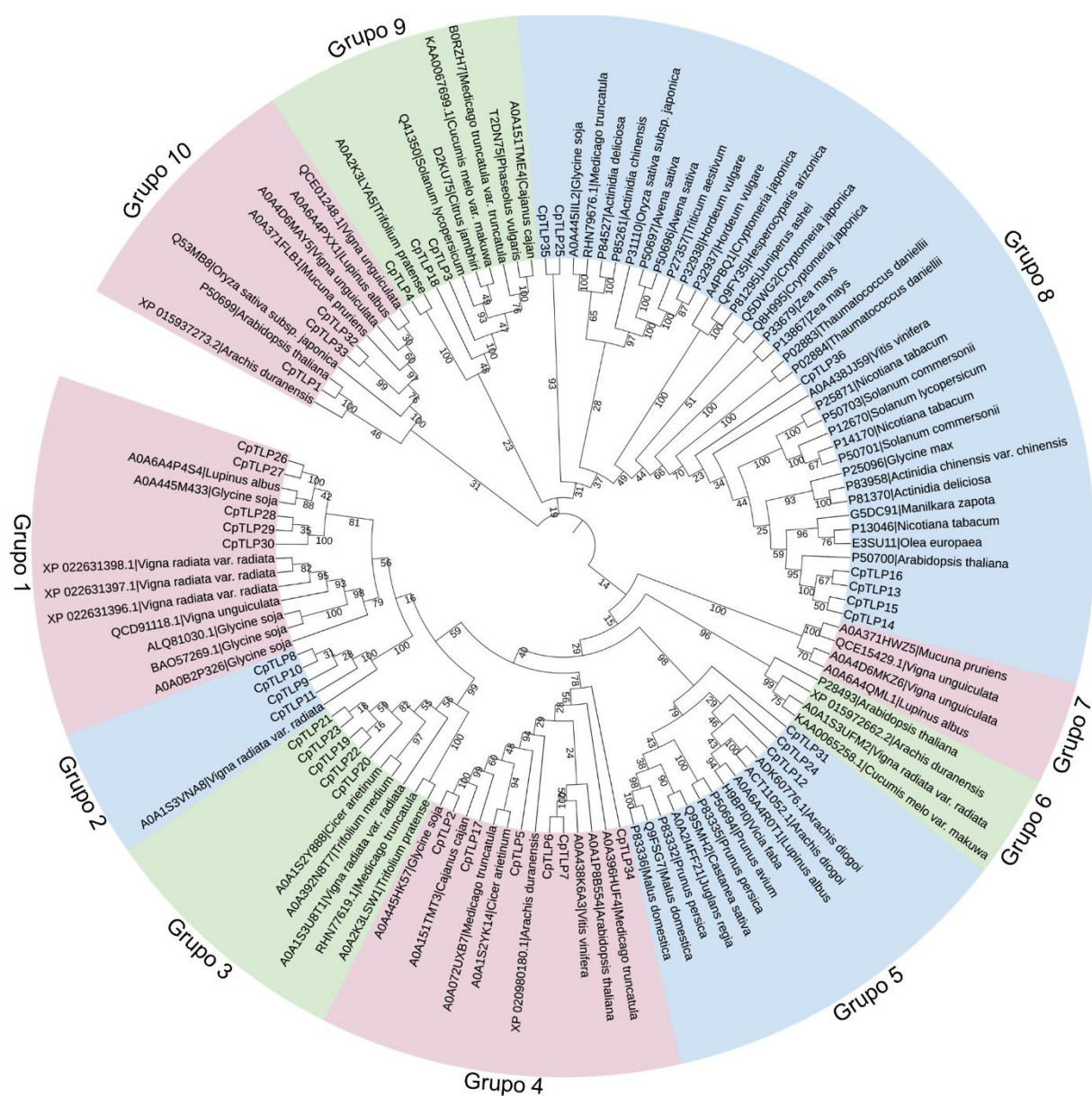
Figura 3– Formação de grupos baseada na distribuição dos motivos conservados entre as 36 CpTLPs. **A.** Árvore fenética das CpTLPs formada pelo método NJ. **B.** Padrões de motivo conservados das TLPs de *C. pyramidale*. Os 20 motivos estão dispostos por cores.



Análise fenética das CpTLPs

As CpTLPs foram comparadas com TLPs previamente descritas para outras espécies disponíveis nos bancos de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>), gerando uma árvore fenética, a partir do método de *Neighbor-Joining* (NJ) (Figura 4). Com este propósito, 88 TLPs de 40 diferentes táxons e 16 famílias de plantas foram obtidos.

Figura 4 – Fenograma gerado por meio do método NJ de TLPs de *C. pyramidale* comparativamente com TLPs dos bancos de dados NCBI e UniProt. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso, seguido da espécie vegetal.



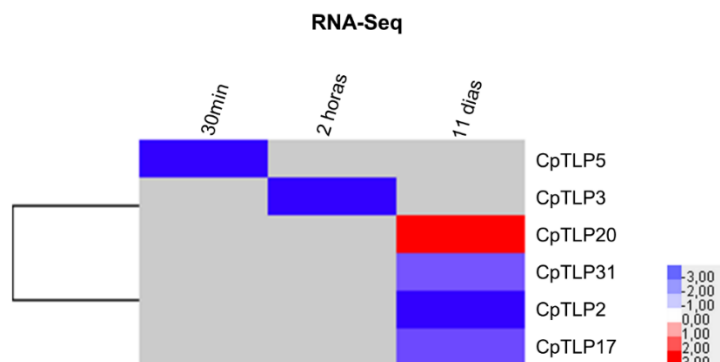
O Fenograma foi dividido em 10 grupos (Figura 4). Com exceção dos grupos seis e sete, os grupos foram compostos de CpTLPs e de TLPs de outras espécies de plantas, apontando a semelhança entre essas proteínas (Figura 4). A distribuição das CpTLPs foi relativamente desigual na maioria dos grupos, com exceção dos grupos e 5, 9 e 10 que agruparam 3 CpTLPs. O grupo 5 foi constituído por sequências de Leguminosae, Rosaceae, Juglandaceae e Fagaceae, o grupo 9 de Leguminosae, Cucurbitaceae, Rutaceae e Solanaceae e grupo 10 foi composto por sequências de Brassicaceae, Leguminosae e Poaceae. Os grupos 6 e 7 são os menores grupos, não apresentaram CpTLPs e cada grupo foi constituído por 4 membros de TLPs de outras espécies.

Espécies das famílias Brassicaceae, Leguminosae e Cucurbitaceae estavam presentes no grupo 6, enquanto o grupo 7 foi composto apenas por sequências da família Leguminosae. O Grupo 8 continha sequências das famílias Actinidiaceae, Brassicaceae, Poaceae, Cupressaceae, Leguminosae, Sapotaceae, Solanaceae, Oleaceae e Marantaceae, tornando-se o maior e mais diverso grupo, composto por 39 membros. O grupo 4 continha de Leguminosae, Vitaceae e Brassicaceae. Os grupos 1, 2 e 3 foram compostos apenas por membros da família Leguminosae.

Análise de expressão gênica

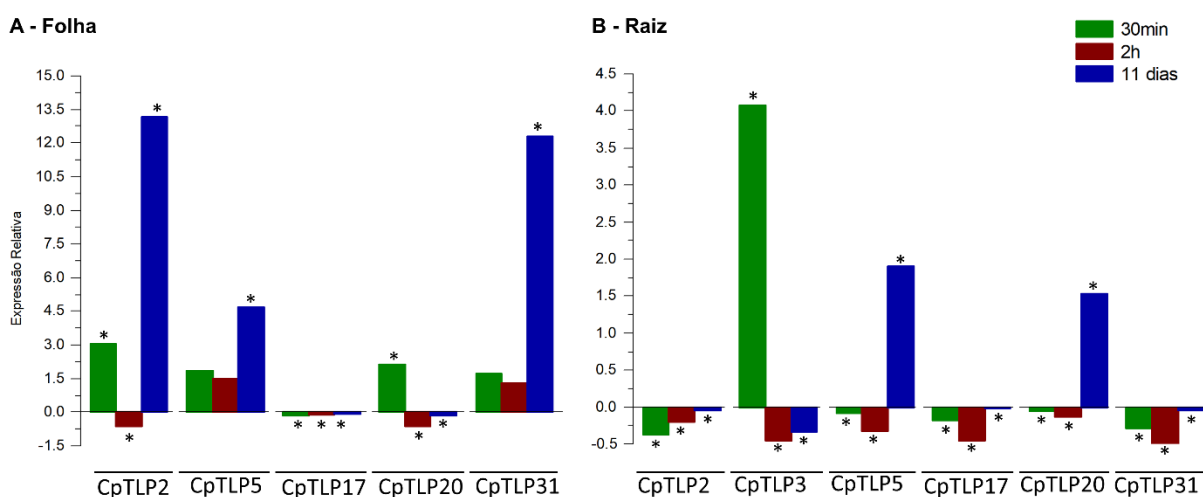
Inicialmente, as 36 TLPs identificadas no transcriptoma (RNA-Seq) de *C. pyramidale* foram avaliadas *in silico* quanto ao seu perfil de expressão. Essa análise revelou seis TLPs (CpTLP2, CpTLP3, CpTLP5, CpTLP17, CpTLP20 e CpTLP31) com diferença de expressão em diferentes tempos (30 min, 2 h e 11 dias) após imposição do estresse salino. O tempo de 11 dias após imposição do estresse foi o que apresentou mais CpTLPs diferencialmente expressas, sendo três: (CpTLP2, CpTLP17 e CpTLP31) reprimidas e uma (CpTLP20) superexpressa. Já, nos tempos iniciais, duas CpTLPs foram reprimidas, uma após 30 min (CpTLP5) e a outra após 2 h (CpTLP3) (Figura 5).

Figura 5 – Análise *in silico* do perfil de expressão das TLPs no transcriptoma (RNA-Seq) da raiz de *C. pyramidale* gerado após imposição do estresse salino (NaCl 100 mM). A escala de cores representa o nível de expressão relativa das CpTLPs superexpressas (vermelho), reprimidas (azul) e sem expressão diferencial (cinza).



As seis CpTLPs diferencialmente expressas na análise *in silico* foram, então, avaliadas quanto sua expressão relativa, via RT-qPCR, em dois tecidos de *C. pyramidale*, raiz e folha, nos mesmos tempos de imposição de estresse (NaCl 100mM). Os dados de expressão são mostrados na Figura 6.

Figura 6 – Expressão gênica de TLPs em *C. pyramidale* em resposta ao estresse salino. As barras representam a expressão relativa das seis CpTLPs no tecido foliar (A) e radicular (B) após 30 minutos (verde) 2 horas (vermelho) e 11 dias (azul) de estresse salino. **up-regulated* e *down-regulated* ($p < 0,05$).



Os dados de expressão dos transcritos codificadores de CpTLP2, CpTLP3, CpTLP5, CpTLP17, CpTLP20 e CpTLP31, no tecido radicular corroboram com os resultados de expressão *in silico* realizados no transcriptoma de *C. pyramidale* (RNA-Seq), onde a maioria das TLPs foram reprimidas (Figura 6B). Entretanto, na análise

de expressão relativa, além da CpTLP20 (única induzida no RNA-Seq) outras duas (CpTLP3 e CpTLP5) apresentaram indução significativa aos 30 min e aos 11 dias de estresse, respetivamente. Após superexpressão aos 30 min, CpTLP3 foi reprimida nos dois tempos seguintes (2 h e 11 dias).

No tecido foliar, quatro das seis CpTLPs foram induzidas em pelo menos dois (inicial e tardio, 30 min e 11 dias, respetivamente) dos três tempos analisados, sendo duas (CpTLP2 e CpTLP20) induzidas no tempo de 30 min e quatro (CpTLP2, CpTLP5, CpTLP20 e CpTLP31) induzidas no tempo de 11 dias (Figura 6A). Embora as CpTLP5 e CpTLP31 apresentaram regulação constitutiva nos tempos iniciais (30 min e 2 horas), após 11 dias apresentaram superexpressão de (4 vezes e 12 vezes, respetivamente). A modulação da expressão da CpTLP2 em folha apresentou indução (30 min), repressão (2h) e superexpressão aos 11 dias (13,18 vezes).

A CpTLP17 mostrou repressão tanto em raiz como na folha de *C. pyramidale*, em todos os tempos avaliados. Também se observa que no tempo de 2 h de imposição do estresse salino, todas as CpTLPs no tecido radicular foram reprimidas, ao passo que na folha foram reprimidas ou sem expressão diferencial.

Esses resultados não apenas demonstraram haver diferenças significativas na resposta transcricional da família TLP em diferentes tecidos da planta, mas também indicam que alguns genes TLPs estão associados à tolerância da catingueira à salinidade.

Modelagem comparativa das CpTLPs

Foram selecionados para as modelagens *templates* com cobertura total. Para CpTLP3 e CpTLP5 o melhor modelo selecionado foi uma estrutura de TLP de um alergénico da maçã (*Malus domestica*) (PDB:3ZS3), as quais compartilharam 38.79% e 53.30% de identidade, respetivamente. Já para CpTLP2, CpTLP17, CpTLP20 e CpTLP31 o melhor modelo selecionado foi um alergénico de *Prunus avium* (PDB:2AHN), compartilhando 56,67%, 55,3 5%, 54,25% e 63,59% de identidade, respetivamente.

Após análise estereoquímica das sequências dos resíduos de aminoácidos, observou-se que mais de 90% dos resíduos de aminoácidos estavam em posições mais favoráveis para todos os modelos (Tabela 2). Acerca da qualidade do dobramento dos modelos, foram observados valores de Z-Score aproximados aos de

modelos de mesmo tamanho solucionados experimentalmente com valores estimados entre -7.73 e -6.94. A estimativa de função energética global pelo algoritmo QmeanDisCo apresentou scores revelou energia global entre 0,70 e 0,85 apresentando picos energéticos em regiões de *loop*.

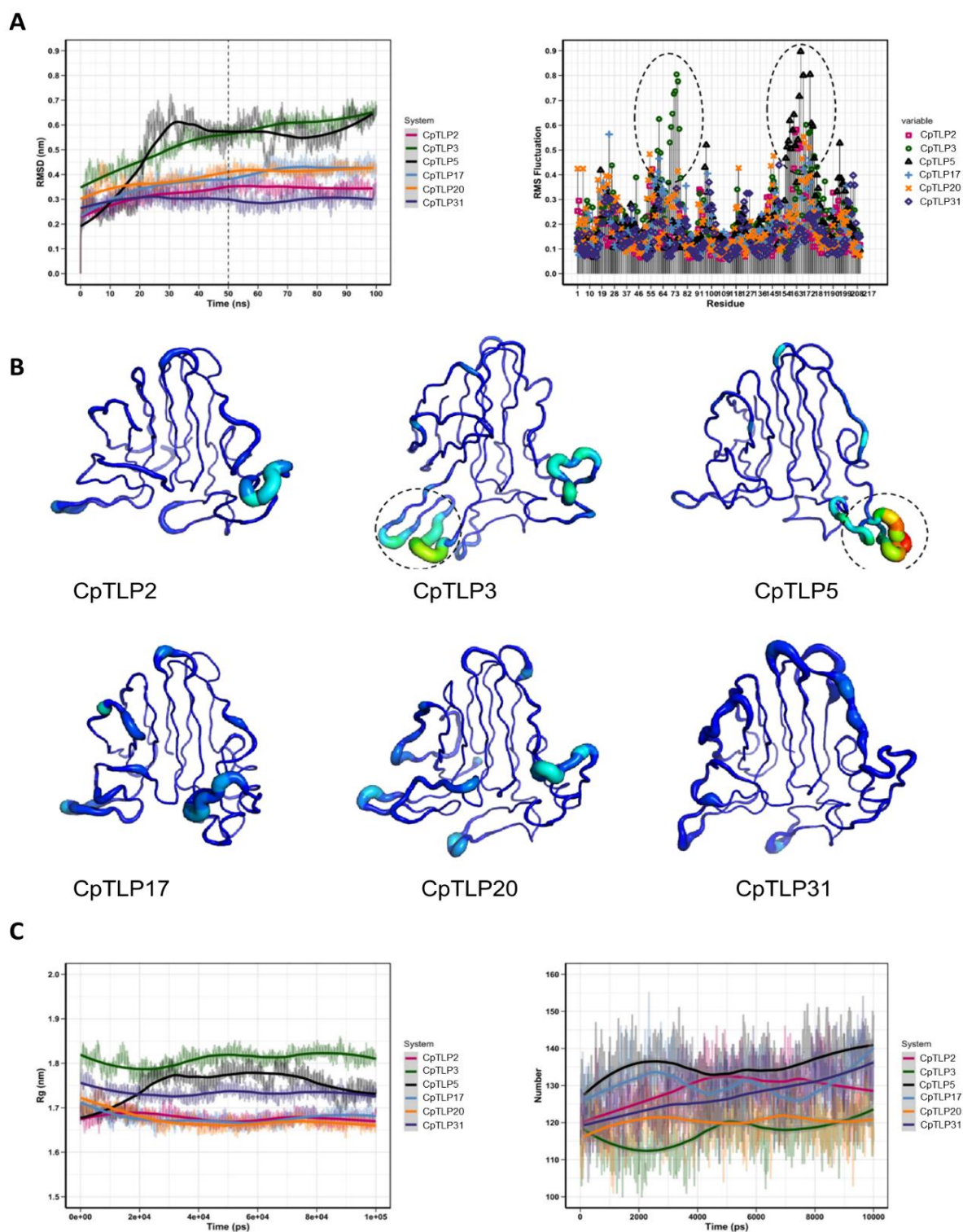
Tabela 2 – Resultados dos algoritmos para modelagem e validação dos modelos teóricos das CpTLPs.

TLP	Template	Coverage	Identity	Method	Ramachandran	QMEAN DisCo	Z-score
CpTLP2	2ahn	Total	56.67%	X-ray, 1.3A	92%	0.78 ± 0.06	-7.73
CpTLP3	3zs3	Total	38.79%	X-ray, 1.8A	90.60%	0.70 ± 0.06	-6.24
CpTLP5	3zs3	Total	53.3%	X-ray, 1.8A	91.90%	0.78 ± 0.06	-7.39
CpTLP17	2ahn	Total	55.35%	X-ray, 1.3A	91.70%	0.82 ± 0.06	-7.05
CpTLP20	2ahn	Total	54.25%	X-ray, 1.3A	90.90%	0.78 ± 0.06	-7.63
CpTLP31	2ahn	Total	63.59%	X-ray, 1.3A	92.70%	0.85 ± 0.06	-6.94

Dinâmica Molecular (DM)

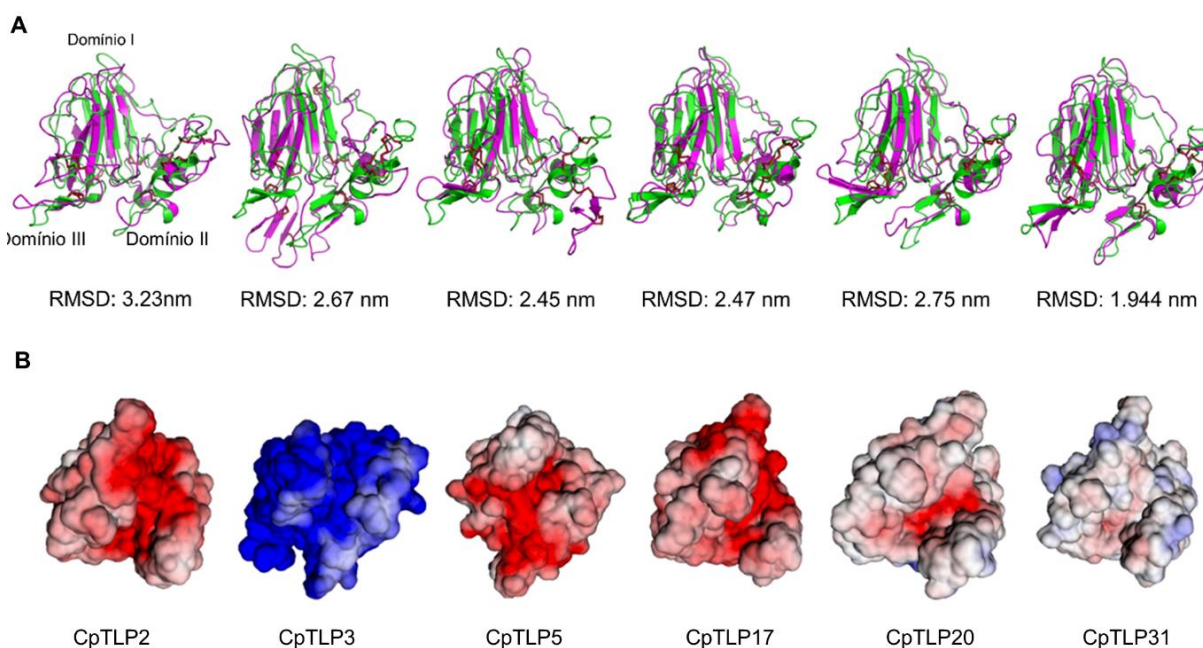
Após a dinâmica foi realizada uma análise para observar as possíveis modificações que os modelos teóricos sofreram durante a simulação em DM, os gráficos de desvio quadrático médio (RMSD), flutuação quadrática média (RMSF), raio de giração e número de ligações de hidrogênio foram avaliados (Figura 7). Ao observar o RMSD, os modelos teóricos CpTLP3 e CpTLP5 foram os que mais sofreram modificações conformacionais ao longo da simulação (Figura 7A, lado esquerdo). Por outro lado, os outros modelos se apresentaram estáveis com variações durante a maior parte da simulação em DM. Na análise de flutuação dos resíduos de aminoácidos foi observado que CpTLP3 e CpTLP5 apresentaram maiores picos de flutuação atômica, mostrando maior flexibilidade nessas regiões de *loop*, que geralmente apresentam maior grau de flexibilidade para flutuação. Essa movimentação atômica é refletida no gráfico de calor *b-factor* (Figura 7A lado direito e 7B). Em contraste, as estruturas CpTLP2 e CpTLP31 se mostraram mais rígidas em comparação com os outros modelos. O raio de giro (Figura 7C lado esquerdo) indica uma tendência a compactação para a maioria dos modelos, com exceção para CpTLP3 e CpTLP5 que se apresentam com variações de dispersão no eixo de massa ao longo da simulação em DM. As ligações de hidrogênio variaram bastante para cada modelo teórico, com os modelos CpTLP5 e CpTLP17 com tendência exponencial ao fim da DM (Figura 7C lado direito).

Figura 7 – Simulações de dinâmica molecular dos modelos teóricos tridimensionais CpTLP2 (magenta), CpTLP3 (verde), CpTLP5 (preto), CpTLP17 (azul claro), CpTLP20 (laranja) e CpTLP31 (roxo). **A.** RMSD (lado esquerdo) mostrando o desvio dos modelos teóricos após a dinâmica e o RMSF (lado direito) dos modelos representados pela flutuação dos resíduos de aminoácidos em relação ao tempo de 100 ns. **B.** Representação das CpTLPs correspondentes ao *b-factor* ou espalhamento dos átomos dos modelos relacionados (quanto mais próximo do vermelho, maior a mobilidade dinâmica dos átomos, e quanto mais próximo do azul, menos mobilidade dinâmica dos átomos); **C.** Raio de giro (lado esquerdo) mostrando a compactação/dispersão dos modelos e o gráfico da ligação de hidrogênio (lado direito).



Apesar de alguns modelos teóricos tenham sido derivados do mesmo *template*, eles apresentam suas próprias características de compactação e flutuação, com forte influência nas mudanças estruturais (Figura 8A). Com a caracterização do mapa de potencial eletrostático (Figura 8B), foi possível observar que a CpTLP3 foi o único modelo que apresentou carga superficial majoritariamente com caráter físico-químico básico (azul), em comparação aos demais modelos, que apresentaram resíduos de aminoácidos ácidos (vermelho) densamente expostos na superfície da fenda eletronegativa do domínio REDDD ou ainda, outros aminoácidos caracterizados neutros (branco).

Figura 8 – Modelos tridimensionais das TLPs de *Cenostigma pyramidale*. **A** Estrutura antes (verde) e depois (magenta) da simulação em dinâmica molecular com a respectiva distância (em nanômetro) entre os modelos e a posição dos domínios representados por I, II e III. **B** O potencial eletrostático de superfície (gerado com APBS) para os modelos tridimensionais teóricos de CpTLPs, a cor vermelha é referente a carga negativa dos resíduos de aminoácidos, a cor azul a carga é referente a carga positiva dos resíduos de aminoácidos.

