



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

JÉSSICA BARBARA VIEIRA VIANA

**MODIFICADORES EPIGENÉTICOS: GENÔMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL
EM PLANTAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE CONDIÇÕES
ESTRESSANTES**

Recife

2022

JÉSSICA BARBARA VIEIRA VIANA

**MODIFICADORES EPIGENÉTICOS: GENÔMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL
EM PLANTAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE CONDIÇÕES
ESTRESSANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Genética.

Área de concentração: Biologia Molecular

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

Coorientador: Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB4/1788

Viana, Jéssica Barbara Vieira

Modificadores epigenéticos : genômica estrutural e funcional em plantas submetidas a diferentes tipos de condições estressantes / Jéssica Barbara Vieira Viana. – 2022.

174 f. : il.

Orientadora Profa. Dra. Ana Maria Benko-Iseppon.

Coorientador: Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 202.

Inclui referências.

1. Genética vegetal. 2. Plantas. 3. Bioinformática. I. Benko-Iseppon, Ana Maria (orientadora). II. Ferreira, Neto, José Ribamar Costa (coorientador). III. Título.

581.35

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2022-113

JÉSSICA BARBARA VIEIRA VIANA

**MODIFICADORES EPIGENÉTICOS: GENÔMICA ESTRUTURAL E FUNCIONAL
EM PLANTAS SUBMETIDAS A DIFERENTES TIPOS DE CONDIÇÕES
ESTRESSANTES**

Aprovada em 08/04/2022

BANCA EXAMINADORA:

Dr^a. Ana Maria Benko-Iseppon
Departamento de Genética – UFPE

Dr. Ederson Akio Kido
Departamento de Genética – UFPE

Dr. Rommel Thiago Juca Ramos
Universidade Federal do Pará

Dr. Eliseu Binneck
EMBRAPA Soja

Dr. João Pacífico Bezerra Neto
Universidade de Pernambuco

Recife

2022

DEDICATÓRIA

À minha mãe, Regina Célia, pelo amor,
incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por ter me dado forças para superar todos os obstáculos durante minha jornada de doutorado e por ter colocado pessoas maravilhosas na minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG), pelo curso oferecido.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À minha mãe, Regina Célia, pelo amor incondicional, pelos valores a mim ensinados e por ser meu maior exemplo de garra e determinação.

À minha irmã, Rafaela Anastácia, pelo companheirismo, amizade e confiança.

À minha orientadora Dr^a. Ana Maria Benko Iseppon, pela oportunidade a mim proporcionada, pela confiança e todos os ensinamentos. Além de ser um exemplo de profissional a ser seguido.

Ao meu coorientador Dr. José Ribamar Costa Ferreira Neto, pelo seu apoio e incentivo desde o processo seletivo, constante preocupação com o andamento do projeto, pelos conselhos e ensinamentos.

Ao Dr. Paulo Sarmanho da Costa Lima, pela preocupação, por sempre confiar no meu trabalho, pelo incentivo a fazer doutorado e todo seu apoio.

À profa. Dra. Valesca Pandolfi, pela supervisão do estágio à docência e todos ensinamentos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG), pelos ensinamentos transmitidos.

À querida técnica do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), Vanessa Souza, por todo apoio, acolhimento, carinho, amizade e cada palavra de conforto.

À equipe do Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal (LGBV), por toda ajuda prestada, amizade e momentos de descontração.

Às amigas Artemisa Borges, Carolline Pires, Flávia Czekalski e Lívia Martins, por toda paciência e dedicação aos ensinamentos repassados a mim.

Ao Dr. João Pacífico, por todos os ensinamentos repassados a mim.

Aos amigos Wilson Oliveira e Joelson Crispim, pela convivência durante esses anos, pelo apoio nos momentos difíceis e amizade verdadeira.

Ao meu Bloco 8 e agregada Marianne Firmino. Obrigada pela amizade, apoio, incentivo, acolhimento e todos os momentos de distrações.

À Jéssica Vasconcelos, presente que Deus me proporcionou em Recife. Serei eternamente grata pelo apoio, preocupação, momentos de descontração, palavras de conforto e todo amor.

Finalmente, agradeço a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a finalização desse ciclo.

“O preço de qualquer coisa é a quantidade de vida que você troca por isso” (HENRY DAVID THOREAU).

RESUMO

Dentre as diversas culturas vegetais mais produzidas no Brasil, destacam-se a uva (*Vitis vinifera* L.) e o feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) com elevados índices de produção anual, apresentando relevante importância social e econômica. Entretanto, a produtividade dessas culturas é frequentemente afetada, devido à ocorrência de estresses. Nesse contexto, as modificações epigenéticas compreendem ampla funcionalidade, sendo os processos de (de)metilação de DNA, (de)metilação das histonas e (de)acetilação das histonas, incluindo aquelas participantes diretos no mecanismo de combate ao estresse (a)biótico. Esses processos são desenvolvidos pelas enzimas metiltransferases (MTases) e demetilases (dMTases) de DNA; metiltransferase (SDGs) e demetilases (JMJs) de histonas; e acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) de histonas. O presente trabalho teve como objetivo analisar essas enzimas mediante abordagens de genômica e transcriptômica. Essas enzimas foram analisadas considerando suas características estruturais, distribuição genômica, mecanismos de expansão genômica e conservação entre outras espécies vegetais, além dos padrões de expressão frente aos estresses biótico e abiótico. Bibliotecas de RNA-Seq de acessos contrastantes da videira [genótipo resistentes (IAC-572) e suscetível (Red Globe)] ao estresse biótico, bem como bibliotecas de RNA-Seq de feijão-caupi sob estresse biótico (injúria mecânica seguida de inoculação viral) e abiótico (desidratação radicular) foram analisadas. As enzimas identificadas no genoma da videira (MTases e dMTases) e do feijão-caupi (SDGs, JMJs, HATs e HDACs) apresentaram, em sua maioria, conservação de suas respectivas estruturas. Além disso, um alto índice de conservação dessas enzimas foi observado nos genomas de diferentes espécies vegetais. Os elementos cis-regulatórios identificados nos promotores foram associados a diferentes TFs que estão intimamente relacionados à resposta vegetal sob condições adversas. Os dados de expressão gênica para acessos contrastantes de videira indicaram que os transcritos induzidos podem auxiliar em uma estratégia molecular no genótipo resistente da videira analisado nesse estudo, uma vez que uma maior indução de modificadores epigenéticos foi observada nesse genótipo quando comparado ao genótipo suscetível. Os dados de RNA-Seq do feijão-caupi apontam para uma maior indução de modificadores epigenéticos na resposta a desidratação

radicular, comparativamente ao ensaio de injúria mecânica seguida de inoculação viral. Em suma, os resultados gerados nesse estudo agregam valor ao entendimento da dinâmica desses modificadores epigenéticos na resposta de vegetais a estresse, evidenciando sua pluralidade estrutural e funcional.

Palavras-chave: (de)metilação de DNA; (de)metilação de histonas; (de)acetilação de histonas; resposta ao estresse; bioinformática.

Abstract

Among the various crops produced in Brazil, grapes (*Vitis vinifera* L.) and cowpea (*Vigna unguiculata* L.) stand out, with high annual production rates, presenting relevant social and economic importance. However, the productivity of these crops is often affected, due to the occurrence of stresses. In this context, epigenetic modifications comprise broad functionality, through the processes of (de)methylation of DNA, (de)methylation of histones and (de)acetylation of histones, including those directly participating in response against (a)biotic stress. These processes are carried out by DNA methyltransferases (MTases) and DNA demethylases (dMTases); methyltransferase (SDGs), histone demethylases (JMJs); histone acetyltransferases (HATs) and deacetylases (HDACs). The present work aimed to analyze these enzymes through genomics and transcriptomics approaches. These enzymes were analyzed considering their structural characteristics, genomic distribution, mechanisms of genomic expansion and conservation among plant species, in addition to expression patterns in response to biotic and abiotic stresses. RNA-Seq libraries from contrasting grapevine accessions [genotype resistant (IAC-572) and susceptible (Red Globe)] to biotic stress, as well as cowpea's RNA-Seq libraries under biotic stress (mechanical injury followed by viral inoculation) and abiotic (root dehydration) were analyzed. The enzymes identified in the grapevine (MTases and dMTases) and cowpea (SDGs, JMJs, HATs and HDACs) genomes, showed mostly conservation of their structures. In addition, a high rate of conservation of these enzymes was observed in the genomes of different plant species. The cis-regulatory elements identified in the promoters were associated with TFs that are closely related to the plant response under adverse conditions. The gene expression data for the contrasting grapevine accessions indicated that the induced transcripts may assist in a molecular strategy in the resistant grapevine genotype analyzed in this study. A greater induction of epigenetic modifiers was observed in this genotype when compared to the susceptible genotype. The Cowpea RNA-Seq data indicate a greater induction of epigenetic modifiers in the response to root dehydration, when compared to the mechanical injury assay followed by viral inoculation. In short, the results generated in this study add value to the understanding of the dynamics of

these epigenetic modifiers in the plant response to stress, evidencing their structural and functional plurality.

Key words: (de)methylation of DNA; (de)methylation of histones; (de)acetylation of histones; stress response, bioinformatic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

- Figura 1-** Sintomas do cancro bacteriano da videira: **(A)** manchas escuras e angulares distribuídas de forma dispersa e lesões escuras e alongadas no pecíolo, que evoluem para fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancro; **(B)** nervuras com lesões escuras e alongadas; **(C)** ramos com manchas escuras, alongadas e cancrios; **(D)** ráquis dos frutos com lesões escuras, alongadas e cancrios; **(E)** bagas com lesões necróticas. Fonte: Naue (2013)..... 40
- Figura 2-** Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos (CABMV). Fonte: Barros (2010)..... 45
- Figura 3-** Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi (CPSMV). Fonte: Barros (2010)..... 46
- Figura 4-** Modelo Zig-Zag para evolução da imunidade inata e silenciamento de plantas baseado na defesa contra patógenos virais e não virais [extensão do modelo proposto por Jones e Dangl (2006)]. dsRNA: RNA de cadeia dupla; DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos; PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos; PTI: Imunidade Desencadeada por PAMP; ETS: Susceptibilidade Desencadeada por Efetores; ETI: Imunidade Desencadeada por Efetores; HR: Resposta Hipersensitiva; PCD: Morte Celular Programada. Fonte: Adaptada de Zvereva e Pooggin (2012)..... 48
- Figura 5-** Principais categorias de genes envolvidos na resposta vegetal a estresses abióticos, com ênfase para seca. Após a percepção do estresse são acionados grupos de genes envolvidos na regulação e transdução de sinais **(A)**, acionando cascatas de sinalização que induzem genes que codificam proteínas diretamente envolvidas nos mecanismos

	de tolerância ao referido estresse (B). Fonte: Benko-Iseppon et al. (2011).....	50
Figura 6-	Processo de metilação de citosina do DNA dependente de siRNAs (RdDM). (A) RNA polimerase IV origina um transcrito; (B) RDR2 reconhece e copia o transcrito, gerando um RNA dupla fita (dsRNA); (C) a enzima DLC3 cliva o dsRNA originado, produzindo siRNAs de 24pb; (D) a proteína AGO4 lê os siRNAs e digere a molécula de fita dupla mantendo uma única fita que serve como guia; (E) a fita guia interage fisicamente com o transcrito produzido pela RNA polimerase V, marcando o locus a ser metilado (me); (F) o complexo RISC recruta metiltransferase DRM2. Fonte: Adaptada de Ferreira-Neto et al. (2017).....	54
Figura 7-	Estrutura de um nucleossomo, apresentando sua estrutura globular central (octâmero), o DNA que a envolve e as caudas das histonas.....	56
 Artigo I		
Figura 1-	Árvore fenética - construída a partir das sequências de proteínas MTases de <i>Arabidopsis thaliana</i> (círculo azul escuro), <i>Zea mays</i> (círculo verde claro), <i>Glycine max</i> (círculo azul claro), <i>Oryza sativa</i> (círculo vermelho escuro), <i>Citrus sinensis</i> (círculo marrom), <i>Solanum lycopersicum</i> (círculo amarelo) e <i>Vitis vinifera</i> (círculo vermelho) - gerada pelo MEGAX, via método <i>neighbor-joining</i> . Os nomes laterais representam as diferentes classes da família MTase. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições).....	72
Figura 2-	Árvore fenética - construída a partir das sequências de proteínas VvdMTases de <i>Arabidopsis thaliana</i> (círculo azul escuro), <i>Glycine max</i> (círculo laranja), <i>Prunus persica</i> (círculo vermelho escuro), <i>Malus domestica</i> (círculo roxo), <i>Brassica</i>	

rapa (círculo amarelo) *Medicago truncatula* (círculo azul claro) *Solanum lycopersicum* (círculo verde) e *Vitis vinifera* (círculo vermelho) - gerada pelo MEGAX, via método *neighbor-joining*. Os nomes laterais representam as diferentes classes da família dMTase. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições)..... 73

Figura 3- Estruturas gênicas (esquerda) e motivos conservados (direita) dos genes VuMTases (A) e VvdMTases (B). Diferentes classes de VuMTases e VvdMTases estão identificadas em retângulos na lateral esquerda, sendo cada cor correspondente a uma classe específica. CDS, UTRs e íntrons das estruturas gênicas estão representados por retângulos azul, retângulos vermelhos e linhas pretas, respectivamente. Os motivos conservados estão representados por blocos coloridos. Os números romanos indicam os motivos característicos de cada família gênica..... 75

Figura 4- Quantificação dos loci conservados de metiltransferase de DNA (A) e demetilase de DNA (B) entre as 14 espécies vegetais com maiores índices de ortologia no genoma da videira. As espécies e famílias estão indicadas no exterior das barras. O quantitativo e suas respectivas porcentagens de ortologia gênica, em cada espécie analisada, em relação à videira, estão apresentadas no interior das barras..... 77

Figura 5- Localização e identificação dos CCREs, motivos consenso (matriz JASPAR ID: MA1236.1; MA1260.1; MA1091.1; MA1281.1; MA0053.1; MA1085.2; MA1278.1) e TFs associados nos promotores dos genes VvMTases. Na esquerda, os CCREs *bona fide* estão representados por quadrados em diferentes cores, apresentando seus respectivos fatores de transcrição associados. Para cada VvMTases analisadas (centro da imagem), os motivos são identificados em toda sua extensão gênica (direita)..... 79

Figura 6- VvdMTase expressos de forma constitutiva nas bibliotecas de RNA-Seq. O asterisco indica os transcritos diferencialmente expressos considerando $p < 0,05$ e FDR $< 0,05$. Os nomes verticais indicam os lds dos transcritos VvMTases e VvdMTase, sendo: VvMTase^a (Vv_07s0130g00380); VvMTase^b (Vv_08s0007g06800); e VvdMTase (Vv_08s0007g03920)..... 80

Artigo II

Figura 1- Árvores de Neighbor joining geradas a partir das sequências das proteínas SDGs (A) e JMJs (B) de *Arabidopsis thaliana* (AtSDGs/AtJMJs, círculos azuis), *Oryza sativa* (OsSDGs/OsJMJs, círculos verdes) e *Vigna unguiculata* (VuSDGs/VuJMJs, círculos vermelhos). Cada classe das referidas proteínas está destacada em ramos com cores diferentes. Números romanos laterais em 'A' representam diferentes classes de SDGs. Letras e números laterais em 'B' representam diferentes classes de JMJs. Números na base dos nós representam valores de bootstrap (1000 repetições)..... 102

Figura 2 Distribuição cromossômica dos loci VuSDGs e VuJMJs no genoma do feijão-caupi. As posições dos genes em questão estão indicadas ao longo dos cromossomos, em traços e nomes em vermelho (VuSDGs) e em azul (VuJMJs). Os centrômeros dos 11 cromossomos de *V. unguiculata* estão representados por círculos em vermelho escuro. O tamanho de cada cromossomo está de acordo com a escala lateral esquerda, em Mb..... 104

Figura 3- Estruturas gênicas de uma amostra de genes VuSDGs (A) e VuJMJs (B). Diferentes classes de VuSDGs (A) e VuJMJs (B) estão identificadas em retângulos à esquerda e separadas por linhas pontilhadas em cinza claro, sendo cada cor correspondente a uma classe específica. CDS, UTRs e

íntrons estão representados por retângulos verdes, retângulos vermelhos e linhas pretas, respectivamente. A amostra de genes plotada foi escolhida aleatoriamente para representar todas as classes de VuSDGs e VuJMJs encontradas no genoma de *V. unguiculata*..... 106

Figura 4- Alinhamento do domínio SET e identificação dos resíduos de aminoácidos conservados das proteínas VuJMJs e AtJMJs. O domínio SET está representado esquematicamente pela barra superior na cor marrom. Seus respectivos motivos estão indicados pelas barras menores na cor azul, sendo eles: SET I (GxG), SET II (YxG), SET III (RFINHxCxPN) e SET IV (ELxFDY). Legenda: os resíduos de aminoácidos estão indicados por triângulos vermelhos invertidos. Aminoácidos conservados estão destacados em azul. Sequências consenso dessas proteínas estão identificadas na parte inferior. A altura de cada letra indica a conservação da sequência em uma determinada posição. As letras maiúsculas situadas na parte inferior das sequências consenso representam os aminoácidos com 100% de identidade..... 107

Figura 5- Alinhamento do domínio JmjC e identificação dos resíduos de aminoácidos conservados das proteínas VuJMJs e AtJMJs. (A) Classes de JMJs que apresentam o grupo de aminoácidos His, Glu e His, indicado por triângulos vermelhos invertidos, para ligação de Fe (II), e grupo de aminoácidos Phe e Lys, indicados por triângulos verdes invertidos, para ligação de α -KG. (B) Classes de JMJs que apresentam o grupo de aminoácidos His, Asp e His, indicado por triângulos vermelhos invertidos, para ligação de Fe (II), e grupo de aminoácidos Thr e Lys, indicados por triângulos verdes invertidos, para ligação de α -KG. Os nomes laterais indicam as classes de JMJs. Legenda: aminoácidos conservados estão destacados em azul. Sequências

consenso dessas proteínas estão identificadas na parte inferior de cada conjunto analisado. A altura de cada letra indica a conservação da sequência em uma determinada posição. As letras maiúsculas situadas na parte inferior das sequências consenso representam os aminoácidos com 100% de identidade..... 109

Figura 6- Quantificação dos principais mecanismos de expansão das diferentes classes das proteínas VuSDGs (A) e VuJMJs (B) identificadas no genoma do feijão-caupi. O eixo x representa as diferentes classes de proteínas, enquanto o eixo y representa o seu quantitativo..... 110

Figura 7- Quantificação dos loci conservados de metiltransferase de histonas (A) e demetilase de histonas (B) entre as 20 espécies vegetais com maiores índices de ortologia no genoma do feijão-caupi. As famílias estão representadas por letras laterais às barras, sendo: Fa (Fabaceae); Ma (Malvaceae); As (Salicaceae); Ru (Rutaceae); Vi (Vitaceae); Po (Poaceae); Br (Brassicaceae); Eu (Euphorbiaceae); Ph (Phirmaceae); Ro (Rosaceae); Ra (Ranunculaceae); Ap (Apiaceae); Cr (Crassulaceae); Li (Linaceae); So (Solaneae); Am (Amaranthaceae). As espécies analisadas estão indicadas no interior das barras, com cores diferentes. As porcentagens de ortologia gênica, em cada espécie analisada, em relação ao feijão-caupi, estão apresentadas acima das barras..... 112

Figura 8- Localização e identificação dos CCREs, apresentação dos motivos consenso e TFs associados nos promotores de uma amostra representativa contendo 15 genes VuSDGs. A amostra de genes plotada foi escolhida aleatoriamente para apresentar todos os CCREs encontrados no conjunto total de promotores analisados. Legenda: no painel superior, para cada promotor analisado, os motivos são identificados em toda sua extensão. No painel central, o consenso dos

motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, os CCREs *bona fide* estão representados por retângulos de diferentes cores, apresentando seus respectivos fatores de transcrição associados..... 113

Figura 9- Localização e identificação dos CCREs, motivos consenso e TFs associados nos promotores de uma amostra representativa contendo 11 genes VuJMJs. A amostra de genes plotada foi escolhida aleatoriamente para apresentar todos os CCREs encontrados no conjunto total de promotores analisados. Legenda: no painel superior, para cada promotor analisado, os motivos são identificados em toda sua extensão. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, o CCREs *bona fide* é representado por um retângulo vermelho..... 114

Figura 10- Quantitativo de transcritos VuSDGs (A) e VuJMJs (B) diferencialmente expressos. O eixo 'x' representa os diferentes ensaios analisados: RD – Desidratação Radicular (25 - 150 min); CABMV – Injúria mecânica + inoculação do vírus CABMV (60 min – 16 h); CPSMV - Injúria mecânica + inoculação do vírus CPSMV (60 min – 16 h). O eixo 'y' representa o seu respectivo quantitativo. Barras em vermelho representam o quantitativo dos transcritos induzidos (Up-regulated) e barras em verde representam o quantitativo dos transcritos reprimidos (Down-regulated)..... 115

Figura 11- Heat-Map ilustrando a modulação dos transcritos que codificam VuSDGs (A) e VuJMJs (B) diferencialmente expressos em ao menos um tratamento (RD25 ou RD150), após aplicação do estresse de desidratação radicular..... 116

Figura 12- Expressão relativa via qPCR de transcritos VuSDGs e VuJMJs diferencialmente expressos nas bibliotecas de RNA-Seq. Legenda: o asterisco indica os transcritos diferenci-

almente expressos considerando $p < 0,05$ e $FDR < 0,05$. O ID dos transcritos está representado pelos nomes verticais inferior às barras, sendo: VuSDG^a (Vu72834|c0_g1_i5); VuSDG^b (Vu167285|c0_g1_i8); VuJMJ^a (Vu90804|c0_g1_i1); VuJMJ^b (Vu2751|c0_g1_i2); VuJMJ^c (Vu102353|c0_g1_i11); VuJMJ^d (Vu88045|c0_g1_i9); VuJMJ^e (Vu102353|c0_g1_i2); VuJMJ^f (Vu19410|c1_g1_i1); VuJMJ^g (Vu113817|c4_g2_i10); VuJMJ^h (Vu113817|c4_g2_i3)..... 118

Artigo III

Figura 1- Árvore fenética gerada a partir das sequências das proteínas HAT de *Arabidopsis thaliana* e *Vigna unguiculata*. Cada classe está destacada em retângulos com cores diferentes. Formas geométricas na cor cinza representam os diferentes domínios das proteínas HAT ancorados nas sequencias analisadas. As subclasses e classes são, respetivamente, os elementos mais à direita da figura. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições)..... 137

Figura 2- Árvore fenética geradas a partir das sequências das proteínas HDAC de *A. thaliana* e *V. unguiculata*. Cada classe está destacada em retângulos com cores diferentes. Formas geométricas na cor cinza representam os diferentes domínios das proteínas HDAT ancorados nas sequencias analisadas. As subclasses e classes são, respetivamente, os elementos mais à direita da figura. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições)..... 138

Figura 3- Distribuição cromossômica dos loci VuHATs e VuHDACs no genoma do feijão-caupi. As posições dos genes em questão estão indicadas ao longo dos cromossomos em nomes em vermelho (VuHATs) e em azul (VuHDACs). Os centrômeros dos 11 cromossomos de *V. unguiculata* estão representados por círculos em verde escuro. O tamanho de cada cromossomo está de acordo com a escala lateral esquerda,

	em Mb.....	139
Figura 4-	Estruturas gênicas dos genes VuHATs (A) e VuHDACs (B). Diferentes classes de VuHATs e VuHDACs estão identificadas em retângulos, sendo cada cor correspondente a uma classe específica. CDS, UTRs e íntrons estão representados por retângulos amarelo, retângulos azul e linhas pretas, respectivamente.....	141
Figura 5-	Quantificação dos principais mecanismos de expansão das diferentes classes das proteínas VuHATs (A) e VuHDACs (B) identificadas no genoma do feijão-caupi. O eixo x representa as diferentes classes de proteínas, enquanto o eixo y representa o seu quantitativo.....	142
Figura 6-	Quantificação dos loci conservados de HATs (A) e HDACs (B) entre as 10 espécies vegetais com maiores índices de ortologia no genoma do feijão-caupi. As famílias estão representadas por letras em círculos, sendo: Fa (Fabaceae); My (Myrtaceae); Br (Brassicaceae); Ru (Rutaceae); Cu (Cucurbitaceae); Ro (Rosaceae); Hy (Hydrangenaceae). As espécies analisadas estão indicadas no interior das barras, com cores diferentes. As porcentagens de ortologia gênica, em cada espécie analisada, em relação ao feijão-caupi, estão apresentadas acima das barras.....	144
Figura 7-	Localização e identificação dos CCREs, motivos consenso e TFs associados nos promotores dos genes VuHATs. No painel superior, para cada VuHATs analisado (esquerda), os motivos são identificados em toda sua extensão gênica. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, os CCREs <i>bona fide</i> estão representados por retângulos nas cores vermelho e azul escuro.....	145
Figura 8-	Localização e identificação dos CCREs, motivos consenso e TFs associados nos promotores dos genes VuHDACs. No painel superior, para cada VuHDACs analisado (esquerda),	

os motivos são identificados em toda sua extensão gênica. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, os CCREs *bona fide* estão representados por retângulos nas cores vermelho, azul claro e verde..... 146

Figura 9- Heat-Map ilustrando a modulação dos transcritos que codificam VuHATs (A) e VuHDACs (B) diferencialmente expressos em ao menos um tratamento (RD25 ou RD150), após aplicação do estresse de desidratação radicular..... 147

LISTA DE TABELAS

Revisão da Literatura

Tabela 1-	Área cultivada com videiras no Brasil, por região, em hectares, 2017 a 2020.....	35
Tabela 2-	Produção e produtividade de uvas no Brasil, por estado e região, 2019 a 2020.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-meC	<i>5-methylcytosine</i> (5-metilcitosina)
ABA	<i>Abscisic Acid</i> (Ácido Abscísico)
AGO4	<i>Protein Argonaute 4</i> (Proteína Argonauta 4)
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i> (Adenosina Trifosfato)
avr	<i>Avirulence</i> (Avirulência)
BER	<i>Base Excision Repair</i> (Reparo por Excisão de Base)
CABMV	<i>Cowpea Aphid-born Mosaic Virus</i> (Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos)
CHD	<i>Chromodomain Helicase DNA Binding</i>
CHR5	<i>Chromatin-Remodeling Factor 5</i> (Fator 5 Remodelador da Cromatina)
CLF	<i>Curly Leaf</i>
CMT	<i>Chromomethyltransferase</i> (Cromometiltransferase)
CPSMV	<i>Cowpea Severe Mosaic Virus</i> (Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi)
CRCD-ATP	<i>ATP-dependent Chromatin Remodeling</i> (Complexos Remodeladores da Cromatina Dependentes de ATP)
DAMPs	<i>Damage-associated Molecular Patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Danos)
DCL3	<i>Dicer-like 3 Enzyme</i> (Enzima Dicer-Like 3)
DDR	<i>DNA Damage Repair</i> (Reparo de Danos do DNA)
DME	<i>DEMETER</i>
DML	<i>DEMETER-like</i>
dMTase	<i>DNA Demethylase</i> (Demetilase de DNA)

DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
DRMs	<i>Domains Rearranged Methylases</i> (Metiltransferases de Domínios Rearranjados)
dsRNAs	<i>double-stranded RNAs</i> (RNAs de fita dupla)
ELP2	<i>Elongator Complex Subunit 2</i> (Subunidade 2 do Complexo Elongator)
EMF2	<i>Embryonic Flower 2</i>
ET	<i>Ethylene</i> (Etileno)
ETI	<i>Effector-triggered Immunity</i> (Imunidade Desencadeada por Efetores)
ETS	<i>Effector-triggered Susceptibility</i> (Suscetibilidade Desencadeada por Efetores)
FIE	<i>Fertilization Independent Endosperm</i>
H1	<i>Histone 1</i> (Histona 1)
H2A	<i>Histone 2A</i> (Histona 2A)
H2B	<i>Histone 2B</i> (Histona 2B)
H3	<i>Histone 3</i> (Histona 3)
H3K27me2/3	<i>Histone 3 Lysine-27 Di/Tri-methylation</i> (Di/Tri-metilção da Lisina 27 na Histona H3)
H3K4me3	<i>Histone H3 Lysine-3 Tri-methylation</i> (Tri-metilção da Lisina 4 na Histona H3)
H3T3ph	<i>Histone H3 Threonine-3 Phosphorylation</i> (Fosforilação da Treonina 3 na Histona H3)
H4	<i>Histone 4</i> (Histona 4)
HATs	<i>Histone Acetylases</i> (Histona Acetilases)

HDA9	<i>Histone Deacetylase 9</i> (Desacetilase da histona H9)
HDACs	<i>Histone Deacetylases</i> (Histonas Deacetilases)
HR	<i>Hypersensitive Response</i> (Resposta Hipersensitiva)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INO80	<i>Inositol Requiring 80</i>
ISWI	<i>Imitation Switch</i>
JA	<i>Jasmonic Acid</i> (Ácido Jasmônico)
JmjC	<i>JmjC Domain-containing Protein</i> (Domínio Proteico Jumonj C)
MAMPs	<i>Microbe-associated Molecular Patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Micróbios)
MAP	<i>Mitogen-activated Protein</i> (Proteína Ativada por Mitógenos)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (RNA mensageiro)
MSI1	<i>Multicopy Suppressor of Ira 1</i>
MTase	<i>DNA Methyltransferase</i> (Metiltransferase de DNA)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPR1	<i>Nonexpressor of Pathogenesis-Related Gene1</i> (Gene Ativador 1 Relacionado à Patogênese)
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> (Padrões Moleculares Associados a Patógenos)
PR	<i>Pathogenesis-related Protein</i> (Proteína Relacionada à Patogênese)
PRRs	<i>Pattern Recognition Receptors</i> (Receptores de Reconhecimento de Padrões)
PTGS	<i>Post-transcriptional Gene Silencing</i> (Silenciamento Gênico)

	Pós-transcricional)
PTI	<i>PAMP-triggered Immunity</i> (Imunidade Desencadeada por PAMP)
PTMs	<i>Post-translational Modifications</i> (Modificações Pós-traducionais)
RdDM	<i>RNA-directed DNA Methylation</i> (Metilação de DNA Dependente de RNA)
RIN	<i>RNA Integrity Number</i> (Valor de Integridade do RNA)
RISC	<i>RNA-induced Silencing Complex</i> (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA)
RLKs	<i>Receptor-Like Kinases</i> (Receptores Quinases)
RLPs	<i>Receptor-Like Proteins</i> (Proteínas Semelhantes a Receptores)
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RNA Pol V	<i>RNA polymerase V</i> (RNA polimerase V)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Espécies Reativas de Oxigênio)
ROS1	<i>Repressor of Transcriptional Gene Silencing 1</i> (Proteína Repressora do Silenciamento 1)
SA	<i>Salicylic Acid</i> (Ácido Salicílico)
siRNAs	<i>small interfering RNAs</i> (Pequenos RNAs de Interferência)
sRNAs	<i>small RNAs</i> (Pequenos RNAs)
SWI/SNF	<i>Switching Defective/Sucrose Nonfermenting</i>
SWN	<i>Swinger</i>
TFs	<i>Transcription Factors</i> (Fatores de Transcrição)
TGS	<i>Transcriptional Gene Silencing</i> (Silenciamento Gênico)

Transcricional)

VvdMTase	Demetilase de DNA de <i>Vitis vinifera</i>
VvMTase	Metiltransferase de DNA de <i>Vitis vinifera</i>
VuSDG	Metiltransferase de histonas de <i>Vigna unguiculata</i>
VuJMJ	Demetilase de histonas de <i>Vigna unguiculata</i>
VuHAT	Acetilase de histonas de <i>Vigna unguiculata</i>
VuHDAC	Deacetilase de histonas de <i>Vigna unguiculata</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
1.1	OBJETIVOS.....	32
1.1.1	Objetivo Geral.....	32
1.1.2	Ojetivos Específicos.....	32
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	34
2.1	ESPÉCIES VEGETAIS DE IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA NO BRASIL.....	34
2.2	VITICULTURA.....	35
2.2.1	Importância socioeconômica da videira no Vale do Submédio São Francisco.....	35
2.2.2	Principais agentes bióticos causadores de perdas na viticultura.....	37
2.2.2.1	Reclassificação taxonômica de <i>Xanthomonas citri</i> pv. <i>viticola</i>	38
2.2.3	Cancro bacteriano da videira.....	39
2.3	FEIJÃO-CAUPI.....	41
2.3.1	Importância estratégica no Brasil e no Mundo.....	41
2.3.2	Principais estresses bióticos e abióticos causadores de perda na produção do feijão-caupi.....	42
2.3.3	Fatores abióticos: um enfoque na seca.....	43
2.3.4	Fatores bióticos: um enfoque nas viroses.....	43
2.3.4.1	Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos (CABMV).....	44
2.3.4.2	Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi (CPSMV).....	45
2.4	MECANISMOS VEGETAIS DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS.	47
2.5	MECANISMOS VEGETAIS DE RESPOSTA A SECA.....	49
2.6	MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS.....	52
2.6.1	Metilação do DNA dependente de RNA.....	53
2.6.2	Modificações pós-traducionais de histonas.....	55
2.6.3	Complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP (CRCD-ATP).....	57
2.7	A EPIGENÉTICA NA RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS.....	58

2.8	ÔMICAS E MODIFICADORES EPIGENÉTICOS: EMPREGABILIDADE E DISPONIBILIDADE DE DADOS.....	59
3	ARTIGO I: MODULAÇÃO TRANSCRICIONAL E ESTRUTURA GENÔMICA DE METILTRANSFERASES E DEMETILASES DE DNA EM <i>Vitis</i> spp. SOB INOCULAÇÃO POR <i>Xanthomonas citri</i> <i>pv. viticola</i>.....	62
4	ARTIGO II: METILTRANSFERASES E DEMETILASES DE HISTONAS EM FEIJÃO-CAUPI: IDENTIFICAÇÃO GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA SOB CONDIÇÕES ESTRESSANTES.....	92
5	ARTIGO III: ACETILTRANSFERASE E DESACETILASE DE HISTONAS EM FEIJÃO-CAUPI: GENÔMICA ESTRUTURAL E TRANSCRIPTÔMICA SOB ESTRESSES BIÓTICO E ABIÓTICO..	129
6	DISCUSSÃO GERAL.....	156
7	CONCLUSÕES.....	159
	REFERÊNCIAS.....	160

1 INTRODUÇÃO

O setor agrícola é, historicamente, umas das principais bases da economia nacional, sendo responsável por cerca de 26,6% do PIB brasileiro (calculado em R\$ 7,45 trilhões em 2020). Dentre as culturas de importância econômica, a videira e o feijão-caupi encontram-se entre as 20 espécies mais cultivadas em território nacional (IBGE, 2020).

O cultivo da videira (*Vitis vinifera* L.) apresenta significativa importância econômica, com destaque para o Submédio do Vale do São Francisco, situado na região Nordeste, a segunda maior área produtora de uvas no país (IBGE, 2020). Seu cultivo, entretanto, ainda enfrenta graves problemas fitossanitários, sendo o cancro bacteriano da videira - causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv) - uma das principais doenças que acometem essa cultura, limitando a sua produtividade e acessibilidade aos mercados interno e externo (KUHN e FAJARDO, 2003; MAPA, 2018).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.)], por sua vez, é uma leguminosa de grande importância socioeconômica em diversas áreas de clima seco e semiárido, incluindo as regiões Norte e Nordeste do Brasil. É comumente usada na dieta básica da população mais carente dessas regiões, destacando-se por sua riqueza em proteínas e minerais. Além da importância nutricional, apresenta relevante participação na geração de emprego e renda para muitas famílias menos favorecidas. Apesar do seu elevado valor estratégico, o feijão-caupi apresenta redução na sua produtividade, principalmente em decorrência ao ataque de patógenos. Dentre os fitopatógenos que acometem a referida cultura, destacam-se os vírus do gênero Potyvirus [com ênfase para o *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)] e o vírus do Mosaico Severo do feijão-caupi (CPSMV). Além desses fatores bióticos, fenômenos edafoclimáticos, como a seca, afetam severamente a produção desse grão.

Ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de resposta a condições adversas, os quais são desencadeados por modulação transcricional de genes diversos. Os fenômenos epigenéticos (também denominados de modificações epigenéticas) são reguladores da expressão gênica (ZIPFEL, 2009). Tais fenômenos estão relacionados a alterações na conformação da cromatina, tornando-a mais (ou menos)

acessível à maquinaria transcricional, o que irá resultar na regulação (indução, repressão ou inativação) da expressão de genes específicos (FERREIRA-NETO *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm relatado o papel dessas modificações epigenéticas nos mecanismos de tolerância/resistência a estresses em plantas. Por exemplo, Sánchez *et al.* (2016) demonstraram os impactos da metilação do DNA no sistema imunológico de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Os autores observaram que diferentes mutantes, defeituosos na metilação do DNA (hipometilados), exibiram indução do gene PR1 (relacionado à promoção da defesa vegetal), apresentando, assim, resistência aumentada ao patógeno biotrófico *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa). Já os mutantes hipermetilados (defeituosos na demetilação do DNA) foram mais suscetíveis a esse patógeno, exibindo repressão do gene acima citado. Além do exposto, modificações epigenéticas também foram relatadas na resposta da planta contra diversos estresses abióticos, incluindo a seca (BOCCHINI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; MOGLIA *et al.*, 2019).

A compreensão dos mecanismos moleculares de resposta a estresses ambientais, incluindo o papel de modificações epigenéticas, contribuirá para o entendimento da fisiologia molecular vegetal e para ações de melhoramento agrônomo. No entanto, estudos envolvendo a identificação, caracterização e transcriptômica dos genes codificadores das enzimas que promovem as modificações epigenéticas (também denominadas de modificadores epigenéticos) em *V. vinifera* e *V. unguiculata* sob condições desfavoráveis são inexistentes.

Diante disso, o presente trabalho objetivou identificar e caracterizar genes codificadores de modificadores epigenéticos, bem como analisar sua respectiva expressão nas culturas acima mencionadas. Para videira, tal ação foi executada para o grupo das metiltransferases e demetilases de DNA. A modulação transcricional de transcritos codificadores dessas enzimas foi analisada em acessos contrastantes (resistente e susceptível) de *Vitis* spp. submetidos à estresse por infecção de Xcv. Para o feijão-caupi, estudou-se a genômica estrutural de acetilases e desacetilases de histonas, bem como metiltransferases e demetilases de histonas. A transcriptômica desses grupos enzimáticos foi analisada em diferentes genótipos submetidos

independentemente a diferentes estresses, mais especificamente: Pingo de ouro (estresse de desidratação radicular); BR14-Mulato (injúria mecânica seguida de inoculação por CPSMV); e IT85F-2687 (injúria mecânica seguida de inoculação por CABMV). Com as análises propostas pretende-se lançar luz sobre esses importantes atores, adicionando informação ao comportamento molecular dos mesmos e fundamentando as bases para seu futuro uso biotecnológico.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Minerar genomicamente e analisar a expressão de loci codificadores de enzimas executoras de modificações epigenéticas em acessos contrastantes (tolerante *versus* suscetível) de videira submetidos à inoculação por *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, bem como em acessos resistentes/tolerantes de feijão-caupi submetidos a déficit hídrico (desidratação radicular) ou a processos de injúria mecânica seguida de inoculação por CABMV ou injúria mecânica seguida de inoculação por CPSMV, identificando-se transcritos potencialmente associados à resposta adaptativa a esses estresses.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Identificar e caracterizar estruturalmente loci codificadores de elementos pertencentes à família gênica das metilases e demetilases de DNA no genoma de videira, bem como acetilases e desacetilases de histonas e metiltransferases e demetilases de histonas no genoma de feijão-caupi;
2. Analisar a ortologia dos loci acima mencionados em relação a outras espécies vegetais;
3. Determinar os mecanismos associados à expansão genômica das famílias mencionadas nos genomas das espécies-alvo do presente trabalho;
4. Realizar análises de enriquecimento de elementos cis-regulatórios nos promotores dos loci acima citados, bem como identificar seus respectivos fatores de transcrição associados;

5. Caracterização *in silico* das proteínas codificadas pelos loci acima mencionados;
6. Analisar a expressão de transcritos codificadores de metilases e demetilases de DNA em acessos contrastantes (tolerante *versus* suscetível) de videira submetidos à inoculação de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*;
7. Analisar a expressão de transcritos codificadores de acetilases e desacetilases de histonas e metiltransferases e demetilases de histonas em diferentes genótipos de feijão-caupi submetidos a estresses como desidratação radicular ou injúria mecânica seguida de inoculação por CABMV ou injúria mecânica seguida de inoculação por CPSMV;
8. Validar a expressão dos transcritos-alvo diferencialmente expressos nos tempos de tratamentos impostos via PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESPÉCIES VEGETAIS DE IMPORTÂNCIA SOCIOECONÔMICA NO BRASIL

A biodiversidade brasileira apresenta relevante importância socioeconômica mundial e nacional, sendo a agroindústria responsável por cerca de 26,6% do PIB brasileiro (calculado em R\$ 7,45 trilhões em 2020). Quanto ao PIB do Agro, a maior participação é do setor agrícola (68%), enquanto a pecuária é responsável por apenas 32% (CEPEA, 2020).

A agricultura no Brasil é, historicamente, umas das principais bases da economia do país (IPEA, 2021). Dentre as espécies mais cultivadas no Brasil, destacam-se a videira, o feijão-caupi, a cana-de-açúcar, a soja e o milho, dentre outras espécies de grande interesse econômico (IBGE, 2020).

No Nordeste brasileiro, região que ocupa cerca de 18% do território total brasileiro, a agricultura tem um papel de destaque na economia regional, com cerca de 83% da mão de obra do campo equivalente à agricultura familiar. O Nordeste do Brasil é considerado um dos maiores produtores de diversas culturas economicamente importantes, como a soja, o feijão comum e a cana-de-açúcar, destacando-se como o segundo maior produtor de uvas de mesa (IBGE, 2020). Além disso, essa região apresenta significativa importância no consumo e produção do feijão-caupi (FERREIRA FILHO *et al.*, 2011).

O Nordeste apresenta regiões com clima quente e seco, que permitem o cultivo e produção de uvas sob irrigação, além do cultivo de espécies com tolerância à seca e à altas temperaturas, como o feijão-caupi (FREIRE-FILHO *et al.*, 2005; SILVA e CORREIA, 2010). Atualmente, a viticultura e o cultivo de feijão-caupi destacam-se pela sua importância no agronegócio brasileiro, com produção anual de 491.326 e 414.232 toneladas, respectivamente (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2021; IBGE, 2021). Além disso essas culturas apresentam destacada importância como fontes geradoras de emprego e renda para a população de baixa renda, contribuindo para o seu fortalecimento comercial tanto local como a nível nacional (CARVALHO, 2016).

Para um maior crescimento do agronegócio dessas culturas economicamente importantes, é necessário um aumento da sua produção agrícola mediante o desenvolvimento de cultivares com resistência a fatores

bióticos e abióticos e com características agronômicas e industriais de interesse, sendo fontes potenciais de genes de resistência, que poderão ser utilizadas em projetos de melhoramento. Faz-se necessária, portanto, a constante adição de tecnologias e disponibilização de novas informações para o contínuo progresso de seus programas de melhoramento. Nesse contexto, o desenvolvimento de pesquisas genéticas/genômicas tem fornecido novas perspectivas para produção de variedades melhoradas, com destaque para a cadeira produtiva da videira e do feijão-caupi.

2.2 VITICULTURA

2.2.1 Importância socioeconômica da videira no Vale do Submédio São Francisco

Globalmente, as uvas estão entre as frutas mais consumidas, apresentando produção mundial estimada em 91 milhões de toneladas, em uma área de 7.671.879 hectares, sendo utilizada na produção de vinhos, consumo *in natura* e na produção de uvas passas, sucos, geleias, vinagre, óleo de sementes e fertilizantes (LAZZAROTTO e FIORAVANÇO, 2013; FAO, 2019).

O Brasil é considerado o terceiro maior país em termos de produtividade, com 22.864 kg por hectare (ha), ocupando uma área atual de 73 mil ha (FAO, 2019). As regiões Sul e Nordeste são consideradas as maiores produtoras de uvas no país, com cerca de 53 mil e 10 mil ha de área cultivada, respectivamente. A Tabela 1 destaca a área de cultivo, nos últimos 4 anos, dessa cultura no Brasil. (IBGE, 2020).

Tabela 1. Área cultivada com videiras no Brasil, por região, em hectares, 2017 a 2020.

Região	2017	2018	2019	2020
Norte	10	26	31	30
Centro-Oeste	256	207	200	196
Sudeste	8.600	8.717	9.514	9.389
Nordeste	11.462	11.191	10.485	10.484
Sul	57.700	55.710	55.501	53.648
Brasil	78.028	75.951	75.731	73.747

Fonte: IBGE (2020).

No Nordeste brasileiro, a viticultura concentra-se no polo agrícola localizado em Petrolina (Pernambuco) e Juazeiro (Bahia), situado no Submédio do Vale São Francisco. Em 2020, o estado do Pernambuco destacou-se como o segundo maior produtor de uvas do Brasil, com aproximadamente 364 mil toneladas e produtividade média de 43.984 kg/ha (IBGE, 2020). A Tabela 2 apresenta dados atualizados e detalhados de produção e produtividade em cada estado das cinco regiões do país.

Tabela 2. Produção e produtividade de uvas no Brasil, por estado e região, 2019 a 2020.

Região	Estado	Safra 2019 (toneladas)	Safra 2020 (toneladas)	Rendimento Médio (kg/ha) 2019	Rendimento Médio (kg/ha) 2020
Norte	Rondônia	219	213	7.300	7.577
	Tocantins	12	12	12.000	12.000
	Total	231	225	7.452	7.741
Sul	Paraná	48.000	57.556	12.000	14.389
	Santa Catarina	59.525	50.128	14.900	15.380
	Rio Grande do Sul	666.423	835.769	14.375	15.993
	Total	773.948	943.453	14.239	15.829
Sudeste	Minas Gerais	17.307	16.707	15.398	14.317
	São Paulo	148.379	147.005	18.457	18.305
	Espírito Santo	3.207	3.240	15.876	16.000
	Rio de Janeiro	206	201	9.810	9.550
	Total	169.099	167.153	18.016	17.990
Centro-Oeste	Mato Grosso do Sul	72	54	12.000	10.800
	Mato Grosso	1.304	1.261	24.604	24.750
	Goiás	1.656	2.093	19.714	20.874
	Distrito Federal	1.235	1.267	21.667	22.228
	Total	4.267	4.675	21.335	21.967
Nordeste	Ceará	564	542	24.552	28.038
	Paraíba	2.600	2.600	20.000	20.000
	Pernambuco	420.830	363.135	50.973	44.266
	Bahia	74.142	57.942	40.760	28.899
	Piauí	24	120	24.000	24.000
	Total	498.160	424.339	48.701	41.483
Brasil		1.445.705	1.539.845	19.483	19.602

Fonte: IBGE (2020)

O alto índice de produtividade no Vale do São Francisco está diretamente associado ao seu clima predominante quente e seco. Essa condição permite, por sua vez, o manejo da irrigação que, associado à aceleração dos processos fisiológicos, garante o crescimento acelerado dos vinhedos. Dessa forma, é possível produzir cerca de duas safras e meia por ano, sendo o ciclo de reprodução em torno de 120 dias, garantindo uma

produtividade acima da média nacional (SILVA e CORREIA, 2010). No Sul do Brasil, por exemplo, a viticultura é praticada da forma tradicional, com apenas um ciclo anual no qual, após a poda, a planta inicia a brotação, floresce, frutifica, amadurece e novamente entra em repouso vegetativo (KISHINO e MARUR, 2007).

A viticultura tem sofrido grandes transformações, tendo assumido maior importância na região do Vale do São Francisco. Visando atender às demandas internas e externas do mercado consumidor, destaca-se como uma das principais frutas em termos de importação, além de ser uma grande exportadora de uvas finas de mesa de alta qualidade (OLIVEIRA, 2016). A viticultura apresenta, portanto, uma relevante importância econômica e social nessa região, gerando empregos diretos e indiretos no campo, contribuindo assim para seu fortalecimento comercial tanto local como em nível nacional (CARVALHO, 2016).

Apesar do seu alto potencial social e econômico, a viticultura enfrenta diversos problemas fitossanitários que podem ocasionar prejuízos diretos, diminuindo a vida útil dos parreirais instalados a médio/longo prazo no Vale do São Francisco (NAUE, 2013). Dentre os fatores que podem afetar negativamente a sua produção, destacam-se as doenças causadas por microrganismos, como bactérias, fungos e vírus (CAETANO *et al.*, 2017).