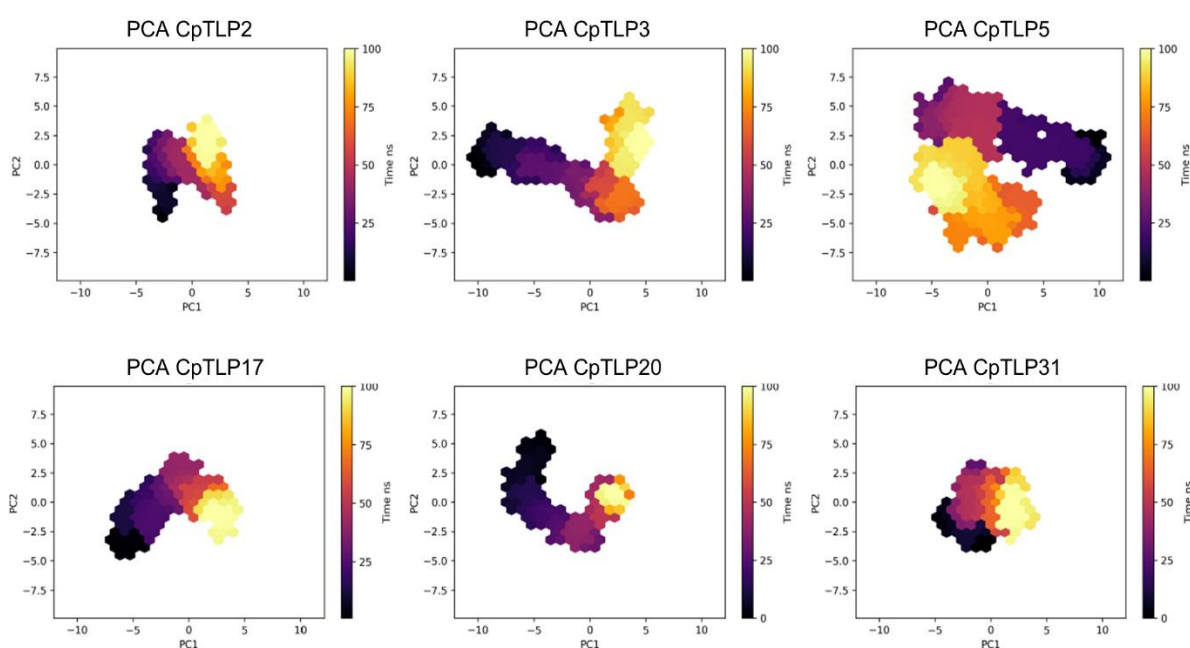


Análise do componente principal (PCA)

Em relação à PCA das trajetórias da simulação em DM (técnica utilizada para descrever a dinâmica conformacional das CpTLPs por meio dos movimentos atômicos da estrutura convertidos em movimentos principais), a Figura 9 apresenta os agrupamentos de conformações ao longo dos planos PC1 e PC2. Foi possível

observar que a estrutura CpTLP3 e CpTLP5 na região de 0 e 50ns apresentaram ampla área de dispersão junto aos componentes, apresentando considerável variação conformacional e flexibilidade em comparação com os outros modelos teóricos. Por outro lado, os movimentos entre 75 e 100ns mostraram valores menos dispersos, convergindo para um *cluster* mais conservado com menos variação, mas variando em comprimento nos componentes principais para todos os modelos.

Figura 9 – Agrupamento de componente principal (2D) de vários instantes da trajetória de simulação (0 a 100 ns) com base nas respectivas coordenadas cartesianas.



Discussão

Identificação, análise estrutural e propriedades físico-químicas das CpTLPs

Entre as espécies da catinga, a *C. pyramidale* destaca-se pelo valor medicinal e uso forrageiro (ALVES et al., 2007; DANTAS et al., 2009; VILELA et al., 2021). Um dos mecanismos de defesa vegetal é a expressão de genes que codificam TLPs, as quais desempenham papel crucial na transdução de sinais e ação antimicrobiana (RAJAM et al., 2007; CAO et al., 2016; AN et al., 2019).

Nesse estudo nós identificamos 36 TLPs de *C. pyramidale*, obtidas no transcriptoma (RNA-Seq) do tecido radicular após 30 min, 2 h e 11 dias de imposição ao estresse salino (NaCl, 100 mM). Esse é o primeiro estudo reportando TLPs desta

espécie, uma das mais representativas do bioma caatinga, com notável tolerância a deficiência hídrica e à salinidade. O número de TLPs identificado é similar ao obtido para outras espécies vegetais, sendo inferior em melão, *C. melo* L. (LIU et al., 2020) e *Arabidopsis* (SHATTERS et al., 2006) (ambos com 28 TLPs); em nabo, *Brassica rapa* L. (29 TLPs) (WANG et al., 2020); uva, *V. L.* (33) (YAN et al., 2017); e em cevada, *Brachypodium* e sorgo (19, 28 e 35 TLPs, respectivamente) (IQBAL et al., 2020). Números superiores de TLPs foram relatados em *O. sativa* (IQBAL et al., 2020), *Populus trichocarpa* (ZHAO; SU, 2010) e *Vigna unguiculata* (JESÚS-PIRES et al., 2020), com 37, 55 e 56 TLPs, respectivamente. Considerando os papéis significativos associados à defesa vegetal é coerente que o número de TLPs varie amplamente entre os vários níveis taxonômicos (JESÚS-PIRES et al., 2020), além disso sugere que expansão dos genes TLPs variou substancialmente entre as diferentes famílias das plantas (SU et al., 2021).

Análises estruturais revelaram que as CpTLPs codificam para um polipeptídeo de 219 aminoácidos (média), com pI variando de 4,11 a 9,64 e massa molecular de 20,6 a 24,5 kDa, confirmando com as descrições na literatura, como sendo proteínas de baixa massa molecular (~18 a 26 kDa) e pI ácidos ou básicos (BREITENEDER, 2004; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; WANG et al., 2010).

As CpTLPs identificadas apresentaram três domínios conservados: TLP-PA, Thaumatin e a superfamília GH64-TLP-SF, com alta similaridade com a taumatina, conforme reportado em *Populus szechuanica* sob infecção do fungo *Melampsora laricis-populina* (CHEN et al., 2016). A maioria as CpTLPs apresentaram as características típicas das TLPs de plantas: os resíduos de cisteína (Cys) altamente conservados, assinatura típica da família da taumatina, o motivo REDDD, bem com o peptídeo de sinal na região N-terminal. Esses são requisitos estruturais dessa família de proteínas, tal como as pontes dissulfeto formadas pelas Cys e que conferem estabilidade sob condições extremas de temperatura e pH para as TLPs (FIERENS et al., 2009).

As CpTLPs apresentaram aminoácidos altamente conservados e correspondentes ao motivo de assinatura G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-[GQ]-X(2,3)-C, este está presente em toda a família de proteínas PR-5 (JESÚS-PIRES et al., 2020), o que reforça a identidade das CpTLPs. A CpTLP34 apresentou variações nas regiões dos aminoácidos do motivo REDDD, enquanto algumas CpTLPs (CpTLP5, 18, 20, 31) apresentaram modificações no quinto aminoácido desse motivo,

ao passo que o CpTLP3 apresentou modificações no segundo (E) e terceiro (D). Essas substituições, assim como alterações em torno da fenda ácida sugerem a especificidade de função dessas TLPs, uma vez que causam diferenças na topologia e no potencial eletrostático de superfície da proteína (FAILLACE et al., 2021; MIN et al., 2004). Mudanças conformacionais são observadas na maioria das plantas e podem explicar a grande variedade de propriedades das TLPs até agora descritas. O motivo REDDD compreende uma fenda ácida conservada, geralmente associada à atividade antifúngica ou atividade β -1,3-glucanase, cuja propriedade é indicada ser universal entre os TLPs de eucariotos (JAMI et al., 2007; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010), sendo fundamental para a estabilidade das moléculas (BATALIA et al., 1996) e na manutenção da estrutura topológica e potencial eletrostática da proteína (MISRA et al., 2016). Tais motivos também foram relatados em TLPs de outras espécies, incluindo *A. thaliana* e *O. sativa* (KAUR et al., 2020), *C. melo* L. (LIU et al., 2020) e *V. vinifera* L. (YAN et al., 2017).

Neste estudo, todas as CpTLPs apresentaram um peptídeo sinal na região N-terminal, e 18 das 36 TLPs apresentaram um ou dois domínios TM, corroborando com os resultados de Li et al. (2020b) em espécies de algodão e Liu et al. (2020), no melão. Estes são responsáveis pelo direcionamento das TLPs às vias secretoras para atingirem sua função como proteínas de defesa a nível extracelular (LIU et al., 2020; SINGH et al., 2013; WANG et al., 2011). De fato, a maioria das CpTLPs também foram preditas na região extracelular, enquanto cerca de 14% foram preditas no vacúolo. SAMAC et al. (2011) que avaliaram a expressão de TLPs em raízes de *Medicago truncatula* sob inoculação de *Phytophthora medicaginis*, observaram as das TLPs estavam direcionadas para a região extracelular e no vacúolo. Na fase inicial sob desequilíbrio osmótico severo, algumas TLPs podem ser rapidamente liberadas na região extracelular para atuar no sistema defensivo e, posteriormente, na fase final do desequilíbrio osmótico, as TLPs tendem a se acumular nos vacúolos, conferindo maior tolerância ao estresse salino. Tal mecanismo ocorre principalmente no tecido foliar, como observado por TACHI et al. (2009) em soja. Essa atuação mais efetiva nas folhas pode ser explicada pelo fato das proteínas PR constituírem de 5%-10% da proteína total da folha, embora TLPs também sejam acumuladas em todos os órgãos da planta (JAMI et al. 2007; LAROSA et al., 1992; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

Análise fenética e motivos conservados

As TLPs apresentam as características de sequência que sugerem os seus membros da família devem ser parafiléticos, originados de 10 ancestrais comuns, antes da diferenciação de monocotiledôneas e dicotiledôneas (KOHLE et al., 2008; LIU; ZAMANI; EKRAMODDOULLAH, 2010; SHATTERS et al., 2006). A fenética revelou que CpTLPs com as TLPs de várias espécies foram divididos em 10 grupos e a distribuição foi relativamente dispersa em cada grupo, corroborando com os resultados obtidos por (LI et al., 2020b; LIU; ZAMANI; EKRAMODDOULLAH, 2010; LIU et al., 2020) em algodão, *Arabidopsis* e melão, respectivamente. O agrupamento de CpTLPs identificados em vários clados corrobora com a natureza parafilética de origem. O número variável de CpTLPs em cada grupo ocorre devido à duplicação diferencial de genes da família TLP (SHARMA et al., 2022), o que sugere que elas podem ter características semelhantes, conforme relatado por Wang et al. (2011), além disso indica que esses genes podem desempenhar uma ampla variedade de papéis sob diferentes condições de estresse e de crescimento (SU et al., 2021).

No presente estudo, foi observado que os grupos 6 e 7 foram compostos apenas de TLPs de outras espécies, sugerindo que as CpTLPs podem compartilhar apenas 8 genes ancestrais comuns com os de outras plantas. Além disso, todos os grupos compostos por TLPs de *C. pyramidale* também estavam presentes TLPs outras leguminosas, indicando a alta similaridade das TLPs dessa família.

Nos grupos formados exclusivamente pelas CpTLPs foi observada a formação de 9 grupos com oito motivos altamente conservados dos 20 motivos preditos. Ademais, as CpTLPs apresentaram algumas especificidades em regiões do REDDD. Conforme Petre et al. (2011), alguns aminoácidos podem sofrer diversificação de seleção, com exceções provavelmente atribuídas a estruturas de proteínas atípicas, no entanto, as TLPs de plantas apresentam o motivo REDDD e resíduos de cisteínas com alta conservação, o que permite a conservação de diversos motivos ao longo da proteína.

Expressão diferencial das CpTLPs

Nas plantas, a regulação da expressão de genes (positiva ou negativa) pode levar a diferentes respostas fisiológicas durante um estresse, seja biótico ou abiótico.

Nos últimos anos há um crescente interesse nas TLPs tendo em vista seu papel na defesa vegetal (LI et al., 2020a), principalmente em resposta a fatores abióticos. Sob estresses de seca ou salinidade, as proteínas PR-5 estabilizam a osmolaridade celular via compartimentalização de solutos espaço intercelular e no vacúolo ou por meio de alterações metabólicas e estruturais, tais como por meio da ativação de vias de sinalização ou por mudanças no Ca^{2+} levando à morte celular programada (CHOWDHURY; BASU; KUNDU, 2017; MANGHWAR; HUSSAIN, 2022). Além disso, as TLPs têm um papel na ativação da via biossintética que desencadeia o acúmulo de prolina envolvida na eliminação de espécies de ROS, possuindo também um papel na cascata de sinalização de defesa, envolvida na iniciação das vias JA/ET e AS. (MANGHWAR; HUSSAIN, 2022).

Para explorar a função dessa importante classe de proteínas, sequências de TLPs diferencialmente expressas no transcriptoma de *C. pyramidale* foram usadas como candidatas na análise de expressão (via RT-qPCR) no tecido radicular e foliar, nos mesmos tratamentos (estresse salino, 30 min, 2 h e 11 dias, incluindo os controles). Outros estudos relataram respostas positivas de expressão de TLPs em plantas sob estresse salino, por exemplo, Li et al. (2020b) observaram que os genes GhTLP35 e GhTLP81 do algodão (*G. hirsutum*) apresentaram um aumento de expressão, essa indução foi relatada por Wang et al. (2011) no estudo da expressão de CkTLP no tecido radicular da *Cynanchum komarovii* (planta adaptada encontrada no deserto) sob estresse salino.

Os resultados da análise de expressão das CpTLPs revelaram perfil de expressão contrastante em relação aos tecidos avaliados. Ou seja, no tecido foliar, a maioria das CpTLPs foi induzida, ao passo que no tecido radicular, a maioria das CpTLPs foi reprimida. A superexpressão de CpTLP2, CpTLP5 e CpTLP31 após 11 dias de irrigação com solução salina, no tecido foliar, reflete a importância das TLPs na tolerância de *C. pyramidale* frente à salinidade. Resultados semelhantes foram relatados por Tachi et al. (2009), que avaliaram a expressão gênica de GmOLP, em condições de estresse salino em soja (*Glycine max*) sob diferentes tempos e diferentes tecidos. Segundo os autores GmOLP foi altamente induzida nas folhas de soja, iniciando a partir das 2 h de estresse, sendo altamente induzida entre 18 e 72 h. Conforme He et al. (2017) e Weng et al. (2014), as TLPs geralmente apresentam um aumento de expressão nos primeiros momentos de estresse, resultando em maior efetividade na defesa vegetal.

No tecido radicular, a CpTLP3 foi superexpressa após 30 min, reprimida nos demais tempos, sugerindo que ela pode ter um papel na sinalização do estresse, atuando no metabolismo primário do estresse (SAMAC et al., 2011). Já a CpTLP2 e CpTLP17 foram reprimidas em todos os tratamentos. A repressão dessas TLPs pode sugerir sua atuação em outras atividades e eventos moleculares diferentes (PIETRE et al., 2011). O mesmo foi observado em melão (LIU et al., 2020) e algodão (LI et al., 2020), cujas TLPs foram associadas ao crescimento e desenvolvimento das plantas, ou ainda, apresentaram indução em resposta a outras condições de estresses (IQBAL et al., 2020; LI et al., 2020; NEALE et al., 1990). Outro exemplo é a PopTLP1 (em *P. trichocarpa*) cuja expressão foi induzida por ozônio, UV-B, seca, cobre e infecção fúngica (PETRE et al., 2011). As CpTLP5 e CpTLP20 foram superexpressas após 11 dias de estresse, indicando a atuação dessas proteínas no processo de tolerância de *C. pyramidale* frente ao estresse salino.

Neste estudo, a maioria das CpTLPs apresentaram perfis de expressão distintos entre os tecidos raiz e folha. Tais essas diferenças podem estar relacionadas à diversidade de funções desempenhadas por essas proteínas, além das diferenças relativas a cada tecido da planta (LIU et al., 2020; MUNIS et al., 2010; MUOKI et al., 2021; SINGH et al., 2013;). Perfis de expressão contrastantes entre diferentes tecidos também foi observado em manjerição, *Ocimum basilicum* (MISRA et al., 2016), no melão (LIU et al., 2020) e em soja (TACHI et al., 2009). Por outro lado, as CpTLP5 e CpTLP17 mostraram padrões de expressão semelhantes nos dois tecidos avaliados, indicando que essas TLPs são importantes recursos para a *C. pyramidale* sob salinidade.

Modelagem e dinâmica molecular

Tal como observado em tomate, *Lycopersicon esculentum* (GHOSH; CHAKRABARTI, 2008), os modelos tridimensionais das CpTLPs apresentaram maior predominância de folhas- β , além dos três domínios característicos das TLPs (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010), os quais correspondem a um β -barril (domínios I), um domínio II (constituído por vários *loops*), e o domínio III (o qual dispõe um pequeno *loop*)(FAILLACE et al., 2021, LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

Neste estudo também propomos modelos estruturais para as CpTLPs. A

validação dos modelos teóricos relevou que a maioria (90%) dos resíduos apresentaram angulações *phi-psi* permitidas, sugerindo a confiabilidade estereoquímica da “espinha dorsal” dos modelos teóricos (ASHOK KUMAR; VENKATESH, 2014). As estimativas de qualidade do dobramento do modelo corroboram a qualidade estereoquímica supracitada e ratificam, portanto, a representatividade dos modelos teóricos.

Foi observado nas análises de dinâmica molecular, tendências individuais de expansão e/ou compactação associadas a monções coletivas possivelmente relacionadas à acomodação de diferentes modelos elucidados pelo mesmo *template*. Ademais, a maioria dos modelos apresentou estrutura tridimensional estável e tendência à compactação, típico das TLPs (KUMAR; MUKHERJEE, 2020). Dois modelos, entretanto, se apresentaram como exceção, sendo eles CpTLP3 e CpTLP5 os quais sofreram modificações conformacionais mais expressivas. Foi observado, ainda, que as regiões de maiores monções coletivas se situam em regiões de *loop*, reconhecidas pela flexibilidade estrutural (KIM; VOS; OGATA, 1988), apesar disso, a arquitetura de sanduíche- β das TLPs permite rigidez e estabilidade durante a dinâmica molecular (KUMAR; MUKHERJEE, 2020; MENU-BOUAOUICHE et al., 2003).

A maioria das CpTLPs apresentou características típicas das TLPs, com exceção da CpTLP3, a qual apresentou carga superficial com predomínio de resíduos de aminoácidos catiônicos, enquanto os demais modelos apresentaram predomínio aniônicos ou neutros. É possível observar na caracterização físico-química da topologia dos modelos que a região da fenda central, entre os domínios I e II, apresenta riqueza em aminoácidos hidrofílicos e ácidos (REDDD), característicos das TLPs, portanto, eletronegativo, tal como caracterizado em *Malus domestica* (KREBITZ et al., 2003), *Musa acuminata* (LEONE et al., 2006) *Nicotiana tabacum* L. (MIN et al., 2004), *Prunus avium* (INSCHLAG et al., 1998) e *Zea mays* (BATALIA et al., 1996). No entanto, devido a substituições nas regiões do motivo REDDD, a CpTLP3 não apresentou esse forte caráter eletronegativo, sugerindo que essa proteína pode ter uma função diferente das demais TLPs analisadas nesse estudo, como atuação no crescimento e desenvolvimentos da planta, uma vez que a especificidade das TLPs é determinada que pelas diferenças em torno desse motivo (FAILLACE et al., 2021; MIN et al., 2004).

Conclusão

Neste estudo foi possível identificar 36 TLPs da *C. pyramidale* que apresentam características estruturais e funcionais semelhantes ao observado em outros organismos para essa família. Na análise de expressão diferencial, a maioria das CpTLPs foram induzidas na folha e reprimidas na raiz nos tempos testados. Em geral, a modulação das CpTLPs analisadas indica que esses genes desempenham um papel na resposta ao estresse salino na espécie estudada. Os genes que codificam TLPs representam candidatos valiosos para o melhoramento de plantas, principalmente visando transformação genética e obtenção de plantas mais tolerantes a fatores de estresse, principalmente à salinidade.

Referências

- ALI, G. S.; HU, X.; REDDY, A. S. N. Overexpression of the *Arabidopsis* thaumatin-like protein 1 in transgenic potato plants enhances resistance against early and late blights. **bioRxiv**, p. 621649, 29 abr. 2019. <https://doi.org/10.1101/621649>.
- ALVES, E. U. et al. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Revista Árvore**, v. 31, p. 405–415, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622007000300006>.
- ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 545–552, jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.001>.
- AN, M. et al. Molecular Characterization of the Thaumatin-like Protein PR-NP24 in Tomato Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 47, p. 13001–13009, 27 nov. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05256>.
- ASHOK KUMAR, H. G.; VENKATESH, Y. P. In silico analyses of structural and allergenicity features of sapodilla (*Manilkara zapota*) acidic thaumatin-like protein in comparison with allergenic plant TLPs. **Molecular Immunology**, v. 57, n. 2, p. 119–128, 1 fev. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.08.010>.
- BATALIA, M. A. et al. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 1, p. 19–22, jan. 1996. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-19>.

BERENDSEN, H. J. C. et al. Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration. In: PULLMAN, B. (Ed.). **Intermolecular Forces: Proceedings of the Fourteenth Jerusalem Symposium on Quantum Chemistry and Biochemistry Held in Jerusalem, Israel, April 13–16, 1981**. The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry. Dordrecht: Springer Netherlands, 1981. p. 331–34. https://doi.org/10.1007/978-94-015-7658-1_21.

BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 479–481, maio 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00421.x>.

BROOKS, B. R. et al. CHARMM: The Biomolecular Simulation Program. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 30 jul. 2009. <https://doi.org/10.1002/jcc.21287>.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

CAO, J. et al. Expansion and evolution of thaumatin-like protein (TLP) gene family in six plants. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 3, p. 299–307, jul. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0134-y>.

CHANG, S.; PURYEAR, J.; CAIRNEY, J. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 11, n. 2, p. 113–116, 1 jun. 1993. <https://doi.org/10.1007/BF02670468>.

CHEN, C. et al. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. **Molecular Plant**, v. 13, n. 8, p. 1194–1202, ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>.

CHEN, Z. J. et al. Cloning and characterization of defense-related genes from *Populus szechuanica* infected with rust fungus *Melampsora larici-populina*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 22 fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017314>.

CHOWDHURY, S.; BASU, A.; KUNDU, S. Overexpression of a New Osmotin-Like Protein Gene (SindOLP) Confers Tolerance against Biotic and Abiotic Stresses in Sesame. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00410>.

CHRISTENSEN, A. B. et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 3, p. 135–144, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1364->

3703.2002.00105.x.

COLE, C.; BARBER, J. D.; BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl_2, p. W197–W201, 1 jul. 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn238>.

CRAMER, G. R. et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 163, 17 nov. 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>.

DANTAS, B. F. et al. Taxas de crescimento de mudas de catingueira submetidas a diferentes substratos e sombreamentos. **Revista Árvore**, v. 33, p. 413–423, jun. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000300003>.

EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 14863–14868, 8 dez. 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>.

FAILLACE, G. R. et al. Molecular Characterisation of Soybean Osmotins and Their Involvement in Drought Stress Response. *Frontiers in Genetics*, v. 12, p. 632685, 25 jun. 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.632685>.

FIERENS, E. et al. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 24, n. 3, p. 646–654, 1 jun. 2009. <https://doi.org/10.1080/14756360802321831>.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W29–W37, 1 jul. 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>.

FROSI, G. et al. Increase in biomass of two woody species from a seasonal dry tropical forest in association with AMF with different phosphorus levels. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 46–52, jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.009>.

FROSI, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. **Tree Physiology**, v. 38, n. 1, p. 25–36, 2017. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx105>.

FROSI, G. et al. Reference genes for quantitative real-time PCR normalization of *Cenostigma pyramidale* roots under salt stress and mycorrhizal association. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, n. 2, p. e20200424, 2021a. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0424>.

FROSI, G. et al. Transcriptome of *Cenostigma pyramidale* roots, a woody legume, under different salt stress times. **Physiologia Plantarum**, p. ppl.13456, 24 maio 2021b. <https://doi.org/10.1111/ppl.13456>.

GHOSH, R.; CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. **Planta**, v. 228, n. 5, p. 883–890, out. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0790-5>.

HAYASHI, M. et al. A Thaumatin-Like Protein, Rj4, Controls Nodule Symbiotic Specificity in Soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 9, p. 1679–1689, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu099>.

HE, R. et al. Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. **Protoplasma**, v. 254, n. 4, p. 1579–1589, jul. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1047-y>.

HESS, B. et al. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 1 mar. 2008. <https://doi.org/10.1021/ct700301q>.

HOCKNEY, R.W. **Methods in Computational Physics**, vol. 9, Academic, New York p. 135, 1970.

INSCHLAG, C. et al. Biochemical Characterization of Pru a 2, a 23-kD Thaumatin-Like Protein Representing a Potential Major Allergen in Cherry (*Prunus avium*). **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 116, n. 1, p. 22–28, 1998. <https://doi.org/10.1159/000023920>.

IQBAL, I. et al. Thaumatin-Like Protein (TLP) Gene Family in Barley: Genome-Wide Exploration and Expression Analysis during Germination. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1080, 16 set. 2020. <https://doi.org/10.3390/genes11091080>.

ISAYENKOV, S. V.; MAATHUIS, F. J. M. Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 80, 15 fev. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>.

JAMI, S. K. et al. Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 238–252, 7 mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.01.006>.

JESÚS-PIRES, C. et al. Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 1, p. 36–51, 27 jan. 2020. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190318164905>.

KAUR, A. et al. Physico-chemical characterization and topological analysis of pathogenesis-related proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* using in-silico approaches. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0239836, 28 set. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239836>.

KIM, S.-H.; VOS, A. DE; OGATA, C. Crystal structures of two intensely sweet proteins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 13, n. 1, p. 13–15, 1 jan. 1988. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(88\)90011-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(88)90011-4).

KOHLER, A. et al. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. **Plant Molecular Biology**, v. 66, n. 6, p. 619–636, 1 abr. 2008. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9293-9>.

KREBITZ, M. et al. Plant-based Heterologous Expression of Mal d 2, a Thaumatin-like Protein and Allergen of Apple (*Malus domestica*), and its Characterization as an Antifungal Protein. **Journal of Molecular Biology**, v. 329, n. 4, p. 721–730, jun. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(03\)00403-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(03)00403-0).

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 19 jan. 2001. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.

KUMAR, R.; MUKHERJEE, P. K. Trichoderma virens Alt a 1 protein may target maize PR5/thaumatin-like protein to suppress plant defence: An in silico analysis. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, p. 101551, dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101551>.