2.2.2 Principais agentes bióticos causadores de perdas na viticultura

A videira sofre impacto negativo de patógenos de natureza diversa. As principais doenças causadas por fungos nessa cultura são: Míldio (*Plasmopara viticola*), Oídio (*Uncinula necator*) e Antracnose (*Elsinoe ampelina*). No que tange aos agentes virais, destacam-se: a Virose do enrolamento das folhas (*Grapevine leafroll*), a Degenerescência (*Grapevine fanleaf*) e a Necrose das Nervuras (*Grapevine vein necrosis*). Já as bactérias mais frequentes que acometem a videira são: *Agrobacterium vitis*, causadora das Galhas de Coroa e a Xcv, agente causador do Cancro Bacteriano (CAETANO *et al.*, 2017). Nas próximas seções, será dada ênfase à Xcv, agente etiológico do Cancro Bacteriano, foco do nosso trabalho.

2.2.2.1 Reclassificação taxonômica de *Xanthomonas citri* pv. *viticola*

Após comparações entre sequências nucleotídicas, o gênero *Xanthomonas* Dowson está classificado filogeneticamente no Domínio Bacteria, Filo Proteobacteria, Classe Gamaproteobacteria, Ordem Xanthomonadales e Família Xanthomonadaceae (GARRITY e HOLT, 2000). Inicialmente, a bactéria causadora do cancro bacteriano foi classificada por Nayudu (1972) como *Pseudomonas viticola*. Posteriormente, Young *et al.* (1978) sugeriram o termo 'patovar' (abreviação: pv) para classificar as bactérias fitopatogênicas, incluindo as pertencentes ao gênero *Xanthomonas*. Nesse contexto, *P. viticola* foi reclassificada como *X. campestris* pv. *viticola*.

Takita *et al.* (2004), analisando a região *rpf* (Regulação de Fatores de Patogenicidade) de 21 isolados pertencentes a diferentes patovares de *X. campestris*, verificaram que o patovar 'viticola' teve maior similaridade com *X. axonopodis* pv. *citri*, sugerindo que *X. campestris* pv. *viticola* fosse agrupada na espécie *X. axonopodis*. No entanto, devido à ausência de estudos taxonômicos mais abrangentes com o agente causal do cancro bacteriano, o 'Comitê sobre Taxonomia de Fitobactérias', da Sociedade Internacional de Fitopatologistas (Committee on the Taxonomy of Plant Pathogenic Bacteria – International Society of Plant Pathology), sugeriu o uso da alcunha *X. campestris* pv. *viticola* (BULL *et al.*, 2010).

Recentemente, a fim de compreender melhor sua posição taxonômica no gênero, Gama *et al.* (2018) analisaram a relação filogenética de *X. campestris* pv. *viticola* com outras espécies do gênero. Mediante técnicas de análise de sequência multilocus (MLSA), valores médios de identidade nucleotídica (ANI) e coeficientes de correlação de frequência tetranucleotídica (TETRA), os autores observaram que *X. campestris* pv. *viticola* está intimamente relacionada com *X. citri* subsp. *citri*. Portanto, os autores sugeriram a reclassificação de *X. campestris* pv. *viticola* para a denominação atual, *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu, 1972) Dye 1978 comb. nov., recomendação acatada no presente estudo.

2.2.3 Cancro bacteriano da videira

O cancro bacteriano da videira foi relatado, pela primeira vez no Brasil, no início de 1998, em parreirais do Vale do Submédio São Francisco (MALAVOLTA JR *et al.*, 1999). Essa doença é considerada um dos problemas que mais ameaçam a estabilidade fitossanitária da referida região. Além de pôr em risco sua competitividade em termos de produtividade, o cancro bacteriano da videira pode limitar a viticultura nesta região, sendo considerada uma Praga Quarentenária Presente A2 (MAPA, 2018).

O processo de infecção da Xcv ocorre através do mesófilo do hospedeiro, por meio de aberturas naturais, como os estômatos, lesões no tecido vegetal (NASCIMENTO e MARIANO, 2004) e danos nos tricomas (ARAUJO e ROBS, 2000). Após infectar a planta, a bactéria multiplica-se rapidamente, colonizando os espaços intercelulares, atingindo o parênquima xilemático e vasos condutores do sistema vascular, ocasionando infecções sistêmicas (ARAÚJO *et al.*, 2002; NASCIMENTO e MARIANO, 2004).

Em plantas infectadas, os sintomas nas folhas surgem como pontos necróticos de 1 a 2 mm de diâmetro, com ou sem halos amarelados, algumas vezes coalescendo e causando a morte de extensas áreas do limbo foliar (NASCIMENTO *et al.*, 2000). Nos pecíolos (**Figura 1A**) e nervuras (**Figura 1B**) das folhas, nos ramos (**Figura 1C**) e ráquis dos frutos (**Figura 1D**), formam-se manchas escuras e alongadas de coloração negra, conhecidas como cancrios. Tais manchas atingem de 3 a 5 cm de extensão que podem aprofundar nos tecidos, afetando vasos condutores e provocando o colapso no transporte de seiva (FREIRE e OLIVEIRA, 2001).

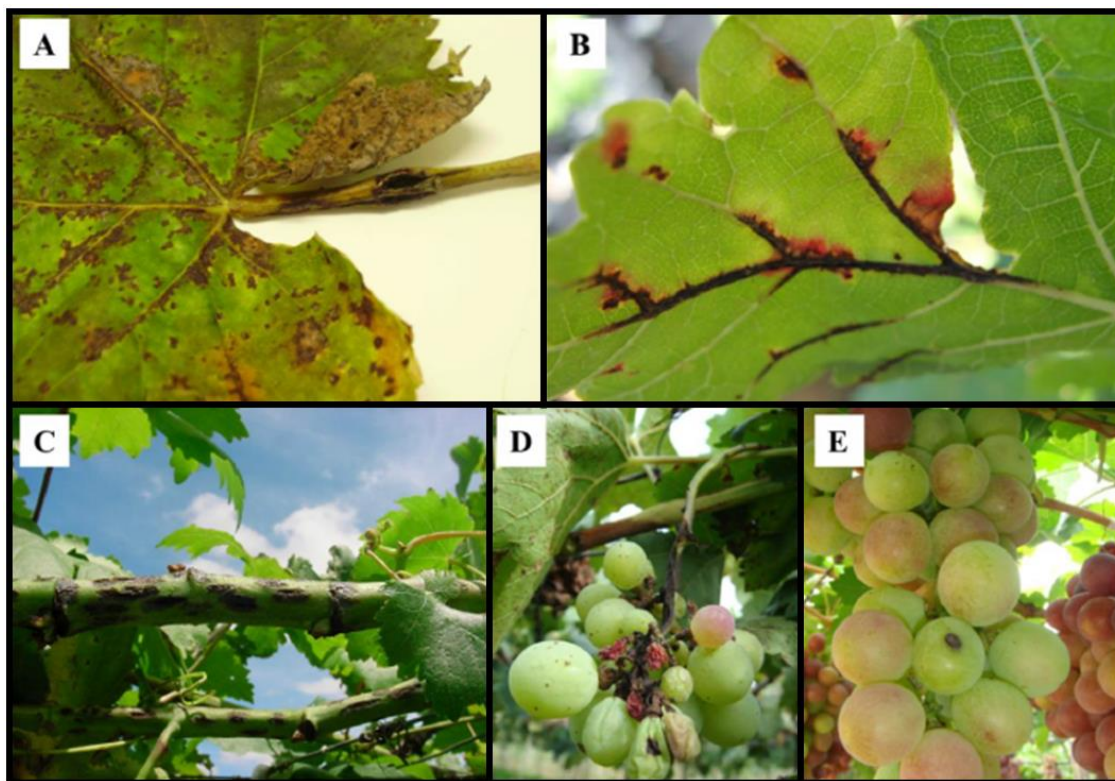


Figura 1. Sintomas do cancro bacteriano da videira: **(A)** manchas escuras e angulares distribuídas de forma dispersa e lesões escuras e alongadas no pecíolo, que evoluem para as fissuras longitudinais de coloração negra, conhecidas como cancro; **(B)** nervuras com lesões escuras e alongadas; **(C)** ramos com manchas escuras, alongadas e cancrios; **(D)** ráquis dos frutos com lesões escuras, alongadas e cancrios; **(E)** bagas com lesões necróticas. Fonte: Naue (2013).

Em relação às bagas, os sintomas observados são as desuniformidades no tamanho e na cor, podendo, também, apresentar lesões necróticas (**Figura 1E**; NAYUDU, 1972). A intensidade dos sintomas causados por *Xcv* varia segundo o nível de resistência da variedade à doença e às condições ambientais (LIMA, 2001). Em cultivares suscetíveis como, a exemplo da Red Globe, o principal impacto envolve a redução da sua produtividade. Lima *et al.* (1999) observaram uma incidência de até 100% de inviabilidade dessa variedade com dois a três anos de idade após a enxertia.

O controle do cancro bacteriano da videira compreende, contudo, um desafio bastante complexo, uma vez que não existem produtos específicos de combate à doença (MARQUES *et al.*, 2009). Em plantas, uma forma alternativa de combate às doenças causadas por microrganismos compreende principalmente uso de cultivares resistentes.

Entre as videiras, um estudo preliminar classificou a espécie *V. labrusca* como resistente a moderadamente resistente ao cancro bacteriano (CHAND, 1992). Já estudos posteriores indicaram que as cultivares Niágara Rosada e Niágara Branca apresentam os menores índices de severidade da doença, enquanto que as cultivares Red Globe, Itália, Benitaka e Rubi apresentaram os maiores índices (MALAVOLTA e ALMEIDA, 2003). De acordo com Lima *et al.* (1999), as cultivares porta-enxertos IAC 572, 766 e 420, usadas na região do Submédio do Vale São Francisco, não mostraram sintomas quando enxertadas com variedades altamente suscetíveis. Nascimento *et al.* (2006), por sua vez, verificaram que os menores índices de doença estão relacionados à variedade Isabel (*V. labrusca*) e a cultivar Paulsen1103 (*V. berlandieri* x *V. rupestris*), enquanto as cultivares de *V. vinifera* foram as mais suscetíveis. Até o momento, não foram identificadas cultivares de *V. vinifera* com resistência genética ao cancro bacteriano no mercado.

2.3 FEIJÃO-CAUPI

2.3.1 Importância estratégica no Brasil e no Mundo

Em nível global, o feijão-caupi é considerado uma das 23 espécies cultivadas mais importantes (COWPEA GENOMICS, 2008), apresentando produção mundial estimada em 72 milhões de toneladas, a qual abrange uma área de 12,5 milhões de ha, resultando em uma produtividade de 5.788 Kg/ha (FAO, 2021). A produção do feijão-caupi no Brasil no ano de 2020, foi de 512.233 toneladas, colhidas em 1.099.560 hectares, com produtividade média de 466 kg/ha (EMBRAPA ARROZ e FEIJÃO, 2021). No que se refere ao mercado internacional, o Brasil é o terceiro maior exportador mundial dos grãos dessa leguminosa, atrás somente de Estados Unidos da América e do Peru, respectivamente (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2017).

O feijão-caupi apresenta produção e consumo destacados nas regiões Norte e Nordeste do país, com recente expansão para áreas de cerrado. Essa cultura destaca-se por sua importância socioeconômica, gerando elevadas taxas de emprego e renda, especialmente para as regiões Norte e Nordeste do país (FREIRE-FILHO *et al.*, 2011). Indicadores de emprego e faturamento

associados à cultura apontam sua participação na geração de 961.993 empregos, com o valor de produção estimado em cerca de R\$ 643 milhões (ROCHA *et al.*, 2017). Adicionalmente, o feijão-caupi representa uma excelente fonte de proteínas, contendo todos os aminoácidos essenciais, carboidratos, minerais e grande quantidade de fibras dietéticas (FREIRE-FILHO *et al.*, 2005).

Além do exposto, o feijão-caupi é bem adaptado às condições de clima e solo das regiões Norte e Nordeste, sendo possuidor de uma grande variabilidade genética. Essa característica o torna uma cultura versátil, podendo seu plantio ser conduzido em diferentes sistemas de produção, tradicionais ou modernos. Essa leguminosa também se destaca por ser amplamente utilizada na alimentação de animais, sendo empregada na forma de forragem verde, feno e ensilagem (FREIRE-FILHO *et al.*, 2005). Dessa forma, a cultura do feijão-caupi apresenta grande valor estratégico.

Embora o feijão-caupi apresente relevante importância agronômica e nutricional, sua produtividade ainda é comprometida por diversos estresses de natureza biótica e abiótica (BOUKAR *et al.*, 2016). Perdas resultantes desses estresses conduzem à diminuição do rendimento médio das colheitas em mais de 50%, representando assim um grande desafio diante da crescente população mundial (GAO *et al.*, 2007).

2.3.2 Principais estresses bióticos e abióticos causadores de perdas na produção do feijão-caupi

O crescimento e a produtividade do feijão-caupi podem tornar-se limitados diante de alguns fatores bióticos e abióticos que ocasionam sérias ameaças à agricultura e resultam na degradação do ambiente (BOUKAR *et al.*, 2016). Dentre os estresses bióticos de importância econômica que afetam negativamente o feijão-caupi, destacam-se os insetos de maneira geral, as ervas daninhas, fungos, bactérias, nematoides e viroses (BASTOS, 2016; BOUKAR *et al.*, 2016). Por sua vez, os elementos estressores de natureza abiótica que mais afetam a produção do feijão-caupi incluem a seca, o calor, a baixa fertilidade do solo (BOUKAR *et al.*, 2016), altas concentrações de CO₂ e altos níveis de radiação solar (SINGH *et al.*, 2010), entre outros.

2.3.3 Fatores abióticos: um enfoque na seca

As mudanças climáticas podem levar a eventos extremos, como o aumento da precipitação e longos períodos de seca (IPCC, 2007). Dessa forma, a estiagem destaca-se como um dos fatores que mais ameaçam a produção agrícola, uma vez que está diretamente relacionada com um dos recursos mais importantes para o desenvolvimento da planta (PINHEIRO e CHAVES, 2011). A exposição prolongada a um período de estiagem ainda compromete, significativamente, o rendimento de acessos do feijão-caupi.

Na região Nordeste do Brasil, o feijão-caupi é a principal leguminosa cultivada devido à sua plasticidade morfológica e fisiológica sob estresse hídrico (ANYIA e HERZOG, 2004; SOUZA *et al.*, 2004; HAMIDOU *et al.*, 2007; BASTOS *et al.*, 2011). Embora a cultura seja adaptada às condições ambientais de cultivo, a sua baixa produtividade nessa região é resultante de vários fatores, como: o uso de sementes não melhoradas; o cultivo em solos de baixa fertilidade; e, principalmente, a irregularidade das precipitações pluviométricas, sendo a seca considerada uma condição comum no Nordeste do país (NASCIMENTO *et al.*, 2011).

Segundo dados apresentados pela Embrapa Arroz e Feijão (2020), a produtividade média do feijão-caupi no Brasil em 2018 foi de apenas 497 Kg/ha, valor considerado baixo em relação aos padrões de outras espécies vegetais próximas. O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.), por exemplo, apresentou produtividade média equivalente a 1.496 Kg/ha para esse mesmo período. Em condições favoráveis, plantas de feijão-caupi podem produzir mais de 1.000 kg de grãos por ha, mas a seca reduz esse potencial para aproximadamente 360 kg/ha (BASTOS *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2011).

2.3.4 Fatores bióticos: um enfoque nas viroses

Dentre os diversos fatores bióticos que afetam o cultivo de espécies vegetais, destacam-se as doenças causadas por agentes patogênicos como, fungos, bactérias e nematoides, além de predação por insetos. No que diz respeito ao feijão-caupi, no Brasil as viroses são consideradas os fatores bióticos que mais limitam o seu cultivo (BARROS, 2010).

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

2.3.4.1 Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos (CABMV)

O Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos pertence à família Potyviridae e ao gênero Potyvirus. Esse gênero reúne mais de 100 espécies virais que infectam plantas, correspondendo a 16% de todas as viroses que acometem esses organismos, o que justifica a grande importância econômica do referido grupo (LIMA *et al.*, 2005). Sua transmissão ocorre em segundos, por meio de várias espécies de pulgões (como *Aphis cracivora* e *Myzus persicae*) e afídeos, através de “picadas de prova” [transmissão não persistente (PIRONE, 1991; GRAY, 1996; Bastos, 2016)].

A doença ocasionada por esse vírus foi relatada pela primeira vez no Brasil no ano de 1974, sendo observada em diversos países como, Estados Unidos, Itália, Holanda, Austrália, Japão, Filipinas, China, Marrocos e Zâmbia (PIO-RIBEIRO *et al.*, 2005). Os sintomas dessa doença são caracterizados pelo aparecimento, nos folíolos, de um mosaico forte marcado por áreas amareladas alternadas por outras de verde normal (**Figura 2**). A presença de faixas verdes nas nervuras pode estar associada ou não à distorção foliar. Quando as plantas são infectadas no início de seu desenvolvimento, elas podem apresentar redução no porte, podendo levar ao nanismo (BASTOS, 2016).



Figura 2. Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com Vírus do Mosaico do Feijão-caupi Transmitido por Afídeos (CABMV). Fonte: Barros (2010).

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

2.3.4.2 Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi (CPSMV)

Segundo o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2020), o CPSMV pertence ao gênero Comovirus e à família Secoviridae. Esse vírus é de fácil transmissão mecânica e em condições naturais é transmitido por espécies de besouros dos gêneros *Diabrotica* e *Cerotoma* (Costa *et al.*, 1978), havendo também registros de sua transmissão pelo manhoso [*Chalcodermus bimaculatus* (ATHAYDE SOBRINHO *et al.*, 2000)]. Há relatos de disseminação do CPSMV em praticamente todas as regiões produtoras de feijão-caupi no país, tendo sua ocorrência registrada em diversos estados brasileiros como: Acre, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Pará, Paraíba,

Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro, São Paulo e no Distrito Federal (BRIOSO *et al.*, 1994).

Os principais sintomas característicos dessa virose são: intenso encrespamento do limbo foliar (em virtude das bolhosidades) e a presença de mosqueado, ou seja, alternância de zonas de coloração verde-clara com outras de cor verde-escura nos folíolos (**Figura 3**). Também pode ser observado subdesenvolvimento das nervuras principais, resultando em franzimento e redução do limbo e distorção foliar (BASTOS, 2016).



Figura 3. Morfologia de uma planta de feijão-caupi inoculada com Vírus do Mosaico Severo do Feijão-caupi (CPSMV). Fonte: Barros (2010).

Quando infectadas no início do ciclo, as plantas apresentam intenso nanismo, o que pode ocasionar grandes perdas na produção. Essa virose pode diminuir a produção em até 80%, dependendo da idade em que a planta foi infectada. As sementes obtidas de plantas doentes apresentam-se deformadas, murchadas e manchadas, com redução de seu poder germinativo (BASTOS, 2016).

No que tange às medidas de controle, destaca-se a utilização de cultivares comerciais altamente resistentes, como a BR 10 - Piauí, BR 14 -

Mulato e BR 17 - Gurguéia. Outras medidas podem ser tomadas, como controle dos vetores, plantio em época de baixa população dos vetores e eliminação das plantas hospedeiras silvestres (BASTOS, 2016).

2.4 MECANISMOS VEGETAIS DE DEFESA CONTRA PATÓGENOS

As plantas desenvolveram inúmeros mecanismos de defesa contra os agentes patogênicos permitindo, assim, a sobrevivência desses vegetais sésseis (ZIPFEL, 2009). Esses organismos reconhecem os patógenos principalmente através de duas classes distintas de receptores imunes (SCHWESSINGER e RONALD, 2012; SPOEL e DONG, 2012; ZVEREVA e POOGGIN, 2012; DANGL *et al.*, 2013). A primeira classe consiste em receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) associados à superfície celular, que são frequentemente representados por receptores quinases (RLKs - *Receptor-Like Kinases*) e proteínas semelhantes a receptores (RLPs - *Receptor-Like Proteins*). Os PRRs reconhecem motivos estruturais conservados presentes em micróbios, tais motivos são conhecidos como padrões moleculares associados a micróbios ou a patógenos (MAMPs ou PAMPs; *Microbe- or Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (MACHO e ZIPFEL, 2014). Dessa forma, a percepção de PAMPs (ou MAMPs) por PRRs ativa a imunidade desencadeada por PAMP (PTI - *PAMP-triggered Immunity*), que consiste em uma cascata de transdução de sinais, resultando em uma reprogramação transcricional e biossíntese de moléculas de defesa específica (HOGENHOUT *et al.*, 2009; BIGEARD *et al.*, 2015).

Já a segunda classe de receptores imunes envolve receptores intracelulares denominados proteínas R, as quais são codificadas por genes R (JONES e DANGL, 2006; TSUDA e KATAGIRI, 2010). Esses receptores reconhecem direta ou indiretamente efetores secretados por patógenos para o ambiente intracelular do hospedeiro e ativam a imunidade desencadeada por efetores (ETI - *Effector-Triggered Immunity*) (HOWDEN e HUITEMA, 2012). Essa imunidade é frequentemente manifestada na resposta hipersensitiva (HR), associada à morte celular rápida, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ácido salicílico (SA), bem como a expressão de genes relacionados à defesa (WIN *et al.*, 2012).

O modelo amplamente aceito para evolução do sistema imune em plantas foi proposto originalmente por Jones e Dangl (2006). Esse modelo, conhecido como modelo Zig-Zag, considera apenas as interações entre plantas e patógenos não virais. Dessa forma, um novo modelo Zig-Zag foi proposto por Zvereva e Pooggin (2012) a partir de diversos estudos demonstrando a atuação do sistema imune de plantas em resposta às infecções virais. Esse novo modelo agrega informações relacionadas às interações planta-vírus ao modelo proposto por Jones e Dangl (2006), sendo, portanto, uma extensão desse modelo.

No modelo de Zvereva e Pooggin (2012), a interação envolve quatro fases distintas (**Figura 4**). Na fase 1 as plantas detectam PAMPs e padrões moleculares associados a danos (DAMPs - *Damage-Associated Molecular Patterns*) via PRRs para induzir a PTI e, no caso de patógenos virais de RNA, as plantas detectam RNA viral de cadeia dupla (dsRNA) para ativar o silenciamento de RNA.

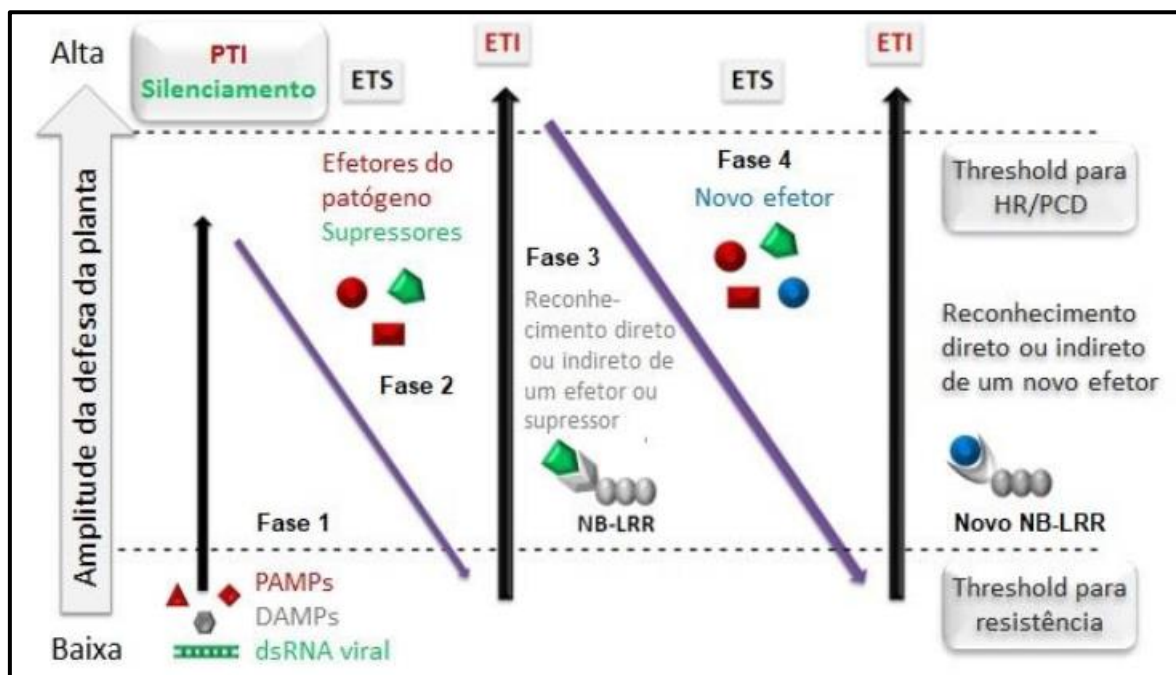


Figura 4. Modelo Zig-Zag para evolução da imunidade inata e silenciamento de plantas baseado na defesa contra patógenos virais e não virais [extensão do modelo proposto por Jones e Dangl (2006)]. dsRNA: RNA de cadeia dupla; DAMPs: Padrões Moleculares Associados a Danos; PAMPs: Padrões Moleculares Associados a Patógenos; PTI: Imunidade Desencadeada por PAMP; ETS: Susceptibilidade Desencadeada por Efetores; ETI: Imunidade Desencadeada por Efetores; HR: Resposta Hipersensitiva; PCD: Morte Celular Programada. Adaptado de Zvereva e Pooggin (2012).

Na fase 2 os agentes patogênicos virais e não virais bem-sucedidos apresentam efetores/supressores que interferem tanto no PTI quanto no silenciamento, resultando em susceptibilidade desencadeada por efetores (ETS). Já na fase 3, um efector ou supressor é reconhecido direta ou indiretamente por uma proteína NB-LRR, ativando a ETI, que poderá levar a uma resposta hipersensível e morte celular programada (PCD - *Programmed Cell Death*). Por fim, a fase 4, ocorre em relação a patógenos que evoluíram de maneira a evitar a ETI, diversificando seu gene efector, ou através da aquisição de efetores adicionais que suprimem a ETI. Nesse contexto, as plantas podem sofrer modificações e adquirir novos genes R, os quais atuarão para que a ETI possa ser acionada novamente (Jones e Dangl, 2006). Assim, o resultado da interação planta-patógeno é proporcional à [(PTI + Silenciamento – ETS) + ETI].

Além disso, os hormônios vegetais, como ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA), ácido abscísico (ABA) e etileno (ET), desempenham papéis importantes na regulação das redes de sinalização envolvidas nas defesas das plantas (ROBERT-SEILANIAN *et al.*, 2011).

2.5 MECANISMOS VEGETAIS DE RESPOSTA A SECA

Diante de fatores abióticos, como seca, as plantas dispõem de uma maquinaria celular diversificada, a qual atua em níveis estratificados como percepção, sinalização, controle transcricional e reorganização de vias responsivas ao estresse (BARTELS e SOUER, 2003; PANDEY, 2008).

Os mecanismos genéticos de percepção que estão relacionados às respostas à seca nos vegetais incluem diversas classes de genes, tradicionalmente divididos em dois grupos: (I) proteínas reguladoras; e (II) proteínas funcionais e estruturais (BENKO-ISEPPON *et al.*, 2011) (**Figura 5**).

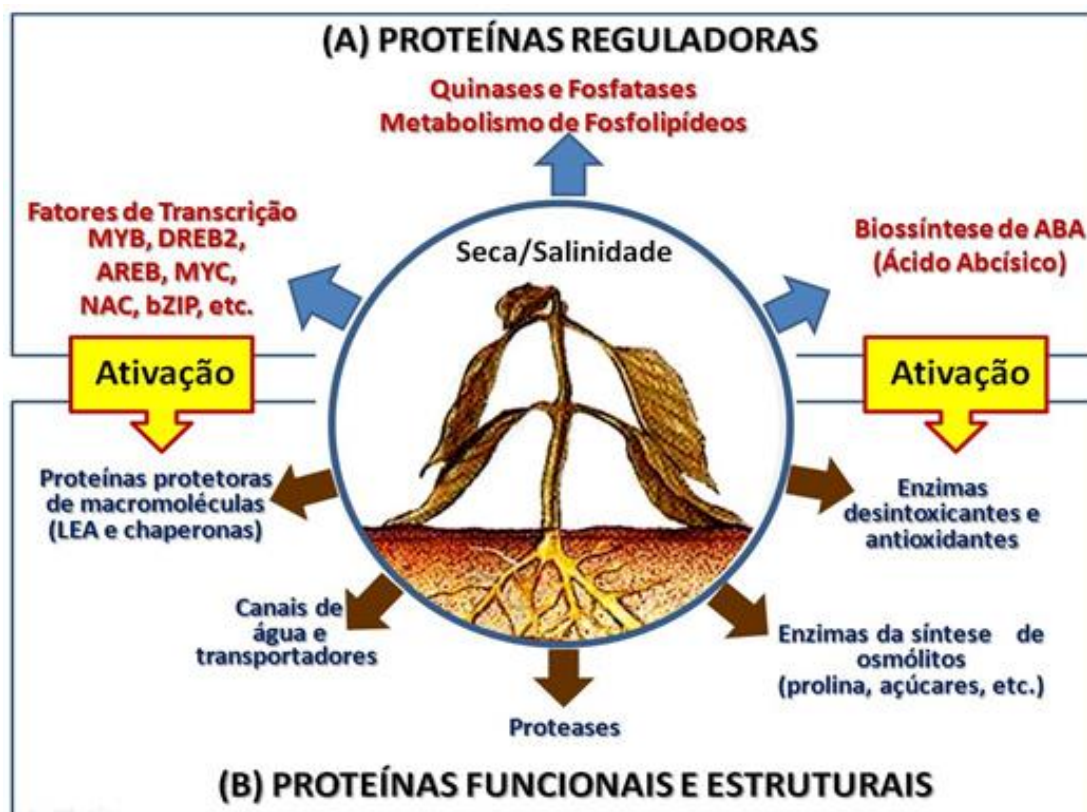


Figura 5. Principais categorias de genes envolvidos na resposta vegetal a estresses abióticos, com ênfase para seca. Após a percepção do estresse são acionados grupos de genes envolvidos na regulação e transdução de sinais **(A)**, acionando cascatas de sinalização que induzem genes que codificam proteínas diretamente envolvidas nos mecanismos de tolerância ao referido estresse **(B)**. Fonte: Benko-Iseppon *et al.* (2011).

O primeiro grupo (**Figura 5A**) inclui genes associados às cascatas de sinalização e ao controle transcricional como, proteínas quinases (MUHAMMAD *et al.*, 2019) e diferentes classes de fatores de transcrição (JOSHI *et al.*, 2016), respectivamente. O segundo grupo (**Figura 5B**), por sua vez, engloba genes codificadores de proteínas que funcionam diretamente na proteção de membranas [como as aquaporinas - AQP (ZHOU *et al.*, 2012)], genes codificadores de chaperonas [como proteínas LEA (Late embryogenesis abundant; (MAGWANGA *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2005)], além de codificadores de enzimas para biossíntese de osmólitos (AHN *et al.*, 2011).

À medida que as condições de seca aumentam, alguns osmólitos, como poliaminas, açúcares (trealose, frutano), aminoácidos (prolina), álcoois de açúcar (manitol, sorbitol, D-ononitol), betaínas e compostos relacionados [GABA (Ácido gama-aminobutírico, glicinabetaína), se acumulam nas células vegetais, auxiliando o sistema de defesa antioxidante e mantendo a

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

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

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

Os mecanismos de ajuste bem como a síntese das moléculas associadas à resposta da planta a condições adversas são controlados, primariamente, via modulação da transcrição de genes específicos. Tal modulação é regulada por muitos fatores de transcrição (TFs) que regulam a resposta da defesa (THILMONY *et al.*, 2006). O papel de TFs na modulação da expressão gênica tem sido amplamente estudado. Nos últimos anos, pesquisas têm revelado mecanismos adicionais de regulação da expressão associada a fenômenos epigenéticos.

A epigenética estuda as modificações da expressão gênica, que podem ser herdadas via linhagem reprodutiva (meiose) ou somática (mitose) advindo de alterações químicas e/ou alteração conformacional na cromatina. Tal herança pode ser repassada tanto para células filhas quanto para uma progênie de indivíduos (FENG *et al.*, 2010).

Nesse contexto, diversos estudos têm relatado que o transcriptoma de um determinado tecido sob estresse pode ser influenciado por modificações epigenéticas em genes de interesse, sendo observado tanto em animais (STANKIEWICZOK *et al.*, 2013) quanto em vegetais (CHINNUSAMY e ZHU, 2009). Nesse último grupo, diversos mecanismos associados à tolerância/resistência a estresses, como alteração da expressão de genes específicos (WANG *et al.*, 2014) e sinalização hormonal (ZHU, 2010), podem ser controlados pela ação de enzimas cujas modificações originam fenômenos epigenéticos.

2.6 MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS

Modificações epigenéticas são originadas de alterações (estruturais e/ou químicas) na cromatina que alteram (facilitando ou inibindo) a acessibilidade da maquinaria transcricional à região promotora de genes específicos. Essas modificações são desencadeadas por três processos enzimáticos: (1) metilação do DNA dependente de RNA; (2) modificações pós-traducionais de histonas; (3) ação de complexos remodeladores da cromatina (FEREIRA-NETO *et al.*, 2017).

2.6.1 Metilação do DNA dependente de RNA

A metilação do DNA consiste na adição, catalisada por enzimas DNA metiltransferases, de um grupo metil ao quinto carbono da citosina. Tal reação é conservada tanto em plantas como em mamíferos (LAW e JACOBSEN, 2010). Esse mecanismo tem como funções a proteção do genoma contra a expansão de elementos transponíveis e a regulação da expressão gênica (CHAN *et al.*, 2005). Em relação à regulação da expressão gênica, a metilação de citosinas exerce tal ação via dois mecanismos: repressão transcricional por meio do bloqueio da ligação de ativadores transcricionais às suas sequências cognatas; e recrutamento de repressores da transcrição causando, assim, o silenciamento da expressão gênica (DOYES e BIRDT, 1991; WATT e MOLLOY, 1998).

Em plantas, a metilação de DNA, dependente de RNA, requer pequenos RNAs de interferência (siRNAs), além de enzimas metiltransferase DRMs (*Domains Rearranged Methylases*) e outros grupos proteicos, como Dicer-like 3 (DCL3) e ARGONAUTE4 (AGO4) (CARTHEW e SONTHEIMER, 2009; WATANABE *et al.*, 2011; MATZKE e MOSHER, 2014). Tal mecanismo é denominado de metilação *de novo*.

A metilação *de novo* consiste na formação de transcritos através da atividade da RNA polimerase IV (**Figura 6A**). Esses transcritos serão utilizados como moldes para síntese de RNAs de fita dupla (dsRNAs), por meio da ação da enzima RNA polimerase dependente de RNA [DR2 (**Figura 6B**)] (LAW *et al.*, 2011) sendo, em seguida, digeridos pela enzima DCL3 (**Figura 6C**). Essa digestão resulta em pequenos fragmentos de 24 nucleotídeos, os siRNAs (XIE *et al.*, 2004). Posteriormente, esses siRNAs são exportados para o citoplasma, onde interagem com a proteína AGO4, a qual reconhece e cliva essas moléculas de fita dupla, mantendo uma única fita, que serve como guia (**Figura 6D**). Junto com DICERs e outras enzimas, a AGO4 forma o complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Esse complexo é encaminhado então para o núcleo, interagindo fisicamente com o transcrito produzido pela RNA polimerase V através da complementariedade de bases [**Figura 6E** (EL-SHAMI *et al.*, 2007; WIERZBICKI *et al.*, 2008; WIERZBICKI *et al.*, 2009)]. Por fim, esse novo complexo protéico recruta a DRM2 para catalisar o processo de metilação

de novo em todos os contextos de sequências: 5'-CG-3'; 5'-CHG-3' e 5'-CHH-3' (H = A, C ou T) [Figura 6F (CAO e JACOBSEN, 2002; CAO *et al.*, 2003; CHAN *et al.*, 2004)].

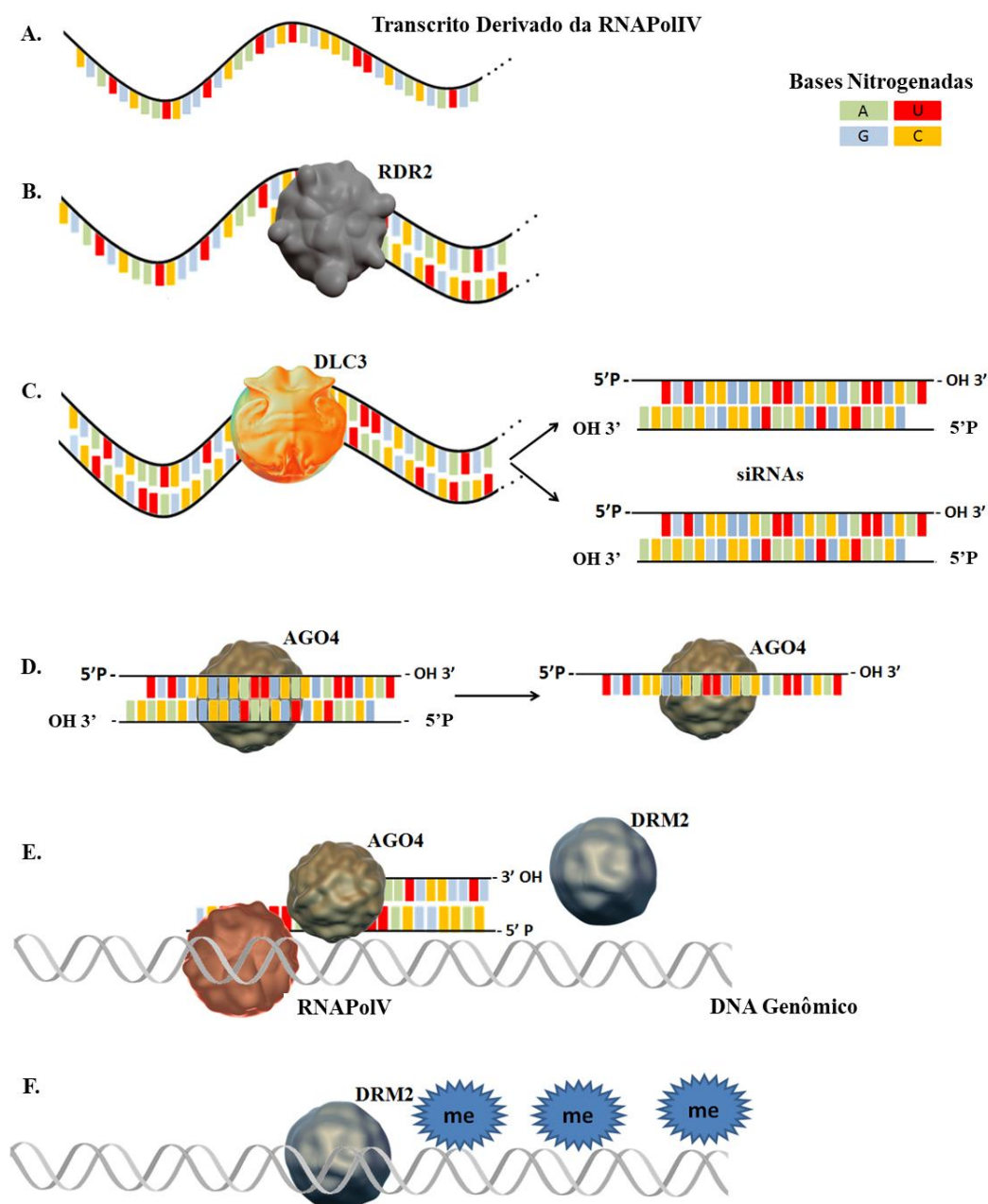


Figura 6. Processo de metilação de citosina do DNA dependente de siRNAs (RdDM). (A) RNA polimerase IV origina um transcrito; (B) RDR2 reconhece e copia o referido transcrito, gerando um RNA dupla fita (dsRNA); (C) a enzima DLC3 cliva o dsRNA originado, produzindo siRNAs de 24 pb; (D) a proteína AGO4 lê os siRNAs e digere a molécula de fita dupla mantendo uma única fita que serve como guia; (E) a fita guia interage fisicamente com o transcrito produzido pela RNA polimerase V, marcando o locus a ser metilado (me); (F) o complexo RISC recruta metiltransferase DRM2. Fonte: Adaptada de Ferreira-Neto *et al.* (2017).

Quanto à manutenção, ou herdabilidade, do processo de metilação de citosinas após a replicação do DNA (processo distinto da metilação *de novo* de citosinas), dois diferentes grupos enzimáticos têm sido relatados e ocorrem somente nos contextos ditos simétricos: subfamília MET1 das metiltransferases, para o contexto 5'-CG-3' (JONES *et al.*, 2001); e a subfamília CMT3 de metiltransferases para o contexto 5'-CHG-3' [H = A, T C ou G (BARTEE *et al.*, 2001; LINDROTH *et al.*, 2001)]. Já manutenção ou herdabilidade da metilação do contexto 5'-CHH-3' (dito assimétrico) não ocorre, sendo executado somente pelo mecanismo *de novo*, acima citado.

Apesar de ser um mecanismo quimicamente estável, grupos metil adicionados às citosinas podem ser removidos através de processos de demetilação, que está associado à ativação da expressão gênica (ZHU, 2009). Em vegetais, diversos estudos relataram que tal atividade é executada por uma família de proteínas contendo o domínio de DNA glicosilases. Em *Arabidopsis*, as enzimas ROS1 [*Repressor of Transcriptional Gene Silencing 1* (GONG *et al.*, 2002; AGIUS *et al.*, 2006; MORALES-RUIZ *et al.*, 2006)], DME (DEMETER) (CHOI *et al.*, 2002; MORALES-RUIZ *et al.*, 2006), DML2 e DML3 realizam ações de metilação de citosinas (MORALES-RUIZ *et al.*, 2006; PENTERMAN *et al.*, 2007; ORTEGA-GALISTEO *et al.*, 2008). Tais enzimas atuam através de uma via de reparo de excisão de base (BER – *Base Excision Repair*) (IKEDA e KINOSHITA, 2009; ZHU, 2009).

2.6.2 Modificações pós-traducionais de histonas

Modificações pós-traducionais e fenômenos epigenéticos se encontram interligados pela ação das proteínas histonas. Essas são pequenas proteínas básicas que, em conjunto com o DNA, constituem a cromatina. Nessa estrutura, o DNA encontra-se enrolado nas histonas, formando unidades denominadas nucleossomos (**Figura 7**). Cada nucleossomo consiste em 147 pares de bases de DNA envolvidos por uma estrutura denominada octâmero de histonas, sendo formada por um tetrâmero de histonas H3-H4 e dois dímeros de H2A-H2B (LUGER *et al.*, 1997).

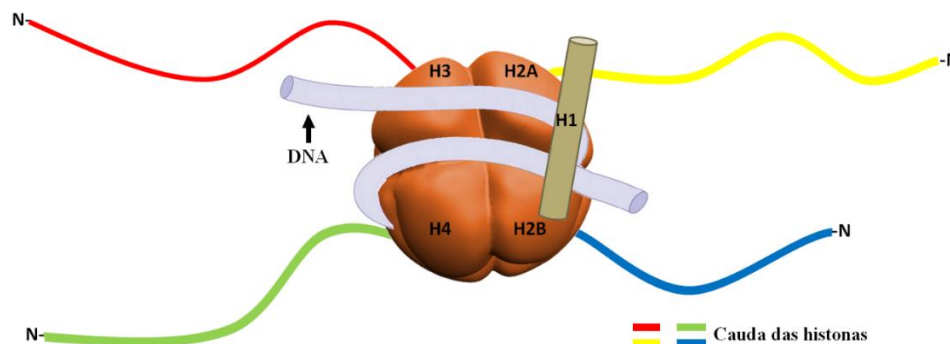


Figura 7. Estrutura de um nucleossomo, apresentando sua estrutura globular central (octâmero), o DNA que a envolve e as caudas das histonas. Fonte: O autor

Modificações pós-traducionais na cauda das histonas, como acetilação, fosforilação, metilação, dentre outras, estão fortemente associadas aos mecanismos de expressão ou silenciamento gênico (KIMURA *et al.*, 2005). Essas modificações podem afetar diretamente a estrutura da cromatina ou podem recrutar "leitores ou efetores" específicos, regulando a expressão gênica, principalmente alterando a estabilidade e o posicionamento dos nucleossomos. Isso afeta a acessibilidade das proteínas reguladoras ou complexos proteicos envolvidos na transcrição, replicação e reparo de DNA (KOUZARIDES, 2007). As principais modificações epigenéticas de histonas são: (de)acetilação e (de)metilação (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011).

A acetilação de histonas é um mecanismo dinâmico regulado pela atividade antagonista de duas famílias de enzimas (histona acetiltransferases - HATs e histona desacetilases -HDACs), as quais agem adicionando/subtraindo grupos acetil em substratos de lisinas nas histonas (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011). Essa adição neutraliza a carga positiva desse aminoácido, enfraquecendo as interações entre histonas e DNA (HONGS *et al.*, 1993). Essa mudança na carga positiva das lisinas desestabiliza a estrutura dos nucleossomos, permitindo o acesso da maquinaria transcricional a um determinado locus (LEE *et al.*, 1993; VETTESE-DADEY *et al.*, 1996). A acetilação da lisina 5 na histona H4 (H4K5ac), por exemplo, é uma marca universal associada a uma maior descompactação do DNA. Tem sido observada desde protozoários, fungos, insetos, até plantas e mamíferos. Essa marcação está relacionada a regiões gênicas potencialmente ativas e com a estrutura da cromatina mais descompactada (KIMURA *et al.*, 2005).

A metilação das histonas ocorre, por sua vez, através da atividade de metiltransferases, principalmente nas cadeias laterais de lisinas e argininas, não alterando a carga dessas proteínas. As lisinas podem ser mono-, di- ou tri-metiladas, enquanto as argininas são mono- ou di-metiladas (BANNISTER e KOUZARIDES, 2011). Dessa forma, diferentes assinaturas de metilação podem estar relacionadas à ativação ou repressão, através de mecanismos de sinalização que recrutam ativadores/repressores da atividade de um gene específico (SCHNITZLER, 2009). Além disso, essas modificações podem alterar as propriedades químicas das histonas, refletindo na sua interação com o DNA (NAKAYAMA *et al.*, 2001). A tri-metilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3), por exemplo, é considerada uma das principais marcas epigenéticas relacionadas à repressão associada a mais de 4000 genes no genoma de *A. thaliana* (ZHANG *et al.*, 2007).

O processo de metilação das histonas é dinâmico, uma vez que demetilases podem remover os grupos metil em resíduos de lisina e arginina das histonas. Existem dois tipos de demetilases de histonas em eucariotos: proteínas com o domínio JUMONJI C (JmjC) (TSUKADA *et al.*, 2006) e demetilase específica de lisina (LSD1 - *Lysine-specific Demethylase*) (SHI *et al.*, 2004).

2.6.3 Complexos remodeladores da cromatina dependentes de ATP (CRCD-ATP)

Um segundo mecanismo alterador da topologia da cromatina é o CRCD-ATP, que pode estar relacionado às modificações nas histonas (ITO *et al.*, 2000; VERBSKY e RICHARDS, 2001). Segundo Erdel *et al.* (2011), esses complexos podem “ler” os sinais epigenéticos, como metilação de citosinas ou modificações químicas de histonas. Esses complexos também podem interagir com proteínas que se associam à cromatina como, por exemplo, os fatores de transcrição, para identificar nucleossomos específicos de regiões promotoras e, assim, regular a expressão de genes-alvo. Ainda, os CRCD-ATP podem regular vias de sinalização de estresses bióticos (WALLEY *et al.*, 2008). Os CRCD-ATP atuam, portanto, como ativadores ou repressores da atividade gênica (VARGA-WEISZ, 2001; LANS *et al.*, 2012).

Quatro famílias de CRCD-ATP são reconhecidamente descritas: INO80 (*Inositol Requiring 80*), CHD (*Chromodomain Helicase DNA Binding*), SWI/SNF (*Switching Defective/Sucrose Nonfermenting*) e ISWI (*Imitation Switch*) (CLAPIER e CAIRNS, 2009).

2.7 A EPIGENÉTICA NA RESPOSTA A ESTRESSES BIÓTICOS E ABIÓTICOS

Diversos estudos têm relatado a participação das modificações epigenéticas na resposta a estresses (a)bióticos em espécies vegetais, tanto em espécies-modelo, como *A. thaliana* (DOWEN *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013), como em espécies cultivadas, a exemplo da cevada (KONG *et al.*, 2020).

Geng *et al.* (2019) analisaram a participação da dinâmica da metilação do DNA na resposta a estresse biótico em trigo, identificando diversas regiões CHH com níveis de metilação reduzidos, em relação à condição controle, após a infecção por *Blumeria graminis* f. sp. tritici (Bgt), fungo causador do oídio. Essas regiões foram associadas a genes receptores quinase, peroxidase e genes relacionados à patogênese, os quais foram enriquecidos para funções como “reposta ao estresse”.