KUMAR, S. A. et al. Beyond just being foot soldiers – osmotin like protein (OLP) and chitinase (Chi11) genes act as sentinels to confront salt, drought, and fungal stress tolerance in tomato. **Environmental and Experimental Botany**, v. 132, p. 53–65, 1 dez. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.08.007>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LAROSA, P. C. et al. Osmotin Gene Expression Is Posttranscriptionally Regulated 1. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 409–415, set. 1992. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.409>.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1993. <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>.

LEONE, P. et al. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. **Biochimie**, v. 88, n. 1, p. 45–52, 1 jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.001>.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W242–W245, 8 jul. 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.

LI, X. et al. Thaumatin-like protein genes of *Panax notoginseng* confers resistance to *Alternaria panax*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 112, p. 101537, dez. 2020a. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2020.101537>.

LI, Z. et al. Comprehensive Genome-Wide Analysis of Thaumatin-Like Gene Family in Four Cotton Species and Functional Identification of GhTLP19 Involved in Regulating Tolerance to *Verticillium dahlia* and Drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 575015, 20 out. 2020b. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575015>.

LIMA, L. L. et al. Remobilization of leaf Na⁺ content and use of nonstructural carbohydrates vary depending on the time when salt stress begins in woody species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 385–395, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.026>.

LIU, J.-J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 419–436, maio 2010. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0826-8>.

LIU, J.-J.; ZAMANI, A.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Expression profiling of a complex thaumatin-like protein family in western white pine. **Planta**, v. 231, n. 3, p. 637–651, 1 fev. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1068-2>.

LIU, W.-X. et al. *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. **Molecular Plant**, v. 6, n. 5, p. 1487–1502, set. 2013. <https://doi.org/10.1093/mp/sst031>.

LIU, Y. et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the TLP gene family in melon (*Cucumis melo* L.). **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2499–2509, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.001>.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil - Volume 3**. 2a edição ed. Nova Odessa, SP, Brasil: Plantarum, 2016.

MANGHWAR, H.; HUSSAIN, A. Mechanism of tobacco osmotin gene in plant responses to biotic and abiotic stress tolerance: A brief history. **BIOCELL**, v. 46, n. 3, p. 623–632, 2022. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.017316>.

MENU-BOUAOUICHE, L. et al. A molecular basis for the endo- β 1,3-glucanase activity of the thaumatin-like proteins from edible fruits. Biochimie, Free and conjugated sugars. **Biochemistry and molecular biology**, v. 85, n. 1, p. 123–131, 1 jan. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00058-0).

MIN, K. et al. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 170–173, 2004. <https://doi.org/10.1002/prot.10571>.

MISRA, R. C. et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic Arabidopsis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25340, jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep25340>.

MUNIS, M. F. H. et al. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 38–44, 26 fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.069>.

MUOKI, R. C. et al. Membrane localized thaumatin-like protein from tea (CstLP) enhanced seed yield and the plant survival under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 163, p. 36–44, jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.012>.

NAWAZ, K. et al. Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects. **African Journal of Biotechnology**, 9(34), 5475–5480, 2010. <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i34>.

NAWROT, R. et al. Characterization and expression of a novel thaumatin-like protein (CctLP1) from papaveraceous plant *Corydalis cava*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 189, p. 678–689, 31 out. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.08.067>.

NEALE, A. D. et al. Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **The Plant Cell**, v. 2, n. 7, p. 673–684, jul. 1990. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.7.673>.

OMUTO, C. T. et al. **Mapping of salt-affected soils – Technical manual**. Rome, Italy: FAO, 2020. <https://doi.org/10.4060/ca9215en>.

OOSTENBRINK, C. et al. A biomolecular force field based on the free enthalpy of hydration and solvation: The GROMOS force-field parameter sets 53A5 and 53A6. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1656–1676, 2004.

<https://doi.org/10.1002/jcc.20090>.

PARKHI, V. et al. Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance. **Molecular Breeding**, v. 23, n. 4, p. 625–639, 1 maio 2009. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9261-3>.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, out. 2011. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>.

PETRE, B. et al. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 33, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-33>.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. e36, 1 maio 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.

RAJAM, M. V. et al. Thaumatin gene confers resistance to fungal pathogens as well as tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. **Biologia plantarum**, v. 51, n. 1, p. 135–141, 1 mar. 2007. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0026-8>.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTEWIT, C.; NAKAGAWARA, K.-I. (Eds.). *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. p. 21–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3.

READ, T., VANCE, D., AND BLUEPRINTS, S. Robust Clustering: A Comparison of Sun™ Cluster 3.0 versus Sun Cluster 2.2 Software. **Sun BluePrints™ OnLine**, 2001, 1-23.

RETHINASAMY, V.; DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. The PR-5 family: Thaumatin-like proteins. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**, p. 107–129, 1 jan. 1999. <https://doi.org/10.1201/9781420049299>.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

SALDANHA, A. J. Java Treeview—extensible visualization of microarray data. **Bioinformatics**, v. 20, n. 17, p. 3246–3248, 22 nov. 2004. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth349>.

SAMAC, D. A. et al. Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 8, p. 786–798, out. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00712.x>.

SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 1177932220952739, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1177/1177932220952739>.

SELS, J. et al. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 11, p. 941–950, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>.

SHARMA, A. et al. Molecular Characterization Revealed the Role of Thaumatin-Like Proteins of Bread Wheat in Stress Response. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.807448>.

SHATTERS, R. G. et al. Phylogenetic and Structural Relationships of the PR5 Gene Family Reveal an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Taxa. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 1, p. 12–29, 1 jul. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0053-z>.

SHEN, M.; SALI, A. Statistical potential for assessment and prediction of protein structures. **Protein Science**, v. 15, n. 11, p. 2507–2524, 2006. <https://doi.org/10.1110/ps.062416606>.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. In: RUSSELL, D. J. (Ed.). **Multiple Sequence Alignment Methods**. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, p. 105–116, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6.

SINGH, N. K. et al. Characterization of a Pathogen Induced Thaumatin-Like Protein Gene AdTLP from *Arachis diogeni*, a Wild Peanut. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83963, 19 dez. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083963>.

SIPPL, M. J. Boltzmann's principle, knowledge-based mean fields and protein folding. An approach to the computational determination of protein structures. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 7, n. 4, p. 473–501, 1 ago. 1993.

<https://doi.org/10.1007/BF02337562>.

STUDER, G. et al. QMEANDisCo—distance constraints applied on model quality estimation. **Bioinformatics**, v. 36, n. 6, p. 1765–1771, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>.

SU, L. et al. Analysis of the thaumatin-like genes of *Rosa chinensis* and functional analysis of the role of RcTLP6 in salt stress tolerance. **Planta**, v. 254, n. 6, p. 118, 10 nov. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03778-y>.

TACHI, H. et al. Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 73–79, jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.012>.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W71–W74, 8 maio 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, set. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>.

VILELA, L. M. B. et al. *Cenostigma pyramidale*: Ethnomedicinal Properties and Perspectives on A Legume Tree Highly Adapted to Semiarid ‘Caatinga’ Region. In: **Ethnopharmacology of Wild Plants**. CRC Press, 2021. <https://doi.org/10.1201/9781003052814>.

WANG, Q. et al. Purification and Characterization of a CkTLP Protein from *Cynanchum komarovii* Seeds that Confers Antifungal Activity. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16930, 22 fev. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016930>.

WANG, T. et al. Identification, evolution and expression analyses of whole genome-wide TLP gene family in *Brassica napus*. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6678-x>.

WANG, X. et al. Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 27–38, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01338.x>.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Current Protocols in Bioinformatics*, v. 47, n. 1, p. 5.6.1-5.6.32, 2014. <https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0506s47>.

WEBER, R. L. M. et al. Expression of an osmotin-like protein from *Solanum nigrum* confers drought tolerance in transgenic soybean. *BMC Plant Biology*, v. 14, n. 1, p. 343, 10 dez. 2014. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0343-y>.

WEL, H.; LOEVE, K. Isolation and Characterization of Thaumatin I and II, the Sweet-Tasting Proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth. **European Journal of Biochemistry**, v. 31, n. 2, p. 221–225, dez. 1972. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1972.tb02522.x>.

WENG, K. et al. Transcriptome of *Erysiphe necator* -infected *Vitis pseudoreticulata* leaves provides insight into grapevine resistance to powdery mildew. **Horticulture Research**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 24 set. 2014. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.49>.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W407-410, jul. 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.

YAN, X. et al. Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TLP29 contributes to disease resistance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4269, dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04105-w>.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

ZHANG, M. et al. Antifungal properties of a thaumatin-like protein from watermelon. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 11, p. 186, 6 out. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2759-8>.

ZHAO, C. et al. Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. **The Innovation**, v. 1, n. 1, p. 100017, 21 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>.

ZHAO, J. P.; SU, X. H. Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. **Planta**, v. 232, n. 4, p. 949–962, set. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1218-6>.

Material Suplementar

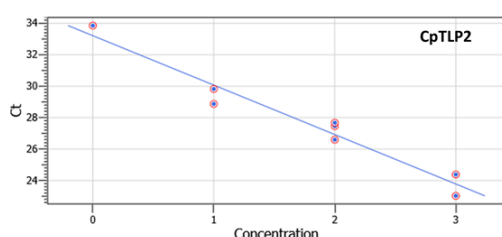
Tabela S1– Genes de referência e alvos (CpTLPs) para reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), com base na literatura e identificados no transcriptoma de *C. pyramidale* sob estresse salino, respectivamente.

Gene	Anotação	Amplicon (pb)	Primer	Referência	Espécies	Eficiência (%) Folha - Raiz	
<i>ARP3</i>	Actin-related protein 3	131	(F) AATTCAGCTCAGCCATCCTTT (R) CCAGCCTCACTTTGATTGTTC	Frosi et al, (2021a)	<i>C. pyramidale</i>	103,18	101,01
<i>SAC1</i>	Suppressor of Actin	101	(F) CCAGTCCAGGTCCTTCACATA (R) TGAAGAGAATGGTTGGTACGG	Frosi et al, (2021a)	<i>C. pyramidale</i>	N/A	101,14
<i>HAG2</i>	Histone acetyltransferase type B catalytic subunit	108	(F) GCATGAGACGAGGAGAGTTTG (R) CACTTCGCCTGCTTAATTTTG	Frosi et al, (2021a)	<i>C. pyramidale</i>	N/A	102,96
<i>MYB4</i>	Transcription repressor MYB4	185	(F) TCACCGAAAGAGAAGCAGTGT (R) AGTCCTATGGCTTGCCTGATT	Frosi et al, (2021a)	<i>C. pyramidale</i>	99,10	N/A
<i>ATKRS-1</i>	Lysyl-tRNA Synthetase (<i>At3g11710</i>)	115	(F) GCATTCTTGCTTATGGTTTCG (R) GCTGCTCTCTCATTTTCCTTCA	Frosi et al, (2021a)	<i>C. pyramidale</i>	95,97	N/A
Alvos							
CpTLP2	Taumatina 2	135	(F) GCCTTCAGTTTACTCGGAGATG (R) TGACTTGGAGAGGAAGGACAG	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	108,03	96,49
CpTLP3	Taumatina 3	131	(F) CAAGCTGTGTTGCAGAAACC (R) ACTTGTGCATGAGCGAAGG	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	N/E	92,55
CpTLP5	Taumatina 5	115	(F) CGTGAACAAGTGCGACTACAC (R) AGCTAGAAAGGAGCGGGAAG	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	97,79	106,73
CpTLP17	Taumatina 17	108	(F) TCCCACACACTCTGCTTCAC (R) GTAGTACCCAGAACACCTGTGG	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	100,38	90,60
CpTLP20	Taumatina 20	84	(F) GTTGGCGGAGTTCACCTTAG (R) AGCATAGGCACGTTGTACCC	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	108,19	100,73
CpTLP31	Taumatina 31	137	(F) GTTTGTGCCACTGGTGACTG	Este estudo	<i>C. pyramidale</i>	105,24	101,25

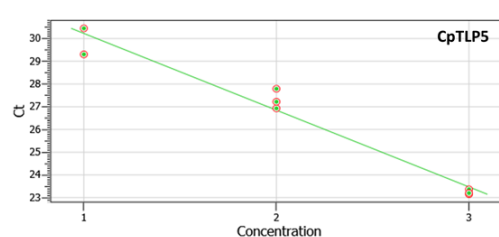
N/A=Não analisado; N/E= Não eficiente.

Figura S1– Curvas de eficiência para os alvos obtidas nos ensaios de RT-qPCR nos tecidos foliar (A) e radicular (B).

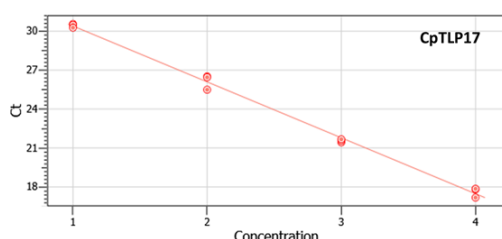
A - Folha



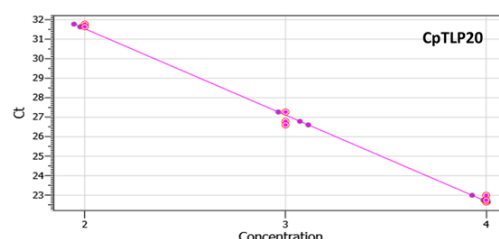
Assay: CpTLP2-SYBR Intercept: 33.22 Slope: -3.14 Error: 0.025 Correlation: -0.975 Efficiency: 108.03%



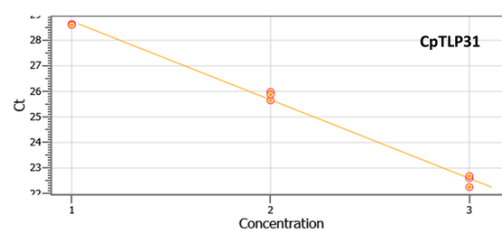
Assay: CpTLP5-SYBR Intercept: 33.6 Slope: -3.38 Error: 0.019 Correlation: -0.981 Efficiency: 97.79%



Assay: CpTLP17-SYBR Intercept: 33 Slope: -3.59 Error: 0.013 Correlation: -0.984 Efficiency: 100.38%

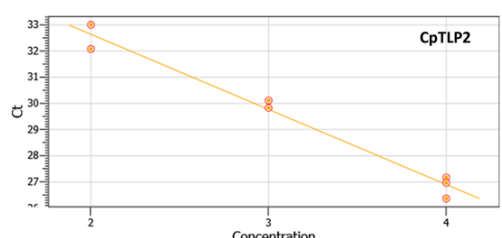


Assay: CpTLP20-SYBR Intercept: 34.26 Slope: -3.14 Error: 0.031 Correlation: -0.970 Efficiency: 108.19%

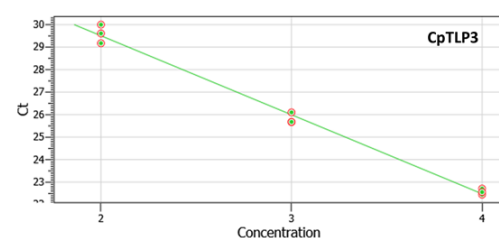


Assay: CpTLP31-SYBR Intercept: 31.82 Slope: -3.39 Error: 0.011 Correlation: -0.987 Efficiency: 105.24%

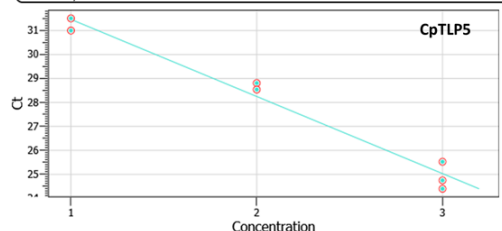
B - Raiz



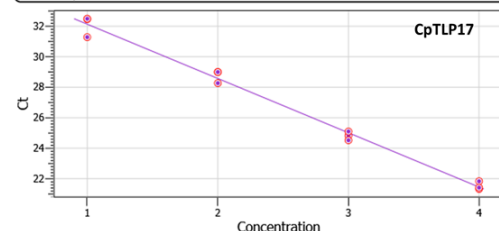
Assay: CpTLP2-SYBR Intercept: 33.22 Slope: -3.41 Error: 0.025 Correlation: -0.975 Efficiency: 96.49%



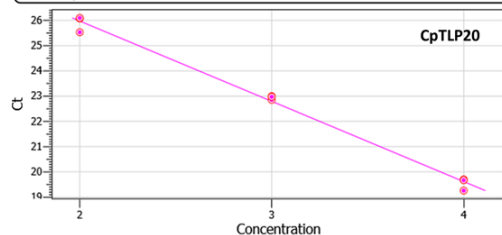
Assay: CpTLP3-SYBR Intercept: 32.91 Slope: -3.21 Error: 0.017 Correlation: -0.991 Efficiency: 92.55%



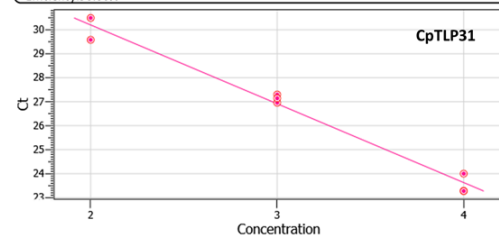
Assay: CpTLP5-SYBR Intercept: 34.68 Slope: -3.21 Error: 0.016 Correlation: -0.987 Efficiency: 106.73%



Assay: CpTLP17-SYBR Intercept: 32.59 Slope: -3.55 Error: 0.013 Correlation: -0.985 Efficiency: 90.60%



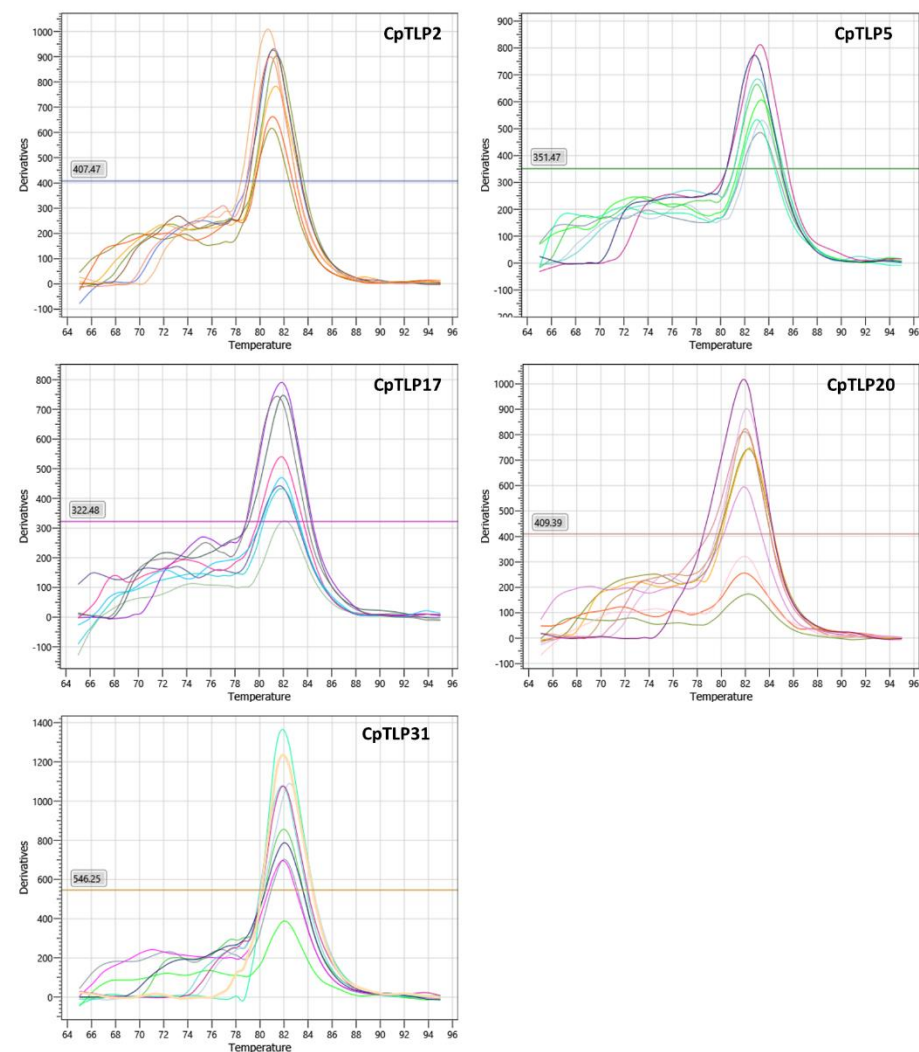
Assay: CpTLP20-SYBR Intercept: 33.54 Slope: -3.31 Error: 0.015 Correlation: -0.975 Efficiency: 100.73%



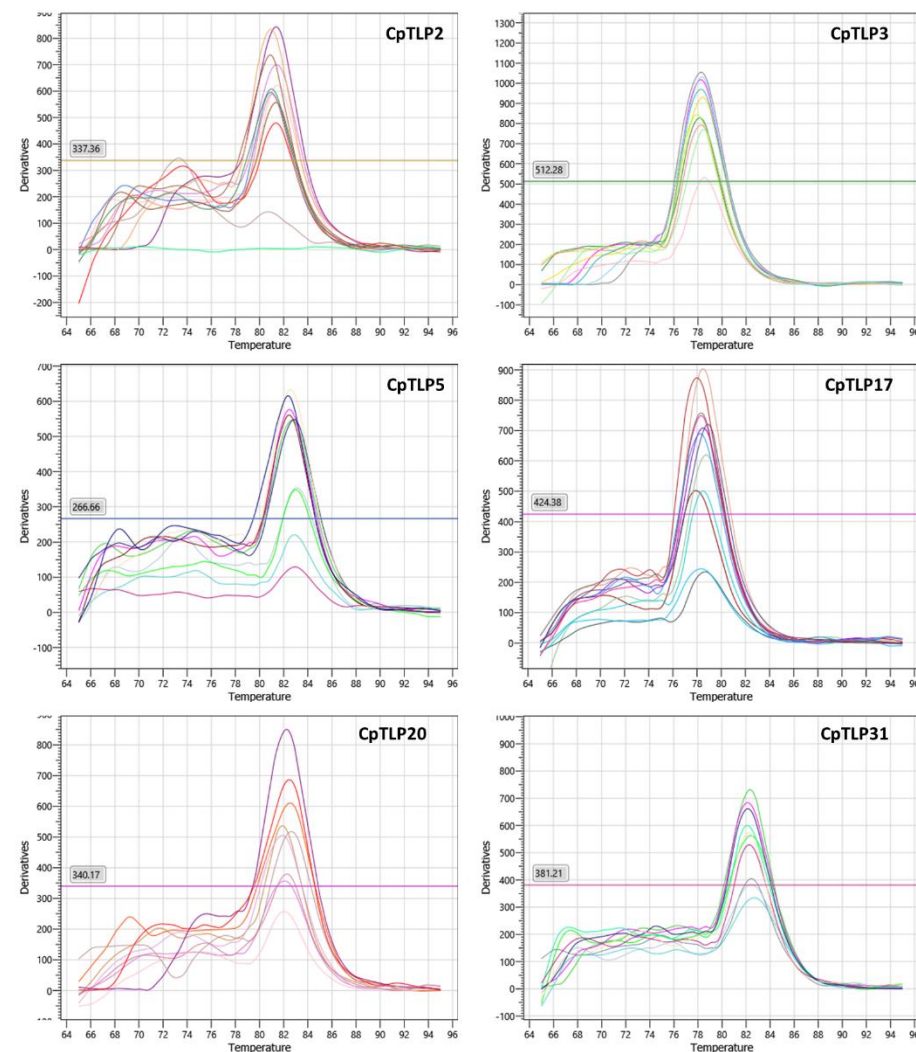
Assay: CpTLP31-SYBR Intercept: 33.77 Slope: -3.29 Error: 0.025 Correlation: -0.989 Efficiency: 101.25%

Figura S2– Curvas de *Melting* dos alvos obtidas nos ensaios de RT-qPCR nos tecidos foliar (A) e radicular (B).

A - Folha



B - Raiz



4.2 ARTIGO 2

Análise estrutural e funcional da família das TLPs no transcriptoma *Stylosanthes scabra* sob supressão de rega

Maria Cidinaria Silva Alves¹, Carolline de Jesús-Pires¹, Gabriella Frosi², Flávia Czekalski Araújo¹, Carlos André dos Santos-Silva¹, Marx Oliveira de Lima¹, Ana Maria Benko-Iseppon¹, Valesca Pandolfi^{1*}

¹*Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Departamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil*

²*Faculté des Sciences, Département de Biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Quebec, Canada*

*Autor correspondente: telefone: +55 81 21267816; e-mail: valesca.pandolfi@ufpe.br.

Resumo: Fatores ambientais, como altas temperaturas, seca, salinidade, (frequentemente agindo de forma combinada) têm levado a grandes perdas a cada ano. Dentre as estratégias de adaptação às condições de estresse (biótico e abiótico) destaca-se a indução de genes relacionados à defesa vegetal, incluindo as TLPs (*Thaumatin-like Proteins*). Essa família de proteínas é conhecida pela sua ação antimicrobiana, mas têm sido investigadas pela sua associação com a tolerância a estresse abióticos. *Stylosanthes scabra* Vogel é uma espécie nativa do Brasil, amplamente adaptada à ambientes hostis, principalmente sob solos pobres e com pouca disponibilidade hídrica, representando uma excelente candidata para estudo de genes de defesa vegetal. O presente trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar TLPs no transcriptoma da *S. scabra*, assim como avaliar o perfil de expressão das SsTLPs após 6, 24 e 48 h de supressão de rega e 6 h após a reidratação. As 64 SsTLPs identificadas apresentaram domínios característicos das TLPs, assim como o peptídeo sinal, ponto isoelétrico e massa molecular também típicos dessa família. O alinhamento múltiplo revelou alta conservação dos 16 resíduos de cisteínas, além do motivo de assinatura e um motivo "REDDD", também característicos das TLPs. A análise de expressão mostrou indução na maioria das SsTLPs, indicando a ação das SsTLPs (SsTLP3, SsTLP4, SsTLP19 e SsTLP46) sobre a tolerância à restrição hídrica em *S. scabra*.