Além disso, Sánchez *et al.* (2016), ao expor diferentes mutantes de *Arabidopsis* ao ataque do patógeno *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa), observaram que os mutantes defeituosos na metilação do DNA (hipometilados) exibiram resistência aumentada a Hpa, enquanto dois mutantes hipermetilados (afetados na demetilação do DNA) apresentaram susceptibilidade ao patógeno. Adicionalmente, através da análise transcriptômica dos mutantes nrpe1 (mutante hipometilado) e ros1 (mutante hipermetilado), em diferentes tempos após a infecção por Hpa, os autores observaram a influência da metilação do DNA na regulação transcricional, em que cerca de 166 transcritos foram induzidos em nrpe1 e reprimidos em ros1. Estudos similares demonstraram a atuação da metilação do DNA na resposta de *Arabidopsis* contra agentes patogênicos biotróficos (LOPEZ *et al.*, 2011; DOWEN *et al.*, 2012; LUNA *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2013).

As modificações de histonas, por sua vez, também apresentam um papel significativo na resposta de plantas contra patógenos. Wang *et al.* (2013),

demonstraram, em *Arabidopsis*, que o ELP2 (*Elongator Complex Subunit 2*), participa de processos de resposta à infecção pelo patógeno *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst) DC3000/avrRpt2 por meio de múltiplas alterações epigenéticas. O ELP2 atua sobre alguns dos principais genes de defesa dessa espécie, incluindo o Nonexpressor of Pathogenesis-Related Gene1 (NPR1; coativador transcricional da imunidade vegetal). Uma vez que o ELP2 possui atividade de acetilase de histonas, os autores analisaram a acetilação de genes-alvo no mutante *elp2*. Com exceção de NPR1, os genes PR1, PR2, PR5, além dos genes EDS1 e PAD4, apresentaram uma redução da acetilação na H3K9/K14ac, sugerindo a regulação do ELP2 no nível de acetilação de histonas em diversos genes de defesa. Adicionalmente, esse estudo constatou uma atividade epigenética adicional do ELP2 na regulação de NPR1 através da modulação do grau de metilação de citosinas ancoradas em seu promotor.

Além do exposto, tem sido demonstrada a regulação diferencial de genes que codificam modificadores epigenéticos em resposta a uma variedade de estresse abióticos, incluindo seca, salinidade, dentre outros (CHEN *et al.*, 2010; LUO *et al.*, 2012; GONZÁLEZ *et al.*, 2013; BOCCHINI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2015; MOGLIA *et al.*, 2019). Esses estudos permitiram ampliar as análises envolvendo as modificações pós-traducionais e a metilação do DNA, os quais revelaram uma reprogramação epigenômica global em plantas sob estresses, destacando, assim, a relevância das modificações epigenéticas nesse contexto.

2.8 ÔMICAS E MODIFICADORES EPIGENÉTICOS: EMPREGABILIDADE E DISPONIBILIDADE DE DADOS

O *status quo* científico da empregabilidade das ômicas no campo da epigenética restringe-se à catalogação de genes cuja expressão pode ser controlada por elementos epigenéticos e à identificação das modificações epigenéticas associadas a esses genes específicos, possuindo grande relevância para o melhor entendimento molecular dos organismos (AHMAD *et al.*, 2010).

Estudos envolvendo comportamento transcricional e a genômica estrutural de genes codificadores de enzimas atuantes na promoção de modificações epigenéticas são incipientes. Zhu *et al.* (2020) realizaram estudos

de genômica estrutural comparativa de loci codificadores de metilases e demetilases de citosinas no genoma de *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. A mesma abordagem foi realizada por Gianoglio *et al.* (2017) e Moglia *et al.* (2019) nos genomas de *Cynara scolymus* L. e *Solanum melongena* L., respectivamente. Qian *et al.* (2014), além de realizarem estudos de genômica estrutural, também desenvolveram análises de expressão de genes para analisar a expressão de metilases de citosinas em milho.

Nesse contexto, a única abordagem disponível em videira (embora empregando uma abordagem de baixo rendimento) foi realizada por Almada *et al.* (2011). Os autores analisaram a expressão, durante o desenvolvimento de órgãos vegetativos e reprodutivos, de cinco genes dessa espécie com homologia a repressores epigenéticos [*Fertilization Independent Endosperm* (FIE), *Embryonic Flower 2* (EMF2), *Curly Leaf* (CLF), *Multicopy Suppressor of Ira 1* (MSI1) and *Swinger* (SWN)] de *Arabidopsis*. Os resultados sugeriram que as alterações epigenéticas podem ser a base da regulação de vários tipos de transição celular (proliferação/diferenciação) que ocorrem durante o desenvolvimento dessa cultura.

Numa outra abordagem, Xie *et al.* (2017) demonstraram padrões globais de metilação em videira, identificando 3.598 genes diferencialmente metilados em suas folhas e que foram atribuídos a 1.144 termos de ontologia gênica, dos quais 8,6% foram associados à resposta frente ao estímulo ambiental.

Baránek *et al.* (2015), por sua vez, analisou a dinâmica e a reversibilidade dos estados de metilação do DNA em *V. vinifera* estressadas por cultivo *in vitro*. Parte significativa das alterações epigenéticas induzidas pode ser repetidamente estabelecida pela exposição a condições particulares de plantio e estresse. No entanto, uma vez que as condições de estresse são interrompidas, mudanças de metilação retornam a estados epigenéticos semelhantes aos das plantas maternas. Um ano após o término das condições de estresse, 40% das alterações epigenéticas retroagiram, sendo, provavelmente, causadas por mecanismos de aclimação transitórios e reversíveis. No entanto, 60% da diversidade de metilação do DNA permaneceu após um ano e, provavelmente, representam epimutações.

No que tange às leguminosas, estudos envolvendo a identificação e caracterização funcional de modificadores epigenéticos em transcriptomas sob

condições adversas são limitados a determinados grupos vegetais, sendo inexistentes em feijão-caupi. Um dos poucos trabalhos disponíveis é o de Abid *et al.* (2017) que relataram os níveis de metilação do DNA em genótipos contrastantes de *Vicia faba* L. sob condições de déficit hídrico. Foram identificadas elevadas taxas de demetilação do DNA no genótipo tolerante, quando comparado ao genótipo susceptível. Adicionalmente, observou-se uma relação de tais taxas de demetilação com a regulação positiva de genes responsivos ao déficit hídrico. Tais resultados sugeriram a participação do processo de demetilação do DNA na resposta ao déficit hídrico no genótipo tolerante de *V. faba*.

Com o exposto, observa-se que, até o momento, a maioria dos dados que aborda o conjunto “epigenética, expressão de genes, plantas e estresses” divide-se em duas vertentes: (a) estudo de associações entre o produto epigenético final e o comportamento de um dado organismo a uma determinada condição não favorável; (b) caracterização funcional dos atores participantes do processo. Ou seja, identificação do gene codificador de um modificador epigenético, a modificação epigenética relacionada, os alvos que estão sob o efeito do referido gene, o comportamento desses alvos perante condições não favoráveis e em quais vias os mesmos atuam (revisado por Sahu *et al.*, 2013).

Diante disso, um catálogo da orquestração transcricional de todos os modificadores epigenéticos atuantes sob condições de estresse ainda apresenta uma expressiva lacuna informacional, especialmente em vegetais. A transcriptômica representa, portanto, uma ampla oportunidade para estudos de associações entre os modificadores epigenéticos e plantas submetidas a diferentes tipos de estresse.

3 ARTIGO I**Artigo a ser submetido à revista*****Plant Pathology*****Fator de Impacto: 2.590**<https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/journal/13653059>**Modulação transcricional e estrutura genômica de metiltransferases e demetilases de DNA em *Vitis* spp. sob inoculação por *Xanthomonas citri* pv. *viticola***

Jéssica Barbara Vieira Viana¹, José Ribamar Costa Ferreira-Neto¹, Roberta Lane de Oliveira-Silva², Flávia Figueira Aburjaile³, Jéssica Barbosa Silva¹, Nataniel Franklin de Melo⁴, Ana Maria Benko-Iseppon^{1*}

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

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

³Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, Brazil.

⁴Embrapa Semiárido, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author. Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; Tel: +55-81-2126-8569; Fax: +55-81-2126-8522; E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br (A.M. Benko-Iseppon)

Resumo

Diversos estudos têm demonstrado um papel da metilação/demetilação do DNA na regulação da resposta vegetal a condições adversas. Tais processos são controlados dinamicamente pela ação das enzimas metiltransferases (MTases) e demetilases (dMTases) de DNA. O presente trabalho propôs realizar uma análise de MTases e dMTases em videira, mediante abordagens de genômica e transcriptômica. Essas enzimas foram analisadas considerando suas características estruturais, distribuição genômica, mecanismos de expansão genômica, conservação em espécies relacionadas, além dos padrões de expressão frente a estresse biótico. No presente estudo, caracterizou-se 11 loci codificadores de MTases e três de dMTases em acessos contrastantes da videira [genótipo tolerante (IAC-572) e suscetível (Red Globe)] sob inoculação bacteriana (*Xanthomonas citri* pv. *viticola*). As 11 MTases foram classificadas em três classes distintas, enquanto dMTases foram classificadas em duas classes. Análises dos mecanismos de expansão de genes codificantes de VvMTases e VvdMTases indicaram a predominância de processos de duplicação em tandem e WGD/Segmental. As razões Ka/Ks mostraram que todos os genes duplicados em tandem e WGD/Segmental estavam sob seleção purificadora. Um alto índice de conservação dessas enzimas foi encontrado nos membros de diferentes famílias vegetais. Os elementos cis-regulatórios identificados nos promotores de VvMTases foram associados aos TFs AP2/ERF, WRKY e Dof-Type. Tais TFs estão relacionados a resposta vegetal a estresses bióticos e abióticos. Os dados de RNA-Seq não apresentaram modulação significativa de VvMTases e VvdMTases. No entanto, os dados de qPCR demonstraram a indução de VvMTases e VvdMTases nos tempos de 24 e 48 h após a inoculação por Xcv, sendo observado uma maior indução desses transcritos no genótipo resistente quando comparado ao genótipo suscetível. Esses resultados fornecem informações valiosas para pesquisas adicionais sobre a evolução e a função molecular de VvMTases e VvdMTases.

Palavras-chave: (de)metilação do DNA, estresse biótico, resposta vegetal

1. Introdução

A metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil ao quinto carbono de citosinas do DNA e compreende um mecanismo epigenético bastante comum usado tanto por procariontes como por eucariontes. Em bactérias, a metilação da citosina tem papel fundamental na defesa contra vírus invasores. Já em eucariotos, esse mecanismo pode interferir também na expressão e recombinação gênicas, além da mobilidade dos elementos transponíveis (Gehring e Henikoff, 2007; Kim e Zilberman, 2014). A metilação é uma marca relativamente estável, a qual pode ser herdada pelas células-filhas após a divisão celular, compreendendo um processo reversível e regulado dinamicamente (Boyko e Kovalchuk, 2011; Mirouze e Paszkowski, 2011).

Nos genomas de plantas, as metiltransferases de DNA (MTases) são responsáveis pelo processo de metilação do DNA. Essas enzimas são categorizadas em três subfamílias distintas: METs, as quais operam a manutenção da metilação no contexto CpG (Jones et al., 2000); CMTs, específicas de plantas que mantêm a metilação nos contextos CpHpG e CpHpH (Bartee et al., 2001; Lindroth et al., 2001; Zemach et al., 2013); e DRMs, as quais executam a metilação *de novo* dos contextos acima citados e do contexto CpHpH (Chan et al., 2005). Essas metiltransferases compartilham um domínio catalítico que abriga seis pequenos motivos conservados, diferindo apenas em suas regiões N-terminais, que refletem em um grau de especialização funcional (Pavlopoulou e Kossida, 2007). Além disso, os eucariotos também abrigam a subfamília DNMT2, que apresenta similaridade de sequências com outras MTases e têm sido relatadas com atividade de metiltransferase (Tang et al., 2003; Jeltsch et al., 2016).

Em plantas, o nível de metilação do DNA é dinâmico e depende do estabelecimento e manutenção da metilação, bem como da demetilação do DNA, a qual pode ocorrer de forma passiva ou ativa (Zhu et al., 2020). No processo passivo, as MTases de manutenção não interferem nos contextos de sequências metiladas. Dessa forma, após vários ciclos de replicação, os locais tornam-se progressivamente demetilados. Já a demetilação ativa envolve uma série de catálises mediadas pelas enzimas demetilase de DNA (dMTases) (Zhu, 2009). Em *Arabidopsis thaliana* L., por exemplo, as proteínas ROS1, DME, DML2 e DML3 participam do processo de demetilação ativa (Kapoor et al., 2005; Niehrs, 2009).

Diversos estudos em vegetais têm demonstrado a dinâmica da metilação do DNA na regulação de uma ampla gama de processos biológicos, incluindo a defesa (Downen et al., 2012; Yu et al., 2013; Sánchez et al., 2016). No contexto das ômicas, as informações das enzimas MTases e dMTases restringem-se aos estudos de genômica estrutural de loci codificadores de metilases e demetilases de citosinas no genoma de espécies como *A. thaliana* (Ogneva et al., 2016), *Cynara cardunculus* L. (Gianoglio et al., 2017), *Solanum melongena* L. (Moglia et al., 2019) e *Camellia sinensis* L. (Zhu et al., 2020).

A videira (*Vitis vinifera* L.) apresenta grande importância socioeconômica, sendo o Nordeste brasileiro, em especial os pólos de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA), no Submédio do Vale do São Francisco responsável pela maior parte da produtividade de uvas finas de mesa no Brasil (IBGE-2020). Porém, um dos riscos à estabilidade

fitossanitária dessa região é o cancro bacteriano da videira, causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Xcv; MAPA, 2018). Até o momento, não há cultivares de *V. vinifera* com resistência genética a essa doença. Lima et al. (1999) apontou a variedade IAC 572 [resultante do cruzamento entre *Vitis caribaea* x R.R 101-104 (*Vitis riparia* x *Vitis rupestris*)] como moderadamente resistente a Xcv.

Estudos envolvendo a mineração de MTases e dMTases em bibliotecas de RNA-Seq de espécies vegetais não foram relatados até o momento. A partir da disponibilidade do genoma de *V. vinifera*, bem como do transcriptoma (RNA-Seq) da videira e do híbrido IAC 572 submetidos à inoculação por Xcv, é possível traçar um panorama das MTases e dMTases, além de explorar o papel dessas enzimas na resposta dessa cultura submetida a Xcv. Diante disso, o presente trabalho visa identificar e caracterizar estruturalmente MTases e dMTases no genoma de *V. vinifera* e analisar suas respectivas funcionalidades em acessos de videira tolerante (IAC 572) e suscetível (Red Globe) sob inoculação por Xcv mediante abordagem transcriptômica.

2. Materiais e Métodos

2.1 Genômica

2.1.1 Identificação e mineração de loci codificadores de VvMTases e VvdMTases

Sequências previamente caracterizadas das famílias metiltransferases e demetilases de DNA, foram recuperadas dos bancos de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>) (**Material Suplementar S1-2**). Essas sequências, pertencentes às espécies *A. thaliana*, *Oryza sativa* L., *Zea mays* L., *Medicago truncatula* L., dentre outras, foram utilizadas como sondas para análises de similaridade contra o proteoma putativo da videira disponível no Banco de dados Phytozome (Vvinifera_145_Genoscope.12X.protein.fa). Essas sequências sondas foram alinhadas via BLASTp contra o proteoma putativo da videira utilizando e-value < e-10.

A estrutura dos domínios das possíveis MTases e dMTases foi estabelecida usando o software CD-Search em combinação com o banco de dados Pfam (pfam.xfam.org). A classificação dos homólogos da videira identificados no genoma em questão foi realizada de acordo com a identificação de domínios característicos das respectivas famílias analisadas, tendo como padrão para todas as metiltransferases o domínio ‘DNA-methylase’ (PF00145). Essa família foi classificada de acordo com a presença de domínios adicionais, como: BAH (PF01426) e CHROMO (PF00385) para subfamília CMT; DNMT1-RFD (PF12047) e BAH (PF01426) para subfamília MET; e UBA (PF00627) para DRMs. Para as demetilases, foram utilizados como padrão os domínios RRM_DME (PF15628), Perm_CXXC (PF15629) e HhH-GPD (PF00730). As dMTases foram classificadas a partir da análise fenética, uma vez que a composição de domínios desse grupo proteico é semelhante para todas as classes de proteínas dessa família gênica.

2.1.2 Análise fenética

Para análise fenética, foram empregadas sequências proteicas curadas de espécies vegetais como, *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Zea mays*, dentre outras contendo os domínios característicos de MTases e dMTases (**Tabela Suplementar S1; Material Suplementar S3-4**). Essas sequências foram alinhadas com as VvMTases e VvdMTases candidatas, utilizando ClustalW (Larkin et al., 2007). A árvore fenética foi obtida pelo método Neighbour Joining (NJ) (Saitou e Nei, 1987), através do software MEGA 7, com bootstrap de 1000 repetições (Kumar et al., 2016). De acordo com a topologia da árvore fenética, as VvMTases e VvdMTases foram classificadas a partir de classificações previamente estabelecidas em *A. thaliana* e demais espécies vegetais empregadas na referida análise.

2.1.3 Localização cromossômica e propriedades proteicas de VvMTases e VvdMTases

A linha de descrição das sequências proteicas recuperadas da videira, em formato fasta, fornece o nome dos loci gênicos correspondentes no referido genoma. Esses nomes foram usados para recuperar suas respectivas coordenadas cromossômicas

contidas no arquivo ‘Vvinifera_145_Genoscope.12X.gene.gff3’ (Banco de dados Phytozome).

O peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI), para todas as proteínas VvMTases e VvdMTases codificadas no genoma da videira, foram preditos por meio da ferramenta online Jvir Gel (Hiller *et al.*, 2006).

2.1.4 Análise dos motivos conservados e estrutura gênica dos VvMTases e VvdMTases

A predição de motivos foi realizada a partir do software MEME (meme-suite.org/tools/meme) (Bailey *et al.*, 2009). Foi definido um número máximo de 17 motivos, os quais continham entre 10 e 25 nucleotídeos de extensão, como estabelecido por Gianoglio *et al.* (2017). Os motivos descobertos pelo MEME foram verificados manualmente e nomeados de acordo com o sistema de nomenclatura sugerido por Pavlopoulou e Kossida (2007).

As estruturas gênicas foram determinadas e representadas graficamente a partir do site *Gene Structure Display Server* (GSDS 2.0) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/index.php>) (Guo *et al.*, 2007), utilizando as sequências de metiltransferases e demetilases recuperadas no genoma da videira.

2.1.5 Mecanismos de expansão dos genes VvMTases e VvdMTases

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

2.1.6 Taxas de substituições sinônimas (Ks) e não-sinônimas (Ka) para genes com origem de duplicação WGD/segmental e tandem

A pressão de seleção entre os eventos de duplicação WGD/segmental foi determinada pela razão Ka/Ks. O software ClustalW 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) foi utilizado para alinhar as sequências completas de genes codificadores de VvMTases e VvdMTases com duplicação WGD/segmental e em tandem. Em seguida, as taxas de Ka e Ks foram calculadas com base na tabela do código genético via método Nei – Gojobori (modelo Jukes-Cantor) implementado no MEGA 7 (Kumar *et al.*, 2016).

A razão Ka/Ks é um indicador da história de seleção em genes ou regiões gênicas. Se o valor for inferior a '1', os pares de genes duplicados podem estar submetidos à seleção purificadora (também chamada de seleção negativa; resulta na conservação da sequência de aminoácidos). Se a razão Ka/Ks for igual a '1', significa que a seleção é neutra (ausência de seleção). Adicionalmente, se essa razão for maior que '1', significa que a seleção é positiva (o que leva ao surgimento de diferentes proteínas).

2.1.7 Análise de ortologia dos loci VvMTases e VvdMTases

Para a detecção de ortologia, utilizou-se informações disponíveis na base de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Na seção PhytoMine (interface InterMine alocada na base de dados Phytozome) foi criada uma query em forma de lista com as identidades dos genes a serem analisados em relação aos 93 genomas montados e anotados, para 82 espécies de Viridiplantae, sendo o resultado gerado pelo software InParanoid (Sonnhammer e Östlund, 2015).

2.1.8 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos

Sequências de regiões promotoras (1.0 kb) de genes codificadores de VvMTases e VvdMTases foram obtidas no banco de dados Phytozome v.12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), via API (Application Programming Interface).

Os motivos contendo elementos cis-regulatórios candidatos (CCREs) em cada promotor foram minerados via software MEME v5.0.3 (Bailey e Elkan 1994; <http://meme-suite.org/tools/meme>). Para essa mineração dos CCREs, o modo clássico foi utilizado. Para cada motivo identificado, há um e-value correspondente. No presente trabalho, adotou-se o e-value < 10⁻² como ponto de corte para a caracterização de bona fide CCREs. O número máximo de motivos analisados foi 10, contendo entre seis a 50 nucleotídeos de extensão.

Para designar um determinado fator de transcrição (TF) aos bona fide CCREs minerados, foi usado o software TomTom v4.11.2 (Gupta et al., 2007; <http://meme-suite.org/tools/tomtom>), acoplado ao banco de dados JASPAR (file: JASPAR2018_CORE_plants_non-redundant). Tal banco de dados apresenta informações sobre perfis de ligação de fatores de transcrição a CCREs experimentalmente validados. O software TomTom alinha os CCREs identificados pelo software MEME contra CCREs anotados da base de dados JASPAR. Os alinhamentos foram avaliados por meio dos critérios estatísticos p-value (cut-off < 10⁻²) e q-value (false discovery rate, FDR cut-off < 10⁻²). As identidades dos TFs associadas aos bona fide CCREs foram relacionadas ao melhor alinhamento obtido (best-hit).

2.2 Transcriptômica

2.2.1 Material biológico, desenho experimental e aplicação do estresse

Para avaliar o estresse da inoculação pela bactéria Xcv, a cultivar ‘Red Globe’ de *V. vinifera* (suscetível a Xcv) e o híbrido ‘IAC-572’ [resultante do cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT (*V. riparia* X *V. rupestris*) com *V. caribaea*], considerado moderadamente resistente a Xcv] foram cultivados em casa de vegetação na Embrapa-Semiárido (Petrolina, Brasil).

Foram utilizados potes plásticos de 5 L, com substrato composto por proporções iguais de solo do tipo argiloso e vermiculita, sob condições controladas [25°C ± 2°C; 60% ± 5% de umidade relativa; e com 12 h/dia de luz natural (Photosynthetic Photon Flux Density (PPFD) = 1.5 × 10³ μmoles)]. Após 30 dias de cultivo, plântulas saudáveis e desenvolvidas foram submetidas à infecção por Xcv (isolado CCRMXC117, o qual

apresenta elevado grau de severidade). Para tal, foram injetados 20 μ L de suspensão bacteriana em três pontos de infiltração na parte abaxial das primeiras três folhas com auxílio de seringas hipodérmicas sem agulhas, conforme metodologia descrita por Gama et al. (2011). Cada acesso submetido ao estresse (tratamento) continha seu respectivo controle (plântulas inoculadas com água destilada esterilizada). As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos após a inoculação: (1) 90 minutos; (2) 6 horas; (3) 24 horas e (4) 48 horas. Ao final de cada tempo, as folhas das mudas dos tratamentos e respectivos controles foram imediatamente coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenadas a -80°C até a extração do RNA total. O delineamento experimental foi fatorial (cultivar x extensão do estresse), com três réplicas biológicas por condição analisada.

2.2.2 Bibliotecas de RNA-Seq: síntese e sequenciamento

O RNA total foi isolado por meio do protocolo CTAB-Acetato (Zhao et al., 2012) associado ao tratamento com DNase do kit ‘SV Total RNA Isolation System’ (Promega, US). A pureza, concentração e integridade do RNA total extraído foram avaliadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific), fluorímetro Qubit® (Life Technologies) e pelo ‘Agilent 2100 Bioanalyzer’ (Agilent Technologies, EUA), respectivamente. Reads paired-end, com extensão de 100 pb, foram geradas via sistema Illumina HiSeq 2500, empregando-se os seguintes kits: ‘HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2’ (PE-402-4002); ‘SBS Kit v2’ (200 Cycle; FC-402-4021); e ‘TruSeq® Stranded mRNA LT - Set A’ (RS-122-2101).

Todas as etapas executadas neste item, exceto o isolamento do RNA, foram realizadas no Centro de Genômica Funcional, da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP, Brasil). Foram geradas 12 bibliotecas RNA-Seq para as cultivares Red Globe e IAC-572 abrangendo as triplicatas biológicas do tratamento de 90 minutos e seu respectivo controle não estressado (*mock control*).

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

O controle de qualidade das reads foi acessado utilizando o software FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). O pacote Trimmomatic v0.36 foi utilizado para remoção dos adaptadores e de sequências de baixa qualidade (Bolger et al., 2014). Em seguida, o software STAR v2.4.0 (Dobin et al., 2013) foi utilizado para o mapeamento das reads contra o genoma de referência disponível para *V. vinifera* v12x (INSDC – GCA_000003745.2), alocado na base de dados NCBI – National Center for Biotechnology Information (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), mantendo-se aquelas que não foram mapeadas. O software Picard v2.9, por sua vez, foi usado para mascarar as duplicatas sem removê-las, considerando a pontuação (*score*) por qualidade das bases (Auwerda et al., 2013), enquanto os transcritos foram montados com o pacote Cufflinks v2.2.1.

A modulação transcricional de VvMTases e VvdMTases foi realizada com base nos valores de FPKM (Fragments Per Kilobase Million) em cada tratamento/tempo disponível. Para análise de expressão diferencial, os dados foram analisados pelo DESeq2 (Bioconductor software package; Love et al., 2014). Considerou-se

diferencialmente expressos transcritos que apresentaram $-1 \geq \text{Log2FC} \geq 1$; $\text{FDR} < 0,05$ e $p < 0,05$.

2.2.4 qPCR: setup, análises de eficiência e expressão relativa

Para avaliar, adicionalmente, a precisão dos dados de expressão gênica, todos os transcritos com expressão constitutiva indicada nas análises RNA-Seq, foram selecionados para investigação via qPCR. Tal análise foi realizada para os tratamentos de 90 minutos, 24 e 48 horas após a inoculação com Xcv. Três repetições biológicas e três técnicas foram usadas por amostra analisada, visando garantir a confiabilidade estatística do processo. As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços e termociclador LineGene 9660 (Bioer), utilizando o método de SYBR Green de detecção.

Amostras de RNA total das amostras foram encaminhadas para a síntese e sequenciamento das bibliotecas RNA-Seq e passaram por um tratamento adicional. Possível contaminação com DNA genômico (DNAg) foi eliminada via digestão com ‘RNase-free DNase I’. A concentração e qualidade do RNA total extraído foram avaliadas, respectivamente, utilizando-se fluorímetro Qubit® (Life Technologies) e espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific), fluorímetro Qubit® (Life Technologies). Para cada amostra estudada, o RNA total (1 µg) foi transcrito de forma reversa, gerando cDNA, usando-se o kit ‘GoScript™ Reverse Transcription System’ (Promega), com iniciadores oligo (dT) e seguindo as recomendações do fabricante.

As reações de qPCR foram preparadas em volume total de 10 µL, contendo: 1 µL de template 10x diluído, 5 µL de ‘HotStart-IT SYBR Green qPCR Master Mix 2x’ (Thermo Scientific), 0,05 µL de ROX, 1 µL de cada oligonucleotídeo iniciador (concentração final de 500 nM), além de água livre de nucleases para completar o volume final de 10 µL. A ciclagem da PCR foi ajustada para 95 °C durante dois minutos, seguido por 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 58 °C durante 30 segundos e 72 °C durante 15 segundos. Após amplificação, foram produzidas curvas de dissociação (60 - 95 °C a uma taxa de aquecimento de 0,1 °C / segundo | a aquisição de dados de fluorescência foi executada a cada 0,3 °C) para confirmar a especificidade dos amplicons obtidos na qPCR.

A eficiência de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$), para todos os pares de oligonucleotídeos iniciadores implementados, foi determinada a partir de uma curva padrão de cinco pontos gerada por diluições seriadas (10 x cada) de cDNA, em triplicatas técnicas. As inclinações da reta da curva padrão no intervalo de -3,58 a -3,10 foram consideradas aceitáveis para o ensaio (Biassoni et al., 2014). Esses valores de inclinação de reta estão correlacionados com eficiências de amplificação entre 90 % ($E = 1.9$) e 110 % ($E = 2.1$).

Os genes “TCBP”, “TRU5” e “60SRP” foram selecionados como genes de referência para normalização dos dados de qPCR. O software Rest2009 (modo standard) foi usado para análise de expressão relativa dos transcritos de interesse. Tal software baseia seu desempenho em comparações pareadas (do transcrito alvo e genes de

referência nas condições tratadas e controles), usando técnicas de randomização e bootstrapping - Pair-wise Fixed Reallocation Randomization Test© (Pfaffl et al., 2002; REST, 2009). Utilizou-se teste de hipótese ($p < 0,05$) para determinar se as diferenças na expressão dos transcritos alvos nas condições controle e tratadas foram significativas.

Os pares de oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados usando-se o software online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), com os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento de 57 - 63 ° C (ótimo de 60°C), extensão do primer de 18 - 22 pb (ótimo de 20 pb), conteúdo de GC de 45-55% (ótimo de 50%) e extensão do amplicon de 100 - 200 pb (**Tabela Suplementar S2**).

3. Resultados

3.1 Genômica

3.1.1 Identificação, classificação e propriedades proteicas de VvMTases e VvdMTases

A partir de análises BLASTp, a busca por genes que codificam MTases e dMTases putativas permitiu identificar, no genoma da videira, um total de 12 MTases e três dMTases. As informações específicas para os 12 VvMTases e três VvdMTases, incluindo seus Ids, classes e domínios conservados estão apresentadas na **Tabela Suplementar S3**. Todas as VvMTases identificadas foram caracterizadas pela presença do domínio de metilação do DNA (DNA_Methylase | PF00145) em sua extremidade C-terminal. Além disso, foi possível classificá-las de acordo com a presença de domínios adicionais. Do total de doze VvMTases, foram identificados quatro CMT; sete MET, sendo cinco incluindo apenas o domínio DNA_Methylase; e um DNMT2 (**Tabela Suplementar S3**). Nenhum membro da classe DRM foi identificado. Os loci de VvdMTases, por sua vez, abrigaram um domínio RRM DME (motivo de reconhecimento de RNA demetilase; PF15628), um Perm-CXXC (PF15629) e um HhH-GPD (PF00730) (**Tabela Suplementar S3**). A composição de domínios das VvdMTases é semelhante para todas as classes de proteínas dessa família. Dessa forma, a classificação da mesma foi estabelecida a partir da análise fenética.

A classificação das VvMTases, tradicionalmente baseada na identificação de domínios específicos, foi validada a partir da análise fenética, incluindo as sequências das proteínas VvMTases e sequências de MTases de *A. thaliana* e *O. sativa*, dentre outras (**Figura 1**). Os membros VvMTases foram agrupados em sete grupos distintos correspondentes às quatro classes de metiltransferases de DNA (CMT, MET, DRM, DNMT2). Assim, foi possível validar a classificação dos membros VvMTases previamente realizada a partir da identificação de domínios específicos. O gene VvMTase12 apresentou divergência entre as classificações, sendo classificado como membro 'desconhecido' (UNK), sendo conseqüentemente retirado das análises posteriores. Os 11 VvMTases restantes foram classificados como *bona fide* distribuídos entre três classes distintas de metiltransferases de DNA (CMT, MET e DNMT2).

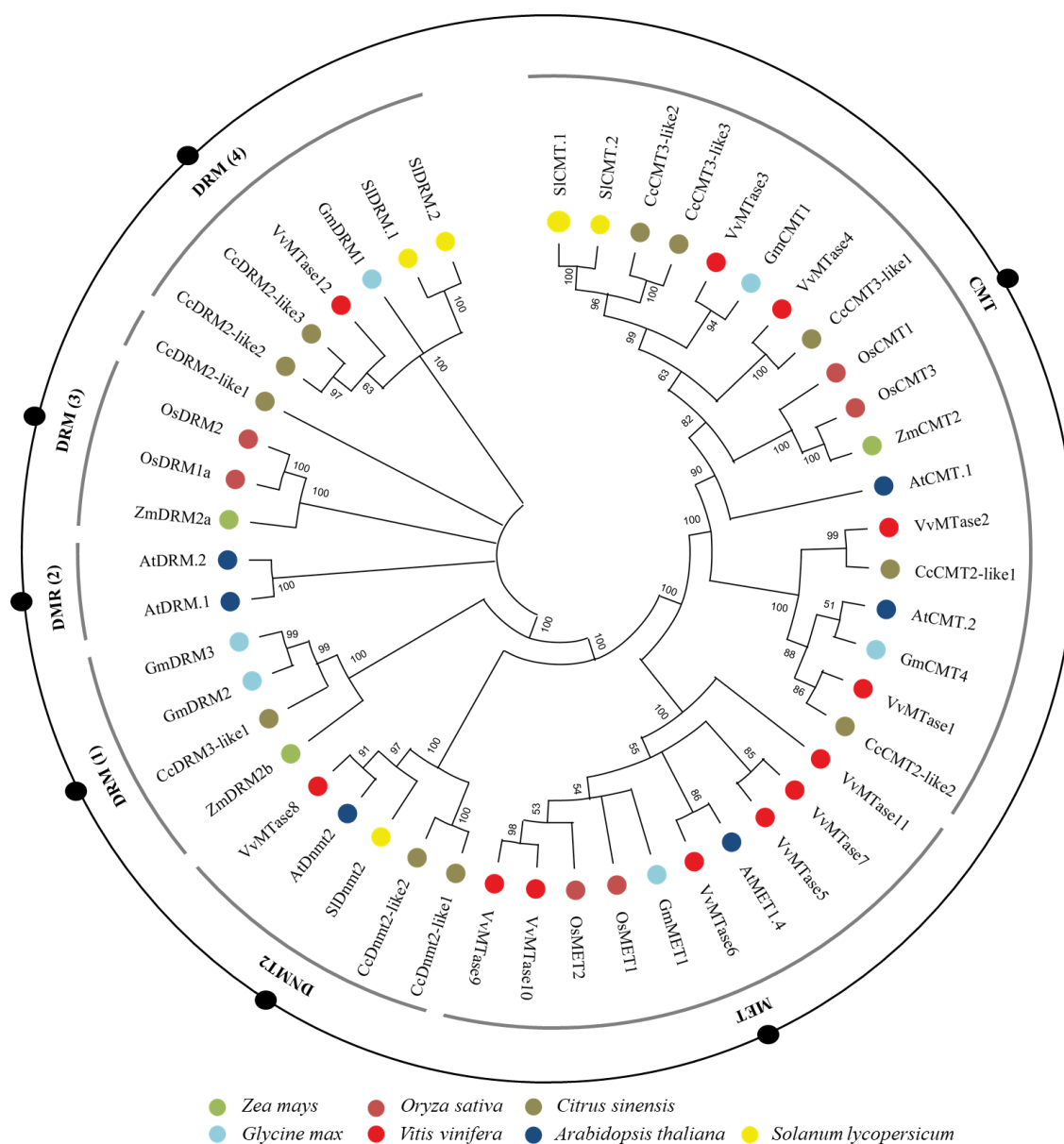


Figura 1. Árvore fenética - construída a partir das seqüências de proteínas MTases de *Arabidopsis thaliana* (círculo azul escuro), *Zea mays* (círculo verde claro), *Glycine max* (círculo azul claro), *Oryza sativa* (círculo vermelho escuro), *Citrus sinensis* (círculo marrom), *Solanum lycopersicum* (círculo amarelo) e *Vitis vinifera* (círculo vermelho) - gerada pelo MEGAX, via método *neighbor-joining*. Os nomes laterais representam as diferentes classes da família MTase. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições).

Já as VvdMTases, foram classificadas somente a partir da análise fenética. Essa análise envolveu seqüências das proteínas VvdMTases identificadas no genoma da videira e seqüências de outras espécies vegetais como, *A. thaliana*, *G. max*, *B. rapa*, dentre outras. Foi observada a formação de quatro grupos correspondentes as três classes de dMTases (DME, DML e ROS1). As seqüências proteica de VvdMTase1 e VvdMTase3 foram agrupadas juntamente com seqüências de proteínas da classe DME, enquanto VvdMTase3 foi agrupado com proteínas dMTases pertencente à classe ROS1

(Figura 2). Dessa forma, foi possível estabelecer uma classificação das VvdMTases identificadas no genoma da videira, sendo classificadas como DME (2) e ROS1 (1).

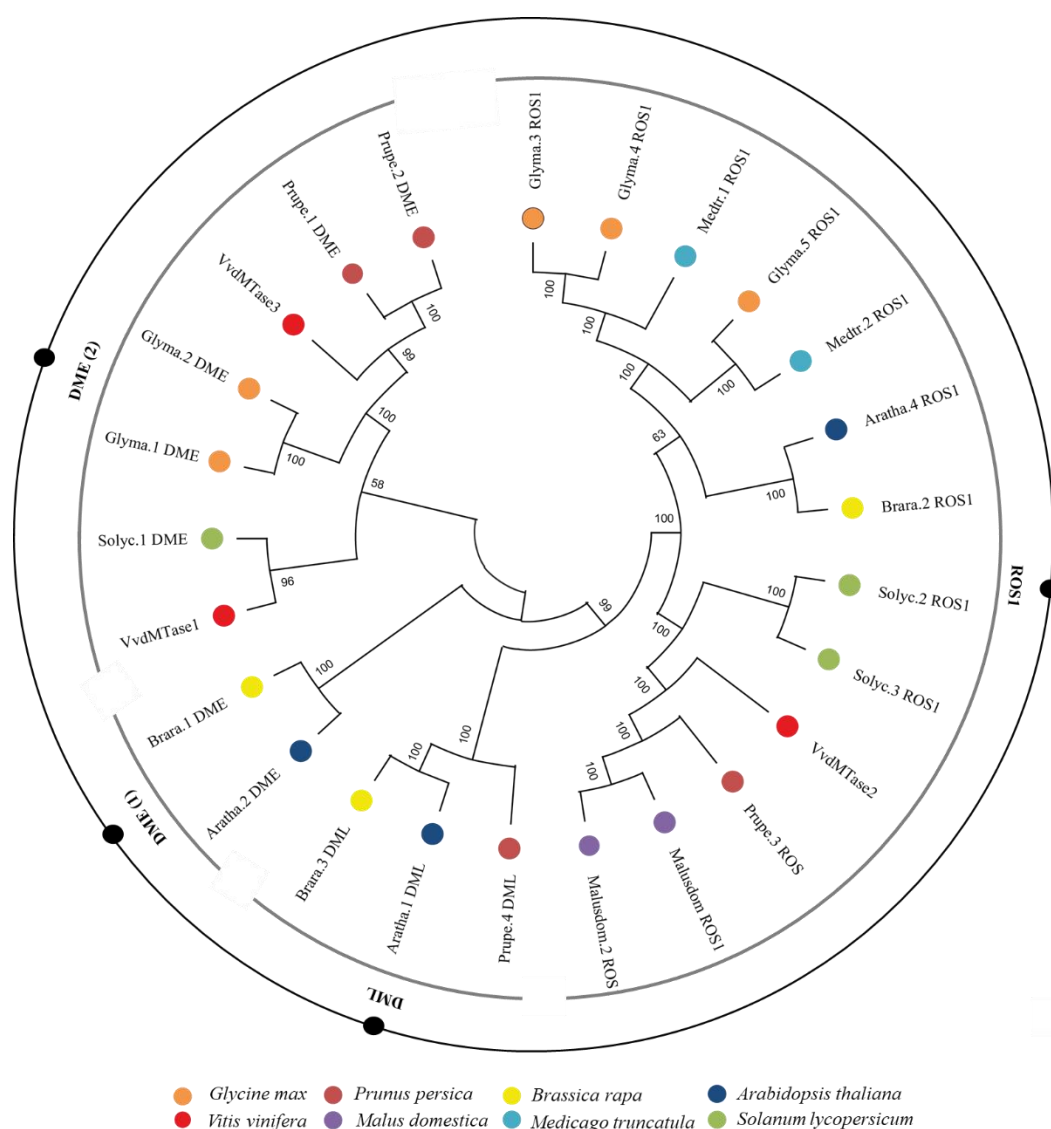


Figura 2. Árvore fenética - construída a partir das sequências de proteínas VvdMTases de *Arabidopsis thaliana* (círculo azul escuro), *Glycine max* (círculo laranja), *Prunus persica* (círculo vermelho escuro), *Malus domestica* (círculo roxo), *Brassica rapa* (círculo amarelo), *Medicago truncatula* (círculo azul claro), *Solanum lycopersicum* (círculo verde) e *Vitis vinifera* (círculo vermelho) - gerada pelo MEGAX, via método *neighbor-joining*. Os nomes laterais representam as diferentes classes da família dMTase. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições).

Em relação à distribuição genômica, os genes VvdMTases identificados foram ancorados em sete dos 19 cromossomos da videira, sendo distribuídos de maneira heterogênea. Já os VvdMTase encontram-se distribuídos ao longo dos cromossomos 6, 8 e 13. As informações específicas para os 11 VvdMTases e três VvdMTases, incluindo

seus IDs, tamanho do gene (bp) e localização cromossômica estão apresentadas na **Tabela Suplementar S4**.

As proteínas VvMTases bem como VvdMTases apresentaram diversidade estrutural entre si com tamanhos variando de 98 a 14098 e 1708 a 3981 resíduos de aminoácidos, respectivamente. Os pIs das VvMTases variaram de 5,39 a 8,64, com MWs variando de 41,91 a 161,38 KDa. Em relação às proteínas VvdMTases, seus pIs divergiram de 7,96 a 8,18, enquanto que os valores dos MWs foram previstos de 103,74 a 182,06 KDa. (**Tabela Suplementar S5**).

3.1.3 Estrutura dos genes VvMTases e VvdMTases e caracterização dos motivos conservados

Para uma melhor compreensão das características estruturais dos genes VvMTases e VvdMTases, parâmetros relevantes biologicamente, como características íntrons e éxons, foram avaliados. As estruturas gênicas dos 11 VvMTases e três VvdMTases estão representadas esquematicamente na **Figura 3A-B**. Os genes VvMTases apresentaram diversidade de estruturas gênicas, com números de éxons variando de dois a 26 e íntrons de um a 25. Todos os genes VvMTases apresentaram pelo menos um íntron em suas estruturas gênicas (**Tabela Suplementar S6; Figura 3A**). Houve uma variação considerável nas estruturas gênicas de VvMTases, sendo a classe MET a mais variável (éxons 2-15, íntrons 1-14). No que diz respeito aos genes VvdMTases, houve variação no número de éxons (19-26) e íntrons (18-25) (**Tabela Suplementar S6; Figura 3B**).

No que tange aos motivos conservados de VvMTases, seis motivos altamente conservados (I, IV, VI, VIII, IX e X) foram identificados. As VvMTases compartilharam uma estrutura semelhante envolvendo os motivos conservados dispostos na sequência I-IV-VI-VIII-IX-X (**Figura 3A**). De maneira geral, a maioria das proteínas VvMTases apresentaram conservação dos motivos. No entanto, três proteínas pertencentes a classe MET apresentaram apenas o motivo VI. Todas as proteínas VvdMTase apresentaram três motivos conservados, sendo os domínios Pern-CXXC e RRM DME, incluídos no motivo III e o domínio HhH-GPD incluído nos motivos I e II (**Figura 3B**).

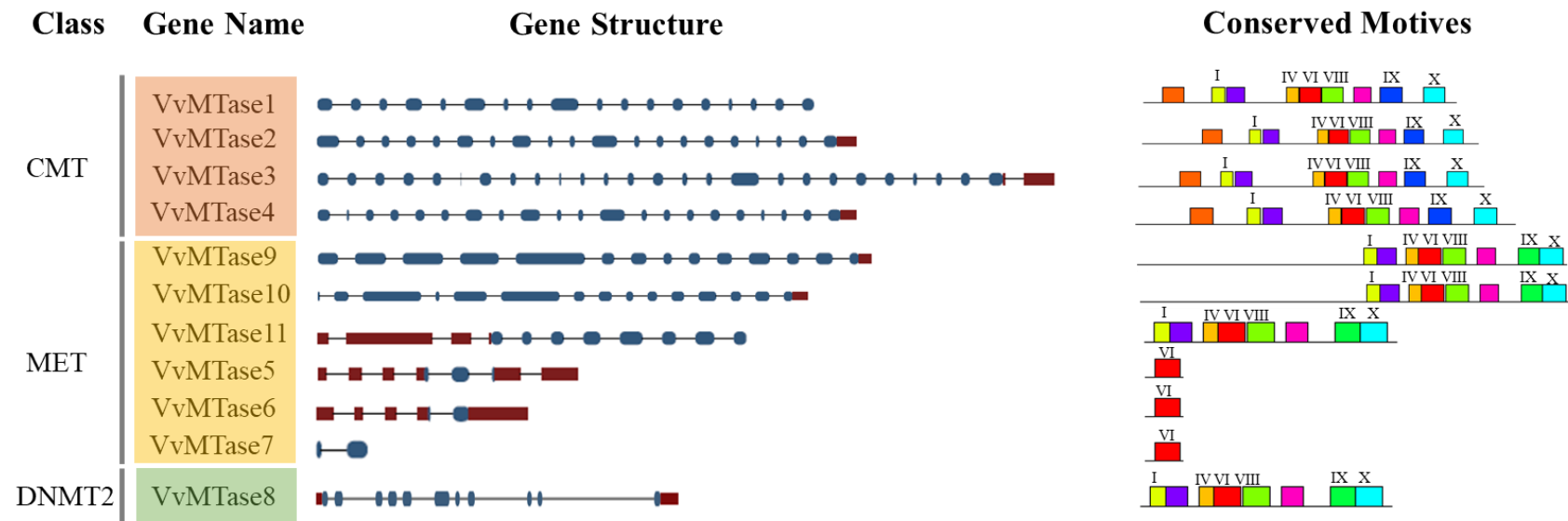
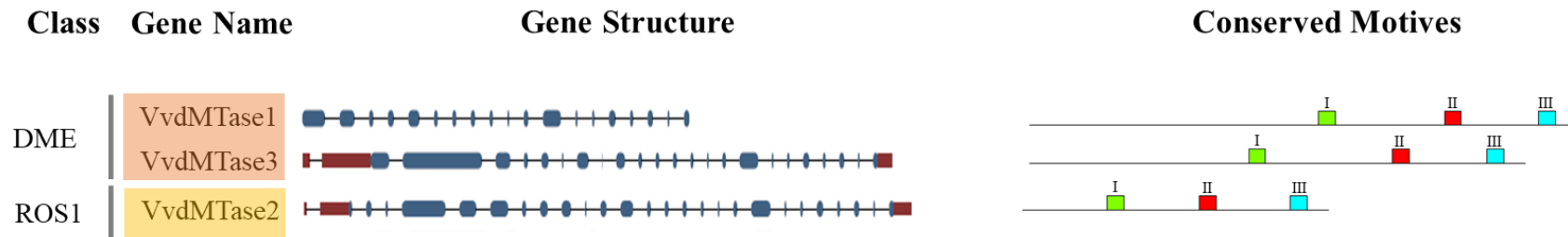
A.**B.**

Figura 3. Estruturas gênicas (esquerda) e motivos conservados (direita) dos genes VuMTases (**A**) e VvdMTases (**B**). Diferentes classes de VuMTases e VvdMTases estão identificadas em retângulos na lateral esquerda, sendo cada cor correspondente a uma classe específica. CDS, UTRs e íntrons das estruturas gênicas estão representados por retângulos azul, retângulos vermelhos e linhas pretas, respectivamente. Os motivos conservados estão representados por blocos coloridos. Os números romanos indicam os motivos característicos de cada família gênica.

3.1.4 Análise dos mecanismos de duplicação dos genes VvMTases e VvdMTases no genoma de *V. vinifera*

De acordo com a análise dos mecanismos de duplicação, três genes VvMTase foram duplicados por mecanismos de duplicação proximal, sendo representantes da classe MET (**Tabela Suplementar S7**). Dois genes da classe CMT, por sua vez, tiveram origem a partir de mecanismos de duplicação dispersa. Foi observado um evento de duplicação em tandem envolvendo dois genes VvMTase, pertencentes à classe MET. Além disso, dois genes VvMTase expandidos a partir do mecanismo de duplicação WGD/Segmental foram identificados no genoma da videira. Apenas um gene VvMTase, pertencentes à classe DNMT, foi considerado singleton (**Tabela Suplementar S7**). Por fim, três eventos de duplicação WGD/Segmental envolvendo os três genes VvdMTases foram observados no genoma da videira (**Tabela Suplementar S7**).