Introdução

Os fatores ambientais adversos, como a seca, causam deficiência de água nas plantas, consequentemente, afetando o crescimento e o desenvolvimento vegetal, limitando severamente a produção agrícola e reduzindo o rendimento e a qualidade das plantas cultivadas (LIU et al., 2013; RASHEED et al., 2016).

A seca desencadeia mudanças fisiológicas e moleculares significativas nas plantas, como redução da pressão do turgor foliar, ajustes do potencial e metabolismo osmótico, redução ou interrupção do crescimento, entre outros (RASHEED et al., 2016; SHINOZAKI; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2006; TARDIEU et al., 2014). As respostas de defesa subjacentes à adaptação aos estresses ambientais são governadas por mudanças na expressão gênica (LIU et al., 2014). A adaptação ao estresse hídrico desencadeia alterações na expressão de numerosos genes pertencentes a diversos grupos funcionais, como fatores de transcrição e proteínas PR, que contribuem para a transdução de sinal e proteção da célula (LIU et al., 2013, 2014; SHU et al., 2018; ZHU, 2016).

As proteínas relacionadas à patogênese (PR) são conhecidas devido à tolerância a estresses ambientais, categorizadas em 17 famílias (PR-1 a PR17). As TLPs (*Thaumatin-like Proteins*) pertencem à família das PR-5, sendo conhecidas conhecida por sua similaridade de sequência com a taumatina, descrita em *Thaumatococcus daniellii*, planta nativa do oeste africano (CHRISTENSEN et al., 2002; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

A família das TLPs possui sequências de proteínas com em média 207 aminoácidos, massa molecular de 18kDa a 26 kDa e oito ligações dissulfeto devido à presença de 16 resíduos de cisteína (Cys), tornando-as estáveis sob diversas condições de estresse, como calor e pH. Além disso, possui um domínio definido de fenda ácida (REDDD), composto pelos aminoácidos conservados arginina, ácido glutâmico e três resíduos de ácido aspártico, que atuam na ligação ao receptor específico quando em atividade antifúngica (GHOSH; CHAKRABARTI, 2008; BREITENEDER, 2004; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010). As TLPs também possuem um motivo de assinatura conservado G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-[GQ]-X(2,3)-C, este está presente na maioria das TLPs (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; ZHAO; SU, 2010).

A superexpressão de TLPs nas plantas resulta em resistência a diversos

patógenos, tais como a *Macrophomina phaseolina* e *Phytophthora infestans* e estresses abióticos, como a salinidade e seca (ACHARYA et al., 2013; HE et al., 2017; LIU et al., 2013; SUBRAMANYAM et al., 2012). Diversos estudos revelaram que as TLPs desempenham funções no desenvolvimento e fisiologia da planta, incluindo atividade antimicrobiana, amadurecimento de frutas e germinação de sementes (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; SALZMAN et al., 1998; SEO et al., 2008). TLPs foram identificadas em várias plantas, incluindo *Arabidopsis thaliana* (SHATTERS et al., 2006), *Arachis diogeni* (SINGH et al., 2013), *Cucumis melo* (L.) (LIU et al., 2020), *Citrullus lanatus* (Thunb.) (ZHANG et al., 2018), *Glycine max* (L.) (HAYASHI et al., 2014), *Hordeum vulgare* (IQBAL et al., 2020), *Oryza sativa* (L.) (SHATTERS et al., 2006) e *Vitis vinifera* (L.) (YAN et al., 2017). No entanto, as TLPs são diversificadas em diferentes espécies de plantas e estresse, o que sugere que suas funções ainda precisam ser investigadas.

Em regiões semiáridas, as plantas frequentemente precisam adaptar-se às condições de estresse, como ambientes salinizados, secos e quentes. Entre as diversas plantas adaptadas nessas regiões, destaca-se a leguminosa *S. scabra* Vogel com notável adaptação a solos pobres, ácidos e sob baixa disponibilidade hídrica, sendo muito utilizada como forrageira (CALLES; SCHULTZE-KRAFT, 2016; CHANDRA; PATHAK; BHATT, 2006; RESENDE et al., 2006). Thumma et al. (2001) revelam que a expressão de diversos genes é induzida sob baixa disponibilidade de água em *S. scabra* e elevam produção de biomassa. Em condições salinas, a *S. scabra* apresentou aumento nos teores de glicina-betaína e colina, enquanto a prolina foi afetada adversamente (AGARWAL; VARSHNEY, 2019). Atualmente a *S. scabra* tem sido predominantemente utilizada em centros de pesquisa agrícola na Austrália, Brasil e em países do sul da Ásia, com vistas melhoramento como adubo verde e pastagem, especialmente em regiões semiáridas (CHANDRA, 2013; MARQUES et al., 2018).

Diante disso, o presente estudo teve como objetivo identificar TLPs no transcriptoma *S. scabra* sob supressão de rega, analisando sistematicamente sua estrutura gênica, localização subcelular, motivos conservados, análise fenética e padrões de expressão no tecido radicular sob estresse hídrico.

Materiais e Métodos

Material Vegetal e tratamentos

O material vegetal deste estudo foi obtido através do experimento descrito em Ferreira-Neto et al. (2021) (em preparo). Resumidamente, estacas enraizadas de *S. scabra* (acesso 85, do BAG da Universidade do Estado da Bahia-UNEB) foram cultivadas em vasos plásticos (de 10 L) contendo areia / solo argiloso / vermiculita (v / v) e mantidas em casa de vegetação na Embrapa Semiárido, Petrolina, PE, à 25 °C (± 2 °C) e umidade relativa de 60% ($\pm 5\%$), sob luz natural (fotossintética densidade de fluxo de fótons (PPFD) = $1,5 \times 10^3 \mu\text{moles m}^{-2}\text{s}^{-1}$ por 12h/dia, regadas diariamente. Após seis meses, as plantas foram submetidas à 6, 24 e 48 horas de deficiência hídrica (por suspensão de água) e 6 horas após a reidratação (cada tratamento com seus respectivos controles (regadas diariamente, 500 mL H₂O), em triplicatas biológicas. As amostras (de cada tratamento) foram coletadas e mantidas a -80 °C até a extração do RNA.

Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total do tecido radicular de *S. scabra* (em todos os tratamentos) foi extraído utilizando o Kit SV Total RNA Isolation System (Promega). As amostras foram tratadas com DNase e analisadas quanto à sua integridade (gel de agarose 1,5%), e concentração (Fluorímetro Qubit®-Life Technologies). Para a validação da expressão, as amostras de RNA total foram convertidas em cDNA utilizando o kit GoScript™ Reverse Transcription System (Promega) seguindo instruções do fabricante e mantidas a -20°C até a realização das reações de amplificações.

Alíquotas de RNA total das amostras de *S. scabra*, 6 e 24 horas de supressão de rega e seus respectivos controles (em triplicata) foram utilizadas para a construção de bibliotecas de RNA-Seq, utilizando a plataforma Illumina HiSeq 2500, 2 × 100 bp, usando o kit HiSeq Rapid PE cluster V.2 (Illumina), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento foi realizado com três réplicas biológicas por tratamento em cada tempo de coleta.

Identificação das sequências

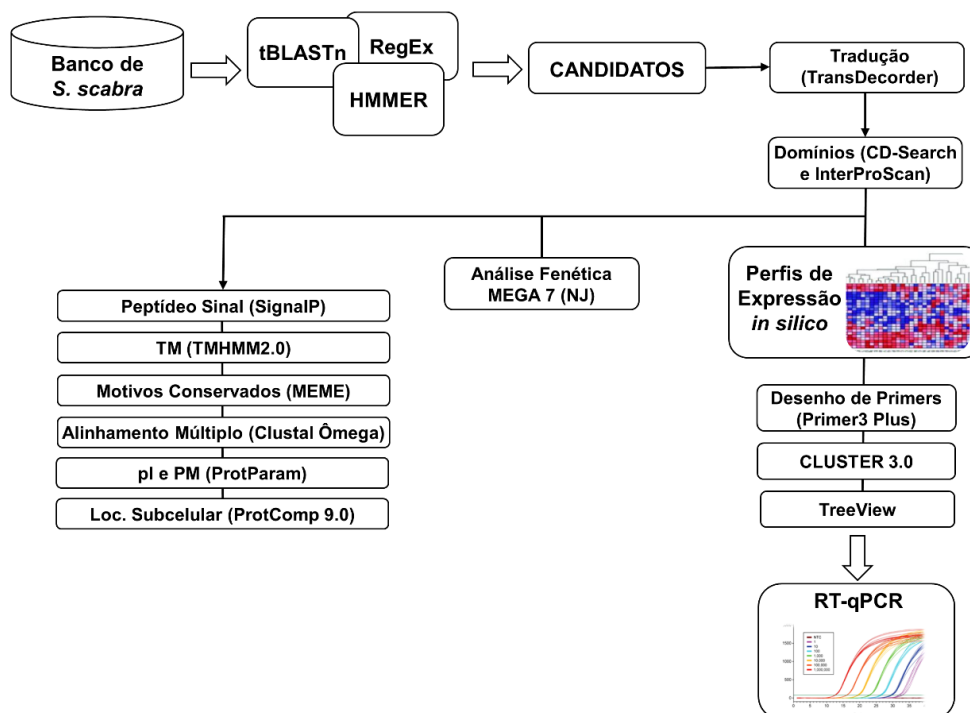
A identificação das sequências da família das TLPs foi realizada utilizando três métodos (SANTOS-SILVA et al., 2020). O primeiro foi realizado através do alinhamento de sequências-sondas (*seed-sequences*) de TLPs disponíveis no banco de dados público UniProt (<https://www.uniprot.org/>) contra o banco de dados de RNA-Seq da estílozantes, por meio da ferramenta BLAST. O segundo utilizou a ferramenta HMMER (FINN; CLEMENTS; EDDY, 2011), buscando padrões no domínio conservado, através do algoritmo de Hidden Markov Modelo (HMM). O terceiro método foi realizado usando expressão regular (RegEx), com padrões de peptídeos desenvolvido por nosso grupo. As sequências candidatas foram traduzidas por meio da ferramenta Transdecoder, submetidas ao Batch CD-Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>) e InterProScan (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/search/sequence/>) para identificar os domínios conservados da classe das TLPs. A presença de domínios transmembrana (TM) e peptídeo sinal foram previstos pelas ferramentas TMHMM 2.0 (KROGH et al., 2001) e SignalP 5.0 (PETERSEN et al., 2011), respectivamente.

Caracterização das sequências candidatas à taumatinas e análise fenética

As sequências com domínio completo foram avaliadas quanto ao tamanho de proteína, ponto isoelétrico (pI), massa molecular (MW) e grande média de hidropaticidade (GRAVY), previstos por ExPASy ProtParam (<http://web.expasy.org/protparam/>) e a localização subcelular foi predita com o auxílio do programa ProtComp 9.0 (Softberry Inc., Mount Kisco, NY, USA). Utilizando a ferramenta Clustal Omega (SIEVERS; HIGGINS, 2014) foi realizado um alinhamento múltiplo com uma sequência de taumatina de *Thaumatococcus daniellii* (Benth.) para identificação de padrões conservados. A estrutura secundária foi predita a partir do pacote JNet Secondary Structure Prediction (COLE; BARBER; BARTON, 2008). Os motivos conservados foram previstos por meio da ferramenta MEME 5.0.3 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) conforme os parâmetros sugeridos por LIU et al. (2020) e visualizados no TBtools (CHEN et al., 2020). Para comparar as relações evolutivas e identificar as subfamílias, TLPs descritas em outras espécies foram utilizadas para construir uma árvore fenética pelo método de *Neighbor-Joining* (NJ)

com auxílio do programa MEGA v.7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) e visualizados no iTOL (LETUNIC; BORK, 2016).

Figura 1- Fluxograma das principais etapas desenvolvidas na anotação estrutural e funcional de Taumatinas no transcriptoma de *S. scabra*.



Expressão *in silico* das SsTLPs

O transcriptoma de *S. Scabra*, sequenciado pela tecnologia de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500), assim como as tabelas de genes diferencialmente expressos em 6 e 24 hapós a suspensão de rega foram disponibilizados pelo grupo do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV/UFPE). A construção do perfil de expressão *in silico* foi baseada na análise dos valores de *Fold Change* (FC) dos transcritos de cada tratamento a partir das análises via EdgeR (ROBINSON; MCCARTHY; SMYTH, 2010), onde foram considerados os transcritos com $FC > 1$ ou < -1 (p -value e FDR ≤ 0.05). Em seguida, esses transcritos foram submetidos ao *software* CLUSTER 3.0 (READ et al., 2001), onde foram realizados agrupamentos relacionando os *clusters* e as bibliotecas através do método *Hierarchical Clustering Analysis* (EISEN et al., 1998), cujos resultados foram apresentados em um painel de expressão gerado pelo programa TreeView (SALDANHA, 2004), dispostos em *heatmap*.

Análise da expressão diferencial via RT-qPCR

Com base na expressão *in silico*, foram selecionadas cinco SsTLPs para serem validadas quanto a sua expressão diferencial, via RT-qPCR. Os pares de primers foram desenhados utilizando o software Primer3 Plus (UNTERGASSER et al., 2007) e Primer-BLAST (YE et al., 2012), seguindo-se os seguintes parâmetros: conteúdo de GC 50%, temperatura de Melting de 40 °C a 60 °C, junção exon-exon e tamanho do amplicon entre 80 - 150 pb.

Amostras de diluições seriadas de cDNA (1/10, 1/100, 1/1000 e 1/10000), em triplicatas técnicas, foram usadas para construir as curvas padrões para cada par de primer, a fim de determinar a eficiência das amplificações a partir da seguinte equação $E=10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$ (RASMUSSEN, 2001). As reações de amplificações por qPCR foram preparadas com 5 µL de SYBR Green (GoTaq® qPCR Master Mix 2x, Promega), 1 µL de cDNA diluído (1/10), 0,3 µL de cada primer (5 µM) e volume ajustado para 10 µL de água livre de nucleases, em triplicatas biológicas e técnicas. As reações foram realizadas no equipamento CFX96 Touch Real-Time (Bio-Rad), com a seguinte programação: 95 °C por 2min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15s, e 60s à 60 °C. A curva de *melting* foi gerada variando a temperatura de amplificação de 65 – 95 °C.

Os genes de referência β -TUB2, F-Box e UBQ10 foram usados para normalização dos dados de expressão (Tabela S1). As validações por RT-qPCR seguiram as orientações do MIQE (*The Minimum Information for Publication of Quantitative RealTime PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009) e foram analisadas pelo programa estatístico REST (*Relative Expression Software Tool*, v.2.0.13; PFAFFL; HORGAN; DEMPFL, 2002).

Resultados

Seleção e caracterização dos candidatos

Foram obtidos 64 transcritos de TLPs no transcriptoma de *S. scabra* (Tabela 1). Desses, 12 sequências apresentaram o domínio GH64-TLP-SF (que inclui hidrolases glicosídicas), 16 apresentaram o domínio Thaumatin (relacionadas à atividade antifúngica) e 36 apresentaram o domínio TLP-PA (similar ao domínio taumatina e presente em proteínas antifúngicas/alergênicas). As sequências de

SsTLPs variaram de 180 a 224 aminoácidos (aa) com tamanho médio de 211 aa, o *pI* de 4,14 (SsTLP1) a 9,06 (SsTLP5 e SsTLP6) e massa molecular de 18,77 kDa (SsTLP15) a 24,28 kDa (SsTLP51 a SsTLP54). Estavam localizadas na região extracelular 54 das 64 SsTLPs e as demais estavam presentes no vacúolo. Os resultados da análise do peptídeo sinal indicou que 87% das SsTLPs continham um peptídeo sinal na região N-terminal, além disso, a maioria das sequências possuía um ou dois domínios TM.

Tabela 1 – Tamanho da proteína (aa), massa molecular (MW), ponto isoeletrico (*pI*), índice de hidropaticidade média (GRAVY), domínios transmembrana (TM) e localização subcelular das SsTLPs.

Gene	ID	Características das Proteínas					Localização subcelular
		Nº de aa	MW (Da)	<i>pI</i>	TM	GRAVY	
SsTLP1	TR21987 c0_g1_i1	218	22,46	4,14	0	-0,105	Extracelular
SsTLP2	TR24711 c0_g1_i1	219	23,06	4,78	1	-0,446	Extracelular
SsTLP3	TR24711 c0_g1_i2	219	22,97	5,05	1	-0,398	Extracelular
SsTLP4	TR24711 c0_g1_i4	197	20,68	5,05	1	-0,392	Extracelular
SsTLP5	TR24722 c0_g1_i1	217	23,35	9,06	1	-0,151	Extracelular
SsTLP6	TR24722 c0_g1_i2	217	23,30	9,06	1	-0,134	Extracelular
SsTLP7	TR24877 c0_g1_i1	213	22,45	7,02	0	-0,062	Extracelular
SsTLP8	TR24877 c0_g1_i2	214	22,62	7,02	1	-0,046	Extracelular
SsTLP9	TR25192 c0_g1_i1	199	21,41	4,29	1	-0,252	Vacúolo
SsTLP10	TR25192 c0_g1_i2	199	21,39	4,37	1	-0,275	Vacúolo
SsTLP11	TR25192 c0_g1_i3	199	21,37	4,19	1	-0,224	Vacúolo
SsTLP12	TR25192 c0_g1_i4	199	21,40	4,29	1	-0,239	Vacúolo
SsTLP13	TR25192 c0_g1_i5	199	21,42	4,37	1	-0,268	Vacúolo
SsTLP14	TR27893 c1_g1_i1	211	22,26	4,8	0	-0,321	Extracelular
SsTLP15	TR27893 c1_g1_i2	180	18,77	4,5	0	-0,369	Extracelular
SsTLP16	TR27893 c1_g1_i3	211	22,26	4,8	0	-0,321	Extracelular
SsTLP17	TR27893 c1_g1_i4	211	22,26	4,8	0	-0,321	Extracelular
SsTLP18	TR27893 c1_g1_i5	211	22,27	4,7	0	-0,308	Extracelular
SsTLP19	TR27893 c1_g1_i6	211	22,26	4,8	0	-0,321	Extracelular
SsTLP20	TR27893 c1_g1_i7	211	22,27	4,7	0	-0,308	Extracelular
SsTLP21	TR27893 c1_g1_i8	211	22,25	4,6	2	-0,317	Extracelular
SsTLP22	TR27893 c1_g1_i9	211	22,25	4,6	2	-0,317	Extracelular
SsTLP23	TR28205 c1_g1_i1	224	23,61	4,67	2	-0,178	Extracelular
SsTLP24	TR28205 c1_g1_i2	224	23,64	4,67	2	-0,225	Extracelular
SsTLP25	TR30051 c0_g1_i1	214	22,30	4,22	0	-0,225	Extracelular
SsTLP26	TR30051 c0_g1_i10	214	22,29	4,22	0	-0,226	Extracelular
SsTLP27	TR30051 c0_g1_i2	214	22,30	4,22	0	-0,225	Extracelular
SsTLP28	TR30051 c0_g1_i3	214	22,30	4,22	0	-0,225	Extracelular
SsTLP29	TR30051 c0_g1_i4	210	21,69	4,22	1	-0,271	Extracelular
SsTLP30	TR30051 c0_g1_i5	214	22,30	4,22	1	-0,225	Extracelular
SsTLP31	TR30051 c0_g1_i7	214	22,30	4,22	0	-0,225	Extracelular

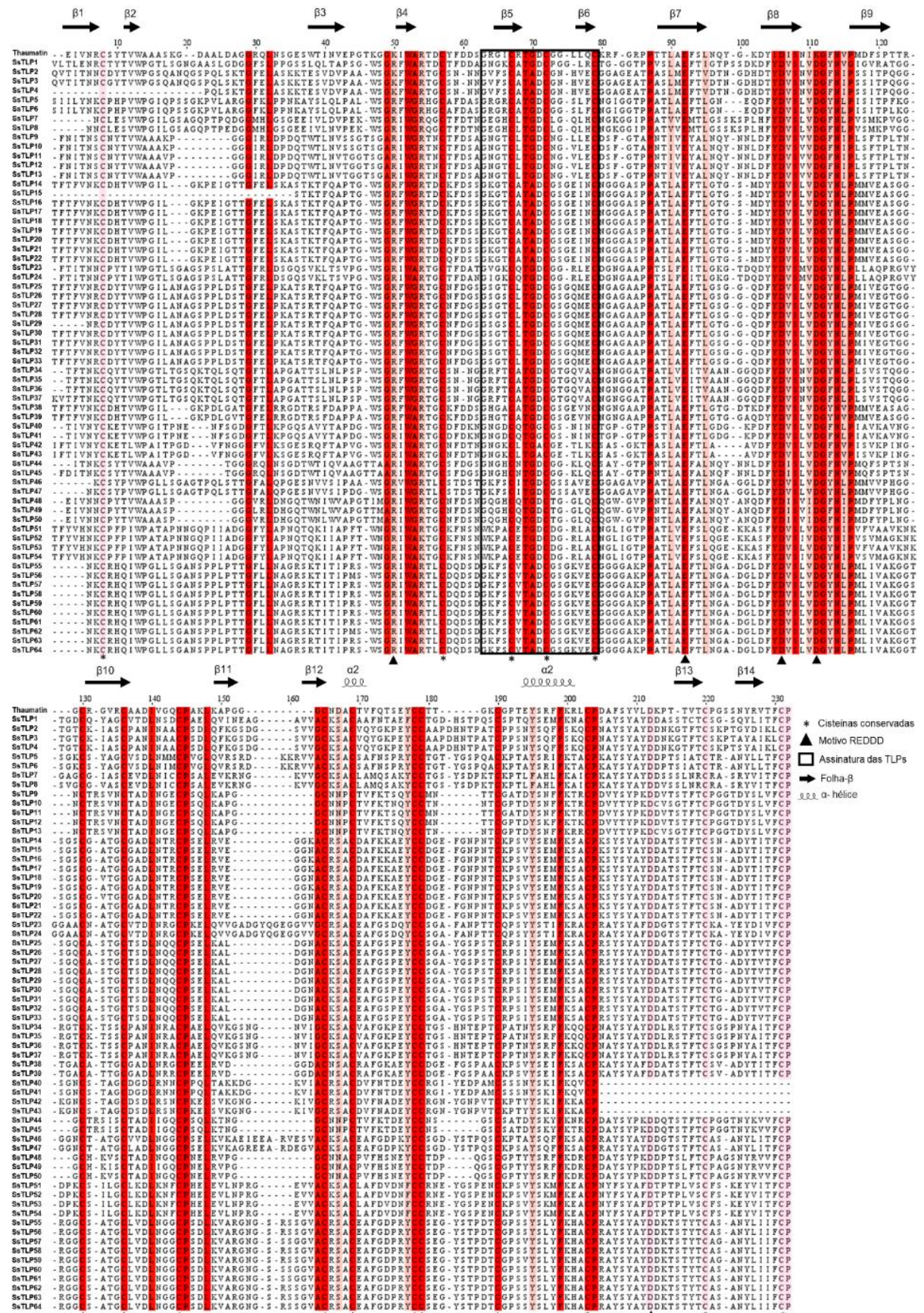
Gene	ID	Características das Proteínas					Localização subcelular
		Nº de aa	MW (Da)	pI	TM	GRAVY	
SsTLP32	TR30051 c0_g1_i8	214	22,30	4,22	0	-0,225	Extracelular
SsTLP33	TR30051 c0_g1_i9	214	22,30	4,22	0	-0,225	Extracelular
SsTLP34	TR62915 c0_g1_i1	217	22,79	8,31	1	-0,351	Extracelular
SsTLP35	TR62915 c0_g1_i2	217	22,77	8,31	0	-0,333	Extracelular
SsTLP36	TR62915 c0_g1_i3	217	22,80	8,46	0	-0,351	Extracelular
SsTLP37	TR62915 c0_g1_i4	219	23,02	8,59	1	-0,345	Extracelular
SsTLP38	TR64766 c0_g1_i1	212	22,20	4,5	2	-0,203	Extracelular
SsTLP39	TR64766 c0_g2_i1	212	22,27	4,56	1	-0,224	Extracelular
SsTLP40	TR64815 c0_g1_i1	184	19,44	4,65	0	-0,385	Extracelular
SsTLP41	TR64815 c0_g1_i3	184	19,44	4,65	0	-0,385	Extracelular
SsTLP42	TR65390 c0_g1_i1	184	19,52	8,52	0	-0,149	Extracelular
SsTLP43	TR65390 c0_g1_i3	184	19,52	8,52	0	-0,149	Extracelular
SsTLP44	TR65634 c0_g1_i1	198	21,09	5,71	1	-0,387	Vacúolo
SsTLP45	TR65634 c0_g1_i2	200	21,32	5,21	1	-0,352	Vacúolo
SsTLP46	TR65763 c1_g1_i1	218	22,43	4,6	0	0,020	Extracelular
SsTLP47	TR65763 c1_g1_i3	219	22,52	4,6	2	-0,103	Extracelular
SsTLP48	TR66439 c0_g1_i1	199	21,63	4,66	0	-0,370	Vacúolo
SsTLP49	TR66439 c0_g1_i2	199	21,68	4,8	0	-0,347	Vacúolo
SsTLP50	TR66439 c0_g1_i3	199	21,65	4,8	1	-0,387	Vacúolo
SsTLP51	TR84027 c0_g1_i1	219	24,35	7,3	0	-0,141	Extracelular
SsTLP52	TR84027 c0_g1_i2	219	24,28	7,3	0	-0,172	Extracelular
SsTLP53	TR84027 c0_g1_i3	219	24,35	7,3	0	-0,141	Extracelular
SsTLP54	TR84027 c0_g1_i4	219	24,28	7,3	0	-0,172	Extracelular
SsTLP55	TR84632 c2_g2_i1	219	22,96	7,89	2	-0,197	Extracelular
SsTLP56	TR84632 c2_g2_i10	219	22,93	7,51	1	-0,197	Extracelular
SsTLP57	TR84632 c2_g2_i2	219	22,83	7,51	2	-0,154	Extracelular
SsTLP58	TR84632 c2_g2_i3	219	22,99	7,9	2	-0,200	Extracelular
SsTLP59	TR84632 c2_g2_i4	219	22,97	7,9	2	-0,175	Extracelular
SsTLP60	TR84632 c2_g2_i5	219	22,84	7,51	2	-0,179	Extracelular
SsTLP61	TR84632 c2_g2_i6	219	22,84	7,51	2	-0,179	Extracelular
SsTLP62	TR84632 c2_g2_i7	219	22,93	7,51	2	-0,168	Extracelular
SsTLP63	TR84632 c2_g2_i8	219	22,99	7,9	2	-0,200	Extracelular
SsTLP64	TR84632 c2_g2_i9	219	22,99	7,9	2	-0,200	Extracelular

Alinhamento múltiplo das sequências e motivos conservados

Os resultados do alinhamento múltiplo das SsTLPs revelaram que a maioria apresenta 16 resíduos de cisteína conservados, conforme mostrado na Figura 1, excetuando a SsTLP15 que apresentou 15 Cys e as SsTLP40 a SsTLP43 que apresentaram 14 cisteínas conservadas. O motivo REDDD conservado [arginina (R), ácido glutâmico (E) e três resíduos de ácido aspártico(D)] foi altamente conservado

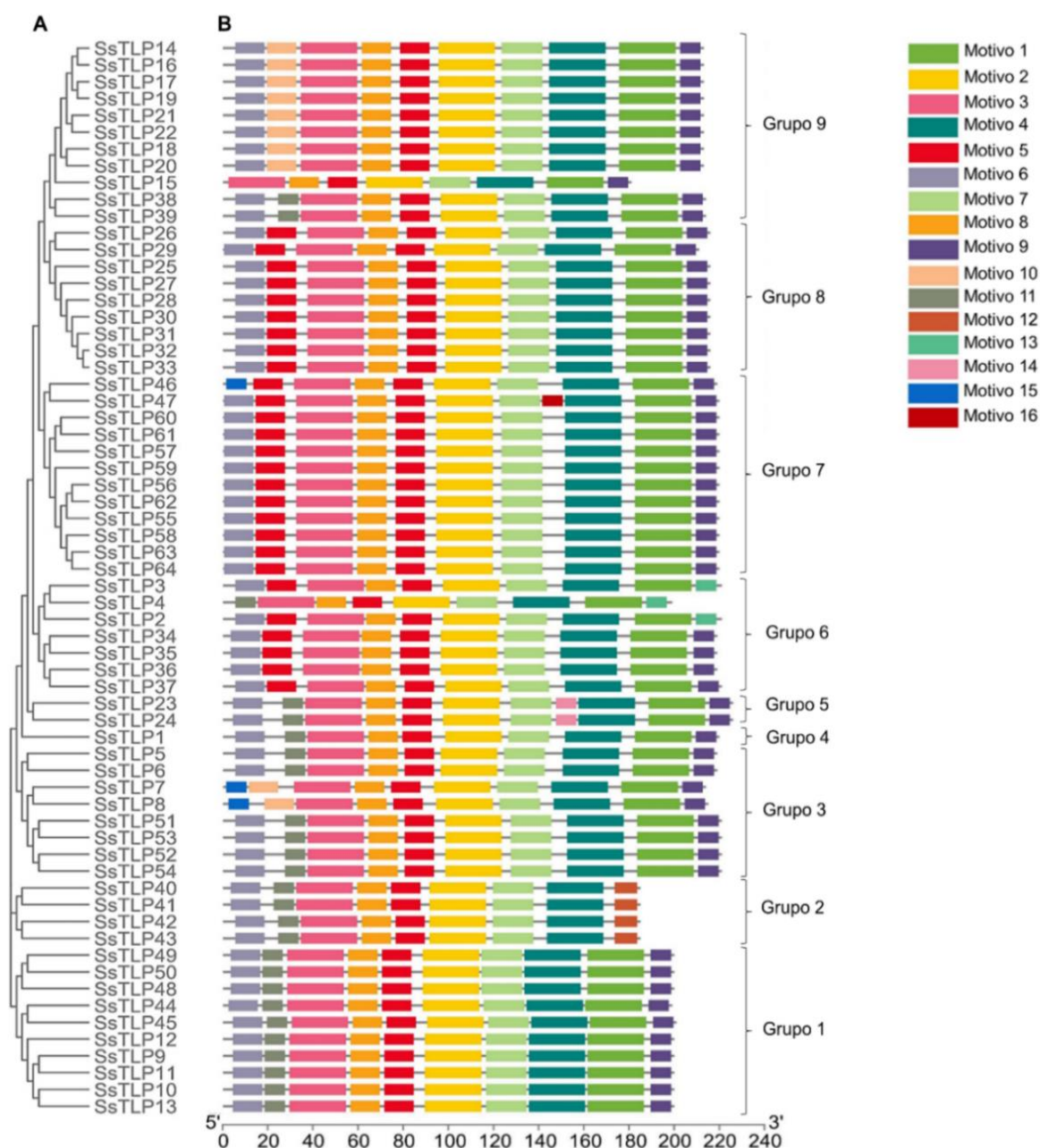
na maioria das SsTPLs, com exceção das SsTLP2, SsTLP3 e SsTLP4 apresentaram substituição no aminoácido arginina por Lisina (K). Além disso, o alinhamento revelou o motivo de assinatura típica da família das TLPs. A predição da estrutura secundária mostrou que as SsTLPs apresentaram de doze a quatorze folhas- β , além de até duas α -hélices (Figura 2).

Figura 2 – Alinhamento múltiplo e predição da estrutura secundária das sequências aminoácidos de Taumatina e das SsTLPs. Os resíduos conservados são indicados pelo fundo vermelho e rosa.



Os grupos e motivos conservados entre as SsTLPs foram investigados para analisar as características funcionais e a diversidade estrutural (Figura 3). Foram observados nove grupos (Figura 3A) e dezesseis motivos conservados (Figura 3B), dos quais nove motivos foram altamente conservados na maioria das sequências. Mais de 89% (57 dos 64) das SsTLPs apresentaram os motivos de um a nove e 27 sequências apresentaram o motivo cinco duplicado. Alguns grupos exibiram motivos únicos, a exemplo dos grupos 2 e 5 (com os motivos 12 e 14, respectivamente). O motivo 15 foi encontrado apenas nas sequências SsTLP7, SsTLP8 e SsTLP46, bem como o motivo 11 estava presente nas SsTLPs 4,38 e 39. Os grupos tendem a apresentar padrões de motivos semelhantes, tais como os grupos um, dois e nove, sugerindo que essas TLPs possuem funções semelhantes.

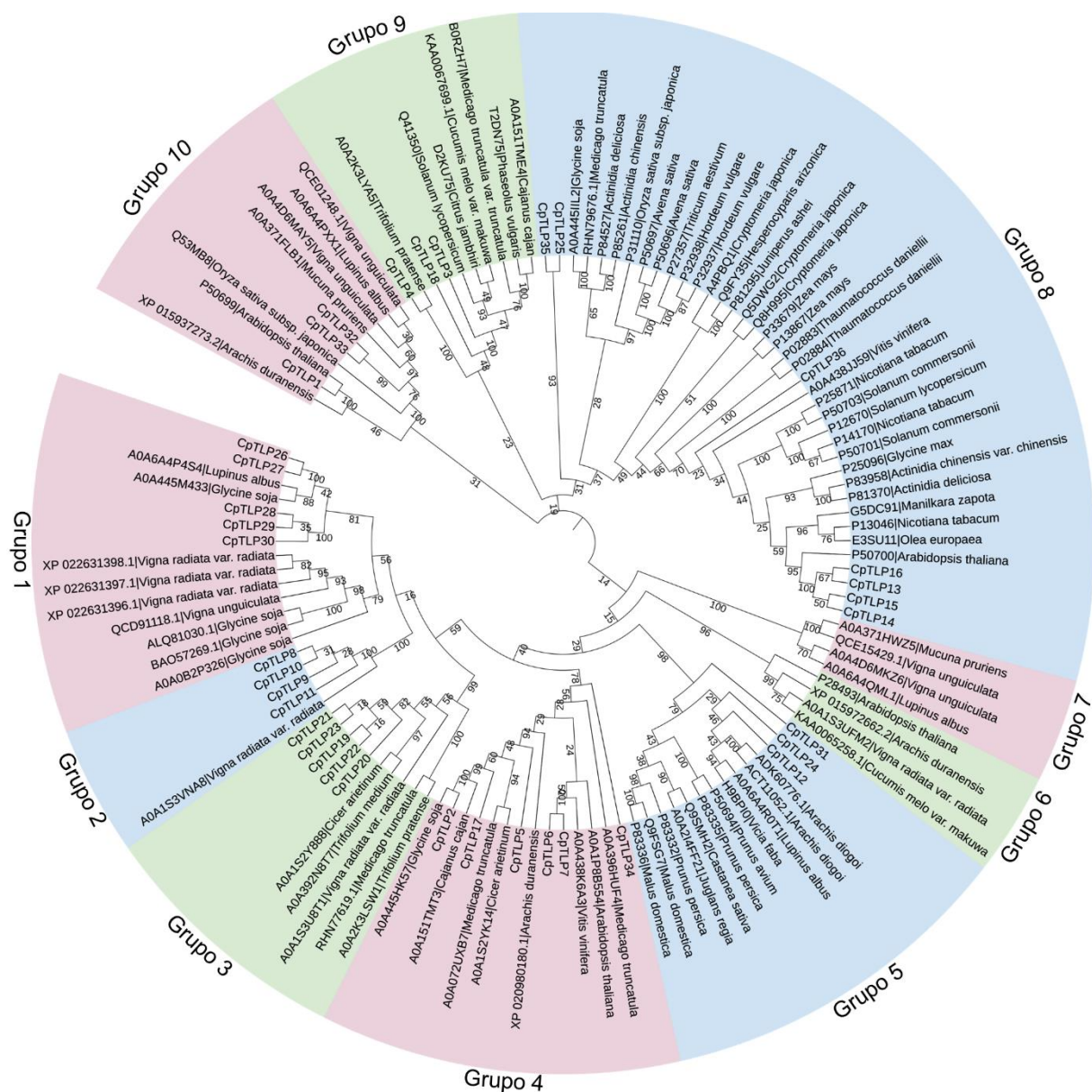
Figura 3 – Formação de grupos baseada na distribuição dos motivos conservados entre as 64 SsTLPs. **A.** Árvore fenética das SsTLPs formada pelo método NJ. **B.** Padrões de motivo conservados das TLPs de *S. scabra*. Os 16 motivos estão dispostos por cores.



Análise fenética

Para comparar as SsTLPs identificadas com TLPs de outras espécies foi gerada uma árvore fenética a partir do método de *Neighbor Joining* (NJ). As TLPs de outros organismos foram obtidas através dos bancos de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>), totalizando 107 TLPs de 42 diferentes táxons e 16 famílias de plantas foram obtidas.

Figura 4 – Fenograma gerado por meio do método NJ de TLPs de *S. scabra* comparativamente com TLPs dos bancos de dados NCBI e UniProt. As proteínas são representadas por seus códigos de acesso, seguido da espécie vegetal.



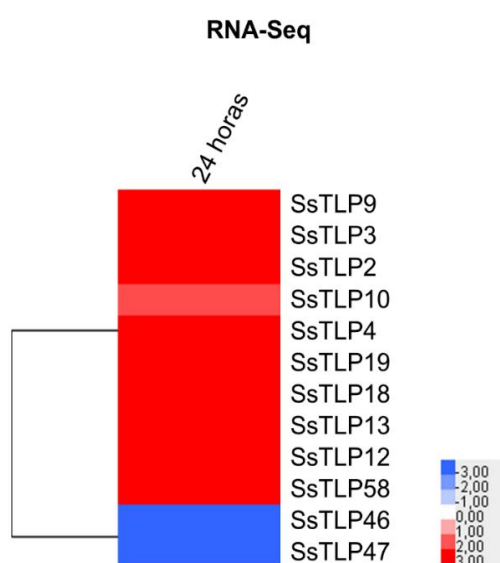
Foi observada a distribuição das TLPs em 10 grupos (Figura 4). Os grupos foram compostos de SsTLPs e de outras espécies de plantas, com exceção do grupo dois, apontando a semelhança entre as SsTLPs e as TLPs de outras plantas. A distribuição das SsTLPs foi relativamente desigual na maioria dos grupos, a exemplo do grupo 10 com apenas a SsTLP1 e grupo 6 com as SsTLP23 e SsTLP24, enquanto no grupo 1 estavam presentes 12 SsTLPs. O grupo 6 também é menor, apresentando 8 TLPs cada. O maior grupo é o 7 com 38 membros, desses 10 eram SsTLPs. O grupo 2,

assim como os grupos 1, 4 e 6 foram compostos apenas por espécies da família Leguminosae. O Grupo 3 foi constituído por espécies da Brassicaceae, Leguminosae e Vitaceae, enquanto o Grupo 5 foi constituído Fagaceae, Juglandaceae, Leguminosae e Rosaceae. O Grupo 7 foi apresentou maior diversidade de famílias, sendo composto por Actinidiaceae, Brassicaceae, Cupressaceae, Leguminosae, Oleaceae, Poaceae, Sapotaceae, Solanaceae, Marantaceae e Vitaceae. O Grupo 8 foi composto por espécies de Cucurbitaceae, Leguminosae, Rutaceae e Solanaceae. Já os grupos 9 e 10 foram compostos pelas famílias Brassicaceae e Leguminosae, diferenciados pela presença das famílias Poaceae e Cucurbitaceae, respectivamente.

Análise de expressão gênica

As 64 SsTLPs identificadas no transcriptoma (RNA-Seq) foram avaliadas *in silico* quanto ao seu perfil de expressão. A partir dessa análise, foram identificados doze transcritos diferencialmente expressos no RNA-Seq de 24 horas após a imposição do estresse hídrico, desses as SsTLP2, SsTLP3, SsTLP4, SsTLP9, SsTLP10, SsTLP12, SsTLP13, SsTLP18, SsTLP19 e SsTLP58 foram induzidos e SsTLP46 e SsTLP47 foram reprimidos (Figura 5).

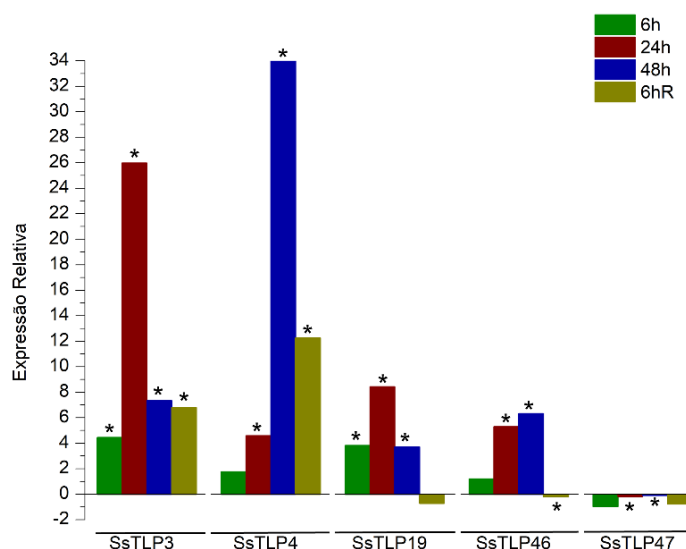
Figura 5 – Análise *in silico* do perfil de expressão das TLPs no transcriptoma (RNA-Seq) da raiz de *S. scabra gerado* após imposição do estresse hídrico. A escala de cores representa o nível de expressão relativa das SsTLPs superexpressas (vermelho), reprimidas (azul) e sem expressão diferencial (cinza).



Das doze SsTLPs diferencialmente expressas, cinco foram avaliadas quanto sua

expressão relativa (SsTLP3, SsTLP4, SsTLP19, SsTLP46 e SsTLP47), via RT-qPCR, no tecido radicular, nos mesmos tempos 6, 24 e 48 h de imposição de estresse hídrico e 6 horas após a reidratação (Figura 6).

Figura 6 – Expressão gênica de TLPs em *S. scabra* em resposta ao estresse hídrico. As barras representam a expressão relativa das cinco SsTLPs no radicular após 6 horas (verde), 24 horas (vermelho), 48 horas (azul) de estresse hídrico e 6 horas de reidratação (amarelo escuro). **up-regulated* e *down-regulated* ($p < 0,05$).



A maioria dos genes codificadores dos transcritos SsTLPs analisados apresentou expressão semelhante aos dados *in silico* do transcriptoma de *S. scabra* (RNA-Seq), excetuando o SsTLP46 que apresentou expressão adversa. Além disso, a maioria das TLPs de *S. scabra* foram induzidas nos tempos avaliados. A SsTLP3 foi induzida em todos os tempos, sendo expressão 25,9 vezes no tempo de 24 horas, quanto a SsTLP4 foi modulada constitutivamente em 6 horas de estresse e induzida nos demais tempos, chegando a 34,8 vezes em 48 horas.

Já SsTLP19 foi induzida em 6, 24 e 48 horas e modulada constitutivamente em 6 horas de reidratação. A SsTLP46 foi expressa de forma constitutiva em 6 horas, induzida em 24 e 48 horas e reprimida em 6 horas de reidratação. A SsTLP47 foi reprimida em 24 e 48 horas e modulada constitutivamente nos demais tempos. Dessa forma, a indução das SsTLPs na maioria dos tempos analisados indica uma possível associação à tolerância da estilosa submetida a supressão de rega.

Discussão

Análise estrutural e propriedades físico-químicas das SsTLPs

A seca é um dos fatores ambientais mais impactantes sobre o crescimento, desenvolvimento das plantas, promovendo de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares (HE et al., 2020). Geralmente os estresses provocam uma resposta sistêmica nas plantas, envolvendo genes de diferentes órgãos e tecidos (BARTLETT et al., 2016). Estudos apontam para o envolvimento de várias vias de sinalização na regulação da expressão de genes PR após estresse abiótico (ALI et al., 2018) incluindo seca e salinidade (WU et al., 2016). Dentre as PR-5, as TLP destacam-se por sua participação na defesa vegetal frente a diferentes tipos de estresses (CAO et al., 2016; AN et al., 2019).

Baseado no transcriptoma (RNA-Seq) de *S. Scabra* nós identificamos 64 TLPs em comparação com 19, 37, 28 e 35 TLPs na cevada, *Oryza sativa*, *Brachypodium* e sorgo, respectivamente (IQBAL et al., 2020); 28 TLPs em *Cucumis melo* (LIU et al., 2020) e *Arabidopsis* (SHATTERS et al., 2006); 29 em *Brassica napus* (Wang et al., 2020); 33 em *Vitis vinifera* (YAN et al., 2017); 55 em *Populus trichocarpa* (ZHAO; SU, 2010) e 56 em *Vigna unguiculata* (JESÚS-PIRES et al., 2020). Essa variação no número de genes codificadores para TLPs é esperado, devido os papéis significativos das TLPs associados à resposta a estresses (JESÚS-PIRES et al., 2020) e indica uma variação considerável na expansão dos genes TLPs entre os diferentes grupos das plantas (SU et al., 2021).

Diversos estudos apontam que as TLPs podem apresentar pontos isoelétricos ácidos ou básicos e são proteínas de baixa massa molecular (18 a 26 kDa) (BREITENEDER, 2004; LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010; WANG et al., 2010). As SsTLPs apresentaram em média 211 aminoácidos, com pI de 4,14 a 9,06 e massa molecular entre 18,77 kDa e 24,28 kDa. Estudos anteriores revelaram as proteínas PR estão localizadas em todos os órgãos da planta, encontradas predominantemente em botões florais, epiderme, raízes e folhas, constituindo 5% a 10% da proteína total da folha e acumuladas no vacúolo, quando sujeitas a ataques patógenos (JAMI et al., 2007; LAROSA et al., 1992; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006) ou preditas na região extracelular (SAMAC et al., 2011). Neste estudo, a maioria das TLPs foi predita na região extracelular, enquanto cerca de 15% foram preditas no

vacúolo. Dados semelhantes foram reportados por Tachi et al. (2009) avaliando a expressão de TLPs em raízes de soja (*Glycine max*) sob estresse salino, observaram que a maioria das TLPs foram preditas na região extracelular (as demais permaneceram no vacúolo), assim como em algodão herbáceo (*Gossypium hirsutum*) sob seca (LI et al., 2020).

A maioria das SsTLPs apresentou um peptídeo sinal N-terminal e, pelo menos, um domínio transmembrana, tal como observado em algodão (LI et al., 2020) e melão (LIU et al., 2020). Tais sequências estão presentes na maioria das TLPs, sendo cruciais para o direcionamento às vias secretoras, indicando seu papel de defesa como proteínas extracelulares (SINGH et al., 2013; WANG et al., 2011). As SsTLPs identificadas apresentaram três domínios conservados: Thaumatin, TLP-PA e a superfamília GH64-TLP-SF, ambos apresentando alta similaridade com a taumatina, conforme reportado em *Populus szechuanica* sob infecção do fungo *Melampsora laricis-populina* (CHEN et al., 2016).

O alinhamento das SsTLPs revelou 16 resíduos de cisteína altamente conservados na maioria das sequências, responsáveis pela formação de pontes de dissulfeto, permitindo o dobramento correto e conferindo estabilidade à proteína (FIERENS et al., 2009). O alinhamento das SsTLPs revelou aminoácidos altamente conservados e correspondentes ao motivo de assinatura (G-X-[GF]-X-C-X-T-[GA]-D-C-X(1,2)-[GQ]-X(2,3)-C) presente em toda a família de proteínas PR-5 (JESÚS-PIRES et al., 2020; TACHI et al., 2009). O motivo REDDD [arginina (R), ácido glutâmico (E) e três resíduos de ácido aspártico(D)] mostrou-se presente na maioria das SsTLPs, exceto algumas sequências que apresentaram substituição no aminoácido arginina (R) por Lisina (K). Esse tipo de alteração resulta em variações na topologia e no potencial eletrostático da superfície da proteína, indicando especificidade de função dessas TLPs. Esse motivo é fundamental para a estabilidade das TLPs sob condições de estresse (BATALLIA et al., 1996; FAILLACE et al., 2021; MIN et al., 2004). Diversos estudos relataram a presença de tais motivos em TLPs de várias espécies, como *Arabidopsis* e arroz (KAUR et al., 2020), melão (LIU et al., 2020) e uva (YAN et al., 2017).

A estrutura secundária das SsTLPs relevou até duas α -hélices e doze a quatorze folhas- β , no melão, as TLPs possuíam de até quatro α -hélices e quatorze folhas- β (LIU et al., 2020), tipicamente as TLPs possuem essa estrutura com predominância

de folhas- β que são cruciais para a sua função e para a estabilidade dessas moléculas (LIU; STURROCK; EKRAMODDOULLAH, 2010).

Análise fenética e motivos conservados

Devido à composição de suas sequências, as proteínas TLPs são parafiléticas, originadas de 10 ancestrais comuns, antes da diferenciação de monocotiledôneas e dicotiledôneas (KOHLE et al., 2008; LIU; ZAMANI; EKRAMODDOULLAH, 2010; SHATTERS et al., 2006). Neste estudo, as SsTLPs e TLPs de outras espécies foram distribuídas em 10 grupos, de forma relativamente dispersa, semelhante aos resultados obtidos em *Arabidopsis* (LIU; ZAMANI; EKRAMODDOULLAH, 2010), algodão (LI et al., 2020) e melão (LIU et al., 2020). A distribuição dispersa das SsTLPs nos grupos indica semelhanças estruturais e funcionais com TLPs de outras espécies conforme descrito por Wang et al. (2011), essa variação na distribuição das SsTLPs ocorre em razão da duplicação diferencial de genes da família TLP (SHARMA et al., 2022), e sugere que as TLPs podem desempenhar diferentes funções sob distintos tipos de estresses e de fases de crescimento da planta (SU et al., 2021). A ausência de SsTLPs no grupo dois sugere que as TLPs de *S. scabra* compartilham 9 dos 10 genes ancestrais comuns de outras plantas. Todos os grupos compostos com SsTLPs possuíram TLPs de leguminosas, apontando a alta similaridade das TLPs dessa família.

As sequências de aminoácidos de SsTLPs foram divididas em nove grupos, com 9 motivos altamente conservados (dos 16 preditos) e algumas sequências possuíram motivos exclusivos. Essas especificidades de sequências são comumente encontradas nas TLPs das plantas e demonstram que alguns aminoácidos sofreram diversificação de seleção (PETRE et al., 2011), no entanto, devido à riqueza de cisteínas e alta conservação do motivo REDDD, as SsTLPs apresentam conservação elevada, indicando semelhança funcional das TLPs, enquanto as alterações na molécula indicam especificidade funcional (FAILLACE et al., 2021; MIN et al., 2004).

Expressão diferencial das SsTLPs

As plantas respondem a estresses abióticos por meio da regulação da expressão gênica que eventualmente resulta na renovação da desintoxicação de toxinas,

homeostase celular e na recuperação do crescimento (SUBRAMANYAM et al., 2011). Sob restrição hídrica, as TLPs desempenham uma função defensiva, mantendo assim a integridade da membrana celular (DAS et al., 2011) através da compartimentalização de solutos no vacúolo e no espaço intercelular e pela regulação da expressão gênica, além da ativação das vias de sinalização (CHOWDHURY; BASU; KUNDU, 2017; MANGHWAR; HUSSAIN, 2022).