3.1.5 Análise da evolução das sequências de VvMTases e VvdMTases duplicados em tandem e WGD/segmental

A razão entre a taxa Ka (taxa de mutação não sinônima) e Ks (taxa de mutação sinônima) foi analisada para os genes VvMTases duplicados em tandem ou WGD/Segmental, bem como os três pares de genes VvdMTases duplicados por WGD/Segmental. Os valores de Ka/Ks para os VvMTases duplicados em tandem e WGD/Segmental foram, respectivamente, 0,19 e 0,30, enquanto que os VvdMTases variaram entre 0,23 e 0,34. Todos os pares de genes de VvMTases e VvdMTases analisados apresentaram $Ka/Ks < 1$, sugerindo que estão sob seleção purificadora (**Tabela Suplementar S8**).

3.1.6 Genômica comparativa dos genes VvMTases e VvdMTases

A análise de ortologia permitiu revelar o nível de conservação dos loci minerados tanto para as MTases quanto para as dMTases. Entre os loci das MTases, foi observado um alto nível de ortologia entre videira e outras espécies pertencentes às famílias Poaceae e Fabaceae. Os 11 loci não redundantes minerados no genoma da videira exibiram ortólogos no genoma de *Brachypodium distachyon* L., *Brachypodium sylvaticum* (Huds.) P. Beauv. (Poaceae) e *Cicer arietinum* L. (Fabaceae) (**Figura 4A**).

Na análise das dMTases, os três loci (100%) da videira apresentaram ortólogos em espécies das famílias Brassicaceae, Poaceae, Euphorbiaceae e Rosaceae, incluindo *Manihot esculenta* Crantz. e *Vigna unguiculata* L. Também foi observado um número expressivo de ortólogos entre a videira e *Citrus sinensis* L. (Rutaceae), revelando uma conservação dos loci de Mtases e dMTases entre a videira e espécies filogeneticamente distintas, como as pertencentes à família Poaceae (**Figura 4B**).

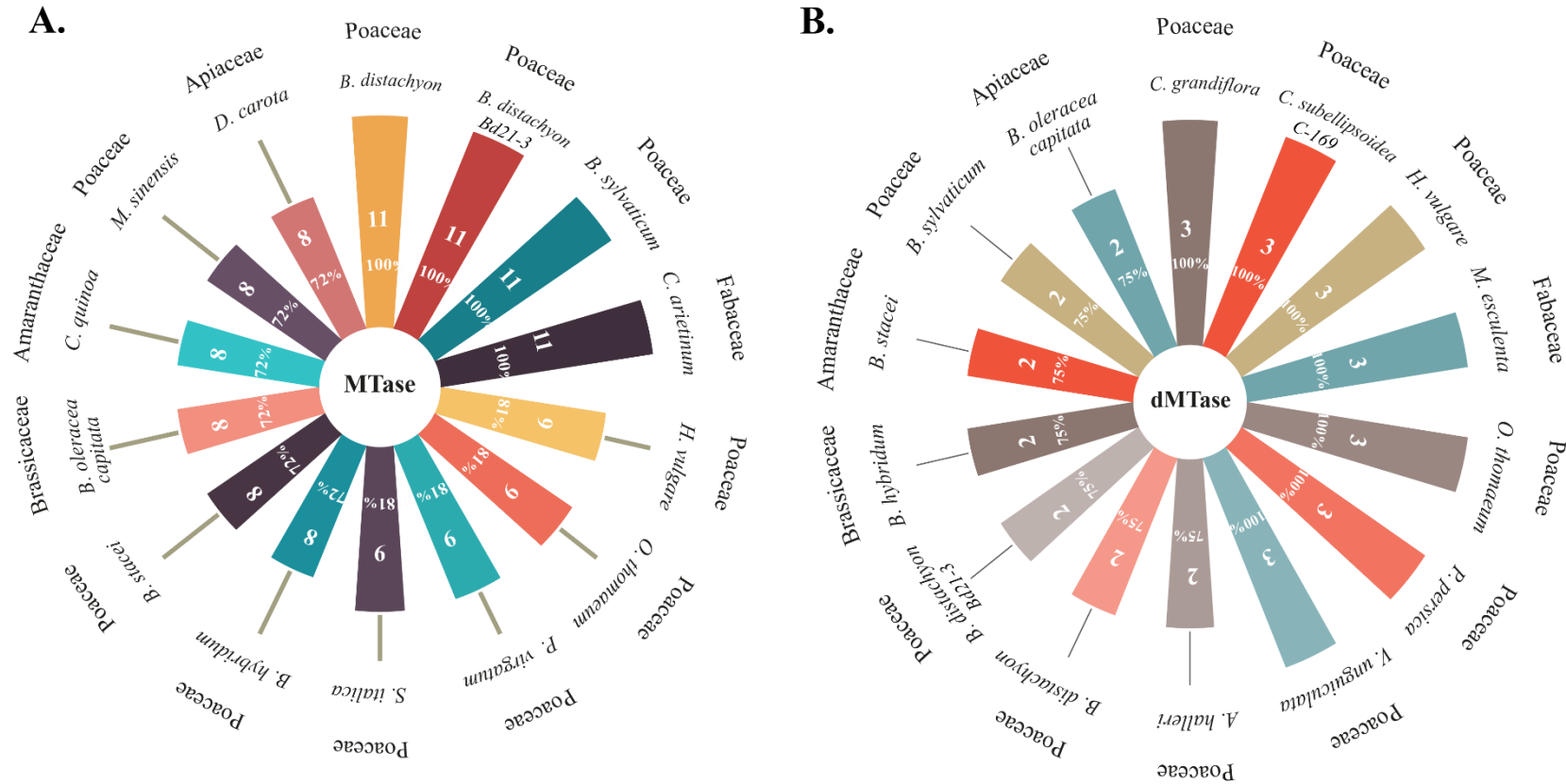


Figura 4. Quantificação dos loci conservados de metiltransferase de DNA (A) e demetilase de DNA (B) entre as 14 espécies vegetais com maiores índices de ortologia no genoma da videira. As espécies e famílias estão indicadas no exterior das barras. O quantitativo e suas respectivas porcentagens de ortologia gênica, em cada espécie analisada, em relação à videira, estão apresentadas no interior das barras.

3.1.7 Mineração de CCRES nos promotores dos genes VvMTases e VvdMTases

Todos os 11 genes que codificam as VvMTases da videira tiveram seus promotores preditos (1Kb) analisados em relação à identificação de elementos cis-regulatórios (CCREs). Três motivos identificados de regiões promotoras estavam dentro do limite estipulado (valor $e < 10^{-2}$, **Figura 5; Figura Suplementar 1**), sendo considerados como *bona fide* CCREs.

Os CCREs identificados estão associados a três famílias de TF distintas (Figura 6): AP2/ERF (dois motivos; caixa vermelha e azul claro; **Figura Suplementar 1A- B**), WRKY (dois motivos; verde claro e verde escuro; **Figura Suplementar 1C e 1F**) e Dof-type (três motivos; lilás, laranja e azul escuro; **Figura Suplementar 1D-E e 3G**). Os CCREs associados ao fator de transcrição do tipo Dof-type (JASPAR ID MA1281.1; MA0053.1; MA1278.1; **Figura 5; Figura Suplementar 1D-E e 1G**) foram os mais abundantes, sendo observados em 66 sítios distintos. Em seguida, observou-se motivos associados a TFs AP2/ERF (JASPAR ID MA1236.1; MA1260.1; **Figura 5; Figura Suplementar 1A-B**), ancorados em 19 sítios. TFs WRKY (JASPAR ID MA1091.1; MA1085.2; **Figura 5; Figura Suplementar 1C e 1F**) apresentaram, por sua vez, em 17 potenciais sítios de ancoramento.

Não houve enriquecimento para CCREs em promotores de VvdMTases.

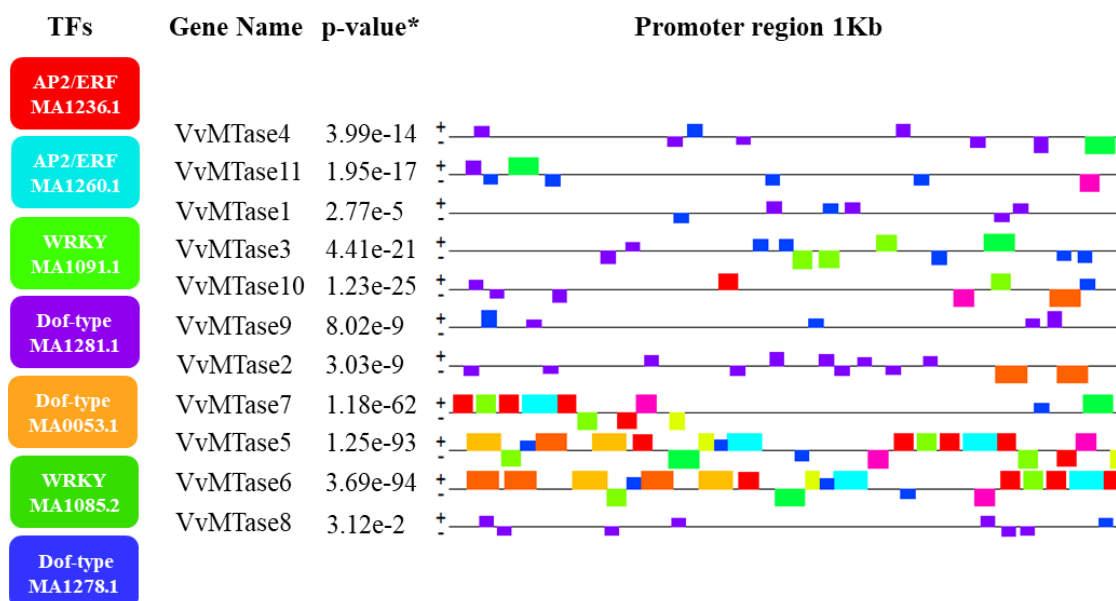


Figura 5. Localização e identificação dos CCREs, motivos consenso (matriz JASPAR ID: MA1236.1; MA1260.1; MA1091.1; MA1281.1; MA0053.1; MA1085.2; MA1278.1) e TFs associados nos promotores dos genes VvMTases. Na esquerda, os CCREs *bona fide* estão representados por quadrados em diferentes cores, apresentando seus respectivos fatores de transcrição associados. Para cada VvMTases analisadas (centro da imagem), os motivos são identificados em toda sua extensão gênica (direita).

3.2 Transcriptômica de VvMTases e VvdMTases em videira submetida a Xcv

Em bibliotecas de RNA-Seq [Tratamento x controle para ambos os genótipos (RedGlobe – suscetível e IAC-572 – resistente)], o perfil transcricional da videira submetida à infecção por Xcv foi traçado tanto para VvMTases quanto para VvdMTases no tempo de 90 minutos após inoculação. Nas referidas bibliotecas, foram minerados e caracterizados 12 transcritos VvMTases. Desses, apenas seis apresentaram domínio conservado completo, sendo distribuídos entre as classes CMT, MET e DNMT2. Além disso, três transcritos VvdMTases pertencentes as classes DME e ROS1 foram minerados nas bibliotecas RNA-Seq em questão. Todos esses transcritos apresentaram domínios conservados completos. Para ambas as famílias, todos os transcritos minerados foram expressos de forma constitutiva ao longo de todo o ensaio de inoculação bacteriana por Xcv (**Tabela Suplementar S9-10**).

3.3 Validação dos dados de expressão gênica via qPCR

Para validar os dados de expressão gênica *in silico* [bibliotecas RNA-Seq (Tratamento 90 min x Controle para ambos os genótipos)], todos os transcritos VvMTases e VvdMTases expressos de forma constitutiva foram avaliados por qPCR.

Considerando os pares de primers funcionais, apenas três [dois VvMTase (Vv_07s0130g00380 e Vv_08s0007g06800, pertencentes as classes MET e CMT, respectivamente) e um VvdMTase (Vv_08s0007g03920, classe DME)] apresentaram eficiência de amplificação variando de 90 a 108,8% em ambos os genótipos avaliados (**Tabela Suplementar S1**). A análise de expressão relativa mostrou que, para o tratamento de 90 minutos, ambos os transcritos VvMTase foram reprimidos no genótipo resistente, enquanto que o transcrito VvdMTase (Vv_08s0007g03920) foi induzido.

Para o genótipo suscetível, o transcrito Vv_07s0130g00380 foi reprimido e Vv_08s0007g06800 apresentou expressão constitutiva. Por fim, o transcrito Vv_08s0007g03920 foi induzido. Esses resultados foram divergentes daqueles observados nos dados de RNA-Seq. Apenas o transcrito Vv_08s0007g06800 apresentou expressão constitutiva no genótipo suscetível, confirmando os dados de RNA-Seq (**Figura 6**).

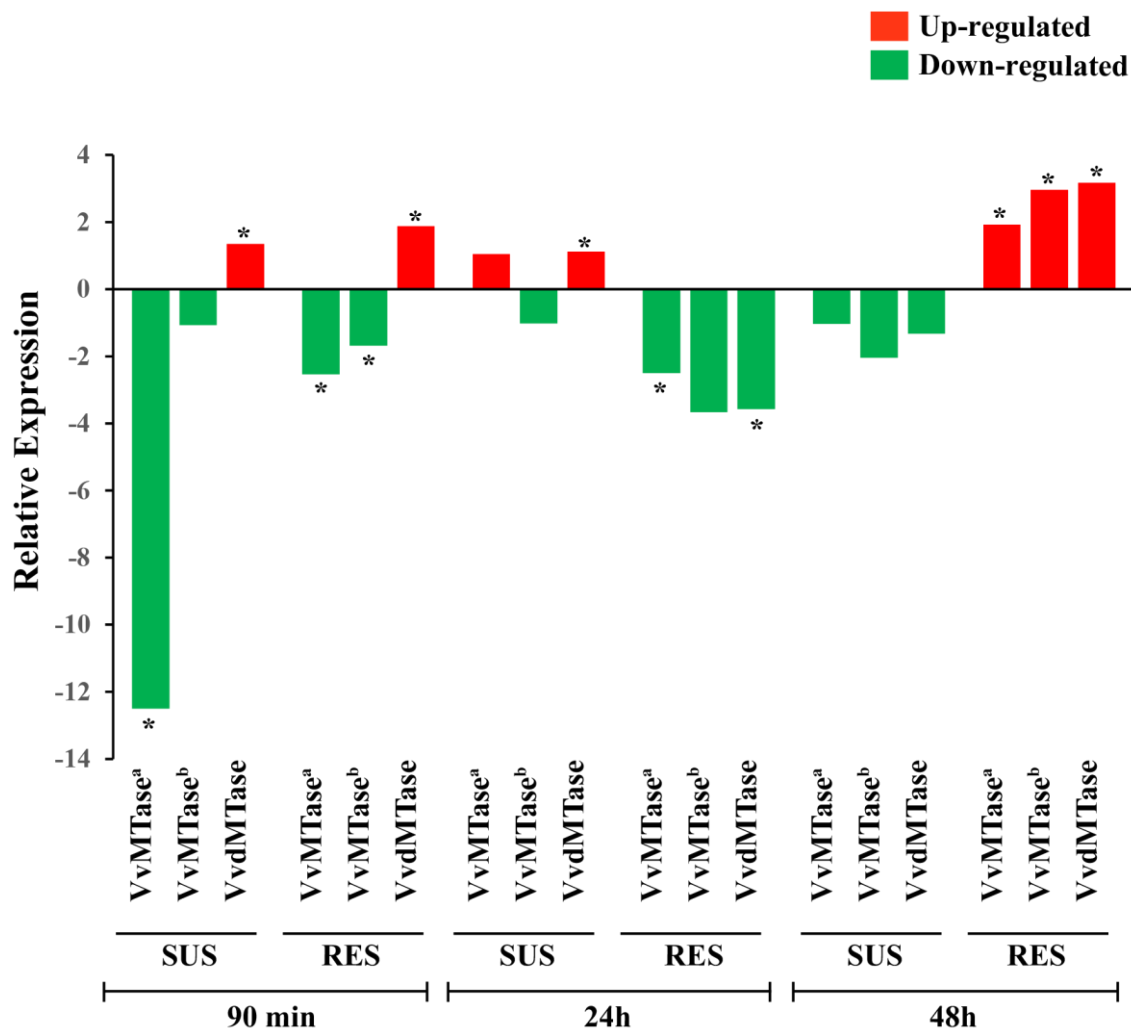


Figura 6. Expressão relativa via qPCR dos transcritos VvMTase e VvdMTase expressos de forma constitutiva nas bibliotecas de RNA-Seq. O asterisco indica os transcritos diferencialmente expressos considerando $p < 0,05$ e FDR $< 0,05$. Os nomes verticais indicam os Ids dos transcritos VvMTases e VvdMTase, sendo: VvMTase^a (Vv_07s0130g00380); VvMTase^b (Vv_08s0007g06800); e VvdMTase (Vv_08s0007g03920).

A fim de compreender melhor o possível papel funcional dos VvMTases e VvdMTases sob inoculação bacteriana por Xcv, os transcritos foram também avaliados via qPCR nos tratamentos de 24 e 48 h após a inoculação. No tratamento de 24 h, os transcritos Vv_07s0130g00380 e Vv_08s0007g03920 foram reprimidos no genótipo resistente. Já o transcrito Vv_08s0007g06800, apresentou expressão constitutiva. No que tange o genótipo suscetível, apenas o transcrito Vv_08s0007g03920 foi induzido, sendo os transcritos Vv_07s0130g00380 e Vv_08s0007g06800 expressos de forma constitutiva. Por fim, no tratamento de 48 h todos os transcritos foram induzidos no genótipo resistente, com destaque para o transcrito Vv_08s0007g03920 da família dMTase, o qual apresentou um maior nível de indução quando comparado aos demais transcritos VvMTases. Já no genótipo suscetível todos os transcritos foram expressos de forma constitutiva. Esses resultados sugerem que VvMTases e VvdMTases tendem a

participar da resposta de defesa a inoculação por Xcv em momentos mais intensos do estresse em questão, sendo observado uma participação desses transcritos especialmente no genótipo resistente.

Em suma, observa-se que a regulação dos transcritos de ambas as famílias gênicas analisadas apresentou uma maior indução no tempo de 48 h após a inoculação, sendo observado uma resposta genótipo específica. Uma vez que, os transcritos VvMTases e VvdMTases tendem a apresentar uma maior indução no genótipo resistente.

4. Discussão

4.1 Mineração e caracterização estrutural de VvMTases e VvdMTases no genoma da videira

A distribuição, posição relativa e abundância de MTases e dMTases têm sido amplamente descritas em espécies vegetais. No presente trabalho, 11 genes VvMTases e três VvdMTases foram identificados no genoma da videira. Essa frequência é semelhante à encontrada em outros genomas vegetais. Por exemplo, *C. sinensis* apresenta sete MTases (três CMT, uma MET e três DRM) e quatro dMTases (Zhu et al., 2020); *S. melongena* exibe seis MTases (três CMT, uma MET e duas DRM) e cinco dMTases (Mogliola et al., 2019); *C. scolymus*, dez genes MTases (cinco CMT, uma MET e quatro DRM) e cinco dMTases (Gianoglio et al., 2017); *G. max* possui 11 (quatro CMT, duas MET e cinco DRM); *M. truncatula*, nove genes MTases (três CMT, duas MET e quatro DRM) (Garg et al., 2014); e *A. thaliana* exibe dez loci MTases (três CMT, quatro MET e três DRM) e cinco dMTases (Pavlopoulou e Kossida, 2007).

O domínio DNA_Methylase (PF00145) encontra-se geralmente localizado na região C-terminal das proteínas VvMTases. Esse domínio, consiste em seis motivos altamente conservados que são envolvidos em uma das etapas da reação de metilação de DNA. Na videira, esse domínio mostrou-se altamente conservado. Os motivos catalíticos conservados I e X, por exemplo, estão envolvidos na ligação da S-Adenosil-L-metionina (AdoMet), a qual desempenha papel na transferência de um grupo metil ao carbono 5 dos resíduos de citosina. Já o motivo IV contém um sítio ativo funcional em todas as MTases descritas. O motivo VI está associado à ligação da citosina alvo. O motivo VIII, por sua vez, realiza contatos inespecíficos com a citosina, os quais contribuem para a neutralização da carga negativa do DNA. Por fim, o motivo IX está envolvido na organização do domínio de reconhecimento do alvo (TRD), fornecendo resíduos invariantes que possivelmente contribuam para o reconhecimento do DNA alvo (Pósfai et al., 1989; Kumar et al., 1994). A elevada conservação desses resíduos é uma característica essencial das proteínas. No entanto, alguns desses motivos não foram identificados em três proteínas VvMTases da classe MET. Essas proteínas apresentaram o domínio DNA_Methylase incompleto ou reduzido. Portanto, a estrutura do domínio DNA_Methylase das proteínas dessas classes apresentaram algumas variações que devem ser exploradas para uma melhor compreensão do desenvolvimento da função dessas proteínas na videira.

As MTases também desempenham um importante papel no reconhecimento dos diferentes contextos de citosinas do DNA (CpG; CpHpG; e CpHpH), o que está

relacionado a diferentes domínios situados na região N-terminal. A sua região variável torna-se um provável candidato à especificidade desses contextos de citosinas do DNA (Szegedi e Gumpert, 2000). Algumas VvMTases da classe MET identificadas no genoma da videira apresentaram dois domínios extras DNMT1-RFD na região N-terminal. Esses domínios são responsáveis pelo reconhecimento de dinucleotídeos CpG hemimetilados e pela metilação de citosina não modificada (He et al., 2011). A sua presença é um elemento essencial para que MET participe da manutenção da metilação do contexto CpG (Zhu et al., 2020). As proteínas da classe CMT, por sua vez, mantêm a metilação nos contextos CpHpG e CpHpH, sendo a última a depender da região genômica (Bartee et al., 2001; Lindroth et al., 2001; Zemach et al., 2013). Essas proteínas apresentam em sua região N-terminal um domínio CHROMO, o qual foi identificado entre os motivos I e IV nas VvMTases. Gianoglio et al. (2017) previamente descreveram a estrutura dessas proteínas em alcachofra. Esse domínio está envolvido nas interações da cromatina e, provavelmente, medeia o reconhecimento e a ligação ao DNA alvo. Além disso, o domínio CHROMO é responsável pela regulação gênica associada à remodelagem da cromatina, podendo ligar-se às histonas metiladas, afetando o nível de metilação do genoma (Jones et al., 2000; Tajul-Arifin et al., 2003).

O domínio bromo-adjacente (BAH) foi identificado, por sua vez, nas proteínas pertencentes às classes MET e CMT. Funciona como um módulo de interação proteína-proteína especializado no silenciamento de genes (Callebaut et al., 1999). O referido domínio também pode estar presente em outras proteínas envolvidas no processo de regulação da transcrição, incluindo a proteína do complexo de origem da replicação (Orc1) (Saze et al., 2013). Já as proteínas da classe DRM, são caracterizadas por abrigar o domínio UBA em sua região N-terminal. Essas proteínas são as principais responsáveis pela metilação dos sítios CpHpH (Chan et al., 2005). No entanto, nenhum membro dessa classe foi identificado no genoma da videira, indicando uma possível perda dos genes dessa classe durante a evolução dessa espécie. No que tange às proteínas VvMTase da classe DNMT2, nenhum domínio na região N-terminal foi identificado. Estudos anteriores mostraram que esse grupo proteico têm uma ampla especificidade de substrato não apenas como uma metilase de DNA (Ashapkin et al., 2016), mas também como metilase de tRNA (Hermann et al., 2003; Tuorto et al., 2012).

Quanto às VvdMTases, todas as proteínas apresentaram um domínio RRM-DME e Perm-CXXC na região C-terminal e um domínio catalítico HhH-GPD. O HhH-GPD é considerado um domínio de DNA glicosilase descontínuo que envolve dois segmentos conectados por uma região de comprimento variável (Ponferrada-Marín et al., 2011). Os domínios RRM-DME e Perm-CXXC, por sua vez, são altamente conservados entre os membros da família demetilase de DNA. Mutações pontuais no domínio C-terminal de DME e ROS1 resultaram na inativação de excisão de 5-meC (Agius et al., 2006; Mok et al., 2010; Ponferrada-Marín et al., 2011). O domínio C-terminal de ROS1 carece de atividade enzimática detectável e liga-se ao DNA com afinidade muito baixa (Ponferrada-Marín et al., 2011), enquanto o isolamento do seu domínio de glicosilase de DNA resulta na sua inativação no processo de excisão de 5-meC, restando, porém, a atividade parcial de liase. Entretanto, a adição desse domínio restaura sua atividade de excisão de bases e aumenta a atividade de AP liase, sugerindo ser indispensável para a atividade de glicosilase de ROS1 (Hong et al., 2014).

Por fim, todos os genes VvMTases, bem como VvdMTases apresentaram pelo menos um íntron em suas respectivas estruturas, sugerindo que o ganho de íntrons contribuiu para a diversificação dessas famílias gênicas na videira. Resultado semelhante foi observado em outras espécies vegetais, como *Solanum melongena* L. (Moglia et al., 2019) e *Dendrobium officinale* Kimura & Migo (Yu et al., 2021).

4.2 Mecanismos de duplicação dos genes VvMTases e VvdMTases no genoma da videira e análise de pressão de seleção

A duplicação gênica contribui para a evolução e expansão de famílias gênicas (Hurles, 2004). As duplicações em tandem por exemplo, representam mecanismos cruciais na geração de novas cópias de genes em clusters, podendo contribuir para diversidade de famílias gênicas (Cannon et al., 2004). Os eventos de duplicação WGD/segmental, por sua vez, podem dispersar de forma ampla cópias de um gene por todo o genoma, contribuindo para geração de novas subfamílias de genes bem como para evolução do genoma de determinada espécie (Baumgarten et al., 2003). Duplicação segmental e em tandem são os principais mecanismos evolutivos que resultam na expansão da família metiltransferase de DNA em plantas (Keller et al., 2014; Pei et al., 2019). Na videira, a duplicação WGD/segmental e em tandem foram as principais responsáveis pela expansão da família MTase (~37%). Em relação à família dMTase, todos os genes tiveram origem a partir do mecanismo de duplicação WGD/segmental. Esses resultados indicam que as duplicações em tandem e WGD/segmental desempenham papel fundamental no mecanismo de expansão das famílias MTases e dMTases. Resultados semelhantes foram previamente relatados em outras espécies vegetais, como *Fragaria vesca* L. (Gu et al., 2016) *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Zhu et al., 2020) e kiwi (Zhang et al., 2020).

A razão entre a taxa de substituição não sinônima (Ka) e a taxa de substituição sinônima (Ks) determina se há pressão seletiva atuando nos genes analisados (Hurst, 2002). Essa razão foi analisada para VvMTases e VvdMTases que apresentaram duplicação em tandem e segmental. Todos os pares de VvMTases e VvdMTases duplicados pelos mecanismos acima exposto estão sob seleção purificadora (Ka/Ks <1). Esse tipo de seleção conserva as sequências de aminoácidos dos grupos proteicos, indicando que os genes analisados não divergiram durante a evolução, os quais mantiveram sua funcionalidade conservada. Além disso, os pares de genes em questão podem apresentar redundância de funcionalidade. Tal ação pode compensar a perda de função de membros específicos dessas famílias de genes ao longo do processo evolutivo.

4.3 Genômica comparativa dos genes VvMTases e VvdMTases

A análise de ortologia gênica é considerada uma abordagem bastante viável para prever funções desconhecidas de genes compartilhados entre diferentes espécies que evoluíram como resultado de eventos de especiação (Peng et al., 2017). Os genes ortólogos são derivados de um único gene no último ancestral comum de duas ou mais espécies, permitindo que compartilhem as mesmas funções em táxons recém-evoluídos (Das et al., 2016). Foi observada uma conservação significativa de MTases e dMTases tanto entre espécies próximas como distantemente relacionadas, como as monocotiledôneas da família Poaceae. Tais dados lançam novas perspectivas de estudos

relacionados à funcionalidade dessas proteínas nas espécies conservadas analisadas nesse estudo.

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

Três diferentes famílias de FTs estiveram associadas a *bona fide* CCREs ancorados aos promotores de genes codificadores das MTases. Esses FTs apresentam íntima associação com a resposta a estresses em plantas. Os TFs da família WRKY compõem uma das maiores famílias de TFs e regulam diversos processos biológicos nas plantas (para uma revisão detalhada, consultar Baillo et al., 2019). No arroz, a indução do gene WRKY67 aumentou a resistência das plantas transgênicas às duas principais doenças dessa cultura, ocasionadas por *Magnaporthe oryzae* e *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo), tornando o WRKY67 um alvo ideal para a melhoria do arroz (Liu et al., 2018b). Os Dof-type, por sua vez, são fatores de transcrição envolvidos na resposta a agentes patogênicos, como vírus e fungos (Wen et al., 2016; Kang et al., 2016). Por fim, TFs AP2/ERF foram induzidos em resposta à infecção por *Alternaria alternata* em maçã, sugerindo seu possível papel na resposta ao mencionado agente patogênico (Li et al., 2020). Dessa forma, é observado que FTs que ancoram em regiões promotoras de MTases participam de ações de orquestração transcricional em diferentes plantas submetidas a ações de defesa contra diferentes patógenos. Isso reforça a importância desses genes em videira e acentua seu valor biotecnológico.

4.5 Transcriptômica de VvMTases e VvdMTases em videira submetida a Xcv

No presente estudo, os dados de RNA-Seq para o tratamento de 90 minutos demonstraram expressão constitutiva de VvMTases e VvdMTases em ambos os genótipos analisados. No entanto, os resultados obtidos a partir da qPCR indicaram uma indução de VvMTases e VvdMTases em pelo menos um dos tratamentos analisados (90 minutos, 24 e 48 h) nos genótipos resistente e suscetível.

Considerando os dados da qPCR, fica evidente que a orquestração transcricional de VvMTases e VvdMTases ocorre de forma dependente do genótipo, uma vez que os dois genótipos analisados apresentaram variação na resposta a Xcv, sugerindo que a dinâmica do processo de metilação do DNA pode estar envolvida na regulação da resistência à Xcv na videira. Existem diversos relatos demonstrando a dinâmica da metilação do DNA das plantas na regulação da resposta a estresses bióticos (Boyko e Kovalchuk, 2011; Diez et al., 2014; Zhu et al., 2015; Espinas et al., 2016). No entanto, estudos envolvendo a expressão de MTases e dMTases dependente de genótipo em plantas sob estresse biótico são escassos. Nossos resultados ampliam o leque de alvos a serem estudados para um maior entendimento das funções da família MTase e dMTase em plantas em resposta a patógenos.

Em termos de família gênica, destacou-se uma maior indução do transcrito pertencente à família dMTase no genótipo resistente. Sánchez et al. (2016), ao expor diferentes mutantes de *Arabidopsis* ao ataque patogênico de *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Hpa), observaram que os mutantes defeituosos na metilação do DNA (hipometilados) exibiram resistência aumentada a Hpa, enquanto dois mutantes hipermetilados (afetado na demetilação do DNA) apresentaram susceptibilidade a esse patógeno. Adicionalmente, através da análise transcriptômica dos mutantes nrpe1

(mutante hipometilado) e *ros1* (mutante hipermetilado), em diferentes tempos após a infecção por Hpa, os autores observaram a influência da metilação do DNA na regulação transcricional, em que cerca de 166 transcritos foram induzidos em *nrpe1* e reprimidos em *ros1*. Estudos similares demonstraram a atuação da metilação do DNA na resposta de *Arabidopsis* contra agentes patogênicos biotróficos (Lopez et al., 2011; Downen et al., 2012; Luna et al., 2012; Yu et al., 2013).

5. Conclusão e Perspectivas

As VvMTases e VvdMTases podem ser agrupados em três e duas classes, respectivamente. Os mecanismos de duplicação em tandem e WGD/segmental possivelmente desempenham um papel crucial na expansão desses genes durante a evolução da videira. A identificação dos elementos cis-regulatórios, seus respectivos FTs e a análise de transcriptômica dos VvMTases e VvdMTases revelam, por sua vez, que esses genes podem estar envolvidos na resposta vegetal a diversos estresses bióticos, além daqueles aqui analisados. Os genótipos da videira analisados tendem a apresentar uma variação na resposta a Xcv. O genótipo resistente, por exemplo, apresenta uma maior indução de VvMTases e VvdMTases, especialmente no tempo de 48 h, quando comparado ao genótipo suscetível. Esse fato, pode estar relacionado a uma maior resistência no genótipo tolerante. Nossos dados fornecem informações valiosas acerca do papel de VvMTases e VvdMTases nos processos moleculares, especialmente no genótipo moderadamente resistente do híbrido IAC 572, sugerindo potenciais alvos biotecnológicos na resposta de defesa dessa cultura. Estudos adicionais são, portanto, necessários para confirmar a funcionalidade desses genes nos processos de (de)metilação de DNA e sua atuação frente à resposta de defesa dessa espécie economicamente importante.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio das bolsas de pesquisa.

Referências

- Agius F, Kapoor A, Zhu JK (2006). Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. PNAS 103:11796–11801.
- Agorio A, and Vera P (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. Plant Cell 19:3778–3790
- Ashapkin VV, Kutueva LI, Vanyushin BF. (2016). Dnmt2 is the most evolutionary conserved and enigmatic cytosine DNA methyltransferase in eukaryotes. Russian Journal of Genetics 52:237-248.
- Bailey TL and Elkan C (1994). Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. Proc Int Conf Intell Syst Mol Bio 2:28-36.
- Baillo EH, Kimotho RN, Zhang Z and Xu P (2019). Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. Genes (Basel) 10:771.
- Bartee L, Malagnac F, Bender J (2001). Arabidopsis cmt3 Chromomethylase Mutations Block Non-CG Methylation and Silencing of an Endogenous Gene. Genes Dev., 15:1753-1758.
- Bartels A, Han Q, Nair P, Stacey L, Gaynier H, Mosley M, et al. (2018). Dynamic DNA methylation in plant growth and development. Int. J. Mol. Sci. 19:2144.
- Baumgarten A, Cannon S, Spangler R and May G (2003). Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. Genetics 165:309.
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. Bioinformatics 30:2114-2120.
- Boyko A and Kovalchuk I (2011). Genome instability and epigenetic modification-heritable responses to environmental stress? Curr Opin Plant Biol 14:260–266.
- Callebaut I, Courvalin J-C, Mornon J-P (1999). The BAH (bromo-adjacent homology) domain: A link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. FEBS Letters 446:189-193.
- Cannon SB, Mitra A, Baumgarten A, Young ND and May G (2004). The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. BMC Plant Biol 4:10.
- Chan SW-L, Henderson IR and Jacobsen SE (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nature Reviews Genetics, 6:351-360.
- Das M, Haberer G, Panda A, Das Laha S, Ghosh TC and Schäffner AR (2016). Expression Pattern Similarities Support the Prediction of Orthologs Retaining Common Functions after Gene Duplication Events. Plant Physiol 171:2343–2357.
- Deng Y. et al. (2017). Epigenetic regulation of antagonistic receptors confers rice blast resistance with yield balance. Science 355:962–965.
- Diez, C. M., Roessler, K., and Gaut, B. S. (2014). Epigenetics and plant genome evolution. Curr. Opin. Plant Biol. 18:1–8.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S et al. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics 29:15–21.
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE and Ecker JR (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. Proc Natl Acad Sci U S A 109:2183–2191.
- Espinass, N. A., Hidetoshi, S., and Yusuke, S. (2016). Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. Front. Plant Sci. 7:1201.

Gama MA, Mariano RL, Viana FM, Ferreira MA and Souza EB (2011). Polyphasic characterization of pigmented strains of *Xanthomonas* pathogenic to cashew trees. *Plant disease*, 95:793-802.

Garg R, Kumari R, Tiwari S and Goyal S (2014). Genomic Survey, Gene Expression Analysis and Structural Modeling Suggest Diverse Roles of DNA Methyltransferases in Legumes. *PLoS One* 9:e88947.

Gehring M and Henikoff S (2007). DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim Biophys Acta - Gene Struct Expr* 1769:276–286.

Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg RB and Fischer RL (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124:495–506.

Geisel, N (2011). Constitutive versus responsive gene expression strategies for growth in changing environments. *PLoS ONE* 6:23–25.

Geng S et al (2019). DNA methylation dynamics during the interaction of wheat progenitor *Aegilops tauschii* with the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis* f. sp. *Tritici*. *New Phytol.* 221:1023-1035.

Gianoglio S, Moglia A, Acquadro A, Comino C and Portis E (2017) The genome-wide identification and transcriptional levels of DNA methyltransferases and demethylases in globe artichoke. *PLoS One* 12:e0181669.

Gu T, Ren S, Wang Y, Han Y, Li Y (2016). Characterization of DNA methyltransferase and demethylase genes in *Fragaria vesca*. *Molecular Genetics and Genomics*. 291:1333–1345.

Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey T and Noble WS (2007). Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*. 8:24.

Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A (2003). The human Dnmt2 has residual DNA- (cytosine-C5) methyltransferase activity. *Journal of Biological Chemistry* 278:31717-31721.

Hong S, Hashimoto H, Kow YW, Zhang X, Cheng X (2014). The carboxy-terminal domain of ROS1 is essential for 5-methylcytosine DNA glycosylase activity. *J. Mol. Biol.* 426:3703–3712.

Hurst L.D (2002). The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet* 18:486–487.

Jansen RK, Kaittanis C, Saski C, Lee SB, Tomkins J, Alverson AJ and Daniell H (2006). Phylogenetic analyses of *Vitis* (Vitaceae) based on complete chloroplast genome sequences: Effects of taxon sampling and phylogenetic methods on resolving relationships among rosids. *BMC Evol Biol* 6:32.

Jeltsch A, Ehrenhofer-Murray A, Jurkowski TP, Lyko F, Reuter G, Ankri S, Nellen W, Schaefer M and Helm M (2016). Mechanism and biological role of Dnmt2 in Nucleic Acid Methylation. *RNA Biology* 14:1108-1123.

Jones DO, Cowell IG and Singh PB (2000). Mammalian chromodomain proteins: their role in genome organisation and expression. *BioEssays* 22:124-137.

Kang WH, Kim S, Lee HA, Choi D and Yeom SI (2016). Genome-wide analysis of Dof transcription factors reveals functional characteristics during development and response to biotic stresses in pepper. *Sci Rep* 6:1–12.

Kapoor A, Agius F and Zhu JK (2005). Preventing transcriptional gene silencing by active DNA demethylation. *FEBS Lett* 579:5889–5898.

Keller TE, Yi SV, (2014). DNA methylation and evolution of duplicate genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 111:5932–5937.

Kim MY and Zilberman D (2014). DNA methylation as a system of plant genomic immunity. *Trends Plant Sci* 19:320–326.

Kumar S, Cheng X, Klimasauskas S, Sha M, Posfai J, Roberts RJ, Wilson GG (1994). The DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 22:1-10.

Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 7:1870-1874.

Lang Z, Wang Y, Tang K, Tang D, Datsenka T, Cheng J, et al. (2017). Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:4511–4519.

Le TN, Schumann U, Smith NA, Tiwari S, Au PCK, Zhu Q, Taylor JM, Kazan K, Llewellyn DJ, Zhang R, Dennis ES, Wang M (2014). DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 15:458.

Li H, Dong Q, Zhao Q, Shi S and Ran K (2020). Isolation, sequencing, and expression analysis of 30 AP2/ERF transcription factors in apple. *PeerJ* 2020:e8391.

Lima MF et al (1999). Bacterial canker of grapevine in Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, 24:440-443.

Lin JY, Le BH, Chen M, Henry KF, Hur J, Hsieh TF, et al. (2017). Similarity between soybean and *Arabidopsis* seed methylomes and loss of non-CG methylation does not affect seed development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114:9730–9739.

Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE. (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 292:2077-2080.

Liu C, Li H, Lin J, Wang Y, Xu X, Max Cheng ZM and Chang Y (2018a). Genome-wide characterization of DNA demethylase genes and their association with salt response in *pyrus*. *Genes (Basel)* 9:398.

Liu Q, Li X, Yan S, Yu T, Yang J, Dong J, Zhang S, Zhao J, Yang T, Mao X et al. (2018b). OsWRKY67 positively regulates blast and bacteria blight resistance by direct activation of PR genes in rice. *BMC Plant Biol* 18:257.

Lopez A, Ramirez V, Garcia-Andrade J, Flors V and Vera P (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase V is required for plant immunity. *PLoS Genet.* 7: e1002434.

Lopez A, Ramirez V, Garcia-Andrade J, Flors V and Vera P (2011). The RNA silencing enzyme RNA polymerase V Is required for plant immunity. *PLoS Genet.* 7: e1002434.

Love MI, Huber W and Anders S (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 15:550.

Luna E, Bruce TJA, Roberts MR, Flors V and Ton Jurrjaan (2012). Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol.* 158:844–853.

MAPA (2018). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Instrução Normativa Nº 38, DE 1º de outubro de 2018. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, ed. 190, seção 1, p.14. Disponível em: < https://www.in.gov.br/materia//asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/d01-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024 > Acesso em: 12 agosto de 2020.

Mirouze M and Paszkowski J (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr Opin Plant Biol* 14:267–274.

Moglia A, Gianoglio S, Acquadro A, Valentino D, Milani AM, Lanteri S and Comino C (2019). Identification of DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum melongena* L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses. *PLOS ONE* 14(10): e0223581.

Mok YG, Uzawa R, Lee J, Weiner GM, Eichman BF, Fischer RL and Huh JH (2010). Domain structure of the DEMETER 5-methylcytosine DNA glycosylase. *PNAS* 107:19225–19230.

Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marín MI, Martínez-Macías MI, Ariza RR, Roldán-Arjona T (2006). DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:6853–6858.

Nash HM, Bruner SD, Scharer OD, Kawate T, Addona TA, Spooner E, Lane WS, Verdine GL (1996). Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr. Biol.* 6:968–980.

Niehrs, C (2009). Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation* 77:1–11.

Nozawa K, Chen J, Jiang J, Leichter SM, Yamada M, Suzuki T, et al. (2021). DNA methyltransferase CHROMOMETHYLASE3 prevents ONSEN transposon silencing under heat stress. *PLoS Genet* 17(8): e1009710.

Ogneva Z V, Dubrovina AS and Kiselev KV (2016) Age-associated alterations in DNA methylation and expression of methyltransferase and demethylase genes in *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plant* 60:628–634.

Ortega-Galisteo, AP, Morales-Ruiz T, Ariza, RR and Roldan-Arjona T (2008). *Arabidopsis* DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol. Biol.* 67:671–681.

Pavlopoulou A and Kossida S (2007). Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: Structure, function, and molecular evolution. *Genomics* 90:530–541.

Pei L, Zhang L, Li J, Shen C, Qiu P, Tu L, Zhang X, Wang, M. (2019). Tracing the origin and evolution history of methylation-related genes in plants. *BMC plant biology*, 19(1): 307.

Peng M, Ying P, Liu X, Li C, Xia R, Li J and Zhao M (2017). Genome-wide identification of histone modifiers and their expression patterns during fruit abscission in litchi. *Front Plant Sci* 0:639.

Penterman J, Zilberman D, Huh JH, Ballinger T, Heniko S and Fischer RL (2007). DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *PNAS* 104:6752–6757.

Ponferrada-Marín MI, Parrilla-Doblas JT, Roldán-Arjona T and Ariza RR (2011). A discontinuous DNAGlycosylase domain in a family of enzymes that excise 5-methylcytosine. *Nucleic Acids Research* 39:1473–1484.

Pósfai J, Bhagwat AS, Pósfai G and Roberts RJ (1989). Predictive motifs derived from cytosine methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 17:2421–2435.

Sánchez AL, Stassen JHM, Furci L, Smith LM and Ton J (2016). The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 88:361–374.

Savageau MA (1977). Design of molecular control mechanisms and the demand for gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5647–5651.

Saze H, Kitayama J, Takashima K, Miura S, Harukawa Y, Ito T and Kakutani T (2013). Mechanism for full-length RNA processing of *Arabidopsis* genes containing intragenic heterochromatin. *Nature Communications* 2301:1–9.

Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD and Higgins DG (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* 7:539.

Sonnhammer ELL and Östlun G (2015). InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Research* 43:D234–D239.

Szegedi SS and Gumpert RI (2000). DNA binding properties in vivo and target recognition domain sequence alignment analyses of wild-type and mutant RsrI [N6-adenine] DNA methyltransferases. *Nucleic Acids Research* 28:3972-3981.

Tajul-Arifin K, Teasdale R, Ravasi T, Hume DA, Mattick JS, RIKEN GER Group, GSL Members and Mattick JS (2003). Identification and analysis of chromodomain-containing proteins encoded in the mouse transcriptome. *Genome Research* 13:1416-1429.

Tang H, Bowers JE, Wang X, Ming R, Alam M and Paterson AH (2008). Synteny and collinearity in plant genomes. *Science* 320:486-488.

Tang LY, Reddy MN, Rasheva V, Lee TL, Lin MJ, Hung MS and Shen CKJ (2003). The Eukaryotic DNMT2 Genes Encode a New Class of Cytosine-5 DNA Methyltransferases. *J Biol Chem* 278:33613-33616.

Tuorto F, Liebers R, Musch T, Schaefer M, Hofmann S, Kellner S, Frye M, Helm M, Stoecklin G, Lyko F (2012). RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis. *Nature Structural & Molecular Biology* 19:900-905.

Wen CL, Cheng Q, Zhao L, Mao A, Yang J, Yu S, Weng Y and Xu Y (2016). Identification and characterisation of Dof transcription factors in the cucumber genome. *Sci Rep* 6:1-11.

Xie H, Konate M, Sai N, Tesfamichael KG, Cavagnaro T, Gilliam M, Breen J, Metcalfe A, Stephen JR, De Bei R et al. (2017). Global DNA methylation patterns can play a role in defining terroir in grapevine (*Vitis vinifera* cv. Shiraz). *Front Plant Sci* 8:1860.

Yu A, Lepere G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham AL, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O et al (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:2389-2394.

Yu, Z., Zhang, G., Teixeira da Silva, J.A. et al. (2021). Genome-wide identification and analysis of DNA methyltransferase and demethylase gene families in *Dendrobium officinale* reveal their potential functions in polysaccharide accumulation. *BMC Plant Biol.* 21:1-17.

Zemach A, Kim MY, Hsieh P-H, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D (2013). The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153:193-205.

Zhang Q, Liang Z, Cui X, Ji C, Li Y, Zhang P, et al. (2018). N6-methyladenine DNA methylation in japonica and indica rice genomes and its association with gene expression, plant development, and stress responses. *Mol. Plant* 11:1492-1508.

Zhang Y, He X, Zhao H, Xu W, Deng H, Wang H, Wang S, Su D, Zheng Z, Yang B, Grierson D, Wu J, Liu W. (2020). Genome-Wide Identification of DNA Methylases and Demethylases in Kiwifruit (*Actinidia chinensis*). *Frontiers in Plant Science*, 11:1-11.

Zhu C, Zhang S, Zhou C, Chen L, Fu H, Li X, Lin Y, Lai Z and Guo Y (2020). Genome-wide investigation and transcriptional analysis of cytosine-5 DNA methyltransferase and DNA demethylase gene families in tea plant (*Camellia sinensis*) under abiotic stress and withering processing. *PeerJ* 2020:e8432.

Zhu JK (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 43:143-166

Zhu, Q. H., Shan, W. X., Ayliffe, M., and Wang, M. B. (2015). Epigenetic mechanisms: an emerging player in plant–microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29, 187–196.

4 ARTIGO II

Artigo a ser submetido à revista

Genes

Fator de Impacto: 4.096

<https://www.mdpi.com/journal/genes>

Metiltransferases e demetilases de histonas em feijão-caupi: identificação genômica e transcriptômica sob condições estressantes

Jéssica Barbara Vieira Viana¹, José Ribamar Costa Ferreira-Neto¹, Roberta Lane de Oliveira-Silva², Ana Maria Benko-Iseppon^{1,*}

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

²Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brazil.

*Corresponding Author. Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; Tel: +55-81-2126-8569; Fax: +55-81-2126-8522; E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br (A.M. Benko-Iseppon)

Resumo: Processos de metilação/demetilação de histonas são reconhecidamente atuantes na regulação da resposta transcricional de vegetais sob condições adversas. Esses processos são controlados dinamicamente pela atividade das metiltransferases (SDGs) e demetilases (JMJs) de histonas. O presente estudo propôs realizar, pioneiramente, a caracterização da diversidade estrutural das enzimas SDGs e JMJs no genoma de *V. unguiculata* (feijão-caupi), bem como analisar os padrões de expressão frente a estresses abiótico (desidratação radicular) e bióticos (injúria mecânica seguida de inoculação de CAMBV ou CPSMV). Foram caracterizados 47 genes SDGs e 26 JMJs no genoma do feijão-caupi. Análises dos mecanismos de expansão dos genes VuSDGs e VuJMJs indicaram prevalência de mecanismos de duplicação dispersa e WGD/segmental. As razões Ka/Ks mostraram que todos os eventos de duplicação WGD/segmental dos genes VuSDGs e VuJMJs estão sob seleção purificadora. Um alto índice de conservação gênica dessas enzimas foi encontrado nos membros de diferentes famílias de Viridiplantae, com destaque para as leguminosas. Os elementos cis-regulatórios identificados nos promotores de VuSDGs e VuJMJs foram associados a fatores de transcrição (TFs) Dof-type e bZIP. Tais TFs estão relacionados a resposta vegetal a estresses bióticos e abióticos. Por fim, constatou-se que VuSDGs e VuJMJs exibiram expressão diferencial sob diferentes estresses, sendo observado um maior número de transcritos induzidos no ensaio de desidratação radicular. Em relação aos ensaios de injúria mecânica e inoculação viral, os transcritos VuSDGs e VuJMJs foram induzidos apenas no tratamento de 60 minutos após a inoculação viral em ambos os ensaios analisados. Esses resultados fornecem informações valiosas acerca do papel de VuSDGs e VuJMJs em potenciais processos fisiológicos de feijão-caupi, apresentando-se como alvos biotecnológicos a serem explorados em futuras pesquisas experimentais na referida espécie e em outras leguminosas economicamente importantes.