Para analisar a função dos genes TLP de *S. scabra*, os genes SsTLPs diferencialmente expressos no transcriptoma radicular foram utilizados como candidatos na análise de expressão no tecido radicular sob supressão de rega, nos tempos 6 h, 24 h e 48 h após e 6 horas após reidratação.

O estudo de expressão via RT-qPCR, a maioria das SsTLPs analisadas mostraram superexpressão em todos os tempos testados. A maioria das SsTLPs continuaram sendo moduladas positivamente, embora com menor nível de expressão. Esse aumento da indução dos genes SsTLPs durante o estresse, seguido da diminuição após a reidratação, demonstra a atuação efetiva das TLPs em *S. scabra* durante a restrição hídrica, principalmente nos primeiros tempos de estresse.

Por exemplo, o gene SsTLP19, induzido em todos os tempos, apresentou aumento de expressão até 24 h, no entanto, após 48 houve um declínio significativo, porém, continuou induzido. Em condições de seca, essa tendência também tem sido reportada em TLPs de diversas espécies, a exemplo TLPs de *C. komarovii* (uma planta adaptada do deserto) (Wang et al., 2011) e de *G. hirsutum* (algodão herbáceo) (LI et al., 2020). Após 6 h de reidratação, a expressão do SsTLP19 não foi significativa, indicando que sua participação foi particularmente importante nos primeiros momentos de deficiência hídrica, quando a planta ainda estava sob influência do estresse.

Com exceção da SsTLP47, as SsTLPs analisadas apresentaram maior indução nos tratamentos 24 h e 48 h (a maioria superexpressas), indicando atuação mais efetiva das SsTLPs frente à restrição hídrica. Já o gene SsTLP47, o qual não apresentou diferença de expressão no tempo de 6 horas, nos tempos de 24 e 48 horas de supressão de rega estava reprimido, indicando que essa TLP pode atuar em mecanismos fisiológicos diferentes da resposta de tolerância a seca, tal como o crescimento e desenvolvimento das plantas, tal como reportado por Munis et al. (2010), onde a GbTLP1 foi fundamental para o desenvolvimento da parede celular secundária da fibra de algodão (*Gossypium barbadense* L.).

Conclusão

Neste estudo foi possível identificar 64 TLPs da *S. scabra* que apresentaram a configuração canônica semelhante às TLPs descritas em outras plantas. Na análise de expressão diferencial, a maioria das SsTLPs foram altamente induzidas nos tempos testados, indicando que elas desempenham um papel na resposta ao estresse salino na espécie estudada. As TLPs mostram-se candidatos valiosos para o desenvolvimento de espécies mais tolerantes a fatores de estresse, principalmente a supressão de rega.

Referências

- ACHARYA, K. et al. Overexpression of *Camellia sinensis* Thaumatin-Like Protein, CsTLP in Potato Confers Enhanced Resistance to *Macrophomina phaseolina* and *Phytophthora infestans* Infection. **Molecular Biotechnology**, v. 54, n. 2, p. 609–622, 1 jun. 2013. <https://doi.org/10.1007/s12033-012-9603-y>.
- AGARWAL, P.; VARSHNEY, K. A. A proteomic and targeted metabolomic approach to investigate changes in *Stylosanthes scabra* Vogel plants in relation to NaCl salinity. **Indian Journal of Scientific Research**, v. 10, n. 1, p. 85–89, 1 ago. 2019. <https://doi.org/10.32606/IJSR.V10.I1.0001>.
- ALI, G. S.; HU, X.; REDDY, A. S. N. Overexpression of the *Arabidopsis* thaumatin-like protein 1 in transgenic potato plants enhances resistance against early and late blights. **bioRxiv**, p. 621649, 29 abr. 2019. <https://doi.org/10.1101/621649>.
- AN, M. et al. Molecular Characterization of the Thaumatin-like Protein PR-NP24 in Tomato Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 67, n. 47, p. 13001–13009, 27 nov. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05256>.
- ARAÚJO, F. C. **Expressão diferencial e respostas fisiológicas de *Stylosanthes scabra* sob déficit hídrico**. 2019. 167 f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2019.
- BARTLETT, M. K. et al. The correlations and sequence of plant stomatal, hydraulic, and wilting responses to drought. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 46, p. 13098–13103, 15 nov. 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604088113>.

BATALIA, M. A. et al. The crystal structure of the antifungal protein zeamatin, a member of the thaumatin-like, PR-5 protein family. **Nature Structural Biology**, v. 3, n. 1, p. 19–22, jan. 1996. <https://doi.org/10.1038/nsb0196-19>.

BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins -- a new family of pollen and fruit allergens. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 479–481, maio 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00421.x>.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 1 abr. 2009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.

CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. New species, nomenclatural changes and recent taxonomic studies in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae): An update. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 4, n. 2, p. 122–128, 27 maio 2016. [https://doi.org/10.17138/tgft\(4\)122-128](https://doi.org/10.17138/tgft(4)122-128).

CAO, J. et al. Expansion and evolution of thaumatin-like protein (TLP) gene family in six plants. **Plant Growth Regulation**, v. 79, n. 3, p. 299–307, jul. 2016. <https://doi.org/10.1007/s10725-015-0134-y>.

CHANDRA, A. Biotechnology of *Stylosanthes*. In: JAIN, S. M.; DUTTA GUPTA, S. (Eds.). *Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops*. Dordrecht: **Springer Netherlands**, p. 217–241, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5500-0>.

CHANDRA, A.; PATHAK, P.; BHATT, R. *Stylosanthes* research in India: Prospects and challenges ahead. **Current Science**, v. 90, 10 abr. 2006.

CHEN, C. et al. TBtools: An Integrative Toolkit Developed for Interactive Analyses of Big Biological Data. **Molecular Plant**, v. 13, n. 8, p. 1194–1202, ago. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2020.06.009>.

CHEN, Z. J. et al. Cloning and characterization of defense-related genes from *Populus szechuanica* infected with rust fungus *Melampsora larici-populina*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 22 fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017314>.

CHOWDHURY, S.; BASU, A.; KUNDU, S. Overexpression of a New Osmotin-Like Protein Gene (SindOLP) Confers Tolerance against Biotic and Abiotic Stresses in Sesame. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00410>.

CHRISTENSEN, A. B. et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular**

Plant Pathology, v. 3, n. 3, p. 135–144, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00105.x>.

COLE, C.; BARBER, J. D.; BARTON, G. J. The Jpred 3 secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl_2, p. W197–W201, 1 jul. 2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn238>.

DAS, M. et al. High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin. **Transgenic Research**, v. 20, n. 2, p. 231–246, abr. 2011. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9405-6>.

EISEN, M. B. et al. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 25, p. 14863–14868, 8 dez. 1998. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>.

FAILLACE, G. R. et al. Molecular Characterisation of Soybean Osmotins and Their Involvement in Drought Stress Response. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 632685, 25 jun. 2021. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.632685>.

FERREIRA-NETO et al. Decoding *S. scabra*: dehydration response mechanisms and identification of potential microbial hosts, (*in prep*), 2021.

FIERENS, E. et al. Biochemical and structural characterization of TLXI, the *Triticum aestivum* L. thaumatin-like xylanase inhibitor. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 646–654, 1 jun. 2009. <https://doi.org/10.1080/14756360802321831>.

FINN, R. D.; CLEMENTS, J.; EDDY, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. suppl_2, p. W29–W37, 1 jul. 2011. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr367>.

GHOSH, R.; CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. **Planta**, v. 228, n. 5, p. 883–890, out. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0790-5>.

HAYASHI, M. et al. A Thaumatin-Like Protein, Rj4, Controls Nodule Symbiotic Specificity in Soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 9, p. 1679–1689, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu099>.

HE, C. et al. Early Drought-Responsive Genes Are Variable and Relevant to Drought Tolerance. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1657–1670, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401199>.

HE, R. et al. Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. **Protoplasma**, v. 254, n. 4, p. 1579–1589, jul. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1047-y>.

IQBAL, I. et al. Thaumatin-Like Protein (TLP) Gene Family in Barley: Genome-Wide Exploration and Expression Analysis during Germination. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1080, 16 set. 2020. <https://doi.org/10.3390/genes11091080>.

JAMI, S. K. et al. Molecular, biochemical and structural characterization of osmotin-like protein from black nightshade (*Solanum nigrum*). **Journal of Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 238–252, 7 mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.01.006>.

JESÚS-PIRES, C. et al. Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 1, p. 36–51, 27 jan. 2020. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190318164905>.

KAUR, A. et al. Physico-chemical characterization and topological analysis of pathogenesis-related proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* using in-silico approaches. **PLOS ONE**, v. 15, n. 9, p. e0239836, 28 set. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0239836>.

KOHLER, A. et al. Genome-wide identification of NBS resistance genes in *Populus trichocarpa*. **Plant Molecular Biology**, v. 66, n. 6, p. 619–636, 1 abr. 2008. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9293-9>.

KROGH, A. et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden markov model: application to complete genomes¹¹Edited by F. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 305, n. 3, p. 567–580, 19 jan. 2001. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4315>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LAROSA, P. C. et al. Osmotin Gene Expression Is Posttranscriptionally Regulated 1. **Plant Physiology**, v. 100, n. 1, p. 409–415, set. 1992. <https://doi.org/10.1104/pp.100.1.409>.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W242–W245, 8 jul. 2016. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.

LI, Z. et al. Comprehensive Genome-Wide Analysis of Thaumatin-Like Gene Family in Four Cotton Species and Functional Identification of GhTLP19 Involved in

Regulating Tolerance to *Verticillium dahlia* and Drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 575015, 20 out. 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575015>.

LIU, J.-J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 419–436, maio 2010. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0826-8>.

LIU, W. et al. bHLH122 is important for drought and osmotic stress resistance in *Arabidopsis* and in the repression of ABA catabolism. **New Phytologist**, v. 201, n. 4, p. 1192–1204, 2014. <https://doi.org/10.1111/nph.12607>.

LIU, W.-X. et al. *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. **Molecular Plant**, v. 6, n. 5, p. 1487–1502, set. 2013. <https://doi.org/10.1093/mp/sst031>.

LIU, Y. et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the TLP gene family in melon (*Cucumis melo* L.). **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2499–2509, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.001>.

MANGHWAR, H.; HUSSAIN, A. Mechanism of tobacco osmotin gene in plant responses to biotic and abiotic stress tolerance: A brief history. **BIOCELL**, v. 46, n. 3, p. 623–632, 2022. <https://doi.org/10.32604/biocell.2022.017316>.

MARQUES, A. et al. Origin and parental genome characterization of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. **Annals of Botany**, v. 122, n. 7, p. 1143–1159, 4 dez. 2018. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy113>.

MIN, K. et al. Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 54, n. 1, p. 170–173, 2004. <https://doi.org/10.1002/prot.10571>.

MISRA, R. C. et al. A thaumatin-like protein of *Ocimum basilicum* confers tolerance to fungal pathogen and abiotic stress in transgenic *Arabidopsis*. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 25340, jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/srep25340>.

MUNIS, M. F. H. et al. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 393, n. 1, p. 38–44, 26 fev. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.01.069>.

MUOKI, R. C. et al. Membrane localized thaumatin-like protein from tea (CSTLP)

enhanced seed yield and the plant survival under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 163, p. 36–44, jun. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.012>.

NEALE, A. D. et al. Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **The Plant Cell**, v. 2, n. 7, p. 673–684, jul. 1990. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.7.673>.

PETERSEN, T. N. et al. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. **Nature Methods**, v. 8, n. 10, p. 785–786, out. 2011. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>.

PETRE, B. et al. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 33, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-33>.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. e36, 1 maio 2002. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.e36>.

RASHEED, S. et al. Transcriptomic Analysis of Soil-Grown *Arabidopsis thaliana* Roots and Shoots in Response to a Drought Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 180, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00180>.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTEWERT, C.; NAKAGAWARA, K.-I. (Eds.). *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2001. p. 21–34. https://doi.org/10.1007/978-3-642-59524-0_3.

READ, T., VANCE, D., AND BLUEPRINTS, S. Robust Clustering: A Comparison of Sun™ Cluster 3.0 versus Sun Cluster 2.2 Software. **Sun BluePrints™ OnLine**, 2001, 1-23.

RESENDE, R. M. S. et al. Genotypic evaluation of accessions and individual selection in *Stylosanthes* spp. by simulated BLUP method. **Cropps Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 253–260, 31 dez. 2006.

ROBINSON, M. D.; MCCARTHY, D. J.; SMYTH, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. **Bioinformatics**, v. 26, n. 1, p. 139–140, 1 jan. 2010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.

SALDANHA, A. J. Java Treeview—extensible visualization of microarray data.

Bioinformatics, v. 20, n. 17, p. 3246–3248, 22 nov. 2004.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth349>.

SALZMAN, R. A. et al. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a developmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. **Plant Physiology**, v. 117, n. 2, p. 465–472, jun. 1998. <https://doi.org/10.1104/pp.117.2.465>.

SAMAC, D. A. et al. Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 8, p. 786–798, out. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00712.x>.

SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology Insights**, v. 14, p. 1177932220952739, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1177/1177932220952739>.

SEO, P. J. et al. Molecular and Functional Profiling of *Arabidopsis* Pathogenesis-Related Genes: Insights into Their Roles in Salt Response of Seed Germination. **Plant and Cell Physiology**, v. 49, n. 3, p. 334–344, 1 mar. 2008. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn011>.

SHARMA, A. et al. Molecular Characterization Revealed the Role of Thaumatin-Like Proteins of Bread Wheat in Stress Response. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.807448>.

SHATTERS, R. G. et al. Phylogenetic and Structural Relationships of the PR5 Gene Family Reveal an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Taxa. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 1, p. 12–29, 1 jul. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0053-z>.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 6 nov. 2006. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>.

SHU, Y. et al. Transcriptome sequencing and expression profiling of genes involved in the response to abiotic stress in *Medicago ruthenica*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, p. 638–648, 28 jun. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0284>.

SIEVERS, F.; HIGGINS, D. G. Clustal Omega, Accurate Alignment of Very Large Numbers of Sequences. In: RUSSELL, D. J. (Ed.). **Multiple Sequence Alignment**

Methods. Methods in Molecular Biology. Totowa, NJ: Humana Press, p. 105–116, 2014. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-646-7_6.

SINGH, N. K. et al. Characterization of a Pathogen Induced Thaumatin-Like Protein Gene AdTLP from *Arachis diogeni*, a Wild Peanut. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83963, 19 dez. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083963>.

SU, L. et al. Analysis of the thaumatin-like genes of *Rosa chinensis* and functional analysis of the role of RcTLP6 in salt stress tolerance. **Planta**, v. 254, n. 6, p. 118, 10 nov. 2021. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03778-y>.

SUBRAMANYAM, K. et al. Ectopic expression of an osmotin gene leads to enhanced salt tolerance in transgenic chilli pepper (*Capsicum annum* L.). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v. 105, n. 2, p. 181–192, 1 maio 2011. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9850-1>.

SUBRAMANYAM, K. et al. Overexpression of tobacco osmotin (Tbosm) in soybean conferred resistance to salinity stress and fungal infections. **Planta**, v. 236, n. 6, p. 1909–1925, 1 dez. 2012. <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1733-8>.

TACHI, H. et al. Molecular characterization of a novel soybean gene encoding a neutral PR-5 protein induced by high-salt stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 1, p. 73–79, jan. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.09.012>.

TARDIEU, F. et al. Genetic and Physiological Controls of Growth under Water Deficit. **Plant Physiology**, v. 164, n. 4, p. 1628–1635, 1 abr. 2014. <https://doi.org/10.1104/pp.113.233353>.

THUMMA, B. R. et al. Identification of causal relationships among traits related to drought resistance in *Stylosanthes scabra* using QTL analysis. **Journal of Experimental Botany**, v. 52, n. 355, p. 203–214, 1 fev. 2001. <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.355.203>.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Web Server, p. W71–W74, 8 maio 2007. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm306>.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, set. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>.

WANG, Q. et al. Purification and Characterization of a CkTLP Protein from *Cynanchum komarovii* Seeds that Confers Antifungal Activity. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16930, 22 fev. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016930>.

WANG, T. et al. Identification, evolution and expression analyses of whole genome-wide TLP gene family in *Brassica napus*. **BMC Genomics**, v. 21, n. 1, p. 1–14, 2020. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6678-x>

WANG, X. et al. Characterization of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaPR5 from wheat induced by stripe rust fungus. **Physiologia Plantarum**, v. 139, n. 1, p. 27–38, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2009.01338.x>.

WU, J. et al. Overexpression of a Pathogenesis-Related Protein 10 Enhances Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 6, p. 552–562, 1 dez. 2016. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2016.0141>.

YAN, X. et al. Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TLP29 contributes to disease resistance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4269, dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04105-w>.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

ZHANG, M. et al. Antifungal properties of a thaumatin-like protein from watermelon. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 11, p. 186, 6 out. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2759-8>.

ZHAO, J. P.; SU, X. H. Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. **Planta**, v. 232, n. 4, p. 949–962, set. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1218-6>.

ZHU, J.-K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. **Cell**, v. 167, n. 2, p. 313–324, 6 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>.

Material Suplementar

Tabela S1– Genes de referência e alvos (SsTLPs) para reações de PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR), com base na literatura e identificados no transcriptoma de *S. scabra* sob supressão de rega.

Gene	Anotação	Amplicon (bp)	Primer	Referência	Espécies	Eficiência (%)
			Forward (F) / Reverse (R)			
F-Box	Proteína F-box	163	(F) CACCAGGATGCAAAAGTGG (R) ATCCGCTTGTCCCTTGAAC	Araújo (2019)	<i>S. scabra</i>	104
UBQ10	Polibiquitina 10	140	(F) TGGCAGACTA CAACATCCAG (R) CACATTATCG ATTGTGTCAG AG	Araújo (2019)	<i>S. scabra</i>	92,2
β-TUB2	Beta-tubulina 2	117	(F)CCGTTGTGGAGCCTTACAAT (R) GCTTGAGGGTCCTGAAACAA	Araújo (2019)	<i>S. scabra</i>	98,25
Alvos						
SsTLP3	Taumatina 3	129	(F) GTTGTTGGAGCATCCTGTCC (R) CAAGCTAACCAAGGCAGTCC	Este estudo	<i>S. scabra</i>	94
SsTLP4	Taumatina 4	101	(F) AGATGCTGGTGTGGCTTCTC (R) GGACAGGATGCTCCAACAAC	Este estudo	<i>S. scabra</i>	96,9
SsTLP19	Taumatina 19	134	(F) CATGTTCTTTGCCGAAG (R) AAACCAGAAATCGGAACCAC	Este estudo	<i>S. scabra</i>	101,2
SsTLP46	Taumatina 46	147	(F) TGACCCTAAATCCGAACCAG (R) GCTTATGATGATGCCACCAG	Este estudo	<i>S. scabra</i>	107,2
SsTLP47	Taumatina 47	105	(F) ATCACCGAACGCTTCACAC (R) GATTTGAATGGTGGGTGTCC	Este estudo	<i>S. scabra</i>	95,8

Figura S1– Curvas de eficiência para os genes de referência e alvos obtidos nos ensaios de RT-qPCR no tecido radicular de *S. Scabra*.

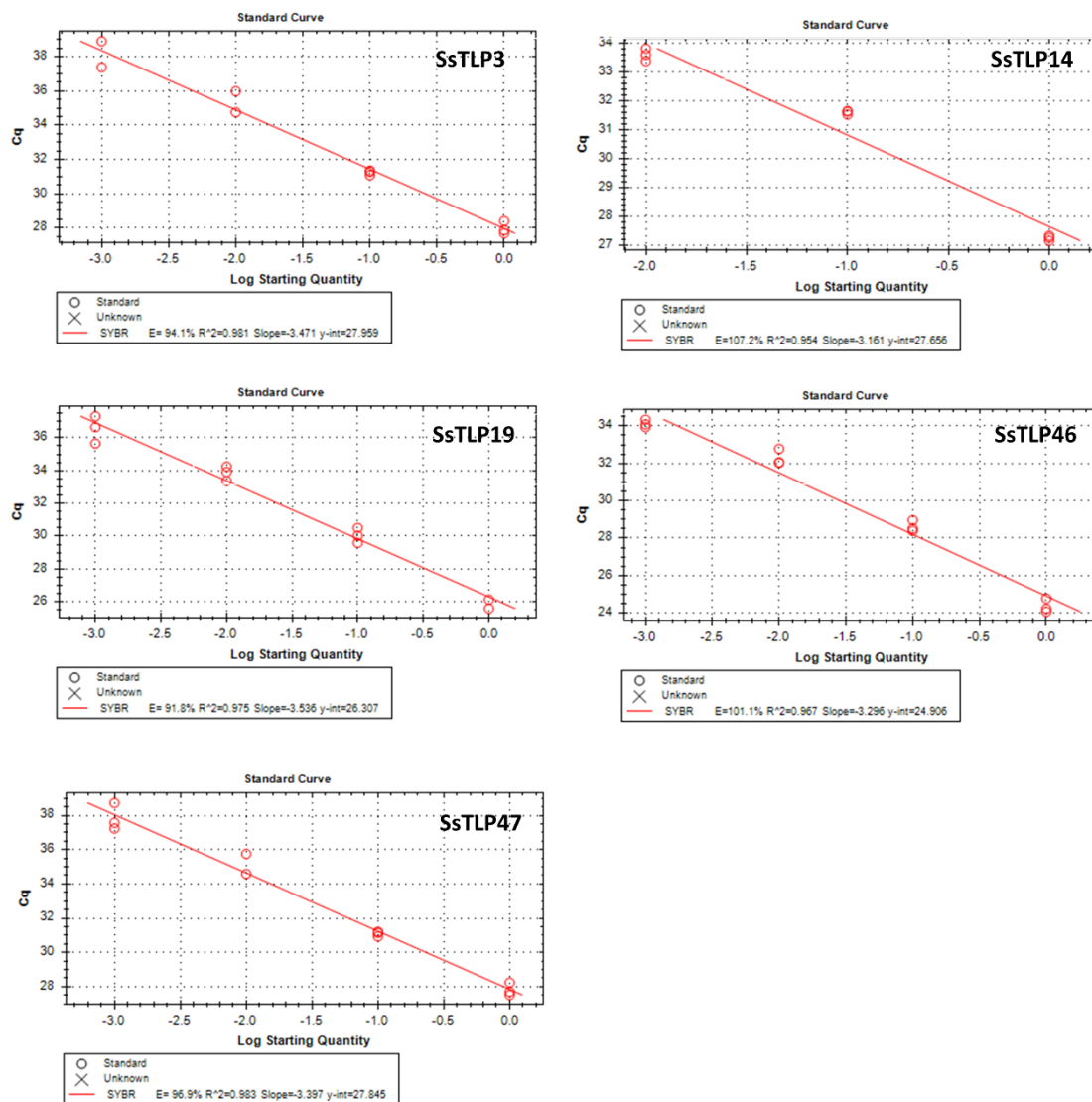
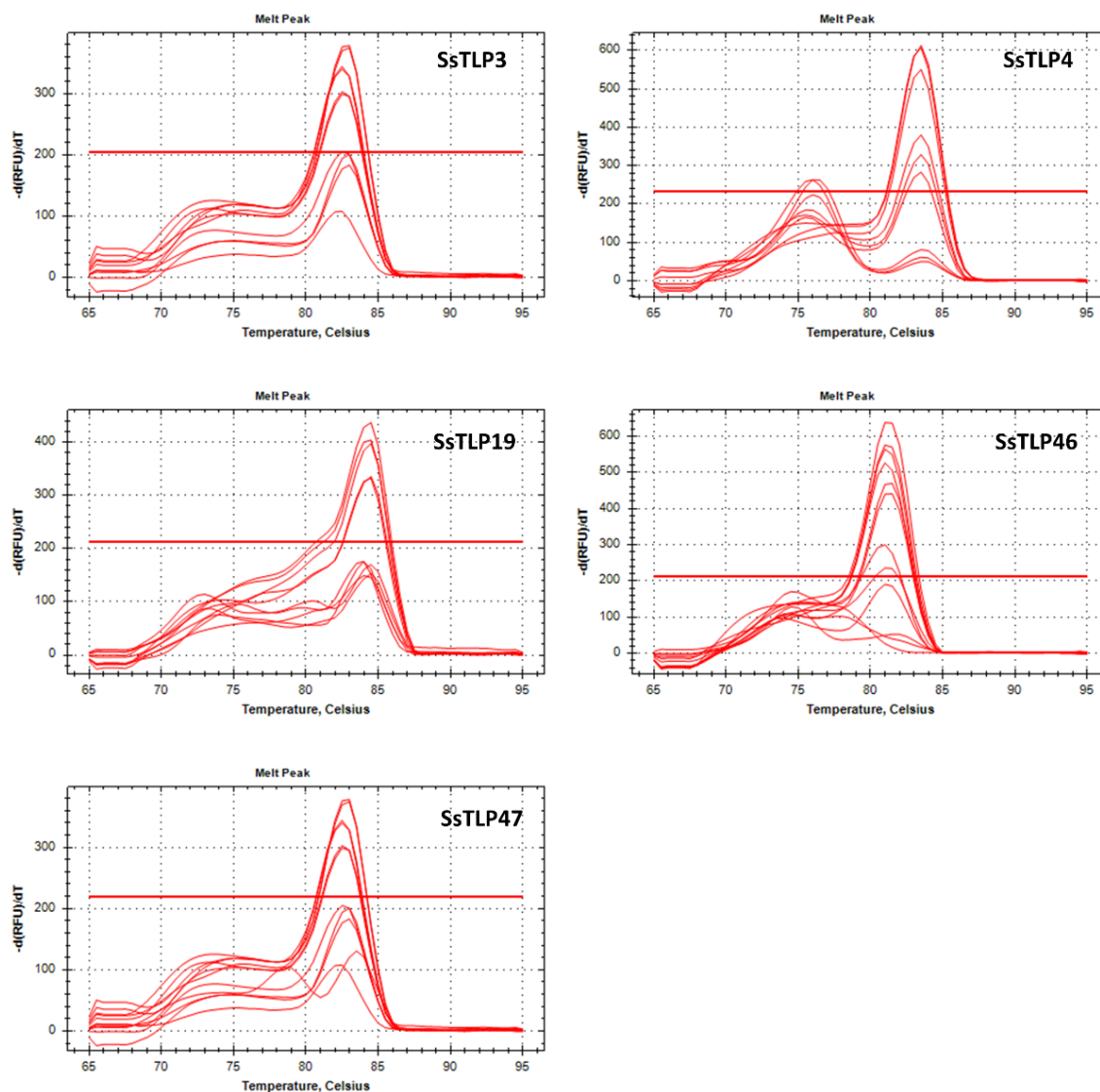


Figura S2– Curvas de *Melting* para os genes de referência e alvos obtidos nos ensaios de RT-qPCR no tecido radicular de *S. Scabra*.



5 CONCLUSÕES

- Neste estudo foi possível identificar e caracterizar TLPs nos transcriptomas de *C. pyramidale* e *S. Scabra*, sendo identificadas 36 e 64 TLPs em *C. pyramidale* e *S. Scabra*, respectivamente.
- As TLPs identificadas apresentaram características estruturais e funcionais semelhantes às descritas na literatura.
- As TLPs analisadas via RT-qPCR apresentaram expressão diferencial (induzidas ou reprimidas) em resposta aos estresses estudados. Na catingueira, as TLPs apresentaram perfis de expressão distintos nos tecidos folha e raiz, sugerindo que as TLPs podem ter funções diferentes de acordo com o tecido onde são expressas.

6 SÚMULA CURRICULAR

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1633031262017450>

Maria Cidinaria Silva Alves

Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Alagoas - UNEAL, Brasil (2017) e Especialização Lato Sensu em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Cândido Mendes- UCAM, Brasil (2019). Mestranda pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia Vegetal na Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Brasil. Dedica-se em pesquisas com foco na identificação de genes codificadores de proteínas TLPs envolvidos na tolerância de espécies nativas do semiárido à estresses abióticos por meio da Bioinformática a Biologia molecular no Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), Departamento de Genética, UFPE, sob a orientação do Prof. Dr^a Valesca Pandolfi.

Formação complementar

2020 - Soluções biotecnológicas aplicadas às ações de enfrentamento à COVID-19. Carga horária: 45h. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2020 - Curso de Biossegurança. Carga horária: 45h. Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil.

2020 - Filogenia: pequena-escala (Filogenética) e larga-escala (Filogenômica). Carga horária: 15h. Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.

2019 - O Curso Teórico-Prático de Introdução a Bioinformática. Carga horária: 20h. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

2019 - BIOINFORMÁTICA BÁSICA: “Anotação de Genes e Famílias gênicas”. Carga horária: 20h. Universidade Federal de Pernambuco., UFPE, Brasil.

Artigos completos publicados em periódicos

ALVES, M. C. S.; ALMEIDA, D. H. Identificação da meso e macrofauna edáfica na Reserva Estância São Luiz e uma área sob o cultivo de palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*). *Diversitas Journal*, 5 (3), 1671-1690. 2020.
<https://doi.org/10.17648/diversitas-journal-v5i3-954>.

Resumos publicados em anais de congressos

ALVES, M. C. S.; FARIA, G. F. A. F.; PIRES, C. D. J.; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V. Expressão Diferencial *In Silico* De PR-5 No Transcriptoma De *Cenostigma Pyramidale* Sob Estresse Abiótico. In: III Simpósio de Biotecnologia Vegetal: Inovação, Sustentabilidade e Impactos para a Sociedade., 2020, Campos dos Goytacazes. Anais - III Simpósio de Biotecnologia Vegetal: Inovação, Sustentabilidade e Impactos para a Sociedade, Campos dos Goytacazes, 2020.

ALVES, M. C. S.; ALMEIDA, D. H. Avaliação da mesofauna edáfica na reserva Estância São Luiz e em uma área sob o cultivo de palma forrageira (*Nopalea cochenillifera*) In: Encontro de Entomologia e Conservação da Biodiversidade, 2020. Encontro de Entomologia e Conservação da Biodiversidade, 2020.

ALVES, M. C. S.; SANTOS, M. I. A. G. Entomofauna Edáfica Constituinte em Áreas de Diferentes Manejos na Caatinga de Alagoas In: I Simpósio de Biologia da UESPI: “Ciência e Ensino em Foco”, 2020. I Simpósio de Biologia da UESPI: “Ciência e Ensino em Foco”. Teresina: FUESPI, 2020.

Apresentações de trabalhos

ALVES, M. C. S.; PIRES, C. D. J.; FARIA, G. F. A. F.; LIMA, M. O.; ANDRADE, F. A.; ARAUJO, F. C.; BENKO-ISEPPON, A.M.; PANDOLFI, V. Prospecção e caracterização *in silico* de TLPS no transcriptoma de *Stylosanthes scabra* sob deficiência hídrica. 2021. (Apresentação de Trabalho/Outra).

ALVES, M. C. S.; FARIA, G. F. A. F.; PIRES, C. D. J.; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V. Caracterização Estrutural de Proteínas do Tipo PR-5 em *Cenostigma pyramidale* Sob Estresse Salino. 2020. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

ALVES, M. C. S. Conservação e uso dos recursos genéticos vegetais. 2020. (Apresentação de Trabalho/Outra).

ALVES, M. C. S.; FARIA, G. F. A. F.; PIRES, C. D. J.; BENKO-ISEPPON, A. M.; PANDOLFI, V. Expressão Diferencial *in silico* de PR-5 no Transcriptoma de *Cenostigma pyramidale* Sob Estresse Abiótico. 2020. (Apresentação de Trabalho/Simpósio).

Curso de curta duração ministrado

ALVES, M. C. S. Bioinformática: Conhecendo as ferramentas para análise de dados de sequenciamento de nova geração. 2019.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A. et al. Application of real-time RT-PCR in vector surveillance and assessment of replication kinetics of an emerging novel ECSA genotype of Chikungunya virus in *Aedes aegypti*. **Journal of Virological Methods**, v. 193, n. 2, p. 419–425, 1 nov. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.004>.
- ALI, J. et al. Molecular Genetics and Breeding for Nutrient Use Efficiency in Rice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1762, jun. 2018a. <https://doi.org/10.3390/ijms19061762>.
- ALI, S. et al. Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 39, n. 12, p. 1–15, 2017. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2565-8>.
- ALI, S. et al. Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. **Microbiological Research**, v. 212–213, p. 29–37, jul. 2018b. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2018.04.008>.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 5 out. 1990. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2).
- ALVES, E. U. et al. Superação da dormência em sementes de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. **Revista Árvore**, v. 31, p. 405–415, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622007000300006>.
- ALVIANO, W. S. et al. In vitro antioxidant potential of medicinal plant extracts and their activities against oral bacteria based on Brazilian folk medicine. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 6, p. 545–552, jun. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.12.001>.
- AL-YASI, H. et al. Impact of drought on growth, photosynthesis, osmotic adjustment, and cell wall elasticity in Damask rose. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 150, p. 133–139, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.038>.
- ANDRADE, W. M. DE et al. Influência da precipitação na abundância de populações de plantas da caatinga. **Revista de Geografia**, v. 26, n. 2, p. 161–184, 2009. <https://doi.org/10.51359/2238-6211.2009.228763>.
- ANTONIOW, J. F. et al. Comparison of Three Pathogenesis-related Proteins from Plants of Two Cultivars of Tobacco Infected with TMV. **Journal of General Virology**, v. 47, n. 1, p. 79–87, 1 mar. 1980. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-47-1-79>.

ARAÚJO, E. et al. Ecofisiologia de plantas da caatinga e implicações na dinâmica das populações e do ecossistema. **Biodiversidade, potencial econômico e processos eco-fisiológicos em ecossistemas nordestinos**, p. 329–361, 1 jan. 2008.

ARCHAMBAULT, A.; STRÖMVIK, M. V. PR-10, defensin and cold dehydrin genes are among those over expressed in *Oxytropis* (Fabaceae) species adapted to the arctic. **Functional & Integrative Genomics**, v. 11, n. 3, p. 497–505, 1 set. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10142-011-0223-6>.

ASHRAF, M. A. et al. Chapter 8 - Environmental Stress and Secondary Metabolites in Plants: An Overview. In: AHMAD, P. et al. (Eds.). **Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress**. [s.l.] Academic Press, 2018. p. 153–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812689-9.00008-X>.

AVULA, K. et al. Role of Lipid Transfer Proteins (LTPs) in the Viral Life Cycle. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, p. 673509, 23 jun. 2021. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673509>.

BAKARE, O. O.; GOKUL, A.; KEYSTER, M. PR-1-Like Protein as a Potential Target for the Identification of *Fusarium oxysporum*: An *In Silico* Approach. **BioTech**, v. 10, n. 2, p. 8, jun. 2021. <https://doi.org/10.3390/biotech10020008>.

BALDIN, T.; MARCHIORI, J. N. C. Anatomia da madeira de *Albizia inundata* (Mart.) Barneby & J.W. Grimes (Fabaceae). **Balduinia**, n. 46, p. 25–31, 25 jul. 2014. <https://doi.org/10.5902/2358198014969>.

BARTELS, D.; SUNKAR, R. Drought and Salt Tolerance in Plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 24, n. 1, p. 23–58, 23 fev. 2005. <https://doi.org/10.1080/07352680590910410>.

BARTLETT, M. K. et al. The correlations and sequence of plant stomatal, hydraulic, and wilting responses to drought. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 46, p. 13098–13103, 15 nov. 2016. <https://doi.org/10.1073/pnas.1604088113>.

BEN REJEB, K.; ABDELLY, C.; SAVOURÉ, A. How reactive oxygen species and proline face stress together. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 278–284, 1 jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.007>.

BENKO-ISEPPON, A. 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, 27 dez. 2011. <https://doi.org/10.26848/rbgf.v4i6.232764>.

BOCCARDO, N. A. et al. Expression of pathogenesis-related proteins in transplastomic tobacco plants confers resistance to filamentous pathogens under field trials. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 2791, 26 fev. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39568-6>.

BRAGA, R. **Plantas do nordeste: especialmente do Ceará**. Natal: Fundação Guimarães Duque, 509 p., 1976.

BRANDAZZA, A. et al. Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals. **FEBS letters**, v. 572, n. 1–3, p. 3–7, 13 ago. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.003>.

BREITENEDER, H. Thaumatin-like proteins--a new family of pollen and fruit allergens. **Allergy**, v. 59, n. 5, p. 479–481, maio 2004. <https://doi.org/10.1046/j.1398-9995.2003.00421.x>.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 1, p. 23–39, ago. 2002. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0290023>.

CALLES, T.; SCHULTZE-KRAFT, R. New species, nomenclatural changes and recent taxonomic studies in the genus *Stylosanthes* (Leguminosae): An update. **Tropical Grasslands-Forrajes Tropicales**, v. 4, n. 2, p. 122–128, 27 maio 2016. [https://doi.org/10.17138/tgft\(4\)122-128](https://doi.org/10.17138/tgft(4)122-128).

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras, v. 5. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2014.

CHANDRA, A. Biotechnology of *Stylosanthes*. In: JAIN, S. M.; DUTTA GUPTA, S. (Eds.). Biotechnology of Neglected and Underutilized Crops. Dordrecht: **Springer Netherlands**, p. 217–241, 2013. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-5500-0>.

CHANDRA, A.; PATHAK, P.; BHATT, R. *Stylosanthes* research in India: Prospects and challenges ahead. **Current Science**, v. 90, 10 abr. 2006.

CHAVES, M. M.; FLEXAS, J.; PINHEIRO, C. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. **Annals of Botany**, v. 103, n. 4, p. 551–560, fev. 2009. <https://doi.org/10.1093/aob/mcn125>.

CHEN, T. H. H.; MURATA, N. Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications: Glycinebetaine against abiotic stress.

Plant, Cell & Environment, v. 34, n. 1, p. 1–20, jan. 2011.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02232.x>.

CHEN, Z. J. et al. Cloning and characterization of defense-related genes from *Populus szechuanica* infected with rust fungus *Melampsora larici-populina*. **Genetics and molecular research: GMR**, v. 15, n. 1, 22 fev. 2016. <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15017314>.

CHOUDHURY, F. K. et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. **The Plant Journal**, v. 90, n. 5, p. 856–867, 2017.
<https://doi.org/10.1111/tpj.13299>.

CHRISTENSEN, A. B. et al. The molecular characterization of two barley proteins establishes the novel PR-17 family of pathogenesis-related proteins. **Molecular Plant Pathology**, v. 3, n. 3, p. 135–144, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1364-3703.2002.00105.x>.

CHYE, M.-L. et al. An agglutinating chitinase with two chitin-binding domains confers fungal protection in transgenic potato. **Planta**, v. 220, n. 5, p. 717–730, mar. 2005.
<https://doi.org/10.1007/s00425-004-1391-6>.

COSTA, L. C. DA; SARTORI, Â. L. B.; POTT, A. Estudo Taxonômico de *Stylosanthes* (Leguminosae - Papilionoideae - Dalbergieae) em Mato Grosso do Sul, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, p. 547–572, set. 2008. <https://doi.org/10.1590/2175-7860200859310>.

DAI, L. et al. The Novel Gene VpPR4-1 from *Vitis pseudoreticulata* Increases Powdery Mildew Resistance in Transgenic *Vitis vinifera* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 0, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00695>.

DANTAS, B. F. et al. Taxas de crescimento de mudas de catingueira submetidas a diferentes substratos e sombreamentos. **Revista Árvore**, v. 33, p. 413–423, jun. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622009000300003>.

DEMARTELAERE, A. C. F. et al. Causas, consequências e métodos atribuídos para prevenir a desertificação na caatinga / Causes, consequences and methods attributed to prevent desertification in caatinga. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 8, p. 83270–83285, 20 ago. 2021. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n8-502>.

DOMBROSKI, J. L. D. et al. Water relations of Caatinga trees in the dry season. **South African Journal of Botany**, v. 77, n. 2, p. 430–434, 1 abr. 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.sajb.2010.11.001>.

DUMANOVIĆ, J. et al. The Significance of Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense System in Plants: A Concise Overview. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 2106, 2021. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.552969>.

EL-KEREAMY, A. et al. *Prunus domestica* Pathogenesis-Related Protein-5 Activates the Defense Response Pathway and Enhances the Resistance to Fungal Infection. **PLOS ONE**, v. 6, n. 3, p. e17973, 23 mar. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017973>.

ELSHARKAWY, M. M.; ELSAWY, M. M.; ISMAIL, I. A. Mechanism of resistance to Cucumber mosaic virus elicited by inoculation with *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. **Pest Management Science**, p. ps.6610, 26 ago. 2021. <https://doi.org/10.1002/ps.6610>.

EPPEL, P.; APEL, K.; BOHLMANN, H. An Arabidopsis thaliana Thionin Gene Is Inducible via a Signal Transduction Pathway Different from That for Pathogenesis-Related Proteins. **Plant Physiology**, v. 109, n. 3, p. 813–820, 1 nov. 1995. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.813>.

FERNANDES, M. F.; CARDOSO, D.; DE QUEIROZ, L. P. An updated plant checklist of the Brazilian Caatinga seasonally dry forests and woodlands reveals high species richness and endemism. **Journal of Arid Environments**, v. 174, p. 104079, 1 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.104079>.

FORTUNA-PEREZ, A. P.; SILVA, M. J. DA; TOZZI, A. M. G. DE A. *Stylosanthes* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergiae) no estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 62, p. 615–628, set. 2011. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201162310>.

FOUNTAIN, J. C. et al. Pathogenesis-related gene expressions in different maize genotypes under drought stressed conditions. **African Journal of Plant Science**, v. 4, n. 11, p. 433–440, 30 nov. 2010.

FROSI, G. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi and foliar phosphorus inorganic supply alleviate salt stress effects in physiological attributes, but only arbuscular mycorrhizal fungi increase biomass in woody species of a semiarid environment. **Tree Physiology**, v. 38, n. 1, p. 25–36, 1 jan. 2018. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpx105>.

FROSI, G. et al. Increase in biomass of two woody species from a seasonal dry tropical forest in association with AMF with different phosphorus levels. **Applied Soil Ecology**, v. 102, p. 46–52, jun. 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2016.02.009>.

FROSI, G. et al. Symbiosis with AMF and leaf Pi supply increases water deficit tolerance of woody species from seasonal dry tropical forest. **Journal of Plant Physiology**, v. 207, p. 84–93, dez. 2016b. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2016.11.002>.

FROSI, G. et al. Transcriptome of *Cenostigma pyramidale* roots, a woody legume, under different salt stress times. **Physiologia Plantarum**, p. ppl.13456, 24 maio 2021. <https://doi.org/10.1111/ppl.13456>.

GARCÍA-OLMEDO, F. et al. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. **Trends in Microbiology**, v. 3, n. 2, p. 72–74, 1 fev. 1995. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)88879-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)88879-4).

GAVROVIĆ-JANKULOVIĆ, M. et al. Isolation and biochemical characterization of a thaumatin-like kiwi allergen. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 5, p. 805–810, nov. 2002. <https://doi.org/10.1067/mai.2002.128947>.

GHOSH, R.; CHAKRABARTI, C. Crystal structure analysis of NP24-I: a thaumatin-like protein. **Planta**, v. 228, n. 5, p. 883–890, out. 2008. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0790-5>.

GISSI, D.S. 2020. **Stylosanthes in Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB29854>>. Acesso em: 24 jul. 2021.

GIULIETTI, A. M.; DE QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. D. G. L.; VAN DEN BERG, C. A. S. S. I. O. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. **MEGADIVERSIDADE**, v. 1, n. 1, 2005.

GOMES-NETO, V. Caracterização de genes de Mamona (*Ricinus communis* L.) associados a tolerância a estresses abióticos. 2021. 199 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2021.

GREEN, T. R.; RYAN, C. A. Wound-Induced Proteinase Inhibitor in Plant Leaves: A Possible Defense Mechanism against Insects. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 776–777, 18 fev. 1972. <https://doi.org/10.1126/science.175.4023.776>.

GREENSTEIN, S. et al. Analysis of the *Aspergillus nidulans* thaumatin-like cetA gene and evidence for transcriptional repression of pyr4 expression in the cetA-disrupted strain. **Fungal Genetics and Biology**, v. 43, n. 1, p. 42–53, 1 jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.10.001>.

GRENIER, J. et al. Some thaumatin-like proteins hydrolyse polymeric beta-1,3-glucans. **The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology**, 3 out. 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00551.x>.

GUJJAR, R. S.; AKHTAR, M.; SINGH, M. Transcription factors in abiotic stress tolerance. **Indian Journal of Plant Physiology**, v. 19, n. 4, p. 306–316, 1 dez. 2014. <https://doi.org/10.1007/s40502-014-0121-8>.

GULL, A.; LONE, A.A.; ISLAMWANI, N.U. Biotic and abiotic stresses in plants. In **Abiotic and Biotic Stress in Plants**; DE OLIVEIRA, A.B., Ed.; IntechOpen: London, UK, 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85832>.

HALL, T.J.; GLATZLE, A. Cattle production from *Stylosanthes* pastures. In: CHAKRABORTY, S. (Ed.) **High-yielding antracnose-resistant *Stylosantes* for agricultural systems**. ACIAR: Camberra, p.51- 64. 2004.

HAYASHI, M. et al. A Thaumatin-Like Protein, Rj4, Controls Nodule Symbiotic Specificity in Soybean. **Plant and Cell Physiology**, v. 55, n. 9, p. 1679–1689, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu099>.

HE, C. et al. Early Drought-Responsive Genes Are Variable and Relevant to Drought Tolerance. **G3 Genes|Genomes|Genetics**, v. 10, n. 5, p. 1657–1670, 1 maio 2020. <https://doi.org/10.1534/g3.120.401199>.

HE, R. et al. Overexpression of a thaumatin-like protein gene from *Vitis amurensis* improves downy mildew resistance in *Vitis vinifera* grapevine. **Protoplasma**, v. 254, n. 4, p. 1579–1589, jul. 2017. <https://doi.org/10.1007/s00709-016-1047-y>.

HESSINI, K. et al. Interactive effects of salinity and nitrogen forms on plant growth, photosynthesis and osmotic adjustment in maize. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 139, p. 171–178, 1 jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.03.005>.

HILOVAARA-TEIJO, M. et al. Snow-Mold-Induced Apoplastic Proteins in Winter Rye Leaves Lack Antifreeze Activity. **Plant Physiology**, v. 121, n. 2, p. 665–674, out. 1999. <https://doi.org/10.1104/pp.121.2.665>.

HILL, N. **A Lei Do Triunfo**. Rio de Janeiro: Ed. Jose Olympio, 2015.

HSIEH, L. S.; MOOS, M.; LIN, Y. Characterization of apple 18 and 31 kd allergens by microsequencing and evaluation of their content during storage and ripening. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 96, n. 6 Pt 1, p. 960–970, dez. 1995. [https://doi.org/10.1016/S0091-6749\(95\)70234-2](https://doi.org/10.1016/S0091-6749(95)70234-2).

IQBAL, I. et al. Thaumatin-Like Protein (TLP) Gene Family in Barley: Genome-Wide Exploration and Expression Analysis during Germination. **Genes**, v. 11, n. 9, p. 1080, 16 set. 2020. <https://doi.org/10.3390/genes11091080>.

ISAYENKOV, S. V. Physiological and molecular aspects of salt stress in plants. **Cytology and Genetics**, v. 46, n. 5, p. 302–318, 1 set. 2012. <https://doi.org/10.3103/S0095452712050040>.

ISAYENKOV, S. V.; MAATHUIS, F. J. M. Plant Salinity Stress: Many Unanswered Questions Remain. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 80, 15 fev. 2019. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>.

JESÚS-PIRES, C. et al. Plant Thaumatin-like Proteins: Function, Evolution and Biotechnological Applications. **Current Protein & Peptide Science**, v. 21, n. 1, p. 36–51, 27 jan. 2020. <https://doi.org/10.2174/1389203720666190318164905>.

JIANG, L. et al. Isolation and Characterization of a Novel Pathogenesis-Related Protein Gene (GmPRP) with Induced Expression in Soybean (*Glycine max*) during Infection with *Phytophthora sojae*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0129932, 26 jun. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129932>.

JIMÉNEZ-ARIAS, D. et al. A Beginner's Guide to Osmoprotection by Biostimulants. **Plants**, v. 10, n. 2, p. 363, fev. 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10020363>.

KIM, Y. J. et al. Cloning and characterization of pathogenesis-related protein 4 gene from *Panax ginseng*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 61, n. 5, p. 664–671, 1 set. 2014. <https://doi.org/10.1134/S1021443714050100>.

KITAJIMA, S.; SATO, F. Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function. **Journal of Biochemistry**, v. 125, n. 1, p. 1–8, jan. 1999. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022244>.

KNOTHE, G. et al. Fatty Acid Profiles of Some Fabaceae Seed Oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 7, p. 1007–1011, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2845-2>.

KUKURBA, K. R.; MONTGOMERY, S. B. RNA Sequencing and Analysis. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2015, n. 11, p. 951–969, 13 abr. 2015. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, jul. 2016. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.

LAGRIMINI, L. M. et al. Molecular cloning of complementary DNA encoding the lignin-forming peroxidase from tobacco: Molecular analysis and tissue-specific expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 21, p. 7542–7546, 1 nov. 1987. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.21.7542>.

LEAL, I. R. et al. Changing the Course of Biodiversity Conservation in the Caatinga of Northeastern Brazil. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 701–706, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2005.00703.x>.

LEONE, P. et al. Resolution of the structure of the allergenic and antifungal banana fruit thaumatin-like protein at 1.7-Å. **Biochimie**, v. 88, n. 1, p. 45–52, 1 jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.001>.

LI, Z. et al. Comprehensive Genome-Wide Analysis of Thaumatin-Like Gene Family in Four Cotton Species and Functional Identification of GhTLP19 Involved in Regulating Tolerance to *Verticillium dahlia* and Drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 575015, 20 out. 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.575015>.

LICHTENTHALER, H. K. El estrés y la medida del estrés en plantas. La ecofisiología vegetal : una ciencia de síntesis, 2003, ISBN 84-9732-267-3, págs. 59-112. Anais.. In: **La Ecofisiología Vegetal : una ciencia de síntesis**. Thomson-Paraninfo, 2003. Disponível em: <<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=830183>>. Acesso em: 26 jul. 2021.

LIMA, C. R. DE et al. Qualidade fisiológica de sementes de diferentes árvores matrizes de *Poincianella pyramidalis* (Tul.) L. P. Queiroz. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, p. 370–378, jun. 2014. <https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000200019>.

LIMA, L. L. et al. Remobilization of leaf Na⁺ content and use of nonstructural carbohydrates vary depending on the time when salt stress begins in woody species. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 158, p. 385–395, 1 jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.11.026>.

LISTA, F. N. et al. Forage production and quality of tropical forage legumes submitted to shading. **Ciência Rural**, v. 49, 4 jul. 2019. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170726>.

LIU, J.-J.; STURROCK, R.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. The superfamily of thaumatin-like proteins: its origin, evolution, and expression towards biological function. **Plant Cell Reports**, v. 29, n. 5, p. 419–436, maio 2010. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0826-8>.

LIU, J.-J.; ZAMANI, A.; EKRAMODDOULLAH, A. K. M. Expression profiling of a

complex thaumatin-like protein family in western white pine. **Planta**, v. 231, n. 3, p. 637–651, 1 fev. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1068-2>.