Palavras-chave: metilação de histonas, demetilação de histonas, seca, viroses.

1. Introdução

Em eucariotos, o DNA está associado a proteínas denominadas histonas. Inicialmente, a função predita desse grupo proteico estava relacionada somente à compactação do material genético [1]. Com o desenvolvimento de novas pesquisas, foi constatado que essas proteínas não eram inertes, sendo substratos de modificações químicas pós-traducionais. Tais modificações ocorrem em resíduos específicos de aminoácidos situados na cauda N-terminal desse grupo proteico, o que resulta na alteração de sua interação com o DNA. Tal alteração origina estados de acessibilidade mais/menos permissivos à maquinaria transcricional (fatores de transcrição) em relação a uma determinada região promotora de um gene-alvo. São catalogados uma série de modificações pós-traducionais em histonas (revisado por [2]). Dentre essas, a metilação de histonas é uma das categorias de maior destaque em plantas, exercendo um influente papel epigenético na regulação da expressão gênica durante processos desenvolvimentais e de resposta a estresses.

A metilação de histonas em vegetais consiste na adição - catalisada por enzimas HKMTases (metiltransferases de histonas) - de até três grupos metil a resíduos específicos de lisina (K), sendo eles: K4, K9, K27, K36 e K79, situados na histona H3; e K20, da histona H4 [3,4]. As HKMTases, também conhecidas como proteínas SET

DOMAIN GROUP (SDG), possuem o domínio SET, evolutivamente conservado, como módulo catalítico [5]. Essas enzimas podem causar efeitos ativadores, bem como repressores, na expressão gênica. Tal influência está associada ao número de grupos metil adicionados, bem como ao(s) aminoácido(s) que ancora(m) a modificação química [6]. Por exemplo, a adição de um grupo metil (me) aos resíduos K4 e K36 da histona H3 (H3K4me e H3K36me, respectivamente) está associada à ativação gênica; enquanto que H3K9me, H3K27me e H4K20me estão relacionadas à repressão [7,4].

Em vegetais, as SDG podem ser categorizadas em sete classes distintas, nomeadas com base nas metiltransferases de histonas [Suppressor of variegation [Su(var)] 3-9, Enhancer of zeste [E(z)] e Trithorax (Trx)] identificadas em *Drosophila*: a) classe I, homólogos de [E(z)] (H3K27); b) classe II, homólogos de Ash1 (H3K36); c) classe III, homólogos de Trx e proteínas relacionadas (H3K4); d) classe IV, proteínas com um domínio SET e um domínio PHD (homeodomínio de planta); e) classe V, proteínas homólogas e relacionadas à Su(var) (H3K9); f) classe VI, proteínas com um domínio SET interrompido; e g) classe VII, metiltransferase Ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase [Rubisco (RBCMT)] [5].

O nível de metilação de histonas nas plantas é dinâmico, uma vez que o grupo metil pode ser removido dos resíduos de lisina através da demetilação de histonas [8]. Esse processo consiste em reações catalisadas por um grupo de enzimas demetilases de histonas, que contêm o domínio JmjC (denominadas de proteínas JMJ). Tais enzimas atuam por meio de reações de hidroxilação dependentes de íons de ferro [Fe (II)] e α -cetoglutarato (α -KG) [9,10]. Em *Arabidopsis thaliana*, as proteínas JMJ são classificadas em cinco categorias com base na similaridade de sequência e especificidade catalítica, sendo: a) KDM4, representada pelas subclasses PKDM8 e PKDM9 (H3K9me_{2/3} e H3K36me_{2/3}); b) KDM5 (H3K4me_{1/2/3}); c) JMJD6 (H3K27me_{2/3}); d) KDM3 (H3K9me₁ e H3K9me₂); e e) enzimas apenas com o domínio JmjC (H3K27me₃), representada pelas subclasses PKDM11/12/13 [11,12,13,14,].

Estudos têm demonstrado o papel das proteínas SDGs e JMJs na regulação de diferentes processos biológicos vegetais. Tais processos incluem respostas a: seca [15], frio [16], alta temperatura [17], salinidade [18] e ataque de patógenos [19]. A identificação genômica e análise funcional dos genes codificantes de SDGs e JMJ compreende uma abordagem recente. Tais grupos proteicos têm sido analisados em diversas espécies vegetais, incluindo *A. thaliana* [5], nabo [20], arroz [21], tomate [22], milho [23,17], laranja [24], soja [25], maçã [26], algodão [27,28], trigo [29], dentre outros.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.), leguminosa amplamente cultivada na África e no Brasil, apresenta relevância socioeconômica, sendo uma importante fonte de proteínas, sais minerais e carboidratos para populações de baixa renda [30,31]. Além disso, essa espécie apresenta acessos tolerantes à seca e a temperaturas elevadas, o que permite seu amplo cultivo em regiões semiáridas e não irrigadas [31]. Apesar da sua reconhecida importância, estudos envolvendo a caracterização estrutural e funcional das proteínas SDGs e JMJs em *V. unguiculata* é inexistente. Com a disponibilidade recente do genoma de referência dessa leguminosa [32], tal espécie foi lançada à era das ômicas. Adicionalmente, o Cowpea Genomics Consortium (CpG), gerenciado pelo nosso grupo de pesquisa, dispõe de dados transcriptômicos para cultivares tolerantes/resistentes do feijão-caupi submetidos a condições de desidratação radicular e a estresses múltiplos [injúria mecânica seguida de inoculação viral de CABMV (vírus do mosaico transmitido pelo afídeo do feijão-caupi) ou CPSMV (vírus do mosaico severo do feijão-caupi)]. Dessa forma, a associação de dados ômicos (genômica e

transcriptômica) torna-se uma rica e importante plataforma de análise de SDGs e JMJs em feijão-caupi.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou a caracterização genômica e transcriptômica das famílias gênicas de SDGs (VuSDGs) e JMJs (VuJMJs) em feijão-caupi. Os resultados gerados pelo nosso trabalho fornecem uma abordagem detalhada acerca das SDGs e JMJs, além de estabelecer bases para futuras explorações experimentais desses grupos proteicos na referida leguminosa que, recentemente vem despontando no cenário das ômicas.

2. Material e Métodos

2.1 Genômica

2.1.1 Identificação e mineração de loci codificadores de VuSDGs e VuJMJs

Sequências previamente caracterizadas contendo o domínio SET (PF00856) e JmC (PF02373) para, respectivamente, as famílias metiltransferases e demetilases de histonas, foram recuperadas dos bancos de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Essas sequências, pertencentes às espécies *A. thaliana*, *Oryza sativa* L., *Zea mays* L., *Medicago truncatula* L., dentre outras, foram utilizadas na identificação de VuSDGs e VuJMJs no genoma do feijão-caupi (**Material S1 e S2**). Para isso, foram realizados alinhamentos contra o proteoma putativo de feijão-caupi (Vunguiculata_469_v1.1.protein_primaryTranscriptOnly.fa; banco de dados Phytozome V12), utilizando-se a ferramenta BLASTp (e-value < e^{-10}). Foi usada apenas a sequência de peptídeo mais longo (transcrito primário), para cada gene do feijão-caupi. Os identificadores das proteínas recuperadas estão associados ao seu respectivo locus.

Para a confirmação da presença dos domínios conservados nos genes VuSDGs e VuJMJs candidatos, os bancos de dados Pfam (pfam.xfam.org/), Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>), bem como a ferramenta SMART (smart.embl-heidelberg.de/), foram utilizados. A mesma metodologia acima relatada foi empregada para identificar os VuSDGs e VuJMJs nas bibliotecas RNA-Seq do CpG, utilizando-se a ferramenta tBLASTn (e-value < e^{-5}). Para mineração nos transcriptomas analisados, também foram utilizadas sequências proteicas das VuSDGs e VuJMJs identificadas e caracterizadas no genoma de *V. unguiculata*.

2.1.2 Classificação dos genes VuSDGs e VuJMJs e identificação de resíduos conservados em VuSDGs e VuJMJs

Os genes VuSDGs e VuJMJs identificados foram classificados com base em duas estratégias distintas:

- a) identificação de domínios característicos das respectivas classes das famílias gênicas analisadas;
- b) análise fenética utilizando sequências proteicas curadas de outras espécies, contendo os domínios característicos de SDGs e JMJs. Essas sequências foram alinhadas com as VuSDGs e VuJMJs candidatas, utilizando ClustalW [33]. A árvore fenética foi obtida pelo método Neighbour Joining (NJ) [34], através do software MEGA 7, com bootstrap de 1000 repetições [34]. De acordo com a topologia da árvore fenética, as VuSDGs e VuJMJs foram classificadas a partir de classificações previamente estabelecidas em *A. thaliana* e *O. sativa*.

Os genes candidatos VuSDGs e VuJMJs que atenderam aos dois critérios de classificação descritos em 'a' e 'b' foram considerados como *bona-fide* VuSDGs e

VuJMJs. Já os genes que apresentaram divergência entre as classificações foram classificados como ‘desconhecidos’ (UNK) e retirados das análises posteriores.

Para identificar os resíduos de aminoácidos conservados nos domínios SET e JmjC das proteínas VuSDGs e VuJMJs, respectivamente, um segundo alinhamento foi realizado via ClustalW, utilizando somente a sequência dos respectivos domínios catalíticos das proteínas analisadas, bem como de *A. thaliana*. Tal alinhamento foi visualizado através da ferramenta Jalview 2 [36].

2.1.3 Características dos genes VuSDGs e VuJMJs

Para a caracterização dos genes VuSDGs e VuJMJs, o Genestats *script* (<https://gist.github.com/darencard/fcb32168c243b92734e85c5f8b59a1c3>), foi utilizado, analisando os seguintes parâmetros: (1) comprimento da sequência transcrita; (2) número de éxons; (3) comprimento total da sequência dos éxons; (4) número de íntrons; (5) comprimento total da sequência dos íntrons; (6) número de CDS; (7) comprimento total da sequência CDS; (8) número de sequências 5' UTR; (9) comprimento total da sequência 5' UTR; (10) número de sequências 3' UTR e; (11) comprimento total da sequência 3' UTR. O número de domínios das famílias analisadas foi anotado de acordo com a identificação realizada pelos bancos de dados Pfam e Conserved Domain Database, bem como pela ferramenta SMART (item 2.1.1).

As características estruturais dos VuSDGs e VuJMJs foram graficamente representadas pelo site *Gene Structure Display Server* (GSDS 2.0) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) [37].

2.1.4 Propriedades proteicas e predição da localização subcelular

O peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI) para todas as proteínas VuSDGs e VuJMJs codificadas no genoma do feijão-caupi [32] foram preditos usando a ferramenta online JVir Gel [38]. A localização subcelular das VuSDGs e VuJMJs foram determinadas mediante ferramenta CELLO [39].

2.1.5 Mecanismos de expansão dos genes VuSDGs e VuJMJs

Os mecanismos de duplicação associados à expansão das famílias gênicas aqui analisadas foram determinados via software MCSanX [40]. Os seguintes mecanismos foram categorizados: duplicação dispersa, em tandem, proximal, segmental (ou WGD/segmental). Genes que não apresentaram cópias duplicadas foram categorizados como singletons.

2.1.6 Taxas de substituições sinônimas (Ks) e não-sinônimas (Ka) para genes com origem de duplicação WGD/segmental

A pressão de seleção entre os eventos de duplicação WGD/segmental foi determinada pela razão Ka/Ks. O software ClustalW 2.0 [33] foi utilizado para alinhar as sequências completas de genes codificadores de VuSDGs ou VuJMJs com duplicação WGD/segmental. Em seguida, as taxas de Ka e Ks foram calculadas com base na tabela do código genético via método Nei – Gojobori (modelo Jukes-Cantor) implementado no MEGA 7 [35].

A razão Ka/Ks é um indicador da pressão de seleção em genes ou regiões gênicas. Se o valor for inferior a '1', os pares de genes duplicados podem estar submetidos à seleção purificadora (também chamada de seleção negativa; resulta na conservação da

sequência de aminoácidos). Se a razão Ka/Ks for igual a '1', significa que a seleção é neutra (ausência de seleção). Adicionalmente, se essa razão for maior que '1', significa que a seleção é positiva (o que leva ao surgimento de diferentes peptídeos).

2.1.7 Ortologia dos loci de VuSDGs e VuJMJs em diferentes espécies de Viridiplantae

Para a identificação da ortologia, foram utilizadas informações disponíveis na base de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Na seção PhytoMine (interface InterMine alocada na base de dados Phytozome), foi criada uma query, em forma de lista, com as identidades dos genes analisados em relação a 93 genomas montados e anotados para 82 espécies de Viridiplantae. O resultado foi gerado pelo software InParanoid [41].

2.1.8 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos

Sequências de regiões promotoras (1.0 kb) de genes codificadores de VuSDGs e VuJMJs foram obtidas no banco de dados Phytozome v.12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), via API (Application Programming Interface).

Os motivos (elementos cis-regulatórios candidatos, ou CCREs) em cada promotor foram minerados via software MEME v5.0.3 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) [42]. Para essa mineração dos CCREs, o modo clássico foi utilizado. Para cada motivo identificado, há um e-value correspondente. No presente trabalho, o e-value $< 10^{-2}$ foi usado como ponto de corte para a caracterização de *bona fide* CCREs. O número máximo de motivos analisados foi 10, contendo entre seis a 50 nucleotídeos de extensão.

Para designar um determinado fator de transcrição (TF) aos *bona fide* CCREs minerados, o software TomTom v4.11.2 (<http://meme-suite.org/tools/tomtom>) [43], acoplado ao banco de dados JASPAR (file: JASPAR2018_CORE_plants_non-redundant), foi usado. Tal banco de dados apresenta informações sobre perfis de ligação de fatores de transcrição a CCREs experimentalmente validados. O software TomTom alinha os CCREs identificados pelo software MEME contra CCREs anotados da base de dados JASPAR. Os alinhamentos foram avaliados por meio dos critérios estatísticos p-value (cut-off $< 10^{-2}$) e q-value (false discovery rate, FDR cut-off $< 10^{-2}$). As identidades dos TFs associadas aos *bona fide* CCREs foram relacionadas ao melhor alinhamento obtido (best-hit).

2.2 Transcriptômica

2.2.1 Material biológico, desenho experimental e aplicação do estresse

2.2.1.1 Ensaio de desidratação radicular

Sementes de *V. unguiculata* cv. Pingo de Ouro (tolerante ao déficit hídrico e à seca) [44,45] foram tratadas com Thiram (*tetramethylthiuram disulfide*) a 0,05% (w/w) e germinadas durante dois dias, sob condições controladas de temperatura ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) e de umidade relativa ($65\% \pm 5\%$). Após isso, as mudas foram transferidas para um sistema hidropônico [46], contendo solução nutritiva aerada e balanceada com pH 6,6 [47]. As plântulas foram colocadas em suportes, de modo que as raízes das mudas ficassem completamente imersas na solução hidropônica. As plântulas foram cultivadas por três semanas (estágio de desenvolvimento V3) em casa de vegetação, sob fotoperíodo natural de aproximadamente 13/11 h de ciclo claro/escuro, temperatura de $30 \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $60 \pm 10\%$ de umidade relativa. Após esse período, o tratamento de

desidratação da raiz foi iniciado, retirando-se a solução nutritiva das plantas tratadas. As raízes foram coletadas após 25 min (RD25), 75 min (RD75) e 150 min (RD150) após a remoção da solução. O tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C, até extração do RNA. Cada acesso submetido ao tratamento continha seu respectivo controle negativo (Cont.25 'e Cont.150'), o qual foi mantido em solução nutritiva e posteriormente coletado. Foi realizado delineamento experimental fatorial (cultivar vs extensão do período de desidratação da raiz) com três RBs por condição analisada. Cada réplica biológica (RB) foi composta por dois indivíduos.

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

As sementes do genótipo 'Pingo de Ouro' do feijão-caupi (ID: Pingo_de_Ouro_1_2) foram formalmente obtidas do 'Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-caupi' do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife - Pernambuco - Brasil). O Prof. Dr. Antônio Félix da Costa (IPA) foi o responsável por identificar a espécie/genótipo.

2.2.1.2 Ensaio de injúria mecânica e inoculação viral

O experimento envolveu injúria mecânica seguida de inoculação com os vírus CABMV (Cowpea aphid-borne mosaic virus) ou CPSMV (Cowpea severe mosaic virus), em condições controladas, em casa de vegetação no IPA. Para o ensaio com CABMV, foi utilizado o genótipo resistente IT85F-2687 [48,49]. Já para o ensaio com CPSMV, foi utilizado o genótipo resistente BR-14 Mulato [50]. O procedimento experimental para ambos os ensaios foi conduzido isoladamente, utilizando os mesmos processos e desenho experimental. Os acessos foram semeados e cultivados por 21 dias (estágio de desenvolvimento V3), sob fotoperíodo natural e temperatura variando entre 28 a 32 °C. Para a inoculação viral, as folhas componentes dos trifólios mais jovens foram previamente submetidas à injúria mecânica com carborundum (carbeto de silício), o que permitiu a penetração do vírus no interior do vegetal. Posteriormente, foi aplicado o inóculo viral nos respectivos genótipos. Cada tratamento continha seu respectivo controle negativo (sem injúria mecânica e sem inóculo viral). As coletas foram realizadas em dois tempos distintos após o tratamento injúria mecânica | inoculação viral: 60 minutos e 16 horas. Ao final de cada tempo, os tecidos foliares dos tratamentos e respectivos controles foram, imediatamente, coletados e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenados a -80 °C, até extração do RNA total. O desenho experimental executado foi do tipo fatorial (cultivar vs extensão do período de inoculação), com três RBs por condição analisada, sendo cada RB composta por cinco plantas. Cada tratamento foi realizado em área isolada, a fim de evitar o impacto dos compostos voláteis utilizados para comunicação entre as plantas. As sementes dos genótipos 'IT85F-2687' e 'BR-14 Mulato' do feijão-caupi foram formalmente obtidas do 'Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-caupi' do IPA. O Prof. Dr. Antônio Félix da Costa (IPA) foi o responsável por identificar a espécie/genótipo.

A expressão gênica diferencial dos dois ensaios apresentados neste item ocorreu em resposta a uma combinação de dois estresses: injúria mecânica e inoculação viral. Os vírus de plantas são incapazes de iniciar um processo infeccioso sem auxílio de uma injúria mecânica inicial, seja oriunda de um organismo vetor ou oriunda de práticas agrícolas, por exemplo. Segundo [51] os vírus que infectam vegetais não possuem receptores celulares específicos, diferentemente dos bacteriófagos e de vírus que infectam animais. Assim, o conjunto 'injúria mecânica e inoculação viral' visa simular o processo infeccioso em um ambiente natural.

2.2.2 Bibliotecas de RNA-Seq: síntese e sequenciamento

O RNA total foi isolado utilizando o kit ‘SV Total RNA Isolation System’ (Promega, US), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do mesmo foram avaliadas por meio NanoDrop, gel de Agarose (1,5%) e pelo ‘Agilent 2100 Bioanalyzer’ (Agilent Technologies, EUA). Apenas as amostras de RNA com integridade (RIN) $\geq 8,0$ foram sequenciadas. O kit ‘RNAm TruSeq® Stranded LT-Set A’ (RS-122-2101) (Illumina, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para purificação do RNA mensageiro (mRNA) e para a construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA), de acordo com as instruções do fabricante. *Reads paired-end*, com extensão de 100 pb, foram geradas via sistema Illumina HiSeq 2500, empregando-se os seguintes kits: ‘HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2’ (PE-402-4002); ‘SBS Kit v2’ (200 Cycle; FC-402-4021); e ‘TruSeq® Stranded mRNA LT - Set A’ (RS-122-2101). O sequenciamento dos transcriptomas dos três genótipos de feijão-caupi foi realizado no Centro de Genômica Funcional da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

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

A montagem das bibliotecas de RNA-Seq sequenciadas para os diferentes ensaios seguiu o pipeline adotado por [52]. Para análise de expressão diferencial, também, executada via pipeline anteriormente mencionado [52], adotou-se o seguinte critério: $-\log_2FC > 1$, $p < 0.05$, and $FDR < 0.05$.

2.2.4 qPCR: setup, análises de eficiência e expressão relativa

Para avaliar, adicionalmente, a precisão dos dados de RNA-Seq, transcritos VuSDGs e VuJMJs diferencialmente expressos, foram selecionados para análise via qPCR. Três repetições biológicas e três técnicas foram usadas por amostra analisada, visando garantir a confiabilidade estatística do processo. Os pares de primers foram desenhados usando-se o software online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), com os seguintes parâmetros: temperatura de anelamento de 57 - 63 ° C (ótimo de 60°C), extensão do primer de 18 - 22 pb (ótimo de 20 pb), conteúdo de GC de 45-55% (ótimo de 50%) e extensão do amplicon de 100 - 200 pb. Com base nesses critérios, foi possível desenhar 15 pares de oligonucleotídeos iniciadores, sendo sete referente a transcritos VuSDGs e oito transcritos VuJMJs (**Tabela S1**). As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços e termociclador LineGene 9660 (Bioer), utilizando o método de SYBR Green de detecção.

Alíquotas da mesma amostra de RNA total enviada para sequenciamento das bibliotecas de RNA-Seq foram empregadas nesta etapa. A possível contaminação com DNA genômico (gDNA) foi eliminada por digestão com 'DNase I livre de RNase'. A concentração e a qualidade do RNA foram avaliadas, respectivamente, utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific) e eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) corado com Blue Green (LGC, São Paulo, Brasil), respectivamente. Para cada amostra estudada, o RNA total (1 µg) foi transcrito de forma reversa, gerando cDNA, usando-se o kit ‘GoScript™ Reverse Transcription System’ (Promega), com iniciadores oligo (dT) e seguindo as recomendações do fabricante. Configuração de qPCR, ciclagem de PCR, ensaio de eficiência de amplificação e análise de curva de melting foram realizados de acordo com [53].

A eficiência de amplificação ($E = 10^{(-1/\text{slope of the standard curve})}$), para todos os pares de oligonucleotídeos iniciadores implementados, foi determinada a partir de uma curva

padrão de quatro pontos gerada por diluições seriadas (10 x cada) de cDNA, em triplicatas técnicas. As inclinações da reta da curva padrão no intervalo de -3,58 a -3,10 foram consideradas aceitáveis para o ensaio. Esses valores de inclinação de reta estão correlacionados com eficiências de amplificação entre 90 % ($E = 1.9$) e 110 % ($E = 2.1$).

Os genes “Actina”, “Enzima Conjugadora de Ubiquitina E2 Variante 1D” foram selecionados como genes de referência para normalização dos dados de desidratação radicular de qPCR. Esses genes foram indicados a partir de testes realizados por [53] para a mesma cultivar, tecido e condição. “F-box protein” e “Ubiquitina 10” foram selecionados como genes de referência para normalização dos dados de injúria mecânica seguida de inoculação viral de qPCR. Esses genes foram selecionados a partir de testes realizados pelo grupo (dados não publicados) para as mesmas cultivares, tecidos e condições.

O software Rest2009 (modo standard) foi usado para análise de expressão relativa dos transcritos alvos analisados. Tal software baseia seu desempenho em comparações pareadas (do transcrito alvo e genes de referência nas condições tratadas e controles), usando técnicas de randomização e bootstrapping - Pair-wise Fixed Reallocation Randomization Test© (REST, 2009) [54]. Utilizou-se teste de hipótese ($p < 0,05$) para determinar se as diferenças na expressão dos transcritos alvos nas condições controle e tratadas foram significativas.

3. Resultados

3.1 Genômica

3.1.1 Identificação e classificação de VuSDGs e VuJMJs no genoma do feijão-caupi

Quarenta e sete genes codificadores de metiltransferases de histonas (denominados VuSDGs) foram identificados no genoma do feijão-caupi. Todos os VuSDGs incluíram o domínio catalítico SET (PF00856). Com base na identificação de domínios específicos (AWS, WIYLD, Pré-SET, PHD, PWWP, FYRC, FYRN, Pós-SET, Zf-CW, CXC, SANT) e seguindo a classificação de *A. thaliana* (Ng et al., 2007), os 47 VuSDGs foram classificados em sete classes distintas: I – II – III – IV – V – VI – VII (**Tabela S2**). As classes V e VII foram as mais abundantes no genoma do feijão-caupi, com 11 e 10 genes, respectivamente.

As informações específicas para os 47 VuSDGs, incluindo seus IDs, classificação, extensão em nucleotídeos, extensão da cadeia polipeptídica, bem como pontos isoelétricos (pI), peso molecular (MW) e localização subcelular estão apresentadas na **Tabela S3**. As 47 proteínas VuSDGs apresentaram diversidade estrutural entre si. Os seus respectivos tamanhos variaram de 310 a 2387 aminoácidos. Os pIs das VuSDGs variaram de 4,34 a 9,28, com MWs variando de 34,59 a 169,07 KDa. Quanto à localização subcelular, foi possível identificar a distribuição das VuSDGs em seis compartimentos celulares distintos: cloroplasto (uma VuSDGs), mitocôndria (uma), extracelular (duas), membrana plasmática (três), citoplasma (quatro) e núcleo (36) (**Tabela S3**).

Além do quantitativo exposto para VuSDGs, foi possível identificar 26 genes codificadores de demetilases de histonas. Tais genes foram descritos como VuJMJs e nomeados com base nas suas respectivas classes (Jmj-only, KDM3-5, PKDM8-9 e JMDJ6). A classificação de todos os VuJMJs foi baseada na identificação de domínios específicos (JmjN, Zf-C5HC2, JmjC, FYRC e FYRN), sendo a classe KDM3 a mais abundante no genoma do feijão-caupi, com nove genes. Já a classe JMDJ6, foi a menos representada, com apenas dois genes (**Tabela S4**). Todas as proteínas VuJMJs

compartilharam um domínio catalítico JmjC (PF02373). Já o domínio JmjN foi identificado em 11 das 26 VuJMJs, sendo observado em todos os membros das classes KDM5, PKDM8 e PKDM9. Um domínio de dedo de zinco, zf-C5HC2, foi identificado em todos os membros da classe PKDM8 e na maioria dos membros de KDM5. Os membros da classe Jmj-only apresentaram apenas um domínio JmjC em sua estrutura proteica. Além desses domínios, FYRN e FYRC foram identificados na maioria dos membros da classe KDM5. Todos os domínios identificados nas VuJMJs, bem como sua classificação, estão detalhadamente descritos na **Tabela S4**.

As 26 proteínas VuJMJs apresentaram de 413 a 1832 resíduos de aminoácidos. Os pIs variaram de 4,93 a 8,9, enquanto os MWs variaram de 46,05 a 179,1 KDa. Assim como VuSDGs, as VuJMJs estão distribuídas em sua maioria no núcleo (19). Já as demais VuJMJs tiveram endereçamento celular para cloroplasto (uma), mitocôndria (uma), membrana plasmática (uma) e citoplasma (quatro) (**Tabela S5**).

De acordo com a análise fenética - incluindo as sequências proteicas das VuSDGs e de *A. thaliana* (AtSDGs), bem como de *Oryza sativa* (OsSDGs) - os membros de VuSDGs foram agrupados em 10 grupos distintos correspondentes às sete classes de metiltransferases de histonas (**Figura 1A**). Essas classes foram designadas em números romanos de I a VII. A classe III foi dividida em dois grupos, sendo um identificado com uma sequência de VuSDGs (VuSDGIII.6) e um homólogo de OsSDGs. O grupo correspondente à classe III foi formado, por sua vez, a partir de sequências AtSDGs e OsSDGs, bem como os membros VuSDGs identificados anteriormente. Já a classe VI foi dividida em três grupos distintos, sendo dois formados apenas por membros OsSDGs e VuSDGs. Assim, foi possível validar a classificação dos membros VuSDGs previamente realizada a partir da identificação de domínios específicos. O gene VuSDGIII.5 foi identificado juntamente com homólogos OsSGDs e AtSDG da classe IV. Contudo, na caracterização de domínios, esse gene foi previamente identificado como membro da classe III. Por apresentar domínios específicos da classe III, nós classificamos o gene VuSDGIII.5 como membro dessa classe (**Figura 1A**).

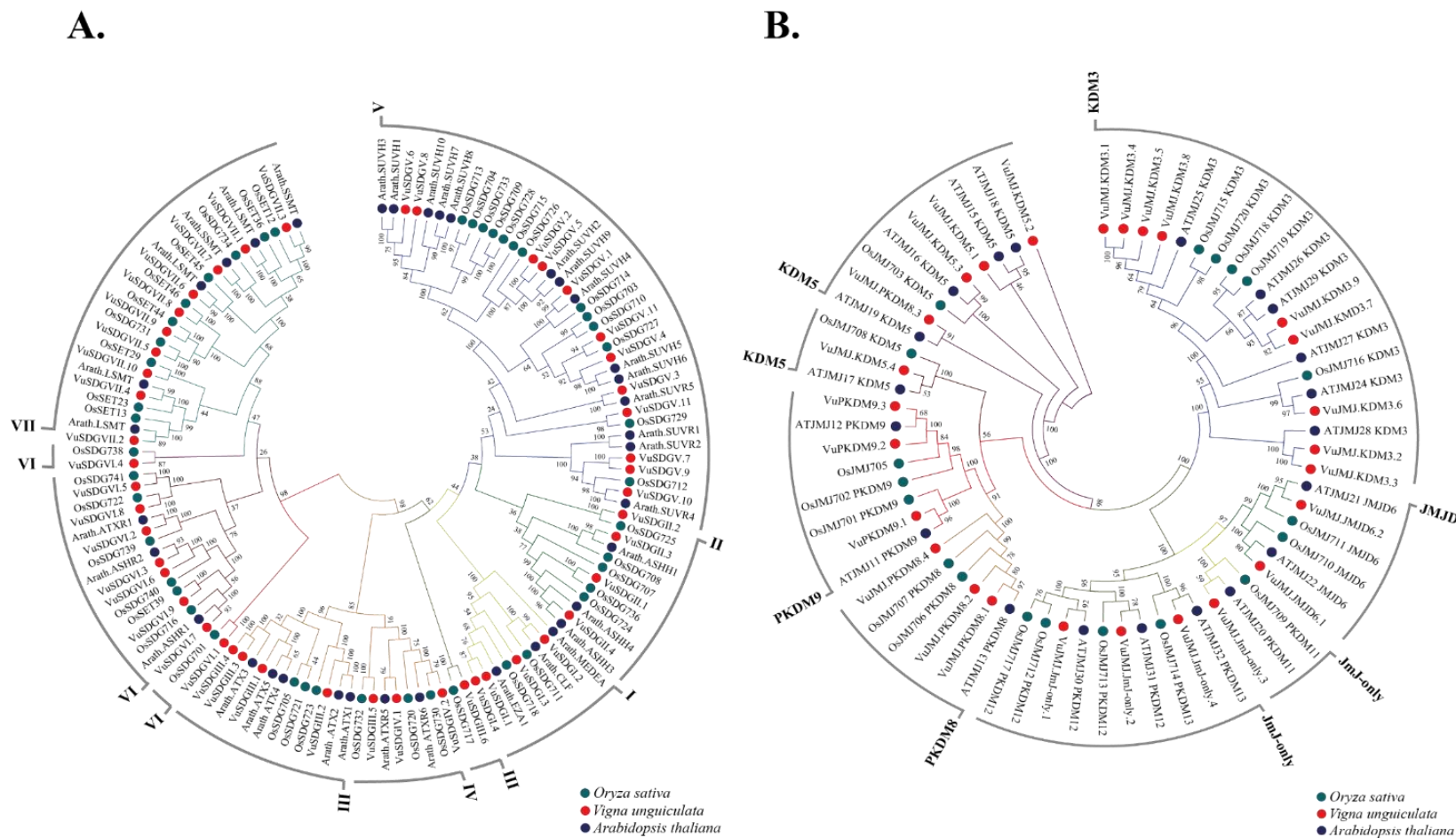


Figura 1. Árvores fenéticas - obtidas a partir do método de Neighbor-Joining - geradas a partir das sequências das proteínas SDGs (A) e JMJs (B) de *Arabidopsis thaliana* (AtSDGs/ AtJMJs, círculos azuis), *Oryza sativa* (OsSDGs/OsJMJs, círculos verdes) e *Vigna unguiculata* (VuSDGs/VuJMJs, círculos vermelhos). Cada classe das referidas proteínas está destacada em ramos com cores diferentes. Números romanos laterais em ‘A’ representam diferentes classes de SDGs. Letras e números laterais em ‘B’ representam diferentes classes de JMJs. Números na base dos nós representam valores de bootstrap (1000 repetições).

A análise fenética para as demetilases de histonas, incluindo as sequências das proteínas VuJMJs e de *A. thaliana* (AtJMJs), bem como de *O. sativa* (OsJMJs), permitiu classificar os membros VuJMJs em oito grupos abrangedores de cinco classes de demetilases de histonas (**Figura 1B**). Essas classes foram designadas como: Jmj-only (correspondente às classes PKDM11-12-13 em *A. thaliana* e *O. sativa*); KDM3; JMJD6; KDM5; PKDM8; e PKDM9. A classe Jmj-only, com membros que apresentam apenas o domínio JmjC, encontra-se subdivida em PKDM11, PKDM12 e PKDM13 em *A. thaliana* e *O. sativa*. Essa classe Jmj-only foi dividida em dois grupos na árvore fenética. Um grupo foi formado pelo membro VuJMJ_Jmj-only.4, em conjunto com homólogos de AtJMJ e OsJMJ da classe PKDM11. Já o segundo grupo foi formado pelos membros VuJMJ_Jmj-only.2, VuJMJ_Jmj-only.3 e VuJMJ_Jmj-only.5, bem como membros AtJMJ e OsJMJ pertencentes às classes PKDM12 e PKDM13. A classe KDM5 também foi dividida em dois grupos, ambos formados por membros VuJMJ. Assim, foi possível confirmar a classificação dos membros VuJMJs previamente realizada a partir da identificação de domínios específicos. O gene VuJMJ_PKDM8.3 foi identificado juntamente com homólogos OsSGDs e AtSDG da classe KDM5. Contudo, na caracterização de domínios, esse gene foi anteriormente classificado como membro da classe PKDM8. Por apresentar domínios específicos da classe PKDM8, classificamos o gene VuJMJ_PKDM8.3 como membro dessa classe (**Figura 1B**).

Os 47 VuSDGs foram ancorados em todos os 11 cromossomos do feijão-caupi, distribuídos de maneira heterogênea (**Tabela S6; Figura 2**). Alguns loci foram ancorados nas regiões terminais dos cromossomos 2, 3, 4, 6 e 7, como VuSDGV.5, VuSDGVII.2, VuSDGII.4, VuSDGVII.3 e VuSDGVII.6, respectivamente. Além disso, dois loci foram ancorados na região pericentromérica dos cromossomos 4 e 7 (VuSDGVII.7 e VuSDGV.7, respectivamente). Já os 26 VuJMJs foram ancorados em oito dos 11 cromossomos do feijão-caupi, não sendo observados nos cromossomos 4, 5 e 8 (**Tabela S7; Figura 2**). Todos os VuJMJs encontraram-se desigualmente distribuídos ao longo dos cromossomos de *V. unguiculata*. Quatro loci (VuJMJ_KDM3.8, VuJMJ_KDM3.7, VuJMJ_KDM3.4 e VuJMJ_KDM3.1) foram ancorados nas regiões terminais dos cromossomos 3 e 7. Além disso, o locus VuJMJ_PKDM9.4 foi ancorado na região pericentromérica do cromossomo 9.

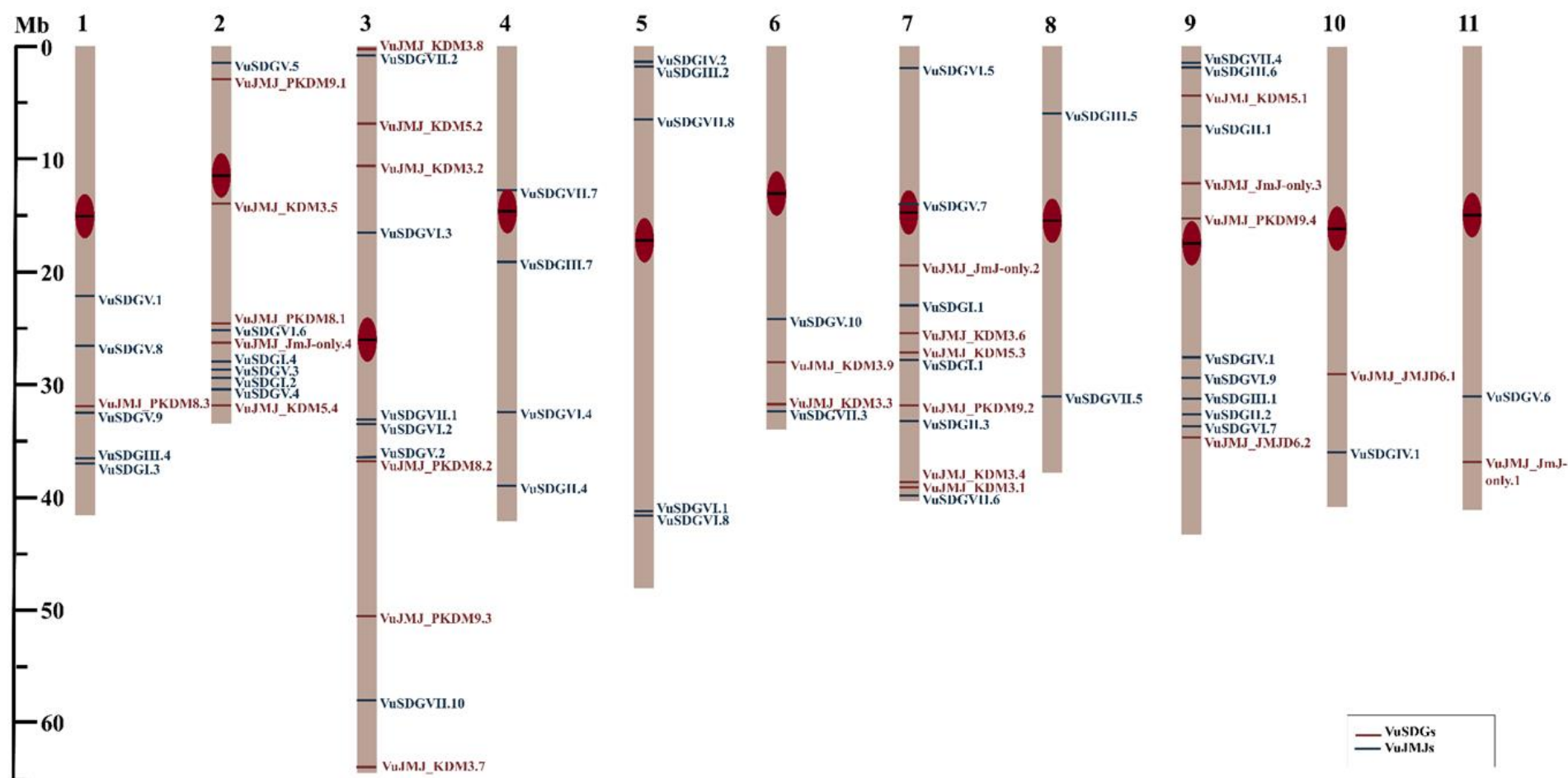


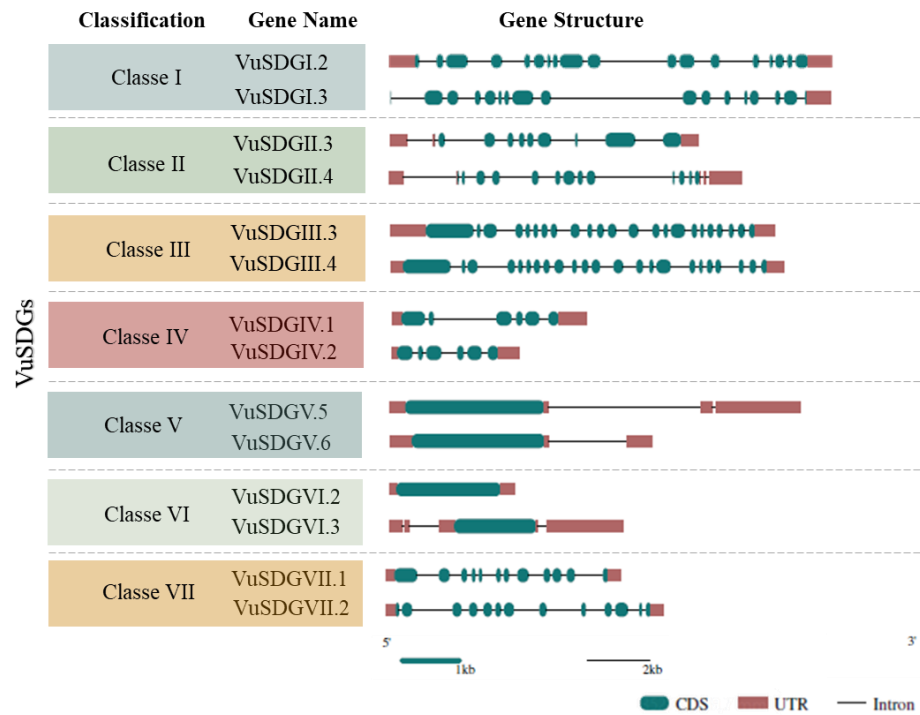
Figura 2. Distribuição cromossômica dos loci VuSDGs e VuJMJs no genoma do feijão-caupi. As posições dos genes em questão estão indicadas ao longo dos cromossomos, em traços e nomes em vermelho (VuSDGs) e em azul (VuJMJs). Os centrômeros dos 11 cromossomos de *V. unguiculata* estão representados por círculos em vermelho escuro. O tamanho de cada cromossomo está de acordo com a escala lateral esquerda, em Mb.

3.1.2 Estrutura dos genes VuSDGs e VuJMJs

Para a compreensão das características estruturais dos genes VuSDGs e VuJMJs, 12 parâmetros foram analisados (**Tabela S8-9**). As estruturas gênicas (íntrons, CDS e regiões UTR) dos 47 VuSDGs e 26 VuJMJs estão representadas esquematicamente na **Figura 3**. Esta seção abordará o número de éxons, íntrons e domínios, os quais são considerados mais informativos biologicamente.

Os genes VuSDGs apresentaram estruturas heterogêneas, com número de éxons variando de um a 26 e íntrons de zero a 25 (**Tabela S8; Figura 3A**). Somente os genes VuSDGVI.2 e VuSDGVI.6, ambos pertencentes à classe VI, não apresentaram íntrons, sendo formados apenas por um éxon. Na estrutura dos genes VuSDGs, observou-se variação de um a sete domínios, sendo os genes das classes I e IV invariáveis, com números constantes de quatro e dois domínios dentro de suas classes, respectivamente. As classes III (domínios 2-7, éxons 2-26 e íntrons 1-25) e VI (domínios 1-5, éxons 1-20 e íntrons 0-19) foram as mais variáveis. Variações no número de domínios, éxons e íntrons para os membros da classe IV não foram, contudo, observadas.

No que tange aos genes VuJMJs, houve variação no número de éxons (2-33), de íntrons (1-32) e de domínios (1-5) (**Tabela S9; Figura 3B**). Todos os genes VuJMJs apresentaram pelo menos um íntron em suas estruturas gênicas, sendo as classes Jmj-only, JMJD6 e KDM5 as mais variáveis, com números de íntrons variando entre 3-12, 1-15 e 11-32, respectivamente (**Figura 3B**). De maneira geral, foi observada uma conservação de estruturas entre os genes pertencentes a uma mesma classe. A classe PKDM8, por exemplo, apresentou estrutura gênica conservada entre todos os membros, com 11 éxons, 10 íntrons e três domínios.



B.

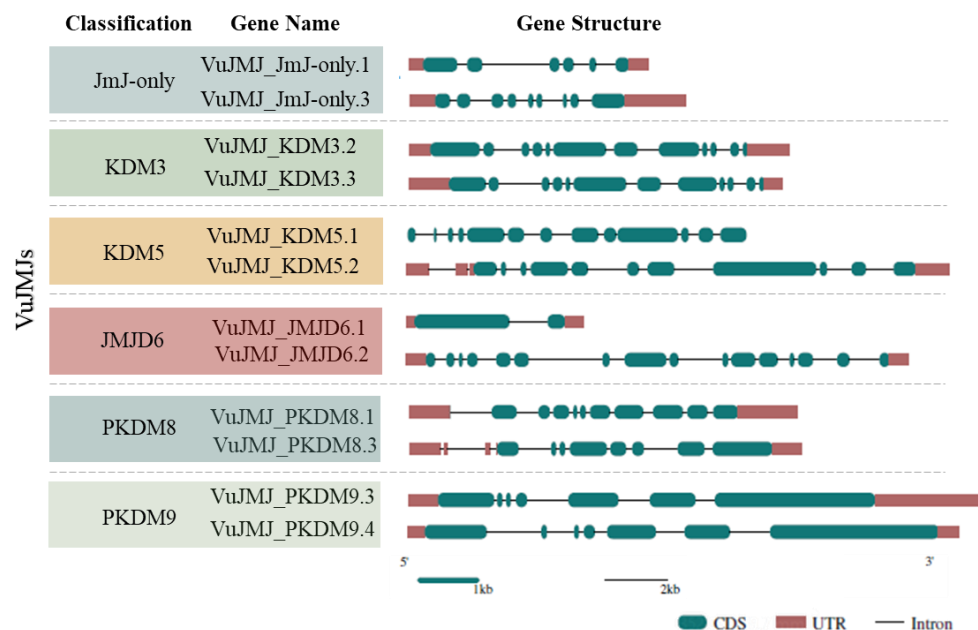
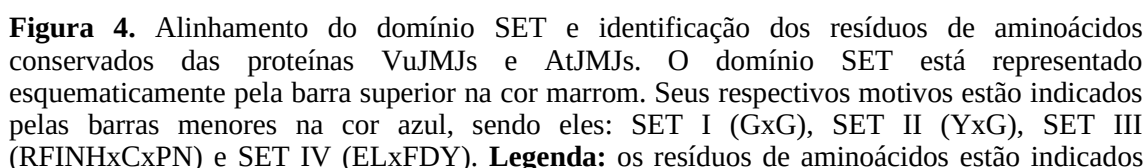


Figura 3. Estruturas gênicas de uma amostra de genes VuSDGs (A) e VuJMJs (B). Diferentes classes de VuSDGs (A) e VuJMJs (B) estão identificadas em retângulos à esquerda e separadas por linhas pontilhadas em cinza claro, sendo cada cor correspondente a uma classe específica. CDS, UTRs e íntrons estão representados por retângulos verdes, retângulos vermelhos e linhas pretas, respectivamente. A amostra de genes plotada foi escolhida aleatoriamente para representar todas as classes de VuSDGs e VuJMJs encontradas no genoma de *V. unguiculata*.

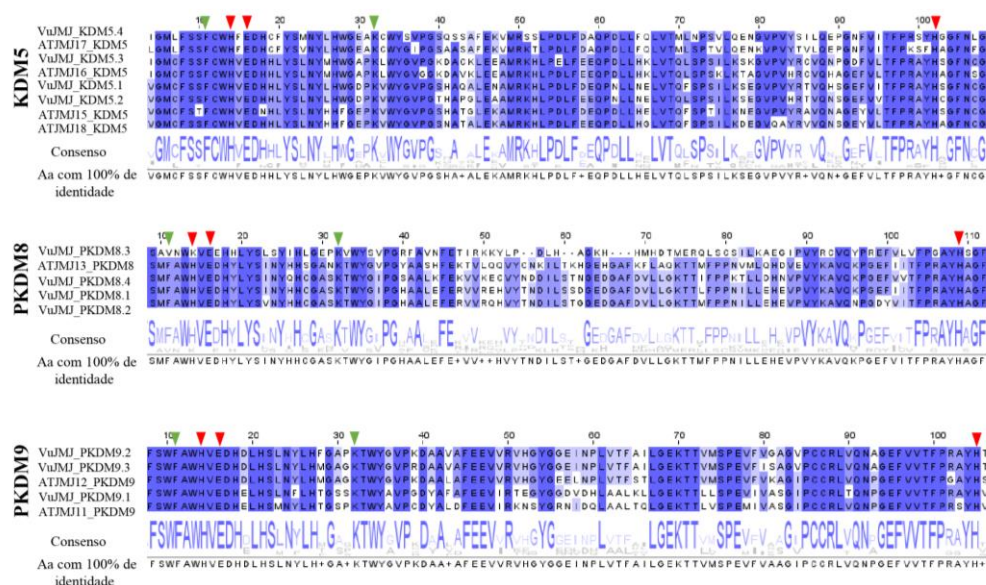


por triângulos vermelhos invertidos. Aminoácidos conservados estão destacados em azul. Sequências consenso dessas proteínas estão identificadas na parte inferior. A altura de cada letra indica a conservação da sequência em uma determinada posição. As letras maiúsculas situadas na parte inferior das sequências consenso representam os aminoácidos com 100% de identidade.