LIU, S. et al. Network analysis of ABA-dependent and ABA-independent drought responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 41, n. 3, p. 624–637, set. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0229>.

LIU, W.-X. et al. *Arabidopsis* Di19 functions as a transcription factor and modulates PR1, PR2, and PR5 expression in response to drought stress. **Molecular Plant**, v. 6, n. 5, p. 1487–1502, set. 2013. <https://doi.org/10.1093/mp/sst031>.

LIU, X. et al. RNA-Seq Transcriptome Analysis of Maize Inbred Carrying *Nicosulfuron*-Tolerant and *Nicosulfuron*-Susceptible Alleles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 3, p. 5975–5989, 13 mar. 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms16035975>.

LIU, Y. et al. Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the TLP gene family in melon (*Cucumis melo* L.). **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2499–2509, maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2020.02.001>.

LORENZI, H. Árvores Brasileiras. **Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil** - Volume 3. 2a edição ed. Nova Odessa, SP, Brasil: Plantarum, 2016.

LOVE, M. I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, v. 15, n. 12, p. 550, 5 dez. 2014. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.

LPWG. The Legume Phylogeny Working Group. AZANI, N.; BABINEAU, M.; BAILEY, C. D.; BANKS, H.; BARBOSA, A. R.; PINTO, B. R.; BOATWRIGHT, J. S.; BORGES, L. M. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, n. 1, p. 44-77, 2017. <https://doi.org/10.12705/661.3>.

LPWG. The Legume Phylogeny Working Group. BRUNEAU, A.; DOYLE, J. J.; HERENDEEN, P.; HUGHES, C.; KENICER, G.; WOJCIECHOWSKI, M. F. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v. 62, n. 2, p. 217-248, 2013. <https://doi.org/10.12705/622.8>.

MAIA, G. N.-. Caatinga: Árvores E Arbustos E Suas Utilidades. São Paulo, SP, Brasil : Fortaleza, Brazil: D&Z, 2004.

MALEHORN, D. E. et al. Characterization and Expression of an Antifungal Zeamatin-like Protein (Zlp) Gene from *Zea mays*. **Plant Physiology**, v. 106, n. 4, p. 1471–1481, 1 dez. 1994. <https://doi.org/10.1104/pp.106.4.1471>.

MANGAL, M. et al. Differential expression profiling of defense related genes for Leaf Curl Virus (ChiLCV) in resistant and susceptible genotypes of Chiili. **Indian Journal of Genetics and Plant Breeding (The)**, v. 80, n. 03, 22 set. 2020. <https://doi.org/10.31742/IJGPB.80.3.10>.

MANSOUR, M. M. F.; ALI, E. F. Evaluation of proline functions in saline conditions. **Phytochemistry**, v. 140, p. 52–68, 1 ago. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2017.04.016>.

MANZONI, C. et al. Genome, transcriptome and proteome: the rise of omics data and their integration in biomedical sciences. **Briefings in Bioinformatics**, v. 19, n. 2, p. 286–302, 1 mar. 2018. <https://doi.org/10.1093/bib/bbw114>.

MARGUERAT, S.; WILHELM, B. T.; BÄHLER, J. Next-generation sequencing: applications beyond genomes. **Biochemical Society Transactions**, v. 36, n. Pt 5, p. 1091–1096, out. 2008. <https://doi.org/doi:10.1042/BST0361091>.

MARQUES, A. et al. Origin and parental genome characterization of the allotetraploid *Stylosanthes scabra* Vogel (Papilionoideae, Leguminosae), an important legume pasture crop. **Annals of Botany**, v. 122, n. 7, p. 1143–1159, 4 dez. 2018. <https://doi.org/10.1093/aob/mcy113>.

MASLOVA, N. V. et al. Rare species of the genus *Oxytropis* DC. (Fabaceae) from the flora of the Republic of Bashkortostan under cultivation within the city of Ufa. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 107, p. 012086, jan. 2018. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/107/1/012086>.

MATIAS, J. R. **Vulnerabilidade de sementes de *Cenostigma pyramidale* (TUL.) aos estresses abióticos**. 2019. 68f. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró-RN, 2019.

MELCHERS, L. S. et al. A new class of tobacco chitinases homologous to bacterial exo-chitinases displays antifungal activity. **The Plant Journal**, v. 5, n. 4, p. 469–480, 1994. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.05040469.x>.

MELO, N. F., LIRA, I. C. S. A., NASCIMENTO, M. P. S. C. B. *Stylosanthes scabra*: Trifólio. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, Cap. 5, p. 631-639 il. color. 2018. Disponível

em: <http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html>, Acesso em: 02 de set. de 2021.

MERCADANTE, M. A Flora do Cerrado: *Stylosanthes scabra*. **Flickr**. Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.flickr.com/photos/43256055@N03/>. Acesso em: 20 de set. de 2021.

MÉTRAUX, J. P.; STREIT, L.; STAUB, TH. A pathogenesis-related protein in cucumber is a chitinase. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 1–9, 1 jul. 1988. [https://doi.org/10.1016/0885-5765\(88\)90038-0](https://doi.org/10.1016/0885-5765(88)90038-0).

MOCHIDA, K.; SHINOZAKI, K. Genomics and Bioinformatics Resources for Crop Improvement. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 4, p. 497–523, abr. 2010. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcq027>.

MOREIRA, B. et al. Espécies Nativas Com Potencial Ornamental Ocorrentes Na Bacia Do Rio Taquarembó, RS. **Revista da Jornada de Pós-Graduação e Pesquisa - Congrega Urcamp**, n. 0, p. 579–591, 2018.

MUIR, J. P. et al. Valor de leguminosas endêmicas para produção pecuária em áreas de Caatinga -. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias (Agrária)**, v. 14, n. 2, p. 5648, 23 abr. 2019. <https://doi.org/10.5039/agraria.v14i2a5648>.

NAGAICH, D. et al. Assessment of genetic diversity and morpho-physiological traits related to drought tolerance in *Stylosanthes scabra*. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 11, p. 3127–3136, 1 nov. 2013. <https://doi.org/10.1007/s11738-013-1345-3>.

NEALE, A. D. et al. Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation. **The Plant Cell**, v. 2, n. 7, p. 673–684, jul. 1990. <https://doi.org/10.1105/tpc.2.7.673>.

NEMA. Núcleo de Ecologia e Monitoramento Ambiental. Espécie do mês: Catingueira. **NEMA-UNIVASF**. Petrolina, 2019. Disponível em: https://www.nema.univasf.edu.br/site/index.php?page=newspaper&record_id=40 Acesso em: 02 de set. de 2021.

NGHONJUYI, N. W. et al. Acute and sub-chronic toxicity studies of three plants used in Cameroonian ethnoveterinary medicine: *Aloe vera* (L.) Burm. f. (Xanthorrhoeaceae) leaves, *Carica papaya* L. (Caricaceae) seeds or leaves, and *Mimosa pudica* L. (Fabaceae) leaves in Kabir chicks. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 178, p. 40–49, 3 fev. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.11.049>.

NILSEN, E. T.; ORCUTT, D. M. The Physiology of Plants Under Stress. **Abiotic**

Factors. John Wiley and Sons, New York. 1996.

O'ROURKE, J. A. et al. An RNA-Seq based gene expression atlas of the common bean. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, p. 866, 6 out. 2014. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-866>.

OKUSHIMA, Y. et al. Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology**, v. 42, n. 3, p. 479–488, 1 fev. 2000. <https://doi.org/10.1023/A:1006393326985>.

OSHUNSANYA, S. O., NWOSU, N. J., AND LI, Y. (2019). “Abiotic stress in agricultural crops under climatic conditions” in **Sustainable agriculture, forest and environmental management**. eds. M. K. Jhariya, A. Banerjee, and R. S. Meena (Singapore: Springer), 71–100. https://doi.org/10.1007/978-981-13-6830-1_3.

PARMESAN, C.; HANLEY, M. E. Plants and climate change: complexities and surprises. **Annals of Botany**, v. 116, n. 6, p. 849–864, 1 nov. 2015. <https://doi.org/10.1093/aob/mcv169>.

PASTORELLO, E. A. et al. Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. 350–359, fev. 2003. <https://doi.org/10.1067/mai.2003.35>.

PER, T. S. et al. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126–140, 1 jun. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018>.

PEREIRA, R. et al. Diversidade estrutural e potencial biológico dos metabólitos secundários de espécies do gênero *Myroxylon* L.f. (Fabaceae): uma revisão da literatura. **Hoehnea**, v. 46, 25 abr. 2019. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-58/2017>.

PEREIRA-FILHO, J. M., BAKKE, O. A., SILVA, D. S., BAKKE, I. A., CARVALHO, F. C. *Poincianella pyramidalis*: Catingueira. In: CORADIN, L.; CAMILLO, J.; PAREYN, F. G. C. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Nordeste**. Brasília, DF: MMA, Cap. 5, p. 598-605 il. color. 2018. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/publicacoes/biodiversidade/category/142-serie-biodiversidade.html>, Acesso em: 02 de set.de 2021.

PEREIRA-SANTANA, A. et al. Transcriptional profiling of sugarcane leaves and roots under progressive osmotic stress reveals a regulated coordination of gene

expression in a spatiotemporal manner. **PLOS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0189271, 11 dez. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189271>.

PETRE, B. et al. Genome-wide analysis of eukaryote thaumatin-like proteins (TLPs) with an emphasis on poplar. **BMC Plant Biology**, v. 11, n. 1, p. 33, 2011. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-33>.

PORTO, W. F.; PIRES, A. S.; FRANCO, O. L. Computational tools for exploring sequence databases as a resource for antimicrobial peptides. *Biotechnology Advances*, v. 35, n. 3, p. 337–349, 1 maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.02.001>.

QUEIROZ, L. P. et al. Diversity and Evolution of Flowering Plants of the Caatinga Domain. In: SILVA, J. M. C. DA; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. (Eds.). **Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 23–63. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_2.

QUEIROZ, L. **Leguminosas da caatinga**. Universidade Estadual de Feira de Santana, 1 jan. 2009.

RAJASHEKER, G. et al. Chapter 27 - Role and Regulation of Osmolytes and ABA Interaction in Salt and Drought Stress Tolerance. In: KHAN, M. I. R. et al. (Eds.). **Plant Signaling Molecules**. Woodhead Publishing, 2019. p. 417–436. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816451-8.00026-5>.

RAJNINEC, M. et al. Basic β -1,3-Glucanase from *Drosera binata* Exhibits Antifungal Potential in Transgenic Tobacco Plants. **Plants**, v. 10, n. 8, p. 1747, ago. 2021. <https://doi.org/10.3390/plants10081747>.

RASHEED, S. et al. Transcriptomic Analysis of Soil-Grown *Arabidopsis thaliana* Roots and Shoots in Response to a Drought Stress. *Frontiers in Plant Science*, v. 7, p. 180, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00180>.

RAZZAQ, A. et al. Rewilding crops for climate resilience: economic analysis and de novo domestication strategies. **Journal of Experimental Botany**, n. erab276, 11 jun. 2021. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab276>.

RESENDE, R. M. S. et al. Genotypic evaluation of accessions and individual selection in *Stylosanthes* spp. by simulated BLUP method. **Cropps Breeding and Applied Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 253–260, 31 dez. 2006.

RETHINASAMY, V.; DATTA, S. K.; MUTHUKRISHNAN, S. The PR-5 family: Thaumatin-like proteins. **Pathogenesis-Related Proteins in Plants**, p. 107–129, 1 jan. 1999. <https://doi.org/10.1201/9781420049299>.

RODRIGUES, E. DE M. et al. Fabaceae em um afloramento rochoso no Semiárido brasileiro. **Rodriguésia**, v. 71, 17 abr. 2020. <https://doi.org/10.1590/2175-7860202071025>.

RUGGIERO, A. et al. Improving Plant Water Use Efficiency through Molecular Genetics. **Horticulturae**, v. 3, n. 2, p. 31, jun. 2017. <https://doi.org/10.3390/horticulturae3020031>.

SAH, S. K.; REDDY, K. R.; LI, J. Absciscic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, p. 571, 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00571>.

SAKAMOTO, Y. et al. *Lentinula edodes* tlg1 encodes a thaumatin-like protein that is involved in lentinan degradation and fruiting body senescence. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 793–801, jun. 2006. <https://doi.org/10.1104/pp.106.076679>.

SAMAC, D. A. et al. Expression of coordinately regulated defence response genes and analysis of their role in disease resistance in *Medicago truncatula*. **Molecular Plant Pathology**, v. 12, n. 8, p. 786–798, out. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00712.x>.

SANTOS, A. M. DOS; MITJA, D. Pastagens arborizadas no projeto de assentamento benfica, município de Itupiranga, Pará, Brasil. **Revista Árvore**, v. 35, p. 919–930, ago. 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622011000500017>.

SANTOS, W. DE S. et al. Análise florística-fitosociológica e potencial madeireiro em área de caatinga submetida a manejo florestal. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 13, n. 3, p. 203–211, 13 set. 2017.

SANTOS-GARCIA, M. O. et al. Identification of *Stylosanthes guianensis* varieties using molecular genetic analysis. **AoB PLANTS**, v. 2012, n. pls001, 1 jan. 2012. <https://doi.org/10.1093/aobpla/pls001>.

SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Cassava (*Manihot esculenta*) defensins: Prospection, structural analysis and tissue-specific expression under biotic/abiotic stresses. **Biochimie**, v. 186, p. 1–12, jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.03.012>.

SANTOS-SILVA, C. A. DOS et al. Plant Antimicrobial Peptides: State of the Art, In Silico Prediction and Perspectives in the Omics Era. **Bioinformatics and Biology**

Insights, v. 14, p. 1177932220952739, 1 jan. 2020. <https://doi.org/10.1177/1177932220952739>.

SÃO-MATEUS, W.M.B.; CARDOSO, D.; JARDIM, J.G.; QUEIROZ, L.P. Papilionoideae (Leguminosae) in the Atlantic Forest of Rio Grande do Norte, Brazil. *Biota Neotropica*, 13(4), 315-362, 2013.

SATHOFF, A. E.; SAMAC, D. A. Antibacterial Activity of Plant Defensins. **Molecular Plant-Microbe Interactions®**, v. 32, n. 5, p. 507–514, 1 maio 2019. <https://doi.org/10.1094/MPMI-08-18-0229-CR>.

SAVARY, S., WILLOCQUET, L., PETHYBRIDGE, S.J. et al. The global burden of pathogens and pests on major food crops. **Nature Ecology & Evolution**, v. 3, n. 3, p. 430–439, mar. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0793-y>.

SHANGGUAN, L. et al. RNA-Sequencing Reveals Biological Networks during Table Grapevine ('Fujiminori') Fruit Development. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0170571, 24 jan. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170571>.

SHARMA, A. et al. Thaumatin-like protein kinases: Molecular characterization and transcriptional profiling in five cereal crops. **Plant Science**, v. 290, p. 110317, jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2019.110317>.

SHATTERS, R. G. et al. Phylogenetic and Structural Relationships of the PR5 Gene Family Reveal an Ancient Multigene Family Conserved in Plants and Select Animal Taxa. **Journal of Molecular Evolution**, v. 63, n. 1, p. 12–29, 1 jul. 2006. <https://doi.org/10.1007/s00239-005-0053-z>.

SHER, A. et al. Significance of Chemical Priming on Yield and Yield Components of Wheat under Drought Stress. **American Journal of Plant Sciences**, v. 08, n. 06, p. 1339, 2017. <https://doi.org/10.4236/ajps.2017.86090>.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, n. 2, p. 221–227, 6 nov. 2006. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl164>.

SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SEKI, M. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 6, n. 5, p. 410–417, 1 out. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00092-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00092-X).

SHU, Y. et al. Transcriptome sequencing and expression profiling of genes involved in the response to abiotic stress in *Medicago ruthenica*. **Genetics and Molecular**

Biology, v. 41, p. 638–648, 28 jun. 2018. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2017-0284>.

SILVA, J. M. C. DA et al. The Caatinga: Understanding the Challenges. In: SILVA, J. M. C. DA; LEAL, I. R.; TABARELLI, M. (Eds.). **Caatinga: The Largest Tropical Dry Forest Region in South America**. Cham: Springer International Publishing, 2017. p. 3–19. https://doi.org/10.1007/978-3-319-68339-3_1.

SILVA, L. B. DA et al. Anatomia e densidade básica da madeira de *Caesalpinia pyramidalis* Tul. (Fabaceae), espécie endêmica da caatinga do Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 2, p. 436–445, jun. 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000200015>.

SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, **Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos**. Revista Brasileira de Biociências, v. 11, n. 1, 25 mar. 2013.

SILVEIRA, J. et al. Mecanismos biomoleculares envolvidos com a resistência ao estresse salino em plantas. **Manejo da salinidade na agricultura: Estudo básico e aplicado**. Fortaleza: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Salinidade, p. 161–180, 1 jan. 2010.

SINGH, N. K. et al. Characterization of a Pathogen Induced Thaumatin-Like Protein Gene AdTLP from *Arachis diogeni*, a Wild Peanut. **PLOS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83963, 19 dez. 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083963>.

SINICROPI, D.; CRONIN, M.; LIU, M.-L. Gene Expression Profiling Utilizing Microarray Technology and RT-PCR. In: FERRARI, M.; OZKAN, M.; HELLER, M. J. (Eds.). **BioMEMS and Biomedical Nanotechnology: Volume II: Micro/Nano Technologies for Genomics and Proteomics**. Boston, MA: Springer US, 2007. p. 23–46. https://doi.org/10.1007/978-0-387-25843-0_2.

SOMSSICH, I. E. et al. Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 8, p. 2427–2430, 1 abr. 1986. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.8.2427>.

STACE, H. M.; CAMERON, D. F. Cytogenetics and the evolution of *Stylosanthes*. **Biology and agronomy of Stylosanthes**, edited by Helen M. Stace and L.S. Edye, 1984.

TABARELLI, M. et al. **Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade**. Ciência e Cultura, v. 70, n. 4, p. 25–29, out. 2018. <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602018000400009>.

TAKEDA, S. et al. Nucleotide Sequence of a cDNA for Osmotin-Like Protein from Cultured Tobacco Cells 1. **Plant Physiology**, v. 97, n. 2, p. 844–846, out. 1991. <https://doi.org/10.1104/pp.97.2.844>.

TERRAS, F. R. et al. Small cysteine-rich antifungal proteins from radish: their role in host defense. **The Plant Cell**, v. 7, n. 5, p. 573–588, 1 maio 1995. <https://doi.org/10.1105/tpc.7.5.573>.

TESHOME, D. T.; ZHARARE, G. E.; NAIDOO, S. The Threat of the Combined Effect of Biotic and Abiotic Stress Factors in Forestry Under a Changing Climate. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1874, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.601009>.

THOMPSON, K. Programming Techniques: Regular expression search algorithm. **Comunicações da ACM**, v. 11, n. 6, p. 419–422, 1 jun. 1968. <https://doi.org/10.1145/363347.363387>.

THORNE, S. J.; HARTLEY, S. E.; MAATHUIS, F. J. M. Is Silicon a Panacea for Alleviating Drought and Salt Stress in Crops? **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 1221, 2020. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01221>.

VANHAUWAERT, S. et al. Expressed Repeat Elements Improve RT-qPCR Normalization across a Wide Range of Zebrafish Gene Expression Studies. **PLOS ONE**, v. 9, n. 10, p. e109091, 13 out. 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109091>.

VAN LOON, L. C. et al. Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins. **Plant Molecular Biology Reporter**, v. 12, n. 3, p. 245–264, set. 1994. <https://doi.org/10.1007/BF02668748>.

VAN LOON, L. C. Regulation of Changes in Proteins and Enzymes Associated with Active Defence against Virus Infection. In: WOOD, R. K. S. (Ed.). **Active Defense Mechanisms in Plants**. NATO Advanced Study Institutes Series. Boston, MA: Springer US, p. 247–273. 1982. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-8309-7_14.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, v. 44, n. 1, p. 135–162, set. 2006. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.44.070505.143425>.

VASSEUR, F. et al. Multivariate genetic analysis of plant responses to water deficit and high temperature revealed contrasting adaptive strategies. **Journal of Experimental Botany**, v. 65, n. 22, p. 6457–6469, 1 dez. 2014. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru364>.

VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S.; PAREYN, F. S G. C. **Ecorregiões propostas para o bioma Caatinga**. Recife: APNE - Associação Plantas do Nordeste, TNC. 76 p, 2002.

VERA, P.; CONEJERO, V. Pathogenesis-Related Proteins of Tomato 1: P-69 as an Alkaline Endoproteinase. **Plant Physiology**, v. 87, n. 1, p. 58–63, 1 maio 1988. <https://doi.org/10.1104/pp.87.1.58>.

VERMA, S.; NIZAM, S.; VERMA, P. K. Biotic and Abiotic Stress Signaling in Plants. In: SARWAT, M.; AHMAD, A.; ABDIN, M. (Eds.). **Stress Signaling in Plants: Genomics and Proteomics Perspective**, Volume 1. New York, NY: Springer, 2013. p. 25–49. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6372-6_2.

VERMA, V.; RAVINDRAN, P.; KUMAR, P. P. Plant hormone-mediated regulation of stress responses. **BMC Plant Biology**, v. 16, n. 1, p. 86, 14 abr. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0771-y>.

VILELA, L. M. B. et al. *Cenostigma pyramidale*: Ethnomedicinal Properties and Perspectives on A Legume Tree Highly Adapted to Semiarid ‘Caatinga’ Region. In: Rai M, Bhattarai S and Feitosa CM (eds) **Wild Plants: The treasure of natural healers**. Chapter 11. CRC Press, Boca Raton <https://doi.org/10.1201/9781003052814>.

WANG, L.; DUMAN, J. G. A thaumatin-like protein from larvae of the beetle *Dendroides canadensis* enhances the activity of antifreeze proteins. **Biochemistry**, v. 45, n. 4, p. 1278–1284, 31 jan. 2006. <https://doi.org/10.1021/bi051680r>.

WANG, Q. et al. Purification and Characterization of a CkTLP Protein from *Cynanchum komarovii* Seeds that Confers Antifungal Activity. **PLOS ONE**, v. 6, n. 2, p. e16930, 22 fev. 2011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016930>.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009. <https://doi.org/10.1038/nrg2484>.

WARWICK, M. C.; LEWIS, G. P. A revision of *Cenostigma* (Leguminosae – Caesalpinioideae – Caesalpinieae), a genus endemic to Brazil. **Kew Bulletin**, v. 64, n. 1, p. 135–146, 1 mar. 2009. <https://doi.org/10.1007/s12225-008-9091-1>.

WEI, Y. et al. An epidermis/papilla-specific oxalate oxidase-like protein in the defence response of barley attacked by the powdery mildew fungus. **Plant Molecular Biology**, v. 36, n. 1, p. 101–112, 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1005955119326>.

WENG, K. et al. Transcriptome of *Erysiphe necator* -infected *Vitis pseudoreticulata* leaves provides insight into grapevine resistance to powdery mildew. **Horticulture Research**, v. 1, n. 1, p. 1–12, 24 set. 2014. <https://doi.org/10.1038/hortres.2014.49>.

WONG, M. L.; MEDRANO, J. F. Real-time PCR for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v. 39, n. 1, p. 75–85, jul. 2005. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>.

WU, J. et al. Overexpression of a Pathogenesis-Related Protein 10 Enhances Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Rice. **The Plant Pathology Journal**, v. 32, n. 6, p. 552–562, 1 dez. 2016. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.06.2016.0141>.

YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K.; SHINOZAKI, K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. **Trends in Plant Science**, v. 10, n. 2, p. 88–94, 1 fev. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.12.012>.

YAN, X. et al. Analysis of the grape (*Vitis vinifera* L.) thaumatin-like protein (TLP) gene family and demonstration that TLP29 contributes to disease resistance. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4269, dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04105-w>.

YANCHEVSKAYA, T. G. et al. Stimulation of Cellular Mechanisms of Potato Antivirus Resistance by the Action of a Preparation Based on *Bacillus subtilis* Bacteria. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 324–330, 1 maio 2018. <https://doi.org/10.1134/S0003683818030158>.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, dez. 2012. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>.

YU, X.-M.; GRIFFITH, M. Antifreeze Proteins in Winter Rye Leaves Form Oligomeric Complexes. **Plant Physiology**, v. 119, n. 4, p. 1361–1370, abr. 1999. <https://doi.org/10.1104/pp.119.4.1361>.

XIA, L. et al. Rice Expression Database (RED): An integrated RNA-Seq-derived gene expression database for rice. **Journal of Genetics and Genomics, Database**. v. 44, n. 5, p. 235–241, 20 maio 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.05.003>.

ZENG, A. et al. RNA sequencing analysis of salt tolerance in soybean (*Glycine max*). **Genomics**, v. 111, n. 4, p. 629–635, 1 jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2018.03.020>.

ZHANG, M. et al. Antifungal properties of a thaumatin-like protein from watermelon. *Acta Physiologiae Plantarum*, v. 40, n. 11, p. 186, 6 out. 2018. <https://doi.org/10.1007/s11738-018-2759-8>.

ZHANG, Z.; COLLINGE, D. B.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. Germin-like oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme, accumulates in barley attacked by the powdery mildew fungus. *The Plant Journal*, v. 8, n. 1, p. 139–145, 1995. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113X.1995.08010139.x>.

ZHAO, C. et al. Mechanisms of Plant Responses and Adaptation to Soil Salinity. *The Innovation*, v. 1, n. 1, p. 100017, 21 maio 2020. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100017>.

ZHAO, J. P.; SU, X. H. Patterns of molecular evolution and predicted function in thaumatin-like proteins of *Populus trichocarpa*. *Planta*, v. 232, n. 4, p. 949–962, set. 2010. <https://doi.org/10.1007/s00425-010-1218-6>.

ZHU, J.-K. Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell*, v. 167, n. 2, p. 313–324, 6 out. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.029>.