No que tange às VuJMJs, a partir da identificação de resíduos conservados, dois grupos distintos de proteínas foram formados (**Figura 5**). No primeiro grupo, os aminoácidos His, Glu e His (triângulo vermelho invertido) foram conservados para a ligação de Fe (II) e os aminoácidos Phe e Lys (triângulo verde invertido) foram conservados para a ligação a α -KG (**Figura 5A**). As proteínas das classes PKDM8, PKDM9 e KDM5 participaram desse primeiro grupo. Já o segundo grupo, o qual envolve os membros das classes JMJD6, KDM3 e Jmj-only, apresentou conservação dos resíduos His, Asp e His (triângulo vermelho invertido) para a ligação de Fe (II). Já os aminoácidos Thr e Lys (triângulo verde invertido) foram conservados para a ligação α -KG (**Figura 5B**).

De maneira geral, a maioria das proteínas VuJMJs apresentaram conservação dos resíduos que interagem com os cofatores Fe (II) e α -KG. No entanto, uma substituição no primeiro resíduo de ligação ao α -KG foi identificada, sendo observada uma alteração de Thr por Ser em todas as proteínas VuJMJs da classe JMJD6, bem como na proteína VuJMJ_Jmj-only.2. Além disso, VuSDG_PKDM8.3 apresentou alteração de Phe por Val (com mesmas propriedades químicas, mas com propriedades físicas diferentes) e His por Lys (com propriedades físicas e químicas distintas).

A.



B.

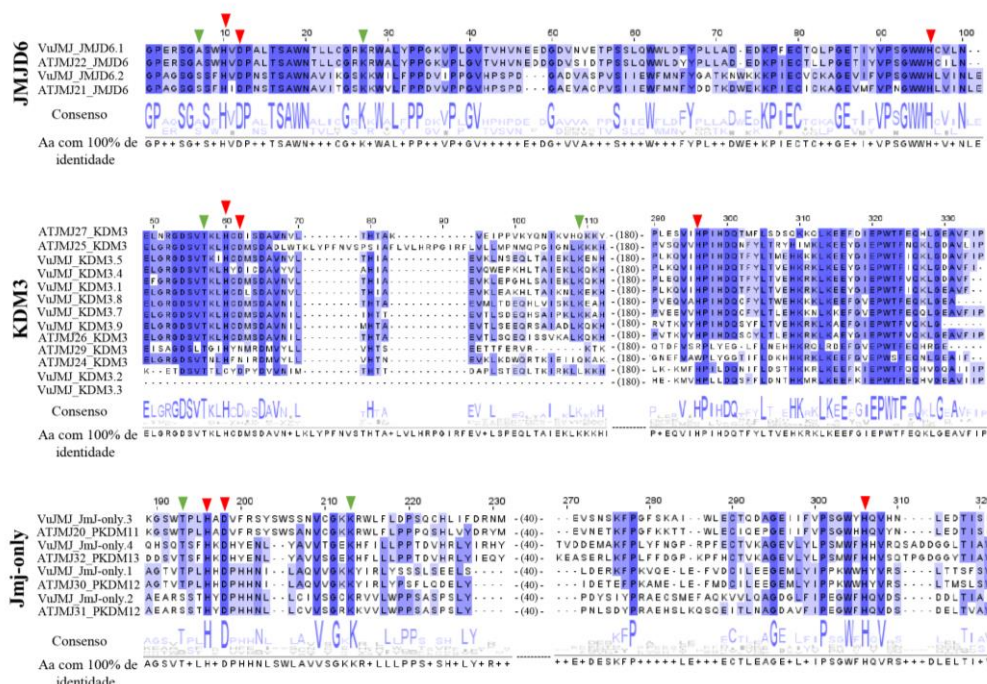


Figura 5. Alinhamento do domínio JmjC e identificação dos resíduos de aminoácidos conservados das proteínas VuJMJs e AtJMJs. **(A)** Classes de JMJs que apresentam o grupo de aminoácidos His, Glu e His, indicado por triângulos vermelhos invertidos, para ligação de Fe (II), e grupo de aminoácidos Phe e Lys, indicados por triângulos verdes invertidos, para ligação de α -KG. **(B)** Classes de JMJs que apresentam o grupo de aminoácidos His, Asp e His, indicado por triângulos vermelhos invertidos, para ligação de Fe (II), e grupo de aminoácidos Thr e Lys, indicados por triângulos verdes invertidos, para ligação de α -KG. Os nomes laterais indicam as classes de JMj. **Legenda:** aminoácidos conservados estão destacados em azul. Sequências consenso dessas proteínas estão identificadas na parte inferior de cada conjunto analisado. A altura de cada letra indica a conservação da sequência em uma determinada posição. As letras maiúsculas situadas na parte inferior das sequências consenso representam os aminoácidos com 100% de identidade.

3.1.4 Análise dos mecanismos de duplicação gênica dos loci VuSDGs e VuJMJs

A análise de duplicação gênica permitiu revelar os mecanismos de expansão dos genes VuSDGs e VuJMJs no genoma de feijão-caupi (**Tabela S10-11**). Interessantemente, nenhum membro VuSDGs nem VuJMJs teve origem a partir de mecanismos de duplicação proximal ou em tandem (**Figura 6**). Apenas cinco membros VuSDGs, pertencentes às classes VI e VII, foram considerados singletons (**Figura 6A**). Além disso, seis genes VuSDGs, expandidos a partir do mecanismo de duplicação WGD/segmental, foram identificados, compondo três pares de genes duplicados via tal mecanismo. Esses pares de genes pertencem às classes I, III e V. A maioria dos VuSDGs (36 dos 47 genes analisados) apresentaram duplicação do tipo dispersa, sendo esse o principal mecanismo de expansão dos VuSDGs no genoma do feijão-caupi.

Apenas um gene VuMJJ, pertencente à classe Jmj-only, foi considerado singleton (**Figura 6B**). Foram identificados seis genes VuJMJs com origem por duplicação WGD/segmental, compondo três pares de genes pertencentes as classes Jmj-only, KDM3 e PKDM9. Além disso, 19 genes VuJMJs tiveram origem por duplicação dispersa, compreendendo também o principal mecanismo de expansão dos VuJMJs no genoma do feijão-caupi.

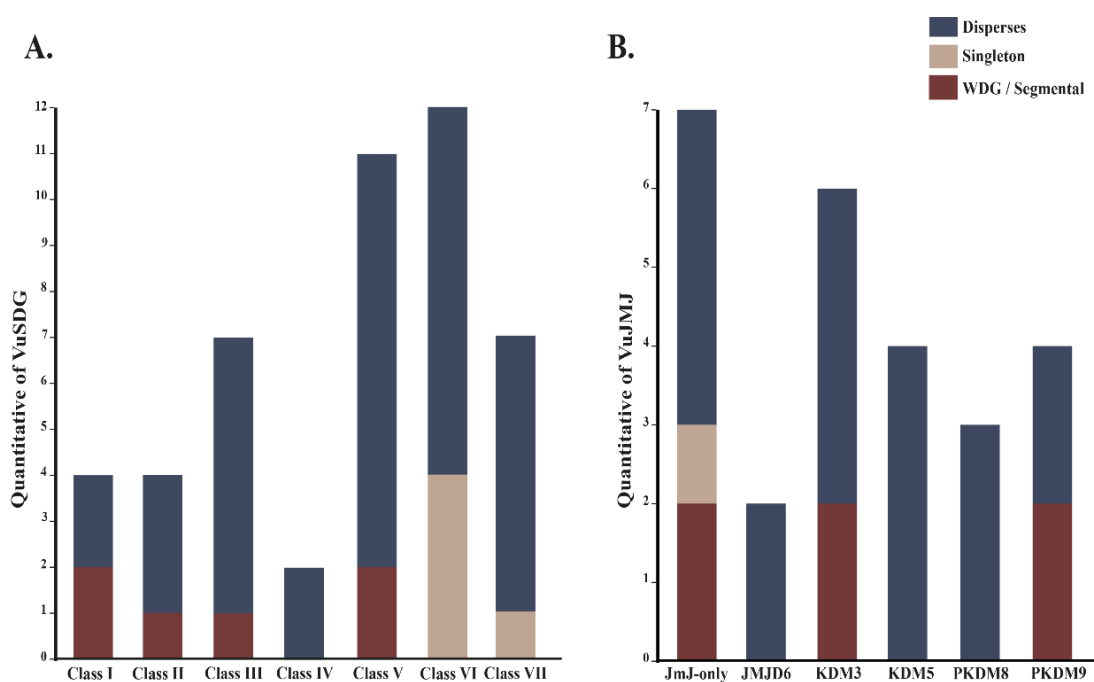


Figura 6. Quantificação dos principais mecanismos de expansão das diferentes classes das proteínas VuSDGs (**A**) e VuJMJs (**B**) identificadas no genoma do feijão-caupi. O eixo x representa as diferentes classes de proteínas, enquanto o eixo y representa o seu quantitativo.

3.1.4 Análise da pressão de seleção em genes VuSDGs e VuJMJs duplicados

A razão entre Ka/Ks foi analisada para os três pares de genes duplicados (via WGD/segmental) em cada família gênica analisada. Os valores de Ka/Ks para os VuSDGs variaram entre 0,62 e 0,97, enquanto que os VuJMJs variaram entre 0,46 e

0,96 (**Tabela S12**). Todos os pares de genes de VuSDGs e VuJMJs analisados apresentaram $Ka/Ks < 1$, sugerindo que esses genes estão sob seleção purificadora, indicando tendência de conservação da sequência de aminoácidos.

3.1.5 Genômica comparativa dos genes VuSDGs e VuJMJs

A fim de compreender a conservação desses genes, foi realizada uma análise da ortologia dos VuSDGs e VuJMJs entre diferentes espécies de Viridiplantae. Essa análise revelou que 64 dos 93 genomas analisados apresentam loci ortólogos para ambas as famílias gênicas em questão (**Tabela S13-14**). Dos 47 loci de VuSDGs, 45 (~96%) exibiram ortólogos no genoma de *Glycine max* L. e *Phaseolus vulgaris* L. As 20 espécies com maiores níveis de ortologia com o feijão-caupi estão representadas na **Figura 7**. Conforme esperado, membros da família Leguminosae destacaram-se por apresentar um maior nível de ortologia gênica, sendo: *G. max* (96%), *P. vulgaris* (96%), *Medicago truncatula* L. (91%) e *Trifolium pratense* L. (91%). Além disso, as espécies da família Brassicaceae, *A. thaliana* (85%), *Brassica rapa* L. (85%) e *Eutrema salsugineum* (Pall.) Al-Shehbaz & S.I.Warwick (85%), também apresentaram níveis significativos de ortologia com *V. unguiculata* (**Figura 7A**).

Na análise das VuJMJs, 25 dos 26 loci de feijão-caupi apresentaram ortólogos no genoma de *P. vulgaris* e *Daucus carota* (~96% da conservação). Além disso, algumas espécies da família Brassicaceae, como *Arabidopsis lyrata* (89%), *B. rapa* (89%), *Capsella grandiflora* (89%), *E. salsugineum* (89%), *Boechera stricta* (85%) e *Capsella rubella* (85%), também apresentaram JMJs ortólogas (**Figura 7B**).

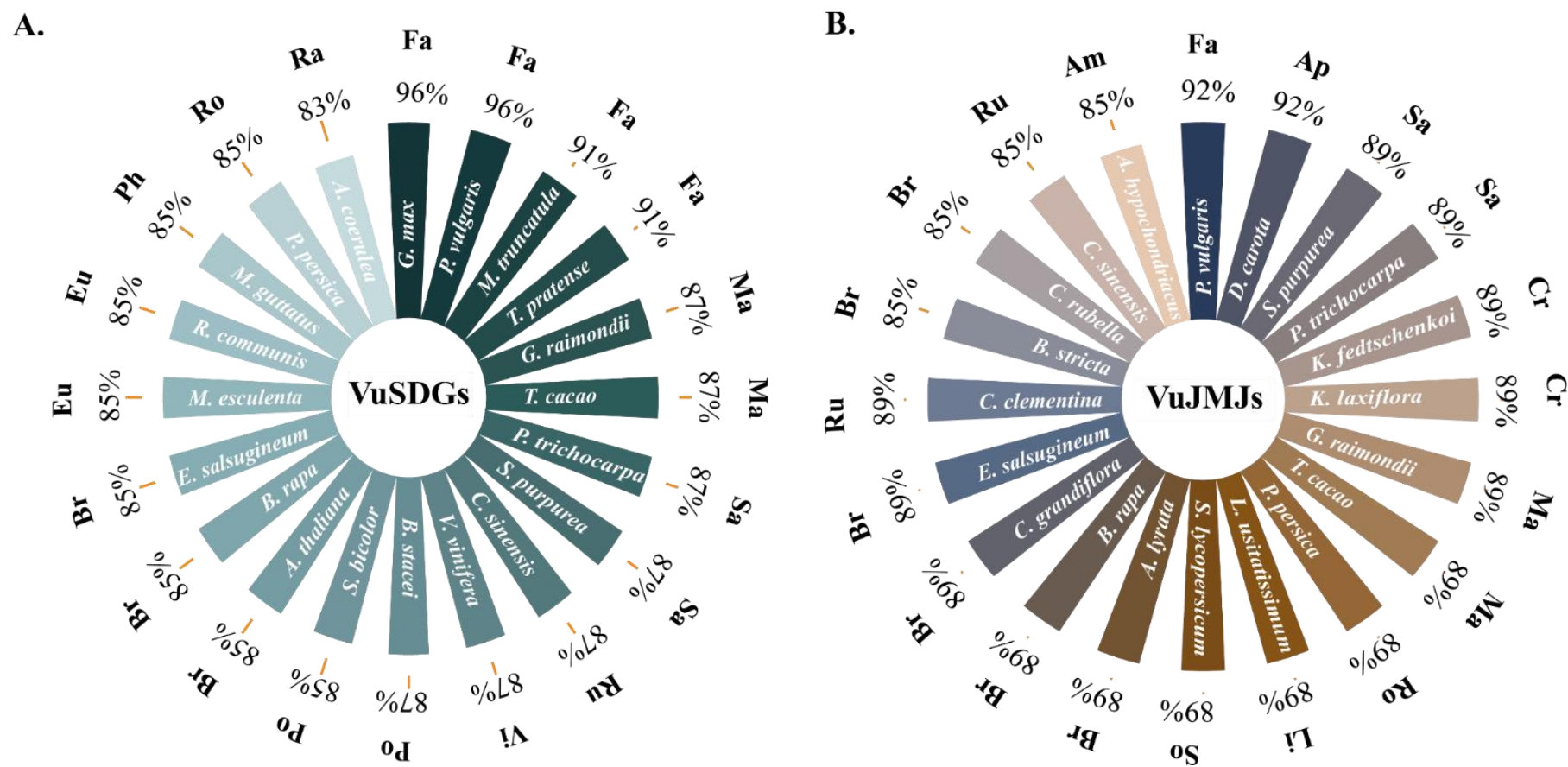


Figura 7. Quantificação dos loci conservados de metiltransferase de histonas (A) e demetilase de histonas (B) entre as 20 espécies vegetais com maiores índices de ortologia no genoma do feijão-caupi. As famílias estão representadas por letras laterais às barras, sendo: Fa (Fabaceae); Ma (Malvaceae); As (Salicaceae); Ru (Rutaceae); Vi (Vitaceae); Po (Poaceae); Br (Brassicaceae); Eu (Euphorbiaceae); Ph (Pharmaceae); Ro (Rosaceae); Ra (Ranunculaceae); Ap (Apiaceae); Cr (Crassulaceae); Li (Linaceae); So (Solaneae); Am (Amaranthaceae). As espécies analisadas estão indicadas no interior das barras, com cores diferentes. As porcentagens de ortologia gênica, em cada espécie analisada, em relação ao feijão-caupi, estão apresentadas acima das barras.

Figura 8. Localização e identificação dos CCRES, apresentação dos motivos consenso e TFs associados nos promotores de uma amostra representativa contendo 15 genes VuSDGs. A amostra de genes plotada foi escolhida aleatoriamente para apresentar todos os CCRES encontrados no conjunto total de promotores analisados. **Legenda:** no painel superior, para cada

promotor analisado, os motivos são identificados em toda sua extensão. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, os CCRES *bona fide* estão representados por retângulos de diferentes cores, apresentando seus respectivos fatores de transcrição associados.

Já os promotores de VuJMJs apresentaram somente um CCRE dentro do cut-off estipulado, o qual encontrou-se distribuído em 21 sítios distintos. Esse elemento está associado ao TF Dof-type (JASPAR ID1278.1) (**Figura 9**).

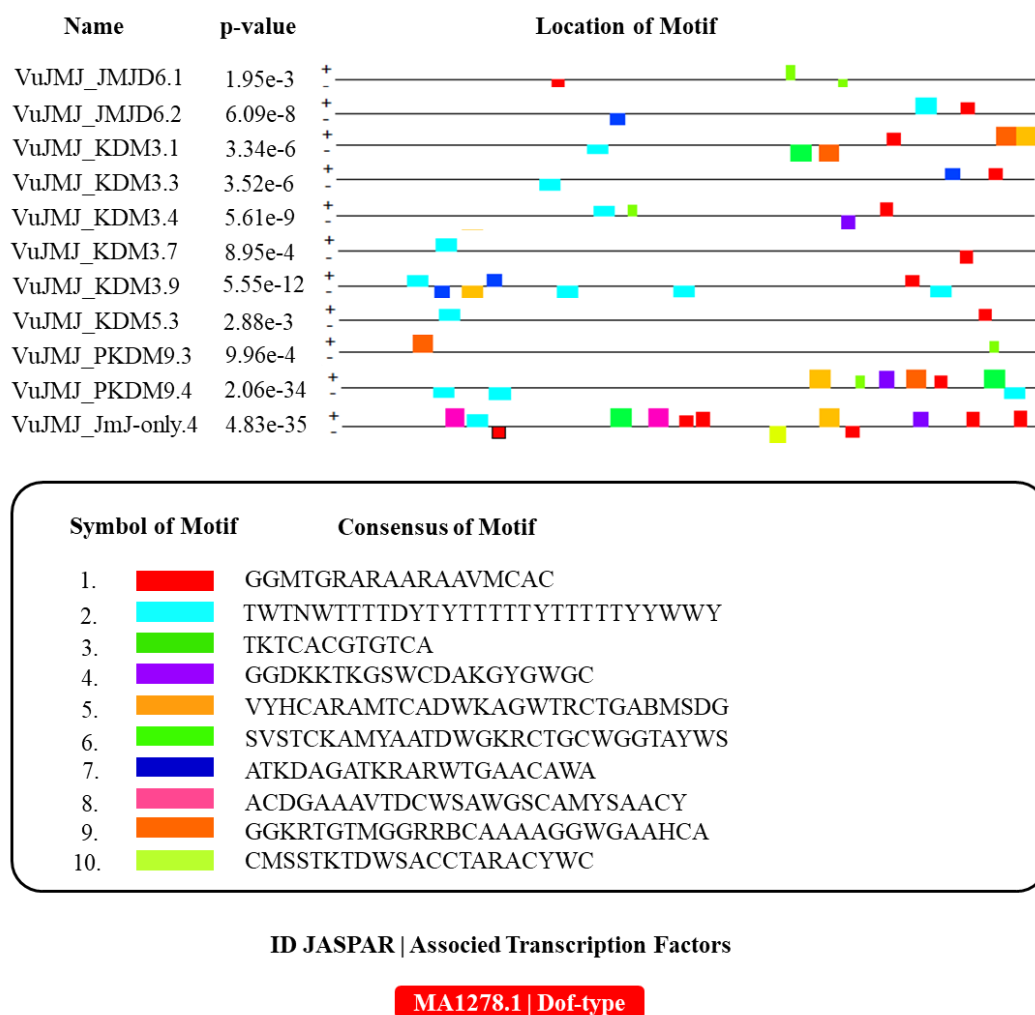


Figura 9. Localização e identificação dos CCRES, motivos consenso e TFs associados nos promotores de uma amostra representativa contendo 11 genes VuJMJs. A amostra de genes plotada foi escolhida aleatoriamente para apresentar todos os CCRES encontrados no conjunto total de promotores analisados. **Legenda:** no painel superior, para cada promotor analisado, os motivos são identificados em toda sua extensão. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, o CCRES *bona fide* é representado por um retângulo vermelho.

3.2 Transcriptômica de VuSDGs e VuJMJs em feijão-caupi submetido a estresses biótico e abiótico

Para analisar a expressão dos genes VuSDGs e VuJMJs, foram utilizadas bibliotecas RNA-Seq de feijão-caupi submetido a três condições desfavoráveis distintas: (a) injúria mecânica seguida de inoculação por CABMV; (b) injúria mecânica seguida de inoculação por CPSMV; e (c) desidratação radicular. Todos os dados transcriptômicos de VuSDGs e VuJMJs em feijão-caupi submetido aos diferentes estresses encontram-se nas **Tabelas S16-17**.

Nas referidas bibliotecas, foram minerados e caracterizados 330 transcritos codificadores de VuSDGs. Considerando todos os ensaios analisados, 31 transcritos VuSDGs apresentaram expressão diferencial, sendo distribuídos nas sete classes de metiltransferases de histonas (classes I – II – III – IV – V – VI – VII). Além disso, 135 transcritos VuJMJs foram identificados nos ensaios analisados. Desses, 24 transcritos VuJMJs apresentaram expressão diferencial. Esses transcritos VuJMJs foram distribuídos em cinco classes de demetilases de histonas (Jmj-only; KDM3; KDM5; PKDM8 e PKDM9) (**Figura 10A e 10B**). Ao comparar as diferentes condições desfavoráveis analisadas, nossos resultados apontam que ambas as famílias gênicas identificadas foram mais moduladas na resposta ao estresse de desidratação radicular (**Figura 10A e 10B**).

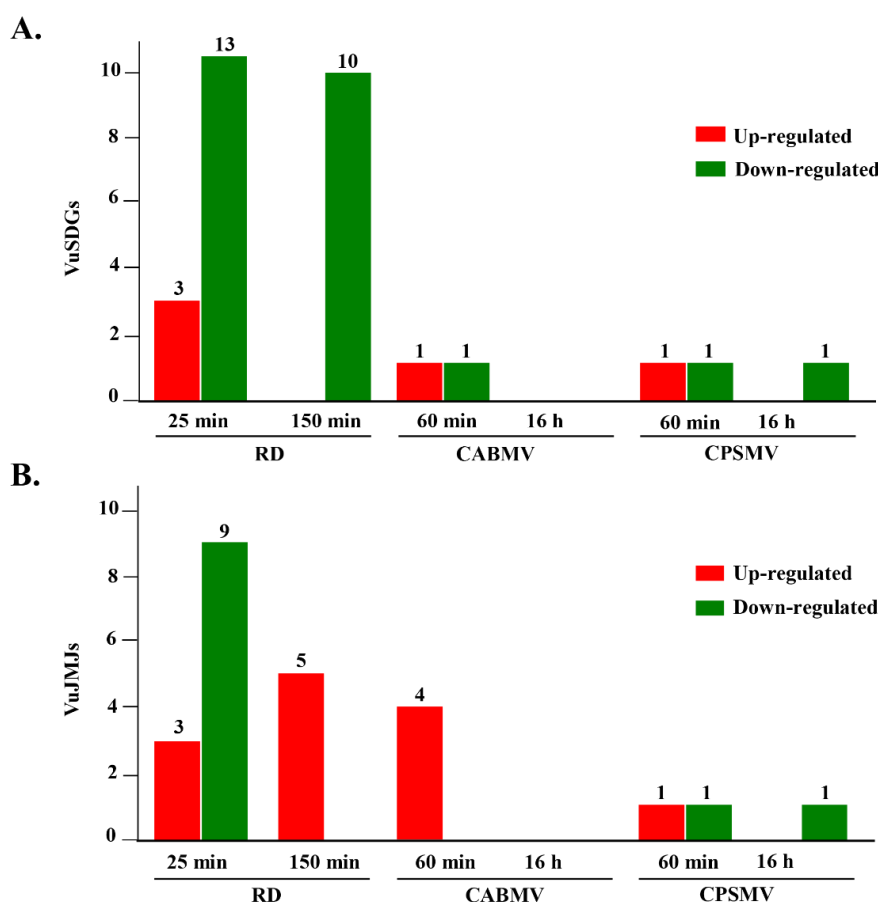


Figura 10. Quantitativo de transcritos VuSDGs (A) e VuJMJs (B) diferencialmente expressos. O eixo 'x' representa os diferentes ensaios analisados: RD – Desidratação Radicular (25 - 150

min); CABMV – Injúria mecânica + inoculação do vírus CABMV (60 min – 16 h); CPSMV - Injúria mecânica + inoculação do vírus CPSMV (60 min – 16 h). O eixo ‘y’ representa o seu respectivo quantitativo. Barras em vermelho representam o quantitativo dos transcritos induzidos (Up-regulated) e barras em verde representam o quantitativo dos transcritos reprimidos (Down-regulated).

3.2.1 Perfil de expressão dos VuSDGs e VuJMJs no ensaio de desidratação radicular

A análise de expressão nos tratamentos RD25 e RD150 analisados para o ensaio de desidratação radicular identificou 26 transcritos VuSDGs diferencialmente expressos nos tratamentos analisados (**Figura 11**). Em RD25, 16 VuSDGs foram diferencialmente expressos, sendo três induzidos e 13 reprimidos. Os três transcritos induzidos foram atribuídos às classes V (2) e I (1), enquanto os transcritos reprimidos foram distribuídos entre as classes I, II, III, V, VI e VII. Já para RD150, todos os transcritos identificados para esse tratamento foram reprimidos (10), sendo atribuídos às classes II, IV, VI e VII (**Tabela S16; Figura 11A**). Nossos resultados indicam que os transcritos que codificam VuSDGs tendem a participar da resposta inicial ao estresse radicular e, nos momentos posteriores de estresse, essa família gênica não apresenta uma expressão diferencial.

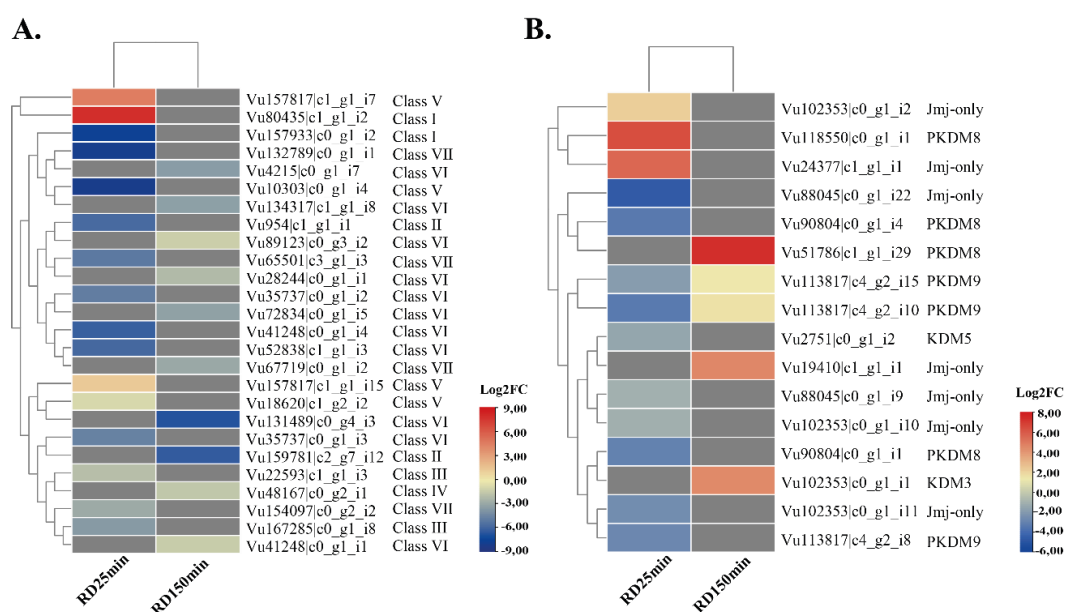


Figura 11. Heat-Map ilustrando a modulação dos transcritos que codificam VuSDGs (**A**) e VuJMJs (**B**) diferencialmente expressos em ao menos um tratamento (RD25 ou RD150), após aplicação do estresse de desidratação radicular.

Para os VuJMJs, em RD25, 12 transcritos foram diferencialmente expressos, sendo três induzidos e nove reprimidos. Os transcritos VuJMJs induzidos nesse tratamento pertencem às classes Jmj-only e PKDM8, enquanto os reprimidos foram atribuídos às classes Jmj-only, PKDM8, PKDM9, KDM3 e KDM5. Já em RD150, cinco VuJMJs foram induzidos, os quais foram distribuídos entre as classes PKDM8, PKDM9, KDM3 e Jmj-only. Nenhum transcrito VuJMJs reprimido foi identificado no tratamento em

questão (**Figura 11B**). As classes PKDM8 e Jmj-only apresentaram transcritos induzidos em ambos os tratamentos analisados (**Tabela S17**). Já as classes PKDM9 e KDM3 apresentaram uma resposta temporal específica, sendo exclusivamente induzidas em RD150. É interessante notar que, em RD150, nenhum VuJMJs foi reprimido, enquanto todos os VuSDGs foram reprimidos no referido tratamento.

3.2.2 Perfil de expressão dos VuSDGs e VuJMJs nos ensaios de injúria mecânica seguida de inoculação viral

Transcritos que codificam VuSDGs diferencialmente expressos no ensaio de injúria mecânica e inoculação por CABMV não foram identificados no tratamento de 16h após a aplicação do estresse. Já no tempo de 60 minutos, apenas um transcrito foi induzido (classe V) e um reprimido (classe VI) (**Tabela S16**). Já no ensaio de injúria mecânica e inoculação de CPSMV, três transcritos VuSDGs foram diferencialmente expressos. Em 60 minutos após a aplicação do estresse, um transcrito foi induzido (classe III) e um reprimido (VI). Após 16 h, apenas um transcrito foi reprimido (classe VII).

Nenhum transcrito VuJMJs foi diferencialmente expresso no tempo de 16 h após a aplicação do estresse de injúria mecânica seguida de inoculação por CABMV. Quatro transcritos VuJMJs, pertencentes à classe Jmj-only de demetilases de histonas, foram induzidos em 60 minutos (**Tabela S17**). Já para o ensaio de injúria mecânica e inoculação por CPSMV, dois transcritos VuJMJs foram diferencialmente expressos em 60 minutos, sendo um induzido (classe PKDM8) e um reprimido (classe PKDM9). Em 16 h após a aplicação do estresse, apenas um transcrito (classe Jmj-only) foi reprimido. Esses resultados sugerem que, quando comparada às metilases de histonas, as demetilases podem apresentar uma participação mais ativa na resposta precoce de defesa do feijão-caupi à inoculação viral, especialmente por CABMV.

3.2.3 Crosstalk entre os estresses de desidratação radicular e resposta precoce de defesa à CABMV e CPSMV

Os transcritos VuSDGs induzidos foram exclusivos para cada ensaio, não sendo possível identificar transcritos induzidos compartilhados (*crosstalk*). Na família VuJMJs, um transcrito pertencente à classe PKDM8 foi induzido e compartilhado entre os ensaios ‘injúria mecânica e inoculação de CABMV’ e desidratação radicular, sugerindo sua possível participação na resposta a condições desfavoráveis distintas em feijão-caupi.

3.3 Validação dos dados de RNA-Seq por qPCR

Para analisar a confiabilidade e robustez da expressão gênica *in silico* (bibliotecas RNA-Seq), transcritos VuSDGs e VuJMJs diferencialmente expressos também foram analisados por qPCR. Considerando os critérios de desenho de primers, foi possível desenhar 15 pares de primers para os transcritos VuSDGs e VuJMJs diferencialmente expressos, sendo sete referente aos transcritos VuSDGs e oito VuJMJs (**Tabela S1**). Os pares de primers desenhados para ambas as famílias gênicas analisadas foram dispostos em todos os ensaios analisados.

No que tange ao conjunto de pares de primers para os transcritos VuSDGs, apenas dois pares apresentaram valores de eficiência aceitáveis (90 a 110%) com eficiência de amplificação equivalente a 95,2 e 101,5%. Tais pares de primers foram relacionados aos transcritos Vu90804|c0_g1_i1 e Vu72834|c0_g1_i5, ambos identificados no ensaio de desidratação radicular, não sendo possível obter pares de primers VuSDGs funcionais

para os ensaios CPSMV e CABMV. No que diz respeito aos pares de primers para os transcritos VuJMJs (Vu2751|c0_g1_i2; Vu102353|c0_g1_i11; Vu88045|c0_g1_i9; Vu102353|c0_g1_i2; Vu167285|c0_g1_i8; Vu19410|c1_g1_i1; Vu113817|c4_g2_i10; Vu113817|c4_g2_i3), todos apresentaram valores de eficiência aceitáveis com eficiência de amplificação variando de 93,3 a 108,1%. (**Tabela S1**). Os pares de primers para os transcritos VuJMJs foram analisados em todos os ensaios executados. A especificidade de ambos os conjuntos de pares de primers analisados foi confirmada pela presença de um único pico nas curvas de melting.

A análise de expressão relativa mostrou que ambos os transcritos VuSDGs analisados por qPCR foram reprimidos no ensaio de desidratação radicular, sendo o transcrito Vu72834|c0_g1_i5 reprimido no ensaio RD25 e Vu90804|c0_g1_i1 reprimido em RD150, confirmando os dados de RNA-Seq (**Figura 12**).

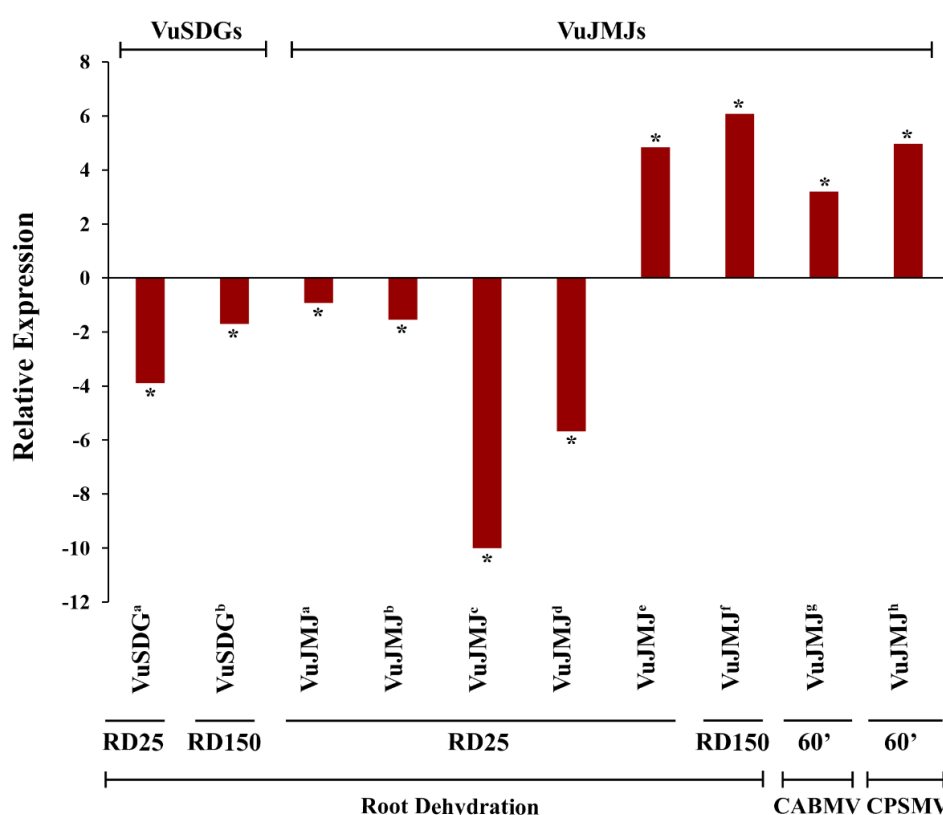


Figura 12. Expressão relativa via qPCR de transcritos VuSDGs e VuJMJs diferencialmente expressos nas bibliotecas de RNA-Seq. **Legenda:** o asterisco indica os transcritos diferencialmente expressos considerando $p < 0,05$ e FDR $< 0,05$. O ID dos transcritos está representado pelos nomes verticais inferior às barras, sendo: VuSDG^a (Vu72834|c0_g1_i5); VuSDG^b (Vu167285|c0_g1_i8); VuJMJ^a (Vu90804|c0_g1_i1); VuJMJ^b (Vu2751|c0_g1_i2); VuJMJ^c (Vu102353|c0_g1_i11); VuJMJ^d (Vu88045|c0_g1_i9); VuJMJ^e (Vu102353|c0_g1_i2); VuJMJ^f (Vu19410|c1_g1_i1); VuJMJ^g (Vu113817|c4_g2_i10); VuJMJ^h (Vu113817|c4_g2_i3).

No que tange aos VuJMJs, a análise de expressão via qPCR mostrou que, para o ensaio de injúria mecânica seguida de inoculação viral, dois transcritos VuJMJs foram induzidos, sendo o transcrito Vu113817|c4_g2_i10 induzido no ensaio CABMV e Vu113817|c4_g2_i3 induzido no ensaio CPSMV, ambos no tempo de 60 minutos. Tais

resultados confirmaram os dados de RNA-Seq. Em relação ao ensaio de desidratação radicular, os transcritos Vu90804|c0_g1_i1, Vu2751|c0_g1_i2, Vu102353|c0_g1_i11, Vu88045|c0_g1_i9 foram reprimidos no ensaio RD25. Já os transcritos Vu113817_c4_g2_i10 e Vu113817_c4_g2_i3 foram induzidos em RD25 e RD150, respectivamente (**Figura 12**). Esses resultados confirmaram os dados de RNA-Seq.

Em suma, foi possível obter 15 pares de primers para os transcritos VuSDGs e VuJMJs diferencialmente expressos nas bibliotecas de RNA-Seq. Desses, 10 foram considerados pares de primers funcionais, os quais apresentaram valores de eficiência aceitáveis. Por fim, todos os pares de primers funcionais analisados por qPCR confirmaram os dados das bibliotecas de RNA-Seq, comprovando a qualidade desses dados.

4. Discussão

4.1 Mineração e caracterização estrutural de VuSDGs e VuJMJs no genoma do feijão-caupi

Com os avanços das plataformas de sequenciamento e a disponibilidade de genomas completos, a identificação das famílias gênicas SDGs e JMJs têm sido amplamente descritas em espécies vegetais. No presente trabalho, identificou-se 47 genes VuSDGs e 23 VuJMJs no genoma do feijão-caupi. Números semelhantes são descritos para *A. thaliana* (47 genes SDGs e 21 JMJs) [5,55], arroz (43 SDGs e 20 JMJs) [55,21] e milho (43 SDGs e 19 JMJs) [23,17]. Entre as leguminosas, os dados restringem-se à família MJJ da soja, que apresenta 48 genes [25]. O número variável de genes JMJs pode estar associado à ampla variação do tamanho do genoma das espécies de leguminosas em questão. O feijão-caupi possui ($2n = 2x = 22$) tamanho do genoma estimado em 640 Mb [32], enquanto a soja ($2n = 4x = 40$), espécie tetraploide, possui genoma ~1,15 Gb [56]. Já no trigo (*Triticum aestivum* L.), espécie hexaploide com $2n = 6x = 42$ e genoma de ~16 Gb [57], 166 genes SDGs foram minerados.

O domínio SET, altamente conservado, das proteínas VuSDGs é considerado essencial para atividade catalítica das proteínas metilases de histonas [21]. Além desse domínio, as proteínas VuSDGs apresentam domínios adicionais (AWS, WIYLD, Pré-SET, PHD, PWWP, FYRC, FYRN, Pós-SET, Zf-CW, CXC, SANT), que atuam em sua maioria na ligação ao DNA e estão relacionados a especificidade funcional. A identificação desses domínios específicos, bem como análise fenética, permitiu classificar as proteínas VuSDGs em sete classes distintas, sendo as mesmas relatadas anteriormente em *A. thaliana* [5] e em *Dendrobium catenatum* Lindl. [58]. Em *A. thaliana*, essas classes também são categorizadas a partir da especificidade da sua atividade enzimática. A classe I, por exemplo, está envolvida na metilação da lisina 27 na histona 3 (H3K27me). Já a classe II é responsável pela metilação de H3K36. As classes III e IV regulam, por sua vez, o processo de metilação de H3K4. A classe V atua na metilação de H3K9, sendo mais abundante em feijão-caupi, em *A. thaliana* e arroz [5] e em *D. catenatum* [58]. Diferentemente, a classe VI não apresenta domínios adicionais, sugerindo a sua existência antes da divergência evolutiva entre as monocotiledôneas e dicotiledôneas. Essa classe é caracterizada pela presença de um domínio SET incompleto ou interrompido por um domínio Zf-MYND, sendo responsável pela metilação de H3K36. Já a classe VII, é representada por proteínas responsáveis por metilar proteínas não histonas [5].

As proteínas VuSDGs apresentam o domínio SET geralmente localizado na região C-terminal da proteína. Esse domínio, consiste em quatro motivos altamente conservados envolvidos em uma das três etapas da reação de metilação de histonas,

sendo elas: ligação da S-Adenosil-L-metionina (AdoMet), a qual desempenha papel na transferência de um grupo metil aos resíduos específicos das histonas; catálise de transferência do grupo metil; e ligação da lisina alvo [59]. Em feijão-caupi, esse domínio mostrou-se altamente conservado, com destaque para Gly-185 e Gly-186 (motivo SET I) que juntamente com os resíduos Arg-298, Phe-299, Ile-300, Asn-301, His-302 (motivo SET III) e Tyr-346 (motivo SET IV) desenvolvem a função de ligação de AdoMet. Além desses resíduos, o Tyr-203, situado no motivo SET II, atua na transferência do grupo metil. Por fim, os resíduos Cys-304, Pro-306, Asn-307 (motivo SET III), Glu-342, Leu-343 e Asp-345 (motivo IV) que estão associados ao processo de ligação a lisina alvo. A elevada conservação desses resíduos é uma característica essencial dessas proteínas. No entanto, alguns desses motivos não foram identificados nas proteínas VuSDGs das classes VI e VII. Além disso, o motivo IV encontram-se incompleto para maioria dos membros das referidas classes. A classe VI das proteínas SDGs é caracterizada por membros que apresentam um domínio SET incompleto ou interrompido por um domínio Zf-MYND. Já a classe VII, contém um domínio SET responsável pela metilação de proteínas não histonas [5]. Portanto, a estrutura do domínio SET das proteínas dessas classes apresentam algumas variações que devem ser exploradas para uma melhor compreensão do desenvolvimento da função dessas proteínas em feijão-caupi.

Todas as proteínas VuJMJs apresentaram um domínio conservado JmjC, específico da família gênica JMJs associada ao processo de demetilação dos resíduos de lisina das histonas [18]. Adicionalmente, diversos domínios como zf-4CXXC_R1, Zf-C5HC2, FYRN e FYRC foram identificados, os quais apresentam papel de ligação ao DNA. As VuJMJs foram classificadas em seis classes, sendo JmjC-only (representada por PKDM11-12-13 em soja) [25], JMJD6, KDM3, KDM5 e PKDM8-9 (representada por KDM4 em *A. thaliana* e arroz, bem como algodão) [55,18]. As proteínas JMJs da mesma classe tendem a atuar nos processos de demetilação de resíduos de lisina das histonas. A classe KDM5, por exemplo, atua na demetilação da marca H3K4. Já a classe KDM4 está associada as marcas H3K9 e H3K36. A classe JMJD6 não apresenta, por sua vez, uma atividade enzimática bem definida [55]. Embora apresentem diferenças na composição de domínios, além de sequências distintas do domínio JmjC, as classes KDM3 e JmjC-only atuam na marca H3K27me [60]. Além disso, membros da classe KDM3, a mais abundante nos genomas do feijão-caupi, *A. thaliana*, arroz [55] e algodão [18], também pode atuar na demetilação da marca H3K9 [55]. Tendo em vista a abundância das classes V e KDM3 no feijão-caupi e a sua importância no silenciamento de elementos transponíveis (TEs) e regiões de DNA repetitivo [61], sugere-se os membros dessas classes como alvos potenciais a serem explorados em estudos a nível fisiológico em *V. unguiculata*.

O domínio JmjC altamente conservado contém alguns resíduos de aminoácidos que desempenham papel fundamental na atividade enzimática das JMJs [55]. Esses resíduos ligam-se ao ferro Fe (II) e α -KG, que atuam como cofatores e são cruciais para as atividades de demetilase de histonas [62,63]. Em feijão-caupi, esse domínio mostrou-se altamente conservado, com destaque para His, Glu/Asp e His para a ligação de Fe (II) e Phe/Thr e Lys para a ligação a α -KG. A elevada conservação desses resíduos é uma característica essencial das proteínas JMJs, sendo observadas nas mais diversas espécies vegetais, como *Arabidopsis* [55], soja [25], *Rosa chinensis* Jacq. [64] e *G. hirsutum* L. [18]. No entanto, todas as proteínas VuJMJs da classe JMJD6, bem como a proteína VuJMJs_Jmj-only2 apresentaram alteração de Thr por Ser, também observado em *Arabidopsis* [55] e soja [25]. Essa substituição possivelmente não irá alterar a ligação dos resíduos aos cofatores, uma vez que Thr e Ser apresentam propriedades físicas e

químicas semelhantes, não alterando a funcionalidade de demetilase de histonas dos membros de VuJMJs. Ainda, VuSDG_PKDM8.3 apresentou alteração de Phe por Val e His por Lys. Essas substituições devem ser exploradas quanto aos impactos que podem causar na ligação desses resíduos aos seus respectivos cofatores no feijão-caupi, uma vez que os aminoácidos substituídos apresentam propriedades físicas e químicas diferentes.

A diversificação de uma família gênica está intimamente relacionada ao ganho ou perda de éxons e/ou íntrons, podendo resultar em especificidade de funções [65]. Apenas dois VuSDGs não apresentaram íntrons em sua estrutura gênica, enquanto 44 genes apresentaram pelo menos um íntron. Em relação aos VuJMJs, todos os genes apresentaram pelo menos um íntron em suas estruturas gênicas. Isso sugere que o ganho de íntrons pode contribuir significativamente para a diversificação estrutural e, possivelmente, funcional dos genes SDGs no feijão-caupi, como previamente relatado para o trigo [29]. Apesar da diversidade estrutural dos VuSDGs e VuJMJs, é possível observar uma conservação dos membros dentro de uma mesma classe, com composição de domínios e estrutura gênica semelhante (**Figura 3**).

4.2 Propriedades proteicas e predição da localização subcelular

No que tange à localização subcelular, as proteínas das famílias gênicas VuSDGs e VuJMJs apresentaram uma localização predominantemente nuclear. Essa localização, foi consistente com sua função de catalisar o processo de (de)metilação das histonas, o qual ocorre no núcleo da célula. Nossos resultados corroboram com os dados previamente descritos da literatura [28,66,18]. Alguns membros VuSDGs e VuJMJs estavam distribuídos pelo cloroplasto, citoplasma, membrana plasmática e mitocôndria. Proteínas SDGs que apresentam atividade de metilação de proteínas não histonas foram relatadas em *Arabidopsis*, especialmente aquelas que apresentam um domínio SET truncado [5]. Essas evidências demonstram a plasticidade de ação dessas proteínas no feijão-caupi, sugerindo sua atividade em diversos compartimentos celulares. Resultados semelhantes foram descritos para a espécie *Brassica rapa* [16].

4.3 Mecanismos de duplicação dos genes VuSDGs e VuJMJs no genoma do feijão-caupi

A duplicação gênica é um importante mecanismo na evolução das espécies vegetais [27]. Além disso, contribuem significativamente para a expansão de famílias gênicas, bem como o surgimento de novas funções biológicas. As duplicações dispersa e WGD/segmental foram as principais responsáveis pela expansão das famílias gênicas SDGs e JMJs no feijão-caupi, sendo a duplicação dispersa a maior força de expansão das famílias analisadas em *V. unguiculata*. Resultados semelhantes foram relatados para genes JMJs na espécie *Fragaria vesca* L. [67], sugerindo que tal tipo de duplicação desempenha um papel significativo na expansão dessa família gênica em espécies vegetais. Genes duplicados por esse mecanismo podem ter surgido a partir da ação de elementos transponíveis (TEs), conforme relatado em diversos organismos [68]. Em vegetais superiores, o genoma é comumente composto por uma quantidade elevada de TEs. As espécies *Vigna angularis* L., *Vigna radiata* L. e *V. unguiculata*, por exemplo, apresentam 43, 50 e 50,1 % de sequências repetitivas presentes em seu genoma, sendo cerca de 32, 39 e 39 %, respectivamente, relativas a TEs [69,32].

A razão Ka/Ks, considerada um indicador do histórico de seleção agindo em sequências gênicas, foi analisada para os VuSDGs e VuJMJs que apresentaram duplicação segmental. Todos os pares de VuSDGs e VuJMJs apresentaram Ka/Ks < 1,

indicando que esses genes estão sob seleção purificadora. Esse tipo de seleção mantém a conservação da sequência de aminoácidos, mantendo a sua funcionalidade e estrutura. Esses resultados sugerem que os pares de genes podem apresentar redundância funcional.

4.4 Genômica comparativa de VuSDGs e VuJMJs

Alto índice de homologia de VuSDGs e VuJMJs foi observado entre os genomas analisados, demonstrando uma conservação significativa dos VuSDGs e VuJMJs nos genomas analisados. Como esperado, leguminosas apresentaram os maiores índices de ortologia com o feijão-caupi, com destaque para o feijão comum e a soja. Nossos resultados abrem novas perspectivas de estudos relacionados a função dessas proteínas nas espécies em que foram conservadas.

4.5 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos

Os CCREs descritos no nosso trabalho podem ser usados para sugerir possíveis ações das quais os VuSDGs e os VuJMJs participam, por meio da identificação dos TFs associados e seus processos biológicos intrínsecos. Os TFs Dof-Type e bZIP associados aos *bona fide* CCREs identificados, apresentam associação com a resposta a estresses em plantas. Dof-type, por exemplo, estão envolvidos na resposta a agentes patogênicos, como vírus e fungos [70,71]. O bZIP, por sua vez, é uma família de TFs específicos de plantas que desempenham papéis cruciais em resposta a estresses bióticos, como a *Sclerotinia sclerotiorum*, fitopatógeno necrotrófico típico da soja [72], além de estresses abióticos, como a seca [73]. Os *bona fide* CCREs ancorados nos promotores dos genes de *V. unguiculata* sugerem que metiltransferases e demetilases de histonas podem atuar em processos diversos em feijão-caupi, reforçando, assim, seu potencial biotecnológico.

4.6 Transcriptômica de VuSDGs e VuJMJs em feijão-caupi submetido a estresse biótico e abiótico

Os dados obtidos a partir da análise de qPCR confirmaram os dados de expressão de RNA-Seq dos 10 alvos analisados (dois VuSDGs e oito VuJMJs). Esse resultado indica confiabilidade das técnicas empregadas no sequenciamento e síntese das bibliotecas de RNA-Seq analisadas. Adicionalmente, esses dados reforçam o rigor da montagem dos transcriptomas e dos métodos estatísticos da análise de expressão diferencial, garantindo a robustez das informações disponíveis no presente trabalho.

O perfil de expressão diferencial dos VuSDGs em resposta à desidratação radicular identificou transcritos (classes V e I) induzidos apenas em RD25. Já para os VuJMJs, classes distintas com diferentes perfis de transcrição em RD25 foram observados, sendo identificado apenas transcritos induzidos (classes PKDM9 e KDM3) em RD150. Esses resultados sugerem que classes de VuSDGs e VuJMJs, na resposta à desidratação radicular, possuem expressão tempo-específica.

A demetilação de H3K27me tem sido relatada na resposta ao estresse de seca, sendo demonstrado que a redução dos níveis de H3K27me3 nas regiões intergênicas de TFs da família NAC, responsivos ao estresse de seca mediante percepção do hormônio ABA, contribui significativamente para a resistência de *Arabidopsis* ao estresse de seca [74]. Em *V. unguiculata* a indução de genes VuJMJs, especialmente da classe KDM3, no ensaio RD150 foi observada. Assim, sugere-se que esses genes podem estar associados ao processo de ativação de genes que atuam mediante a percepção hormonal

na resposta de defesa propriamente dita do feijão-caupi ao déficit hídrico. Enquanto que a metilação de H3K27 a partir da indução dos genes VuSDG da classe I, atua na ativação de genes associados a percepção e sinalização do estresse. Alguns estudos confirmam o importante papel dos genes VuSDGs e VuJMJs na tolerância à seca em diferentes espécies vegetais [29,58].

Apesar da sua reconhecida importância na resposta a estresses bióticos, as funções biológicas das famílias gênicas SDGs e JMJs na defesa vegetal são limitadas a organismos como a bactéria *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000 [75] e os fungos *Uromyces appendiculatus* [76] e *Botrytis cinerea* [77]. Estudos relativos à defesa contra vírus são escassos. Em feijão-caupi, os dados de RNA-Seq mostraram que apenas um transcrito VuSDG (ambos os ensaios – CABMV e CPSMV) foi induzido após 60 minutos de aplicação dos estresses. Para VuJMJs, quatro (ensaio CABMV, 60 minutos) e um transcrito (ensaio CPSMV, 60 minutos) foram induzidos. Nenhum transcrito VuSDGs e VuJMJs foi, porém, induzido após 16 h para ambos os ensaios. Esses resultados indicam que alguns elementos da família VuJMJs podem estar relacionados à resposta precoce de defesa do feijão-caupi à injúria e inoculação viral quando comparada à família VuSDG. Além disso, nossos resultados apontam possíveis alvos a serem explorados quanto a sua função em resposta a patógenos. O único transcrito VuJMJs induzido em resposta *crosstalk* sugere um possível envolvimento em resposta a múltiplos estresses. Estudos prévios têm mostrado a resposta das JMJs a condições adversas em espécies vegetais [75,17,19,18].

A classe V (VuSDGs), PKDM8 e Jmj-only (VuJMJs) destacaram-se por apresentar membros induzidos em pelo menos dois ensaios de transcriptômica analisados (desidratação radicular e injúria mecânica e inoculação de CABMV). A classe V de VuSDGs e PKDM8 de VuJMJs, são responsáveis por atuarem nos processos de metilação e demetilação da marca H3K9me, respectivamente [5,55]. Além disso, PKDM8 também pode atuar na demetilação de H3K36me, enquanto que a classe Jmj-only está associada a demetilação de H3K27me [60]. A marca H3K36me foi previamente relatada por participar da resistência a fitopatógenos, como o fitoplasma causador da doença vassoura de bruxa em *Paulownia fortunei* [19]. Já a marca H3K9me está envolvida na modulação de genes relacionados à defesa no feijão comum submetido ao fungo *Uromyces appendiculatus* [76]. Em trigo, foi relatada a participação dos genes TaSDG1a-7A (classe I) e TaSDG20-3D (classe V) na resposta de defesa a diferentes estresses, incluindo estresse hídrico, calor e resistência à ferrugem da folha causada pelo *Puccinia recondita* [29]. Esses genes estão associados à metilação de H3K9 e H3K27. Sugere-se, portanto, que os genes VuSDGs e VuJMJs envolvidos na (de)metilação das marcas H3K9me, H3K36me e H3K27me podem atuar na regulação de genes relacionados as vias de resposta de defesa aos estresses bióticos e abiótico em feijão-caupi.

5. Conclusões

O presente trabalho fornece um panorama das famílias SDGs e JMJs em *V. unguiculata*, bem como informações valiosas acerca da caracterização funcional dessas famílias gênicas na leguminosa em questão. Os genes VuSDGs e VuJMJs, classificados em sete e seis classes, respectivamente, apresentam uma ampla variação na estrutura gênica. Os mecanismos de duplicação dispersas e WGD/segmental possivelmente desempenham um papel crucial na expansão desses genes durante a evolução do feijão-caupi, sendo a duplicação dispersa a mais predominante para ambas as famílias gênicas. Adicionalmente, nossos resultados lançam luz sob novas perspectivas de estudos relacionados a função dessas proteínas em outras espécies vegetais. A identificação dos

elementos cis-regulatórios e a análise de transcriptômica dos VuSDGs e VuJMJs revelam, por sua vez, que esses genes podem estar envolvidos na resposta vegetal a diversos estresses bióticos e abióticos, além daqueles aqui analisados. O perfil de expressão diferencial dos VuSDGs e VuJMJs revelou que, em feijão-caupi, essas famílias gênicas são responsivas tanto ao estresse de desidratação radicular quanto à resposta precoce de defesa a vírus, com um gene VuJMJS envolvido na resposta a mais de um estresse, indicando um possível crosstalk nessas respostas. Nossos dados fornecem informações valiosas acerca do papel de VuSDGs e VuJMJs nos processos moleculares e fisiológicos nessa espécie, sugerindo potenciais alvos biotecnológicos na resposta de defesa do feijão-caupi. Estudos adicionais são, portanto, necessários para confirmar a funcionalidade desses genes nos processos de (de)metilação de histonas e sua atuação frente à resposta de defesa dessa espécie economicamente importante.

Contribuições dos Autores: AB-I projetou os experimentos. JF-N e RO-S realizaram os experimentos. JV, JF-N e RO-S realizaram os experimentos de laboratório e analisaram os dados. A AB-I obteve os recursos financeiros. AB-I, JV e JF-N escreveram o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Fincanciamento: Esse trabalho foi apoiado pela “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES, Brazil, BioComputational Program 3377/2013; número do processo: 23038.010050/2013-04) por meio de AB-I.

Disponibilidade de dados: O conjunto de dados gerados para esse estudo podem ser encontrados online. Os nomes dos repositórios e número de acesso podem ser encontrados em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Root dehydration | BioProject ID: PRJNA605156; Mechanical injury + CABMV | BioProject ID: PRJNA655993; Mechanical injury + MV | BioProject ID: PRJNA656211.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio das bolsas de pesquisa.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Kornberg, R.D. Structure of Chromatin. *Ann. Rev. Biochem.* **1997**, v.46, p.932-954.
2. Ferreira-Neto, J.R.C.; Silva M.; Pandolfi, V.; Crovella, S.; Benko-Iseppon, A.; Kido, E. Epigenetic Signals on Plant Adaptation: a Biotic Stress Perspective. *Curr Protein Pept Sci*, **2017**, v.18, p.352–367.
3. Goldberg, A.D.; Allis, C.D.; Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. **2007**, v.128, p.635–8.
4. Pfluger, J.; Wagner, D. Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, v.10, p.645–652.
5. Ng, D.W.K.; Wang, T.; Chandrasekharan, M.B.; Aramayo, R.; Kertbundit, S.; Hall, T.C. Plant SET domain-containing proteins: Structure, function and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. **2007**, v.1769, p.316-329.
6. Bannister, A.J.; Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res*, **2011**, v.21, p.381–395.
7. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function. *Cell*, **2007**, v.128, p.693–705.

8. Chen, X.; Hu, Y.; Zhou, D.X. Epigenetic gene regulation by plant Jumonji group of histone demethylase. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, v.1809, p.421–426.
9. Elkins, J.M et al. Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha. *J. Biol. Chem.* **2003**, v.278, p.1802–1806.
10. Treweek, S.C.; McLaughlin, P.J.; Allshire, R.C. Methylation: lost in hydroxylation? *EMBO Rep.* **2005**, v.6, p.315–320.
11. Klose, R.J.; Kallin, E.M.; Zhang, Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat. Rev. Genet.* **2006**, v.7, p.715–727.
12. Yamane, K.; Toumazou, C.; Tsukada, Y.; Erdjument-Bromage, H.; Tempst, P.; Wong, J.; Zhang, Y. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell.* **2006**, v.125, p.483–495.
13. Tahiliani, M.; Mei, P.; Fang, R.; Leonor, T.; Rutenberg, M.; Shimizu, F.; Li J.; Rao, A.; Shi, Y. The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature.* **2007**, v.447, p.601–605.
14. Jones, M.A.; Morohashi, K.; Grotewold, E.; Harmer, S.L. Arabidopsis JMJD5/JMJ30 acts Independently of LUX ARRHYTHMO within the plant circadian clock to enable temperature compensation. *Front. Plant Sci.* **2019**, v.10, p.57.
15. Huang, S. et al. Arabidopsis histone H3K4 demethylase JMJ17 functions in dehydration stress response. *New Phytol.* **2019**, v.223, p.1372–1387.
16. Liu, G.; Khan, N.; Ma, X.; Hou, X. Identification, evolution, and expression profiling of histone lysine methylation moderators in *Brassica rapa*. *Plants (Basel, Switzerland)*, **2019**, v.8, p.526.
17. Qian, Y.; Chen, C.; Jiang, L.; Zhang, J.; Ren, Q. Genome-wide identification, classification and expression analysis of the JmjC domain-containing histone demethylase gene family in maize. *BMC Genom.* **2019**, v.20, p.256.
18. Sun, Z.; Wang, X.; Qiao, K.; Fan, S.; Ma, Q. Genome-wide analysis of JMJC histone demethylase family involved in salt-tolerance in *Gossypium hirsutum* L. *Plant Physiology and Biochemistry.* **2021**, v.158, p.420–433.
19. Yan, L.; Fan, G.; Li, X. Genome-wide analysis of three histone marks and gene expression in *Paulownia fortunei* with phytoplasma infection. *BMC Genomics*, **2019**, v.20, p.234
20. Huang, Y.; Liu, C.; Shen, W.; Ruan, Y. Phylogenetic analysis and classification of the Brassica rapa SET domain protein family. *BMC Plant Biol.* **2011**, v.11, p.1–16.
21. Lu, Z.; Huang, X.; Ouyang, Y.; Yao, J. Genome-wide identification, phylogenetic and co-expression analysis of OsSET gene family in rice. *PLoS ONE*, **2013**, v.8, e65426.
22. Aiese, C.R.; Sanseverino, W.; Cremona, G.; Ercolano, M.R.; Conicella, C.; Consiglio F.M. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: Gaining an insight into their developmental roles. *BMC Genomics* **2013**, v.14, p.57.
23. Qian, Y.; Xi, Y.; Cheng, B.; Zhu, S.; Kan, X. Identification and characterization of the SET domain gene family in maize. *Mol. Biol. Rep.* **2014**, v.41, p.1341–1354.
24. Xu, J.; Xu, H.; Liu, Y.; Wang, X.; Xu, Q.; Deng, X. Genome-wide identification of sweet orange (*Citrus sinensis*) histone modification gene families and their expression analysis during the fruit development and fruit-blue mold infection process. *Front. Plant Sci.* **2015**, v.6, p.607.
25. Han, Y.; Li, X.; Cheng, L.; Liu, Y.; Wang, H.; Ke, D.; Yuan, H.; Zhang, L.; Wang, L. Genome-wide analysis of soybean jmjC domain-containing proteins suggests evolutionary conservation following whole-genome duplication. *Frontiers in Plant Science*, **2016**, v.7, p.1800.
26. Fan, S.; Wang, J.; Lei, C.; Gao, C.; Yang, Y.; Li, Y.; An, N.; Zhang, D.; Han, M. Identification and characterization of histone modification gene family reveal their critical responses to flower induction in apple. *BMC Plant Biol*, **2018**, v.18, p.173.

27. Huang, Y. et al. Identification of SET domain-containing proteins in *Gossypium raimondii* and their response to high temperature stress. *Sci. Rep.* **2016**, v.6, p.1–12.
28. Zhang, J.; Feng, J.; Liu, W.; Ren, Z.; Zhao, J.; Pei, X.; Liu, Y.; Yang, D.; Ma, X. Characterization and stress response of the jmjc domain-containing histone demethylase gene family in the allotetraploid cotton species *Gossypium hirsutum*. *Plants (Basel, Switzerland)*, **2020**, v.9, p.1617.
29. atra, R. et al. Identification and characterization of SET domain family genes in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Sci Rep*, **2020**, v.10, p.14624.
30. Freire- Filho, F. R. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio-Norte, 1º ed. (2011).
31. Boukar, O.; Fatokun, C.A.; Huynh, B.L.; Roberts, P.A.; Close, T.J. Genomic tools in cowpea breeding programs: status and perspectives. *Frontiers in plant science*, **2016**, v.7, p.757.
32. Lonardi, S.; Muñoz-Amatriáin, M.; Liang, Q.; Shu, S.; Wanamaker, S.I.; Lo, S., et al. The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *The Plant Journal*, **2019**, v.98, p.767–782.
33. Larkin, M.A.; Blackshields, G.; Brown, N.P.; Chenna, R.; McGettigan, P.A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I.M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J.D.; Gibson, T.J.; Higgins, D.G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*. **2007**, v.21 p.2947-2948.
34. Saitou, N.; Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. **1987**, v.4, p.406–425.
35. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* **2016**, v.7, p.1870-1874.
36. Waterhouse, A.M.; Procter, J.B.; Martin, D.M.; Clamp, M.; Barton, G.J. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. **2009**, v.9, p.1189-91.
37. Bo, H.; Jinpu, J.; An-Yuan, G.; He, Z.; Jingchu, L.; Ge, G. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics*, **2015**, v.31(8), p.1296-1297.
38. Hiller, K.; Schobert, M.; Hundertmark, C.; Jahn, D.; Münch, R. JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res.* **2003**, v.31, p.3862-3865.
39. Yu, C.S.; Chen, Y.C.; Lu, C.H.; Hwang, J.K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, **2006**, v.64, p.643-651.
40. Wang, Y.; Tang, H.; DeBarry, J.D.; Tan, X.; Li, J.; Wang, X.; Lee, T.H.; Jin, H.; Marler, B.; Guo, H.; Kissinger, J.C.; Paterson, A.H. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res*, **2012**, v.40(7), e49.
41. Sonnhammer, E.L.; Östlund, G. InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic Acids Res.* **2015**, v.43, p.234-9.
42. Bailey, T.L.; Elkan, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *ISMB-94 Proceedings*, **1994**, p.28-36.
43. Gupta, S.; Stamatoyannopoulos, J.A.; Bailey, T.; Noble, W.S. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*, **2007**, v.8(2) R24.
44. Bastos, E.A.; Nascimento, S.P.D.; Silva, E.M.D.; Freire-Filho, F.R.; Gomide, R.L. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. *Rev. Ciênc. Agrônôm.* **2011**, v.42, p.100–107.
45. Rodrigues, E.V.; Damasceno-Silva, K.J.; Rocha, M.M.; Bastos, E.A.; Teodoro, P.E., et al. Selection of cowpea populations tolerant to water deficit by selection index. *Rev. Ciênc. Agrôn.* **2017**, v.48, p.889–896.
46. Rodrigues, F.A., et al. Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genet. Mol. Biol.* **2012**, v.35, p.304–314.

47. Hoagland, D.R.; Arnon, D.I. The Water-Culture Method for Growing Plants Without soil. Circular. California Agricultural Experiment Station 347. (1950). Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19500302257> (acessado 20 fevereiro, 2021).
48. Rocha, M.M.; Lima, J.A.A.; Freire-Filho, F.R.R.; Lima, V.C.V. Resistencia de Caupi de Tegumento Branco a Algumas Estirpes de Comovirus, Potyvirus e Cucumovirus. (1996) Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/53796> (acessado em 20 fevereiro, 2021).
49. Oliveira, C.R.R., et al. Reação de Genótipos de Feijão-caupi Revela Resistência às Coinfecções pelo Cucumber Mosaic virus, Cowpea aphid-borne Mosaic Virus e Cowpea Severe Mosaic Virus. (2012). Disponível em: <http://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/940785> (acessado em 20 fevereiro, 2021).
50. Cardoso, M.J.; Freire-Filho, F.R.; Athayde-Sobrinho, C. BR 14-mulato: Nova Cultivar de Feijão Macassar Para o Estado do Piauí. (1990). Teresina: Embrapa-UEPAE de Teresina, 4. (Comunicado Técnico, 48).
51. Barna, B.; Király, L. Host–pathogen relations: diseases caused by viruses, subviral organisms, and phytoplasmas. *Plant Toxicol.* **2004**, v.1, p.533–568.
52. Ferreira-Neto, J.R.C.; Borges, A.N. da C.; da Silva, M.D.; Morais, D.A. de L.; Bezerra-Neto, J.P.; Bourque, G.; Kido, E.A.; Benko-Iseppon, A.M. The Cowpea Kinome: Genomic and Transcriptomic Analysis Under Biotic and Abiotic Stresses. *Frontiers in Plant Science*, **2021**, v.12, p.1-22.
53. Amorim, L.L.B.; Ferreira-Neto, J.R.C.; Bezerra-Neto, J.P.; Pandolfi, V.; de Araujo, F.T.; da Silva Matos, M.K.; et al. Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. *Plant Methods*, **2018**, v.14, p.88
54. Pfaffl, M.W.; Horgan, G.W.; Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **2002**, v.30:e36.
55. Lu, F.; Li, G.; Cui, X.; Liu, C.; Wang, Xiu-Jie.; Cao, X. Comparative Analysis of JmjC Domain-containing Proteins Reveals the Potential Histone Demethylases in Arabidopsis and Rice. *Journal of Integrative Plant Biology*. **2008**, v.50, p.886-896.
56. Schmutz, J. et al. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature genetics*, **2014**, v.46, p.707-713.
57. Zimin, A.V.; Puiu, D.; Hall, R.; Kingan, S.; Clavijo, B.J.; Salzberg, S.L. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. *Gigascience*. **2017**, v.6, p.1-7.
58. Chen, D.H.; Qiu, H.L.; Huang, Y.; Zhang, L.; Si, J.P. Genome-wide identification and expression profiling of SET DOMAIN GROUP family in *Dendrobium catenatum*. *BMC Plant Biology*. **2020**, v.20, p.1-19.
59. Cheng, X.; Collins, R.E.; Zhang, X. Structural and sequence motifs of protein (histone) methylation enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **2005**, v.34, p.267–294.
60. Gan, E.S.; Xu, Y.; Ito, T. Dynamics of H3K27me3 methylation and demethylation in plant development. *Plant signaling & behavior*, **2015**, v.10, e1027851.
61. Liu, C.; Lu, F.; Cui, X.; Cao, X. Histone methylation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2010**, v.61, p.395–420.
62. Tsukada, Y.; Fang J.; Erdjument-Bromage, H.; Warren, M.E.; Borchers, C.H.; Tempst, P.; Zhang, Y. Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*, **2006**, v.439, p.811–816.
63. Rotili, D.; Mai, A. Targeting histone demethylases: a new avenue for the fight against cancer. *Genes Cancer*, **2011**, v.2, p.663–679.

64. Dong, Y. et al. Genome-wide identification and functional analysis of JmjC domain-containing genes in flower development of *Rosa chinensis*. *Plant Mol Biol*, **2020**, v.102, p.417–430.
65. Xu, G.; Guo, C.; Shan, H.; Kong, H. Divergence of duplicate genes in exon–intron structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **2012**, v.109, p.1187–1192.
66. Li, W. et al. Genome-wide analysis of SET-domain group histone methyltransferases in apple reveals their role in development and stress responses. *BMC Genomics*, **2021**, v.22, p.283.
67. Gu, T.; Han, Y.; Huang, R.; McAvoy, R.J.; Li, Y. Identification and characterization of histone lysine methylation modifiers in *Fragaria vesca*. *Sci. Rep.* **2016**, v.6, p.23581.
68. Cerbin, S.; Jiang, N. Duplication of host genes by transposable elements. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2018, v.49, p.63–69.
69. Kang, Y.J. et al. Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. *Scientific reports*, **2015**, v.5(1), p.1–8.
70. Kang, W.H.; Kim, S.; Lee, H.A.; Choi, D.; Yeom, S.I. Genome-wide analysis of Dof transcription factors reveals functional characteristics during development and response to biotic stresses in pepper. *Sci Rep*, **2016**, v.6, p.1–12.
71. Wen, C.L.; Cheng, Q.; Zhao, L.; Mao, A.; Yang, J.; Yu, S.; Weng, Y.; Xu, Y. Identification and characterisation of Dof transcription factors in the cucumber genome. *Sci Rep* **2016**, v.6, p.1–11.
72. He, Q.; Cai, H.; Bai, M.; Zhang, M.; Chen, F.; Huang, Y.; Priyadarshani, S.V.G.N.; Chai, M.; Liu, L.; Liu, Y.; Chen, H.; Qin, Y. A soybean bZIP transcription factor GmbZIP19 confers multiple biotic and abiotic stress responses in plant. *Int J Mol Sci.* **2020**, v.21, p.4701.
73. Yang, S.; Xu, K.; Chen, S.; Li, T.; Xia, H.; Chen, L.; Liu, H.; Luo, L. A stress-responsive bZIP transcription factor OsbZIP62 improves drought and oxidative tolerance in rice. *BMC Plant Biol.* **2019**, v.19, p.260.
74. Ramirez-Prado. et al. The Polycomb protein LHP1 regulates *Arabidopsis thaliana* stress responses through the repression of the MYC2-dependent branch of immunity. *Plant J.* **2019**, v.100, p.1118–1131.
75. Lee, S.; Fu, F.; Xu, S.; Lee, S.Y.; Yun, D.J, Mengiste, T. Global regulation of plant immunity by histone lysine methyl transferases. *Plant Cell.* **2016**, v.28, p.1640–61.
76. Ayyappan, V.; Kalavacharla, V.; Thimmapuram, J.; Bhide, K.P.; Sripathi, V.R.; Smolinski, T.G.; Manoharan, M.; Thurston, Y.; Todd, A.; Kingham, B. Genome Wide Profiling of Histone Modifications (H3K9me2 and H4K12ac) and Gene Expression in Rust (*Uromyces appendiculatus*) infected Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *PLoS ONE.* **2015**, v.10, e0132176.
77. Crespo-Salvador, Ó.; Sánchez-Giménez, L.; López-Galiano, M.J.; Fernández-Crespo, E.; Schalschi, L.; García-Robles, I.; Rausell, C.; Real, M.D.; González-Bosch, C. The histone marks signature in exonic and intronic regions is relevant in early response of tomato genes to *Botrytis cinerea* and in miRNA regulation. *Plants (Basel).* **2020**, v.9, p.300.

5 ARTIGO III**Artigo a ser submetido à revista*****Genes*****Fator de Impacto: 4.096**<https://www.mdpi.com/journal/genes>**Acetiltransferase e desacetilase de histonas em feijão-caupi: genômica estrutural e transcriptômica sob estresses**

Jéssica Barbara Vieira Viana^a, José Ribamar Costa Ferreira-Neto^a, Ana Maria Benko-Iseppon^{a,*}

^aDepartamento de Genética, Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil.

*Corresponding Author. Address: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Av. Prof. Moraes Rêgo 1235, CEP 50670-420, Recife, PE, Brazil; Tel: +55-81-2126-8569; Fax: +55-81-2126-8522; E-mail: ana.benko.iseppon@pq.cnpq.br (A.M. Benko-Iseppon)

Resumo: O papel da acetilação/deacetilação de histonas na regulação de diversos processos biológicos, incluindo resposta a condições ambientais e interações biológicas, tem sido amplamente descrito em vegetais. Esses processos são controlados pela ação das enzimas acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) de histonas. O presente estudo propôs realizar análises de genômica e transcriptômica de HATs e HDACs em *Vigna unguiculata* (feijão-caupi). As HATs e HDACs foram analisadas considerando suas características estruturais, distribuições em todo o genoma, mecanismos de expansão genômica, conservação entre outras espécies vegetais, além dos padrões de expressão frente a estresses abiótico (desidratação radicular) e bióticos (injúria mecânica seguida de inoculação viral CPSMV e CABMV). Caracterizou-se 15 HATs e 16 HDACs. Ambas as famílias gênicas foram classificadas em quatro classes distintas. A análise dos mecanismos de expansão dos genes VuHATs e VuHDACs, indicou que o mecanismo de duplicação dispersa foi predominante para a expansão de ambas famílias gênicas estudadas. Mecanismos de duplicação em tandem e WGD/Segmental também foram identificados. As razões Ka/Ks mostraram que todos os genes duplicados em tandem e WGD/Segmental estavam sob seleção purificadora. Um alto índice de conservação dessas enzimas foi encontrado nos membros de diferentes famílias vegetais, com destaque para as leguminosas *P. vulgaris* e *P. lunatus*. Os elementos cis-regulatórios presentes em promotores de VuHATs e VuHDACs foram associados a fatores de transcrição Dof-type, bHLH, bZIP e ZF-HD, os quais estão relacionados a resposta vegetal a condições adversas como agentes patogênicos (vírus e fungos) e seca. Por fim, os VuHATs e VuHDACs mostraram perfis de expressão diferencial sob diferentes estresses escrutinados, sendo observado uma maior participação desses genes na resposta ao estresse de desidratação radicular. Apenas um transcrito VuHDACs foi induzido em resposta a mais de um estresse analisado, sugerindo *crosstalk* desse transcrito em respostas à desidratação radicular e resposta precoce ao vírus CABMV. Esses resultados fornecem informações valiosas para pesquisas adicionais sobre a evolução e a função molecular de VuHATs e VuHDACs.

Palavras-chave: (de)acetilação de histonas; estresses (a)biótico; transcriptômica.

1. Introdução

Em organismos eucariotos, o DNA genômico encontra-se associado a proteínas histonas, formando uma estrutura denominada de cromatina. A unidade básica dessa associação, denominada de nucleossomo, compreende cerca de 147 pares de bases de DNA circundando um octâmero de histonas. Cada histona contém uma cauda N-terminal composta por resíduos de aminoácidos, os quais são substratos para uma variedade de modificações pós-traducionais, incluindo acetilação e desacetilação [1]. Em plantas, essas modificações desempenham papéis cruciais na regulação da expressão gênica durante processos desenvolvimentais e de resposta a estresses.

A acetilação de histonas em espécies vegetais é catalisada pelas enzimas acetiltransferases de histonas (HATs). Tal reação consiste na adição - catalisada por enzimas acetiltransferases de histonas (HATs) - de grupos acetil à resíduos específicos do aminoácido lisina (K^+), sendo eles: K9, K14, K18 e K23, da histona H3; e K5, K8, K12, K16 e K20, da histona H4 [2]. O mecanismo de acetilação de histonas neutraliza a carga positiva das lisinas localizadas na sua cauda N-terminal, reduzindo a interação do octâmero proteico com o DNA. Esse mecanismo altera a estrutura da cromatina,

tornando-a mais acessível à maquinaria transcricional (fatores de transcrição) [3]. Por outro lado, a desacetilação das histonas, mediada por desacetilases de histonas (HDACs), consiste na remoção dos grupos acetil das histonas, aumentando a interação dos componentes da cromatina e consequente repressão ou silenciamento de genes [4].

Em vegetais, as enzimas HATs são classificadas em quatro classes distintas com base na composição de domínios específicos, sendo: a) GNAT (HAG), composta por um domínio Acetiltransf_1 (PF00583), a qual inclui as subclasses de acetiltransferases semelhantes a GCN5, ELP3 e HAT1; b) MYST (HAM), que incluem um domínio MOZ-YBF2/SAS3-SAS2-TIP60 (MYSTs); c) HACs (CBP/HAC), semelhantes à proteína de ligação p300/CREB; e d) HAFs (TAFII250/HAF) relacionadas ao fator 1 associado à proteína de ligação a TATA [5]. As proteínas HDACs são classificadas em três classes distintas com base na similaridade de sequências: a) RPD3 / HDA1; b) SIR2; e c) HD2, desacetilases de histonas específicas de plantas [5].

As enzimas HATs e HDACs têm sido descritas como atores cruciais dos processos de regulação da expressão de genes que atuam em diferentes processos biológicos vegetais, incluindo resposta a condições adversas como: seca [6,7], frio [8], salinidade [9], ataque de patógenos [10], dentre outros. Estudos de genômica e transcriptômica dos genes codificadores de HATs e HDACs têm sido realizados em diversas espécies vegetais, como *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn [5], batata [11], videira [12], arroz [13], tomate [14], lichia [15], soja [16], algodão [8], trigo [17,10], dentre outras.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma das leguminosas mais consumidas mundialmente, apresentando alto teor proteico, aliado a uma excelente fonte de vitaminas, sais minerais e fibras [18]. No Brasil, associada à sua importância nutricional, essa cultura ainda apresenta um relevante impacto socioeconômico, representando uma das principais fontes de emprego e renda [18]. Apesar da sua reconhecida importância, o feijão-caupi apresenta severas perdas de produtividade quando cultivado sob condições desfavoráveis. Portanto, compreender os mecanismos de resposta de defesa do feijão-caupi a estresses ambientais, incluindo o papel das HATs e HDACs nesses mecanismos, contribuirá para o entendimento de sua fisiologia molecular e para ações de melhoramento agrônomico. No entanto, estudos envolvendo a identificação e caracterização, bem como a funcionalidade dos genes HATs e HDACs em *V. unguiculata* sob condições desfavoráveis são inexistentes.

O Cowpea Genomics (CpG), gerenciado pelo nosso grupo de pesquisa, é uma rede de biotecnologia que dispõe de dados transcriptômicos para cultivares tolerantes/resistentes do feijão-caupi submetidos a condições de desidratação radicular, injúria mecânica seguida de inoculação viral de CABMV (vírus do mosaico transmitido pelo afídeo do feijão-caupi) e CPSMV (vírus do mosaico severo do feijão-caupi). Além disso, o genoma de referência do feijão-caupi foi disponibilizado recentemente [19]. Esses dados de genômica e transcriptômica permitem a identificação e caracterização funcional dos genes HATs e HDACs em feijão-caupi sob diferentes condições adversas.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou analisar as famílias gênicas HATs e HDACs em feijão-caupi mediante abordagens de genômica estrutural e transcriptômica, esta última analisando dados RNA-Seq do CpG. Essas abordagens permitem traçar um panorama detalhado das HATs e HDACs no genoma do feijão-caupi bem como suas respectivas funcionalidades frente a condições desfavoráveis, oferecendo um significativo avanço na temática das ômicas dessas proteínas na leguminosa em questão.

2. Materiais e Métodos

2.1. Genômica

2.1.1 Identificação e mineração de loci codificadores de VuHAT e VuHDAC

Sequências previamente caracterizadas das famílias acetiltransferases e desacetilases de histonas, foram recuperadas dos bancos de dados NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e UniProt (<https://www.uniprot.org/>). Essas sequências, pertencentes às espécies *A. thaliana*, *Oryza sativa* L., *Zea mays* L., *Medicago truncatula* L., dentre outras, foram utilizadas na identificação de VuHAT (*Vigna unguiculata* acetiltransferases) e VuHDAC (*Vigna unguiculata* desacetilases) (**Material S1-2**) no genoma do feijão-caupi. Para isso, foram realizados alinhamentos BLASTp (e-value < e^{-10}) contra o proteoma putativo de feijão-caupi. Apenas a sequência de peptídeo mais longo (Vunguiculata_540_v1.2.protein_primaryTranscriptOnly.fa.gz; banco de dados Phytozome V13), para cada gene do feijão-caupi, foi usada. Os identificadores das proteínas recuperadas estão associados ao seu respectivo locus.

Para a confirmação da presença dos domínios conservados nos genes VuHAT e VuHDAC candidatos, os bancos de dados Pfam (pfam.xfam.org/) e Conserved Domain Database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>) foram utilizados. A mesma metodologia foi empregada para identificar os VuHAT e VuHDAC nas bibliotecas RNA-Seq do CpGC. Para os transcriptomas, além das sondas acima mencionadas também foram utilizadas sequências proteicas das VuHAT e VuHDAC identificadas e caracterizadas no genoma de *V. unguiculata*.

2.1.2. Classificação dos genes VuHAT e VuHDAC

Os genes VuHAT e VuHDAC identificados foram classificados com base em duas estratégias distintas:

a) identificação de domínios característicos das respectivas classes das famílias gênicas analisadas;

b) análise fenética, utilizando-se sequências proteicas curadas de *A. thaliana*, contendo os domínios característicos referente às diferentes classes de HAT e HDAC. Essas sequências foram alinhadas com as VuHAT e VuHDAC candidatas, utilizando ClustalW [20]. A árvore fenética foi obtida pelo método Neighbour Joining (NJ) [21], através do software MEGA 7, com bootstrap de 1000 repetições [22]. De acordo com a topologia da árvore fenética, as VuHAT e VuHDAC foram classificadas a partir de classificações previamente estabelecidas em *A. thaliana*.

Os genes VuHAT e VuHDAC candidatos que atenderam aos dois critérios de classificação descritos em ‘a’ e ‘b’ foram considerados como *bona-fide* VuHAT e VuHDAC.

2.1.3 Características dos genes VuHAT e VuHDAC

Para a caracterização dos genes VuHAT e VuHDAC, o Genestats script (<https://gist.github.com/darencard/fcb32168c243b92734e85c5f8b59a1c3>), foi utilizado, analisando-se os seguintes parâmetros: (1) comprimento da sequência transcrita; (2) número de éxons; (3) comprimento total da sequência dos éxons; (4) número de íntrons; (5) comprimento total da sequência dos íntrons; (6) número de CDS; (7) comprimento total da sequência CDS; (8) número de sequências 5' UTR; (9) comprimento total da sequência 5' UTR; (10) número de sequências 3' UTR e; (11) comprimento total da sequência 3' UTR. O número de domínios das famílias analisadas foi anotado de acordo

com a identificação realizada pelos bancos de dados Pfam e Conserved Domain Database (item 2.1.1).

As características estruturais dos VuHAT e VuHDAC foram graficamente representadas pelo site *Gene Structure Display Server* (GSDS 2.0) (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn>) [23].

2.1.4 Propriedades proteicas e predição da localização subcelular

O peso molecular (MW) e o ponto isoelétrico (pI) para todas as proteínas VuHAT e VuHDAC codificadas no genoma do feijão-caupi [19] foram preditos por meio da ferramenta online JVir Gel [24]. A localização subcelular das VuHAT e VuHDAC foram determinadas mediante emprego da ferramenta CELLO [25].

2.1.5 Mecanismos de expansão dos genes VuHAT e VuHDAC

Os mecanismos de duplicação associados à expansão das famílias gênicas aqui analisadas foram determinados via software MCScanX [26]. Os seguintes mecanismos foram categorizados: duplicação dispersa, em tandem, proximal, segmental (ou WGD/segmental). Genes que não apresentaram cópias duplicadas foram categorizados como singletons.

2.1.6 Taxas de substituições sinônimas (Ks) e não-sinônimas (Ka) para genes duplicados via mecanismos WGD/segmental e tandem

Ks e Ka, bem como a razão Ks/Ka, foram determinadas para genes que sofreram duplicações do tipo WGD/segmental ou tandem. Para tal, o software ClustalW 2.0 [20] foi utilizado para alinhar as sequências completas de genes codificadores de VuHAT e VuHDAC que foram duplicados via WGD/segmental ou tandem. Em seguida, as taxas de Ka e Ks foram calculadas, com base na tabela do código genético, via método Nei – Gojobori (modelo Jukes-Cantor), implementado no MEGA 7 [22].

A razão Ka/Ks é um indicador da pressão de seleção em genes ou regiões gênicas. Se o valor for inferior a '1', os pares de genes duplicados podem estar submetidos à seleção purificadora (também chamada de seleção negativa; resulta na conservação da sequência de aminoácidos). Se a razão Ka/Ks for igual a '1', significa que a seleção é neutra (ausência de seleção). Adicionalmente, se essa razão for maior que '1', significa que a seleção é positiva (o que leva ao surgimento de diferentes peptídeos).

2.1.7 Ortologia dos loci de VuHAT e VuHDAC em diferentes espécies de Viridiplantae

Para a identificação da ortologia, utilizou-se informações disponíveis na base de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). Na seção Biomart (interface BioMart alocada na base de dados Phytozome), foi criada uma query, em forma de lista, com as identidades dos genes analisados em relação a todos os genomas montados e anotados para as espécies de Viridiplantae.

Esse resultado foi oriundo de ações do software InParanoid [27], que usa scores de similaridade *pairwise* calculados utilizando o NCBI-Blast, entre dois proteomas completos para a construção de grupos ortólogos, seguindo os critérios de similaridade de [28].

2.1.8 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos

Sequências de regiões promotoras (1.0 kb) de genes codificadores de VuHAT e VuHDAC foram obtidas no banco de dados Phytozome v.12.1.6 (<https://phytozome.jgi.doe.gov>), via API (Application Programming Interface).

Os motivos (elementos cis-regulatórios candidatos, ou CCRES), em cada promotor, foram minerados via software MEME v5.0.3 (<http://meme-suite.org/tools/meme>) [29]. Para essa mineração dos CCRES, o modo clássico foi utilizado. Para cada motivo identificado, há um e-value correspondente. No presente trabalho, adotou-se o e-value $< 10^{-2}$ como ponto de corte para a caracterização de *bona fide* CCRES. O número máximo de motivos analisados foi 10, contendo entre seis a 50 nucleotídeos de extensão.

Para designar um determinado fator de transcrição (TF) aos *bona fide* CCRES minerados, o software TomTom v4.11.2 (<http://meme-suite.org/tools/tomtom>) [30], acoplado ao banco de dados JASPAR (file: JASPAR2018_CORE_plants_non-redundant), foi usado. Tal banco de dados apresenta informações sobre perfis de ligação de fatores de transcrição a CCRES experimentalmente validados. O software TomTom alinha os CCRES identificados pelo software MEME contra CCRES anotados da base de dados JASPAR. Os alinhamentos foram avaliados por meio dos critérios estatísticos p-value (cut-off $< 10^{-2}$) e q-value (false discovery rate, FDR cut-off $< 10^{-2}$). As identidades dos TFs associadas aos *bona fide* CCRES foram relacionadas ao melhor alinhamento obtido (best-hit).

2.2. Transcriptômica

2.2.1. Material biológico, desenho experimental e aplicação do estresse

2.2.1.1. Ensaio de desidratação radicular

Sementes de *V. unguiculata* cv. Pingo de Ouro (tolerante ao déficit hídrico e à seca; [31,32] foram tratadas com Thiram (*tetramethylthiuram disulfide*) a 0,05% (w/w) e germinadas durante dois dias, sob condições controladas (25 °C $\pm$ 1 °C de temperatura e 65% $\pm$ 5% de umidade relativa). Após isso, as mudas foram transferidas para um sistema hidropônico [33], contendo solução nutritiva aerada e balanceada com pH 6,6 [34]. As plântulas foram colocadas em suportes, de modo que as raízes das mudas ficassem completamente imersas na solução hidropônica. As plântulas foram cultivadas por três semanas (estágio de desenvolvimento V3) em casa de vegetação, sob fotoperíodo natural de aproximadamente 13/11 h de ciclo claro/escuro, temperatura de 30 $\pm$ 5 °C e 60 $\pm$ 10% de umidade relativa. Após esse período, o tratamento de desidratação da raiz foi iniciado, retirando-se a solução nutritiva das plantas tratadas. As raízes foram coletadas após 25 min (RD25), 75 min (RD75) e 150 min (RD150) após a remoção da solução. O tecido foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C, até extração do RNA. Cada acesso submetido ao tratamento continha seu respectivo controle negativo (Cont.25 'e Cont.150'), o qual foi mantido em solução nutritiva e posteriormente coletado. Foi realizado delineamento experimental fatorial (cultivar vs extensão do período de desidratação da raiz) com três RBs por condição analisada. Cada réplica biológica (RB) foi composta por dois indivíduos.

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

As sementes do genótipo 'Pingo de Ouro' do feijão-caupi (ID: Pingo_de_Ouro_1_2) foram formalmente obtidas do 'Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-caupi' do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA; Recife - Pernambuco - Brasil). O Prof. Dr. Antônio Félix da Costa (IPA) foi o responsável por identificar a espécie/genótipo.

2.2.1.2 Ensaio de injúria mecânica e inoculação viral

O experimento de injúria mecânica seguida de inoculação com os vírus CABMV (Cowpea aphid-borne mosaic virus) ou CPSMV (Cowpea severe mosaic virus) foi realizado, em condições controladas, em casa de vegetação no IPA. Para o ensaio com CABMV, foi utilizado o genótipo resistente IT85F-2687 [35,36]. Já para o ensaio com CPSMV, foi utilizado o genótipo resistente BR-14 Mulato [37]. O procedimento experimental para ambos os ensaios foi conduzido isoladamente, utilizando os mesmos processos e desenho experimental. Os acessos foram semeados e cultivados por 21 dias (estágio de desenvolvimento V3), sob fotoperíodo natural e temperatura variando entre 28 a 32 °C. Para a inoculação viral, as folhas componentes dos trifólios mais jovens foram previamente submetidas à injúria mecânica com carborundum (carbeto de silício), o que permitiu a penetração do vírus no interior do vegetal. Posteriormente, foi aplicado o inóculo viral nos respectivos genótipos. Cada tratamento continha seu respectivo controle negativo (sem injúria mecânica e sem inóculo viral). As coletas foram realizadas em dois tempos distintos após o tratamento injúria mecânica | inoculação viral: 60 minutos e 16 horas. Ao final de cada tempo, os tecidos foliares dos tratamentos e respectivos controles foram, imediatamente, coletados e congelados em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram armazenados a -80 °C, até extração do RNA total. O desenho experimental executado foi do tipo fatorial (cultivar vs extensão do período de inoculação), com três RBs por condição analisada, sendo cada RB composta por cinco plantas. Cada tratamento foi realizado em área isolada, a fim de evitar o impacto dos compostos voláteis utilizados para comunicação entre as plantas. As sementes dos genótipos 'IT85F-2687' e 'BR-14 Mulato' do feijão-caupi foram formalmente obtidas do 'Banco Ativo de Germoplasma de Feijão-caupi' do IPA. O Prof. Dr. Antônio Félix da Costa (IPA) foi o responsável por identificar a espécie/genótipo.

A expressão gênica diferencial dos dois ensaios apresentados neste item ocorreu em resposta a uma combinação de dois estresses: injúria mecânica e inoculação viral. Os vírus de plantas são incapazes de iniciar um processo infeccioso sem auxílio de uma injúria mecânica inicial, seja oriunda de um organismo vetor ou oriunda de práticas agrícolas, por exemplo. Segundo [38] os vírus que infectam vegetais não possuem receptores celulares específicos, diferentemente dos bacteriófagos e de vírus que infectam animais. Assim, o conjunto 'injúria mecânica e inoculação viral' visa simular o processo infeccioso em um ambiente natural.

2.2.2 Bibliotecas de RNA-Seq: síntese e sequenciamento

O RNA total foi isolado utilizando o kit 'SV Total RNA Isolation System' (Promega, US), seguindo as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do mesmo foram avaliadas por meio NanoDrop, gel de Agarose (1,5%) e pelo 'Agilent 2100 Bioanalyzer' (Agilent Technologies, EUA). Apenas as amostras de RNA com integridade (RIN) $\geq 8,0$ foram sequenciadas. O kit 'RNA-Seq TruSeq® Stranded LT-Set A' (RS-122-2101) (Illumina, San Diego, CA, EUA) foi utilizado para purificação do RNA mensageiro (mRNA) e para a construção de bibliotecas de DNA complementar (cDNA), de acordo com as instruções do fabricante. *Reads paired-end*, com extensão de 100 pb, foram geradas via sistema Illumina HiSeq 2500, empregando-se os seguintes kits: 'HiSeq® Rapid PE Cluster Kit v2' (PE-402-4002); 'SBS Kit v2' (200 Cycle; FC-402-4021); e 'TruSeq® Stranded mRNA LT - Set A' (RS-122-2101). O sequenciamento dos transcriptomas dos três genótipos de feijão-caupi foi realizado no Centro de Genômica Funcional da Universidade de São Paulo (São Paulo, Brasil).

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

As 12 bibliotecas de RNA-Seq sequenciadas para o ensaio de desidratação radicular foram agrupadas com as 12 bibliotecas do ensaio 'injúria mecânica e inoculação viral por CABMV', além de 12 do ensaio de 'injúria mecânica e inoculação viral por CPSMV'. Essa montagem conjunta permitiu obter transcritos maiores e mais robustos. Setenta e duas réplicas (12 bibliotecas para desidratação radicular + 12 bibliotecas para CABMV + 12 bibliotecas para CPSMV, com duas réplicas técnicas para cada ensaio) foram submetidas ao pipeline: as reads brutas foram montadas por meio do projeto GenPipes [39] 'RNA-Seq *de novo* pipeline' versão 3.1.3 - da Universidade McGill e Génome Québec Innovation Centre (C3G). Todas as análises de expressão gênica foram realizadas, de maneira independente, para cada ensaio (desidratação radicular; injúria mecânica + inoculação por CABMV; injúria mecânica + inoculação por CPSMV). Tal ação foi realizada pela ferramenta edgeR (Robinson et al., 2010), implementada no pipeline GenPipes. Os transcritos que apresentaram $-1 > \text{Log}_2\text{FC} > 1$, $p < 0,05$ e $\text{FDR} < 0,05$ foram considerados diferencialmente expressos.

3. Resultados

3.1. Genômica

3.1.1. Identificação e classificação de VuHAT e VuHDAC no genoma do feijão-caupi

Dezesseis genes codificadores de acetiltransferases de histonas (denominados VuHAT) foram identificados no genoma do feijão-caupi. Com base na identificação de domínios específicos e seguindo a classificação de *A. thaliana*, os 16 VuHATs foram inicialmente classificados em quatro classes distintas: GNAT; MYST (HAM); CBP/HAC; e TAFII250/HAF. A classe GNAT, representada por HAG, foi subdividida nas subclasses ELP3, HAT1, HPA2 e GCN5. O gene VuHAC apresentou, além do domínio catalítico Acetyltransf_1 (PF00583), um domínio BRCT (PF00533) não identificado na família em questão. Assim, não foi possível estabelecer uma classificação para esse gene. As informações específicas para os 16 VuHATs, incluindo seus IDs, classes/subclasses e domínios conservados estão apresentadas na **Tabela S1**.

A classificação das VuHATs baseada na identificação de domínios específicos foi validada a partir da análise fenética incluindo as sequências das proteínas VuHATs e sequências de HATs de *A. thaliana* (AtHATs). Os membros VuHATs foram agrupados em oito grupos distintos correspondentes às quatro classes de HATs (GNAT; MYST; CBP/HAC; e TAFII250/HAF), seguindo-se a classificação da família HAT em *A. thaliana* (**Figura 1**). Assim, foi possível validar a classificação dos membros VuHDACs previamente realizada a partir da identificação de domínios específicos. Um gene VuHAT não foi agrupado em nenhum grupo, sendo classificado como membro 'desconhecido' (UNK) e consequentemente retirado das análises posteriores. Os 15 VuHATs restantes foram classificados como *bona fide* VuHATs distribuídos entre as quatro classes distintas de HATs, sendo GNAT a mais abundante no genoma do feijão-caupi, com nove genes. Já a classe TAFII250/HAF foi a menos abundante, com apenas um gene.

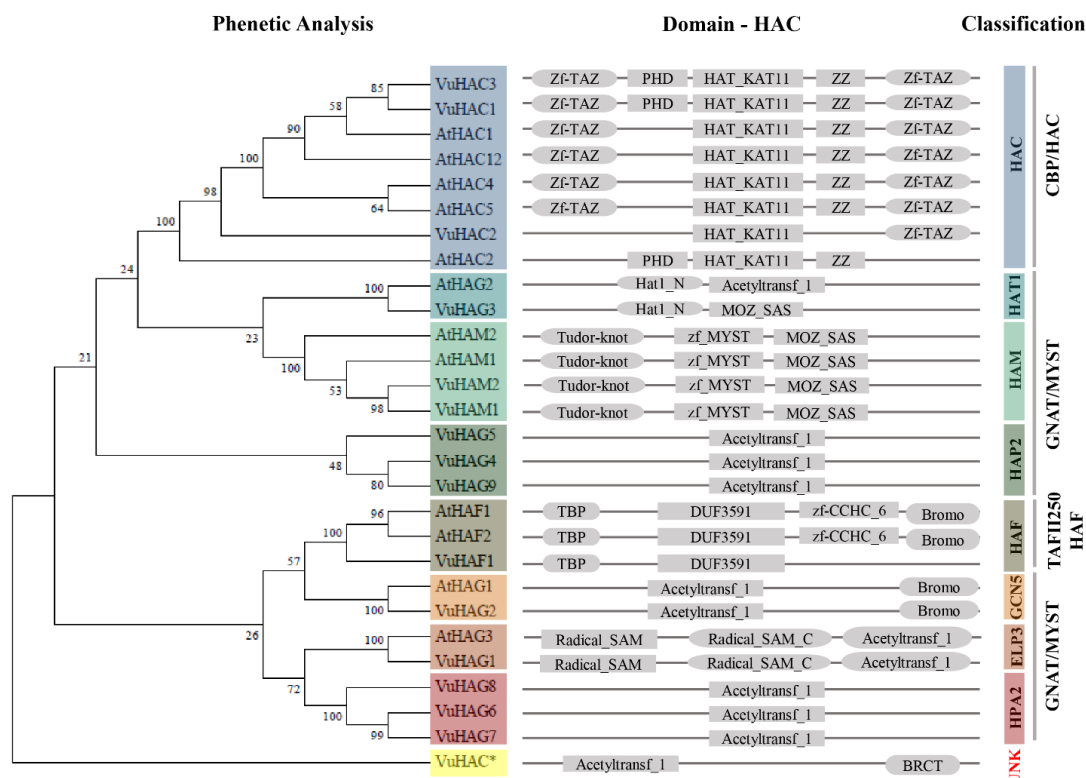


Figura 1. Árvore fenética geradas a partir das sequências das proteínas HAT de *Arabidopsis thaliana* e *Vigna unguiculata*. Cada classe está destacada em retângulos com cores diferentes. Formas geométricas na cor cinza representam os diferentes domínios das proteínas HAT ancorados nas sequencias analisadas. As subclasses e classes são, respetivamente, os elementos mais à direita da figura. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições).

Além do quantitativo exposto, foi possível identificar 17 genes codificadores de desacetilase de histonas. Tais genes foram descritos como VuHDAC. Com base na identificação de domínios específicos, os 17 VuHDACs foram classificados em três classes distintas: RPD3/HDA1; HD2; e SIR2. As informações específicas para os 17 VuHDACs, incluindo seus IDs, classes/subclasses e domínios conservados estão apresentadas na **Tabela S2**. A classificação realizada a partir da identificação de domínios específicos foi contrastada por uma análise fenética, incluindo as sequências das proteínas HDACs identificadas no genoma do feijão-caupi e sequências de *A. thaliana*. Os membros VuHDACs foram agrupados em quatro grupos correspondentes às três classes distintas (RPD3/HDA1; HD2; e SIR2), seguindo-se a classificação da família HDAC em *A. thaliana* (**Figura 2**). Assim, foi possível validar a classificação dos membros VuHDACs previamente realizada a partir da identificação de domínios específicos. O gene VuHDA12 apresentou divergência entre as classificações, sendo classificado como elemento ‘desconhecido’ (UNK). Dessa forma, tal gene foi retirado das análises subsequentes. Os 16 VuHDACs restantes foram classificados como *bona fide* VuHDACs distribuídos entre as três classes distintas de HDACs, sendo a classe RPD3/HDA1 a mais abundante no genoma do feijão-caupi, com 11 genes. Já a classe SIR2 foi a menos abundante, com dois genes.

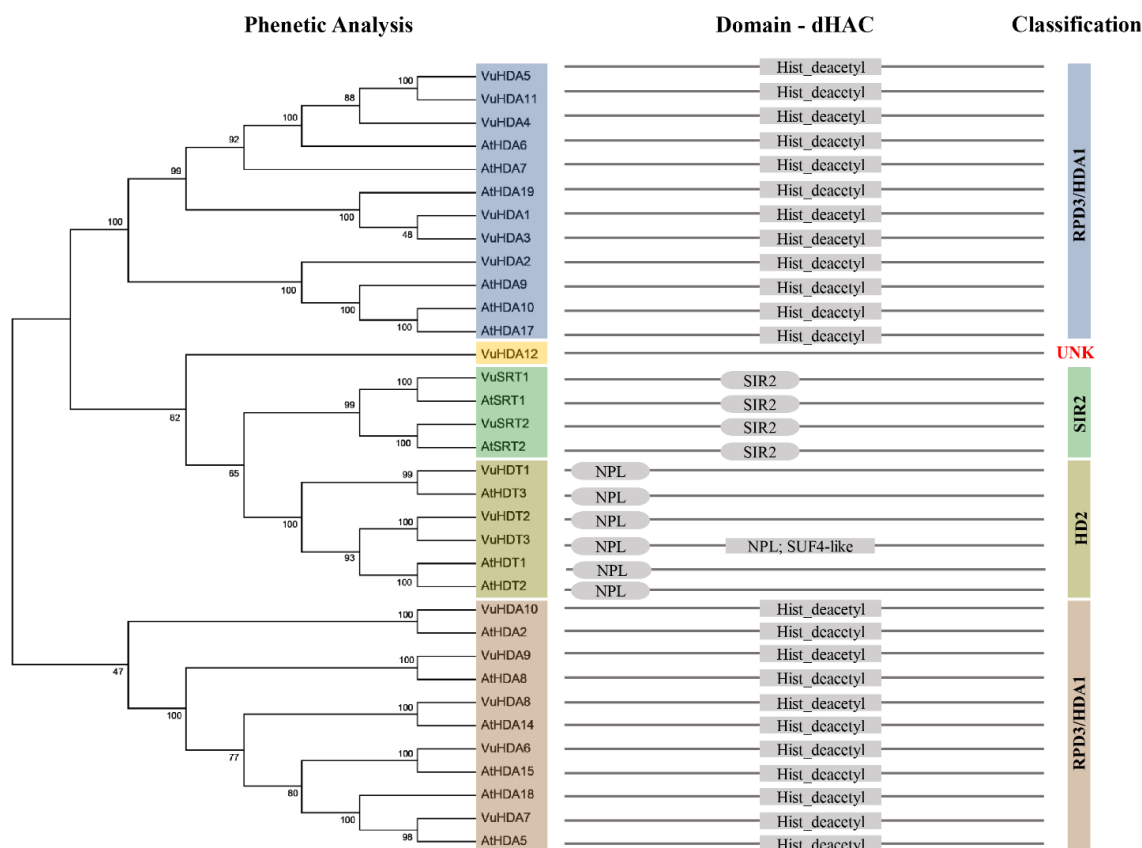


Figura 2. Árvore fenética geradas a partir das sequências das proteínas HDAC de *A. thaliana* e *V. unguiculata*. Cada classe está destacada em retângulos com cores diferentes. Formas geométricas na cor cinza representam os diferentes domínios das proteínas HDAT ancorados nas sequências analisadas. As subclasses e classes são, respectivamente, os elementos mais à direita da figura. Os valores nos nós representam o bootstrap (1000 repetições).

Com relação à distribuição genômica, os 15 VuHATs foram ancorados em nove dos 11 cromossomos do feijão-caupi, não sendo observados nos cromossomos 3 e 6 (**Tabela S3; Figura 3**). Alguns loci foram ancorados nas regiões terminais dos cromossomos 5, 8 e 10, como VuHAC1, VuHAG4 e VuHAC3, respectivamente. Além disso, quatro loci foram ancorados na região pericentromérica dos cromossomos 1, 2, 5 e 9 (VuHAM1, VuHAC2, VuHAG5 e VuHAG1, respectivamente). Já os 16 VuHDACs foram ancorados em oito dos 11 cromossomos do feijão-caupi, não sendo observados nos cromossomos 4, 7 e 10 (**Tabela S4; Figura 3**). Dois loci (VuHDA3 e VuHDA1) foram ancorados nas regiões terminais dos cromossomos 2 e 9. Os cromossomos 4, 7 e 10 foram ancorados apenas por genes VuHAT, enquanto que o cromossomo 6 foi ancorado exclusivamente por um gene VuHDACs (**Figura 3**).

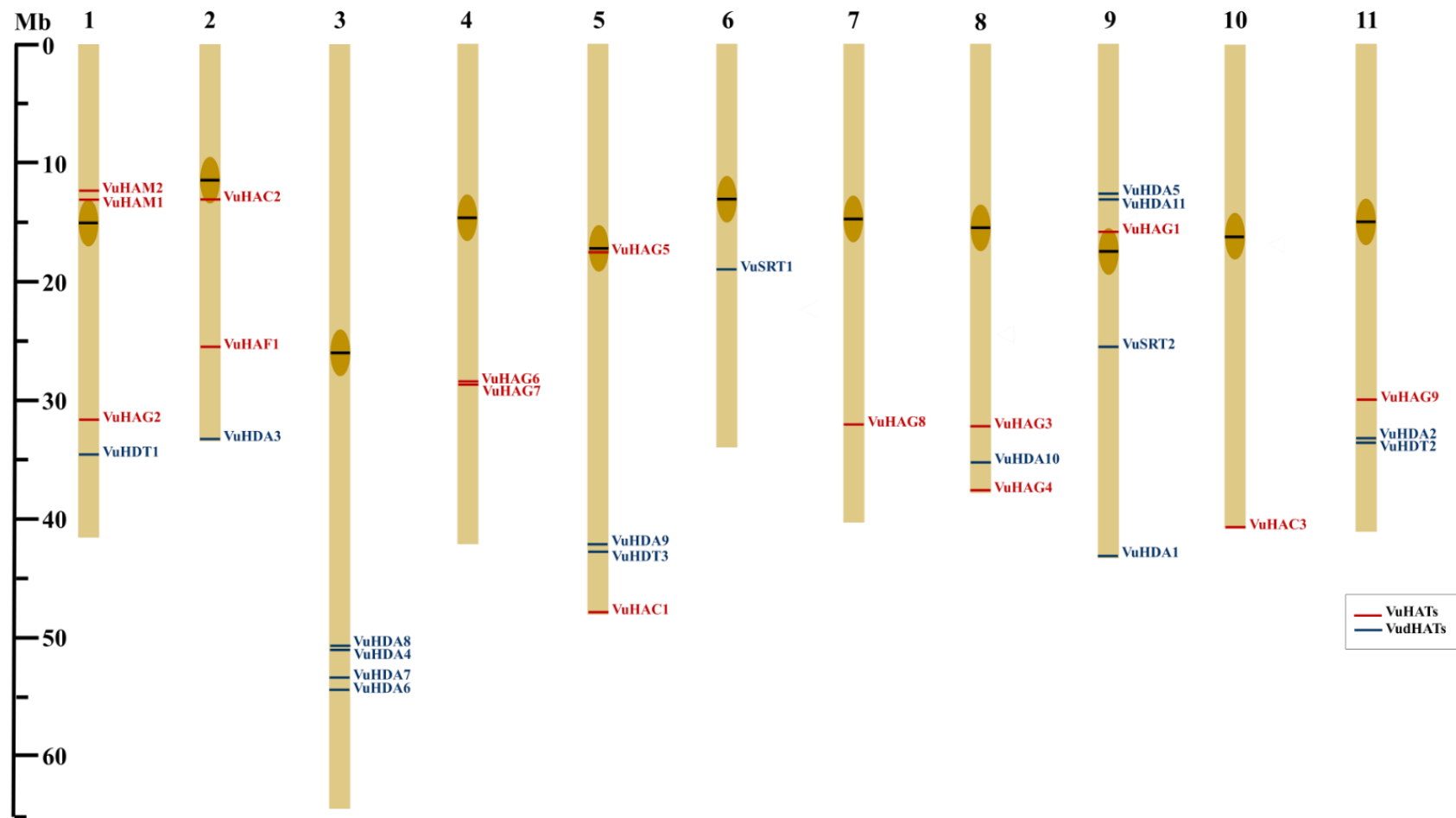


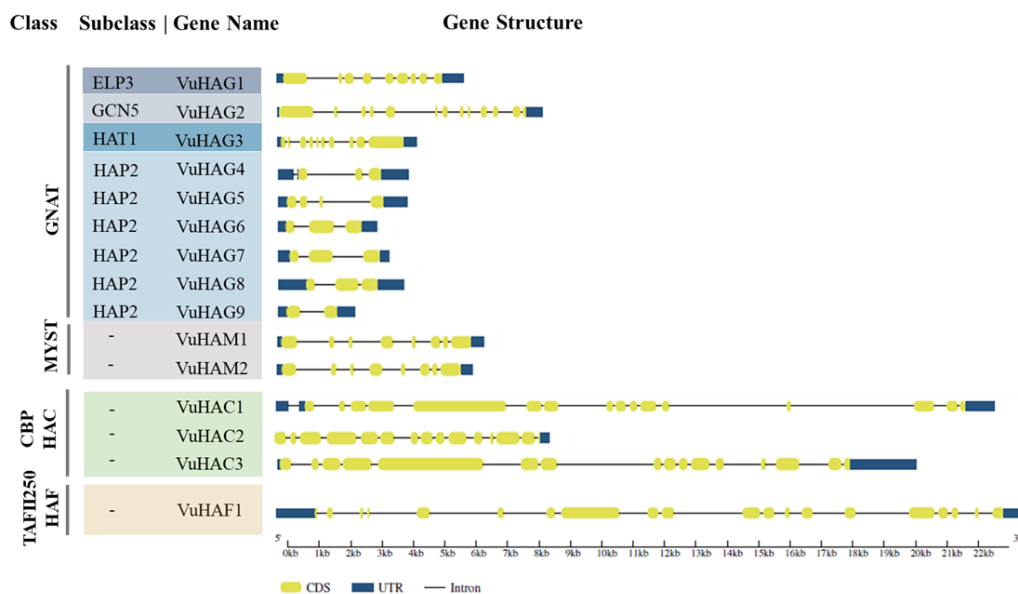
Figura 3. Distribuição cromossômica dos loci VuHATs e VuHDACs no genoma do feijão-caupi. As posições dos genes em questão estão indicadas ao longo dos cromossomos em nomes em vermelho (VuHATs) e em azul (VuHDACs). Os centrômeros dos 11 cromossomos de *V. unguiculata* estão representados por círculos em verde escuro. O tamanho de cada cromossomo está de acordo com a escala lateral esquerda, em Mb.

3.1.2 Estrutura dos genes VuHATs e VuHDACs e caracterização das propriedades das proteínas

Para a compreensão das características estruturais dos genes VuHATs e VuHDACs, 12 parâmetros foram analisados (**Tabela S5-6**). As estruturas gênicas (íntrons, CDS e regiões UTR) dos 15 VuHATs e 16 VuHDACs estão representadas esquematicamente na Figura 4. Esta seção abordará o número de éxons e íntrons, os quais são considerados mais informativos biologicamente.

Os genes VuHATs apresentaram diferentes números de éxons, variando de dois a 20 (**Tabela S5; Figura 4**). Esses genes apresentaram pelo menos um íntron em suas respectivas estruturas. A análise das características estruturais intraclases permitiu identificar que o número de éxons e íntrons apresentaram pouca variação dentro de cada classe. De maneira geral, as estruturas gênicas analisadas foram conservadas entre os genes agrupados na mesma classe (**Figura 4A, Tabela S5**). Na análise envolvendo os genes VuHDACs, também houve variação no número de éxons (3-18) e íntrons (2-17), sendo a classe RPD3/HDA1 a mais variável, com número de éxons variando de 3-18 e íntrons de 2-17 (**Figura 4B; Tabela S6**).

A.



B.

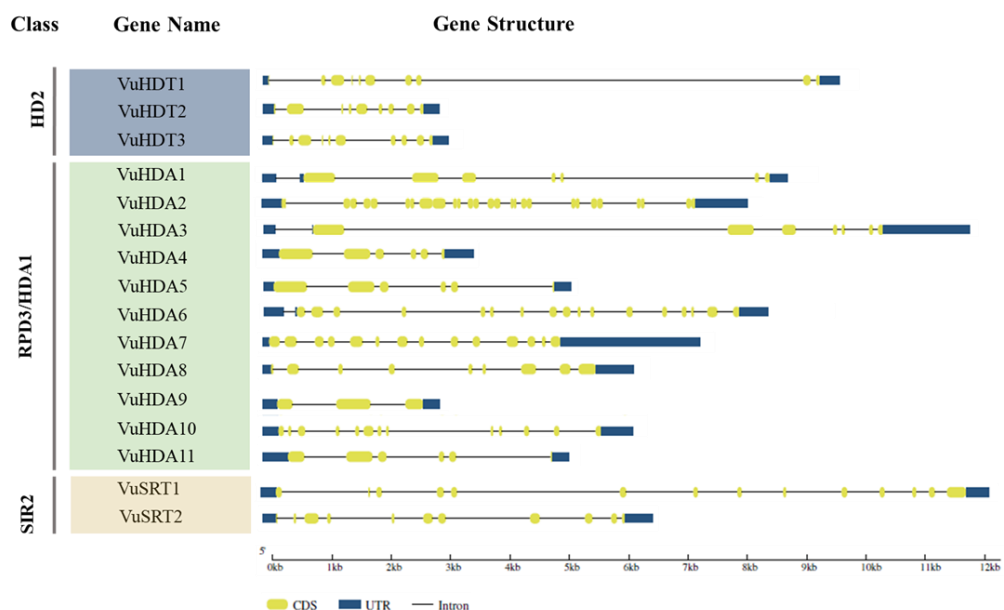


Figura 4. Estruturas gênicas dos genes VuHATs (A) e VuHDACs (B). Diferentes classes de VuHATs e VuHDACs estão identificadas em retângulos, sendo cada cor correspondente a uma classe específica. CDS, UTRs e íntrons estão representados por retângulos amarelo, retângulos azul e linhas pretas, respectivamente.

As 15 proteínas VuHATs apresentaram diversidade estrutural entre si. Os seus respectivos tamanhos variaram de 114 a 1725 aminoácidos. Os pIs das VuHATs variaram de 4,96 a 9,76, com MWs variando de 21,67 a 196,10 KDa. Quanto à localização subcelular, foi possível identificar a distribuição das VuHATs em quatro compartimentos celulares distintos: cloroplasto (três VuHATs), mitocôndria (três), membrana plasmática (uma) e núcleo (8) (Tabela S7).

Em relação às proteínas VuHDACs do feijão-caupi, foi observado uma diversidade estrutural entre si, com tamanhos variando de 297 a 656 resíduos de aminoácidos. Os pIs variaram de 4,45 a 9,04, enquanto os MWs variaram de 32,27 a 72,92 KDa. No que tange à distribuição subcelular predita, as proteínas VuHDACs foram distribuídas em maior quantidade no núcleo (9). Outros compartimentos celulares identificados para VuHDACs foram: citoplasma (quatro), cloroplasto (duas) e mitocôndria (uma) (**Tabela S8**).

3.1.3 Análise dos mecanismos de duplicação dos genes VuHATs e VuHDACs no genoma do feijão-caupi

De acordo com a análise dos mecanismos de duplicação, nenhum membro VuHATs teve origem a partir de mecanismos de duplicação proximal. Apenas quatro genes, pertencentes às classes GNAT e TAFII250/HAF, foram considerados singletons (**Figura 5A; Tabela S9**). Foi observado um evento de duplicação em tandem envolvendo dois genes VuHATs no genoma do feijão-caupi. Esses são pertencentes à classe GNAT (**Figura 5A**). Além disso, dois genes expandidos a partir do mecanismo de duplicação WGD/segmental foram identificados, ambos pertencentes à classe CBP/HAC (**Figura 5A**). Por fim, seis VuHATs foram duplicados por mecanismos de duplicação dispersa, sendo representados exclusivamente por membros das classes GNAT e MYST (**Figura 5A; Tabela Suplementar 11**). Esse mecanismo de duplicação foi responsável por 40% dos mecanismos de expansão dos VuHATs no genoma do feijão-caupi.

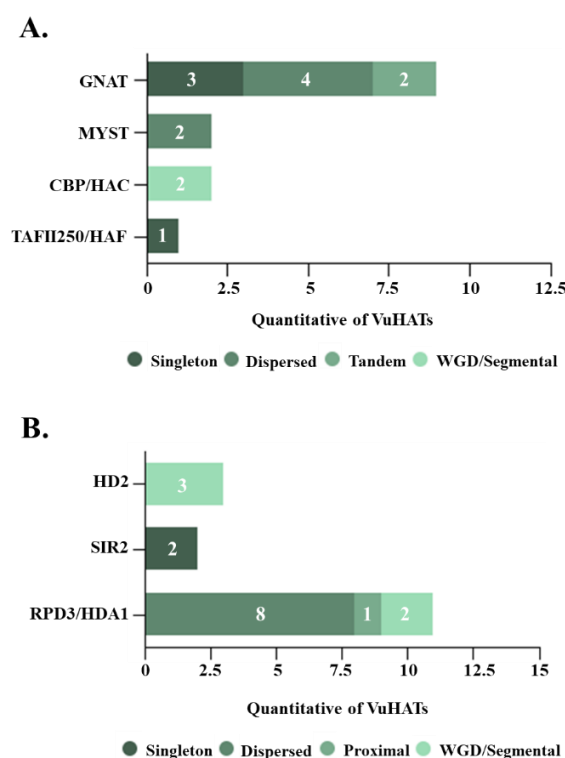


Figura 5. Quantificação dos principais mecanismos de expansão das diferentes classes das proteínas VuHATs (A) e VuHDACs (B) identificadas no genoma do feijão-caupi. O eixo x representa as diferentes classes de proteínas, enquanto o eixo y representa o seu quantitativo.

Em relação aos VuHDACs, nenhum membro teve origem a partir de mecanismos de duplicação em tandem. Apenas dois genes VuHDACs, pertencentes à classe SIR2, foi considerado singletons (**Figura 5B**). Um gene VuHDACs foi duplicado por mecanismo de duplicação proximal, sendo representado pela classe RPD3/HDA1. Quatro eventos de duplicação WGD/segmental envolvendo 5 genes VuHDACs foram observados no genoma do feijão-caupi (**Tabela S10**). Esses genes foram identificados nas classes HD2 e RPD3/HDA1 (**Figura 5B**). Adicionalmente, 8 genes VuHDACs tiveram origem por duplicação dispersa, sendo considerado o principal mecanismo de expansão dos VuHDACs no genoma do feijão-caupi.

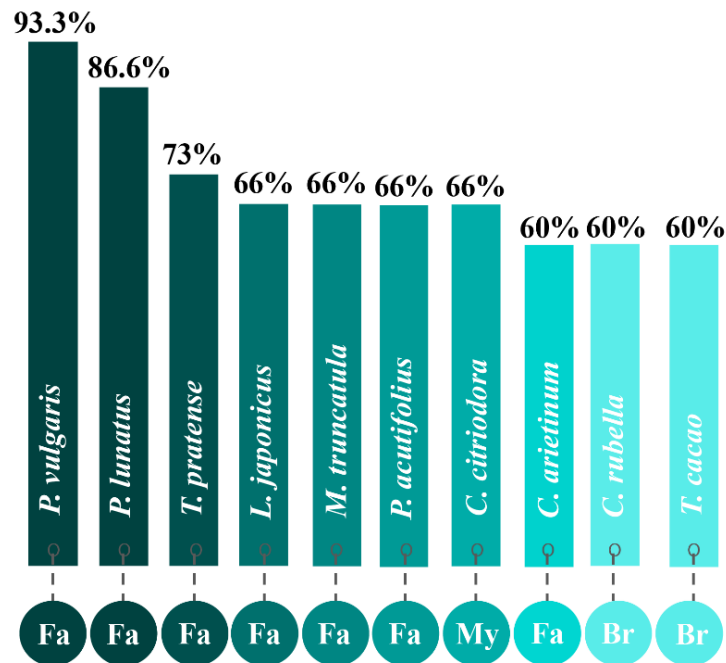
3.1.4 Análise de pressão de seleção de VuHATs e VuHDACs duplicados em tandem e WGD/segmental

A razão entre a taxa Ka (taxa de mutação não sinônima) e Ks (taxa de mutação sinônima) foi analisada para os genes VuHATs duplicados em tandem ou WGD/Segmental, bem como os quatro pares de genes VuHDACs duplicados por WGD/Segmental. Os valores de Ka/Ks para os VuHAT duplicados em tandem e WGD/Segmental foram, respectivamente, 0,40 e 0,19, enquanto que os VuHDACs variaram entre 0,72 e 0,88 (**Tabela S11**). Todos os pares de genes de VuHATs e VuHDACs analisados apresentaram $Ka/Ks < 1$, sugerindo que estão sob seleção purificadora.

3.1.5 Genômica comparativa dos genes VuHATs e VuHDACs

A análise de ortologia demonstrou conservação dos genes VuHATs e VuHDACs no genoma de várias espécies de Viridiplantae (**Tabela S12-13**). As 10 espécies com maiores níveis de ortologia com o feijão-caupi estão representadas na **Figura 6A-B**. Dentre os genomas analisados, as espécies da família Leguminosae destacaram-se por apresentar maiores índices de loci VuHATs ortólogos, sendo *Phaseolus vulgaris* L. (93,3%), *Phaseolus lunatus* L. (86,6%), *Trifolium pratense* L. (73%), *Phaseolus acutifolius* L. (66,6%), *Medicago truncatula* L. (66,6%), *Lotus japonicus* (Regel) K.Larsen (66,6%) e *Cicer arietinum* L. (60%) (**Figura 6A**).

A.



B.

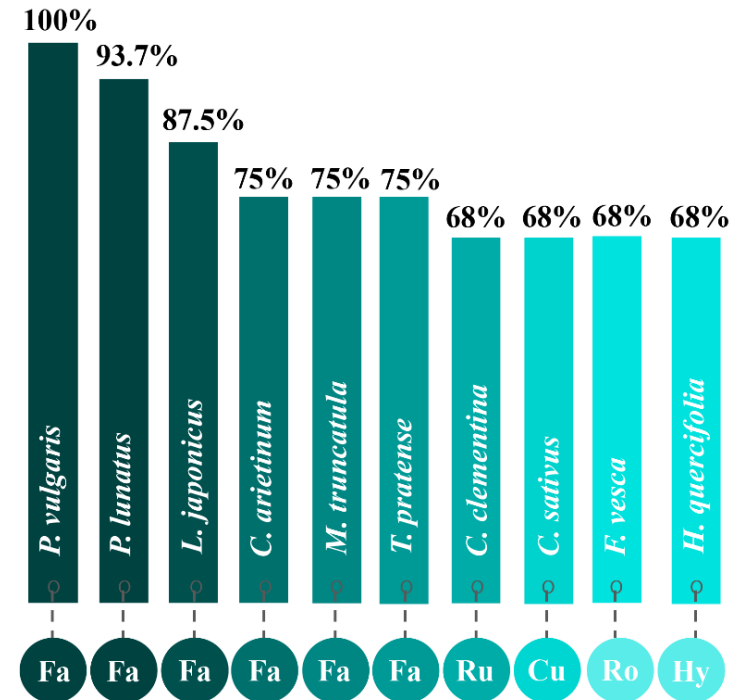


Figura 6. Quantificação dos loci conservados de HATs (A) e HDACs (B) entre as 10 espécies vegetais com maiores índices de ortologia no genoma do feijão-caupi. As famílias estão representadas por letras em círculos, sendo: Fa (Fabaceae); My (Myrtaceae); Br (Brassicaceae); Ru (Rutaceae); Cu (Cucurbitaceae); Ro (Rosaceae); Hy (Hydrangeaceae). As espécies analisadas estão indicadas no interior das barras, com cores diferentes. As porcentagens de ortologia gênica, em cada espécie analisada, em relação ao feijão-caupi, estão apresentadas acima das barras.

Na análise das VuHDACs, os 16 loci feijão-caupi apresentaram ortólogos no genoma da espécie *P. vulgaris* (100% de conservação). Assim como VuHATs, VuHDACs apresentaram maiores índices de ortólogos no genoma das espécies da família Leguminosae, sendo: *P. lunatus* (93,7%), *L. japonicus* (87,5%), *M. truncatula* (75%), *C. arietinum* (75%) e *T. pratense* (75%) (**Figura 6B**).

3.1.6 Mineração de CCREs nos promotores dos genes VuHATs e VuHDACs

Os genes que codificam HATs e HDACs em feijão-caupi tiveram seus promotores analisados em relação à identificação de CCREs (**Figura 7 e 8; Tabela S14**). Identificou-se dois *bona fide* CCREs nos promotores dos genes VuHATs. Esses elementos cis-regulatórios foram associados à classe de TFs C2H2, o qual pertence à família Dof-type (JASPAR ID MA1381.1; MA1274.1). O CCRE mais abundante foi identificado em 50 sítios distintos.

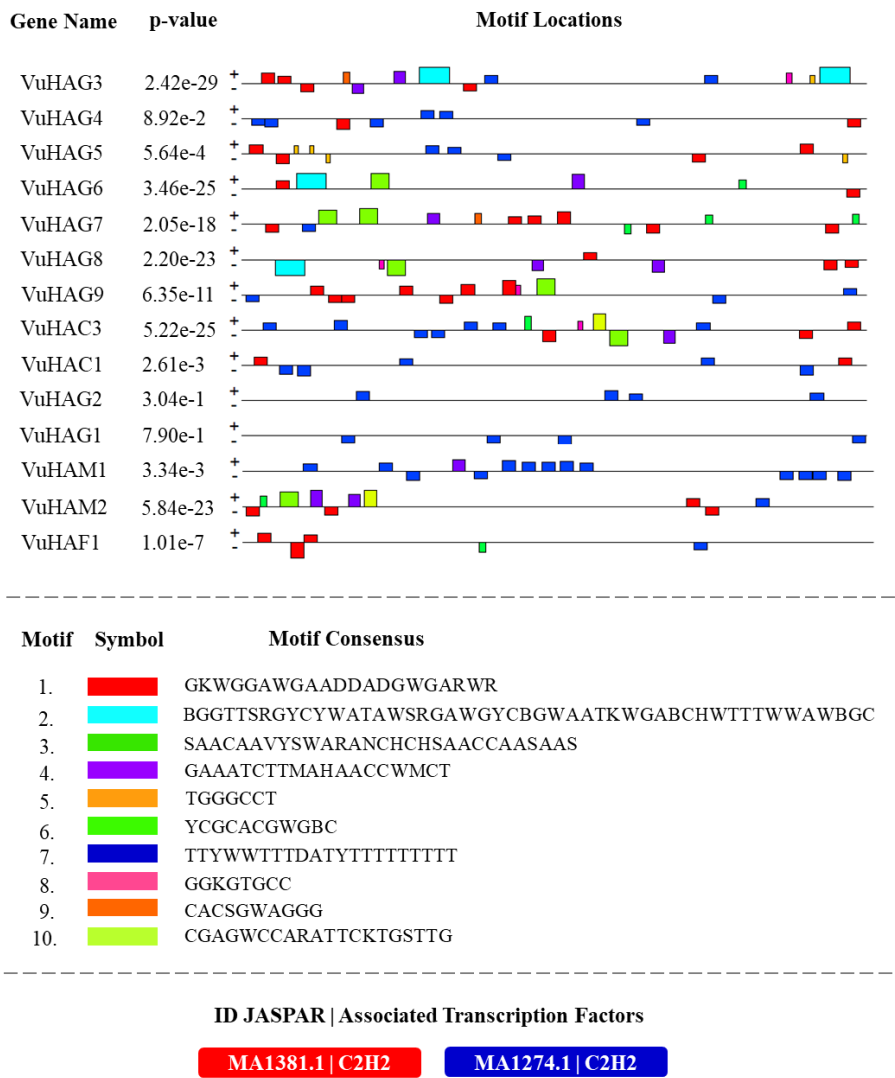


Figura 7. Localização e identificação dos CCREs, motivos consenso e TFs associados nos promotores dos genes VuHATs. No painel superior, para cada VuHATs analisado (esquerda), os motivos são identificados em toda sua extensão gênica. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, os CCREs bona fide estão representados por retângulos nas cores vermelho e azul escuro.

Já os promotores de VuHDACs apresentaram três *bona fide* CCRES associados às seguintes famílias de TFs: bHLH (JASPAR ID MA1050.1), bZIP (JASPAR ID MA1344.1) e ZF-HD (JASPAR ID MA1327.1), sendo os CCRES associados ao TF bHLH o mais abundante, identificado em 15 sítios (**Figura 8**).

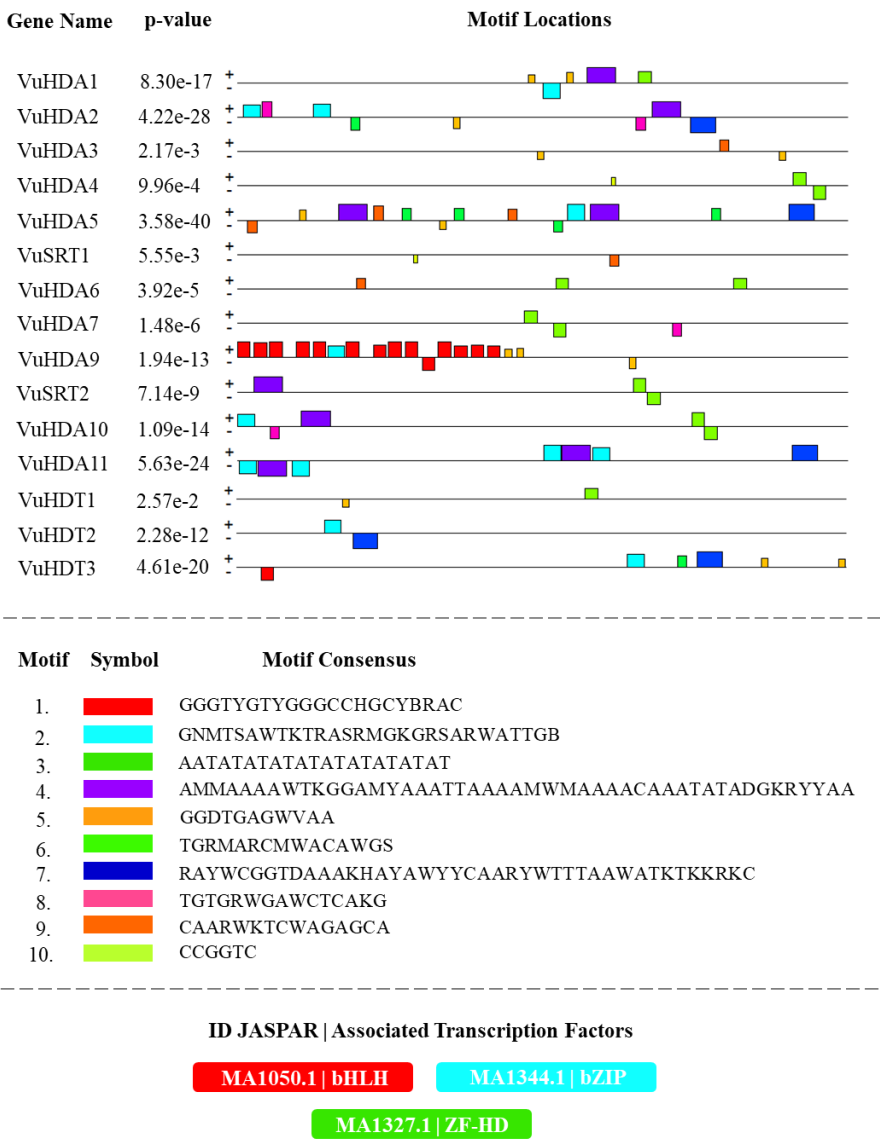


Figura 8. Localização e identificação dos CCRES, motivos consenso e TFs associados nos promotores dos genes VuHDACs. No painel superior, para cada VuHDACs analisado (esquerda), os motivos são identificados em toda sua extensão gênica. No painel central, o consenso dos motivos e suas respectivas simbologias (cores) são identificados. No painel inferior, os CCRES *bona fide* estão representados por retângulos nas cores vermelho, azul claro e verde.

3.2 Transcriptômica de VuHATs e VuHDACs

3.2.1 Ensaio de desidratação radicular

Para analisar a expressão dos transcritos VuHATs e VuHDACs no ensaio de desidratação radicular, dois tratamentos foram analisados, sendo eles: 25 minutos (RD25) e 150 minutos (RD150) após aplicação do estresse de desidratação radicular (**Figura 9**). Em

RD25, oito VuHATs foram diferencialmente expressos, sendo dois induzidos e seis reprimidos. Já em RD150, apenas transcritos induzidos foram identificados (7) (**Tabela S15; Figura 9A**). O quantitativo de transcritos induzidos foi superior em RD150, sugerindo uma maior participação desses transcritos em momentos mais intensos do estresse em questão. Cinco transcritos VuHATS foram compartilhados em ambos os tempos observados, sendo identificados como reprimidos no tratamento RD25 e induzidos em RD150.

Os transcritos VuHATs induzidos foram distribuídos em três classes distintas: CBP/HAC, GNAT e MYST, sendo GNAT e MYST observadas em ambos os tempos analisados. Em contraste, transcritos VuHATs da classe CBP/HAC foram induzidos exclusivamente no tratamento RD150, sugerindo uma resposta temporal específica.

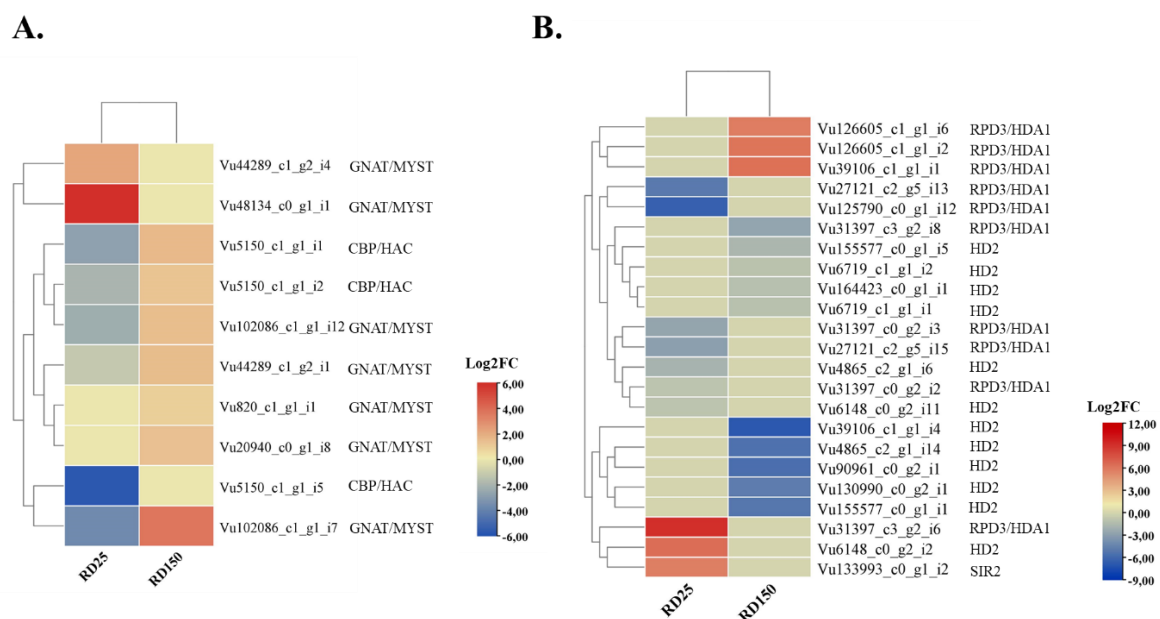


Figura 9. Heat-Map ilustrando a modulação dos transcritos que codificam VuHATs (A) e VuHDACs (B) diferencialmente expressos em ao menos um tratamento (RD25 ou RD150), após aplicação do estresse de desidratação radicular.

Para os VuHDACs, em RD25, 10 transcritos foram diferencialmente expressos, sendo três induzidos e sete reprimidos (**Figura 9B**). Em relação a RD150, 13 transcritos diferencialmente expressos foram identificados. Desses, três foram induzidos e 10 reprimidos. Os transcritos induzidos foram exclusivos em cada tratamento (RD25/RD150). As três classes de deacetilase de histonas apresentaram transcritos induzidos em resposta ao estresse de desidratação radicular, sendo elas: RPD3/HDA1; HD2; e SIR2. Dessas, apenas RPD3/HDA1 apresentou transcritos induzidos em ambos os tratamentos analisados (**Tabela S16**). Já as classes HD2 e SIR2 apresentaram transcritos exclusivamente induzidos em RD150. Adicionalmente, ressalta-se que, em RD150, nenhum VuHATs foi reprimido, enquanto maioria (~77%) dos VuHDACs foram reprimidos.

3.2.2 Ensaios de injúria mecânica seguida de inoculação viral

Nenhum transcrito VuHAT foi induzido para o tempo de 16 h em ambos os ensaios de injúria mecânica seguida de inoculação viral. Já no tempo de 60 minutos, apenas um

transcrito, pertencente à classe GNAT, foi induzido no ensaio de injúria mecânica e inoculação por CPSMV (**Tabela S15**). Não foi identificado nenhum transcrito VuHAT diferencialmente expresso no ensaio de injúria mecânica e inoculação por CABMV.

Em relação aos transcritos VuHDACs, não foi possível identificar transcritos diferencialmente expressos no ensaio de injúria mecânica e inoculação por CPSMV (**Tabela S16**). Já para o ensaio de injúria mecânica e inoculação por CABMV, um transcrito foi induzido em 60 minutos e outro reprimido no tratamento de 16 h. Esses resultados sugerem que ambas as famílias gênicas identificadas tendem a apresentar uma participação reduzida na resposta ao estresse de injúria mecânica seguida de inoculação viral em feijão-caupi.

3.2.3 *Crosstalk* entre os estresses de desidratação radicular e resposta precoce de defesa à CABMV e CPSMV

Os transcritos VuHATs diferencialmente expressos foram exclusivos para cada ensaio, não sendo observado transcritos diferencialmente expressos compartilhados (*crosstalk*). Em relação aos transcritos VuHDACs, um transcrito induzido no ensaio ‘injúria mecânica e inoculação de CABMV’ foi compartilhado com o ensaio de desidratação radicular, demonstrando sua participação na resposta a ambas condições mencionadas. No entanto, estudos adicionais são necessários para confirmar o possível papel desse transcrito.

4. Discussão

4.1 *Mineração e caracterização estrutural de VuHATs e VuHDACs no genoma do feijão-caupi*

As famílias dos genes HATs e HDACs vêm sendo identificadas e analisadas em diferentes espécies vegetais, como *A. thaliana* (12 HAT e 16 HDAC) [5], *Oryza. sativa* L. (oito HAT) [13], tomate (32 HATs e 15 HDAC) [40], lichia (seis HATs e 11 HDACs) [15], soja (28 HDACs) [16], *Quercus suber* L. (oito HAT e 22 HDAC) [41] e *Triticum aestivum* L. (31 HATs e 49 HDACs) [10,17]. O presente estudo identificou e caracterizou 15 genes VuHATs e 16 VuHDACs no genoma do feijão-caupi, sendo a primeira análise que abrange todos os genes HATs e HDACs de *V. unguiculata* (VuHATs e VuHDACs). Além disso, não há análises semelhantes para outras espécies de leguminosas. Entre as espécies com dados para HATs e HDACs, o número variável de genes dessas famílias gênicas pode estar associado às variações do tamanho do genoma e o nível de ploidia das espécies. O feijão-caupi, por exemplo, possui ($2n = 2x = 22$) tamanho do genoma estimado em 640 Mb [19] com 15 e 16 genes HATs e HDACs, respectivamente. Por sua vez, o trigo (*T. aestivum*) é reconhecidamente hexaploide com $2n = 6x = 42$, com genoma de ~16 Gb [42], compreendendo 31 HATs e 49 HDACs minerados.

Todos os genes VuHATs, bem como VuHDACs apresentaram pelo menos um íntron em suas respectivas estruturas, não sendo observado genes sem íntrons. Esses resultados sugerem que o ganho de íntrons pode estar diretamente relacionado à diversificação dessas famílias gênicas no feijão-caupi, o que pode resultar em uma variedade de funções. Fato semelhante foi previamente observado em outras espécies, como por exemplo trigo e algodão [43,10].

4.2 *Propriedades proteicas e predição da localização subcelular*

Os membros das famílias HATs e HDACs do feijão-caupi apresentaram diversos resultados em relação à predição de sua localização subcelular. No entanto, para ambas as

famílias gênicas houve predominância da localização nuclear, o que pode estar relacionado à sua função de adição/remoção de grupos acetil das histonas. Adicionalmente, alguns membros VuHATs e VuHDACs estavam preditos para o cloroplasto, o citoplasma, a membrana plasmática e a mitocôndria. Até o momento não há relatos da atuação das proteínas HATs e HDACs nos processos de (de)acetilação de outras proteínas. Essas proteínas localizadas em compartimentos celulares como, cloroplasto, mitocôndria, dentre outros devem ser exploradas quanto a sua possível atuação em diferentes compartimentos celulares. Resultados semelhantes foram encontrados para diferentes espécies vegetais como, tomate [14] e *Dendrobium officinale* Kimura & Migo [44].

4.3 Os mecanismos de duplicação dos genes VuHATs e VuHDACs no genoma do feijão-caupi

A duplicação gênica contribui significativamente para a expansão e evolução de famílias gênicas [45]. As duplicações em tandem por exemplo, representam mecanismos cruciais na geração de novas cópias de genes em clusters, podendo contribuir para diversidade de famílias gênicas [46]. Os eventos de duplicação WGD/segmental, por sua vez, podem dispersar de forma ampla cópias de um gene por todo o genoma, contribuindo para geração de novas subfamílias de genes bem como para evolução do genoma de determinada espécie [47]. Em feijão-caupi foi observado um evento de duplicação em tandem, bem como outro de WGD/segmental, envolvendo genes VuHATs. Além disso, quatro eventos de duplicação WGD/segmental envolvendo genes VuHDACs foram identificados. Esses resultados indicam que as duplicações em tandem e WGD/segmental desempenham papel importante no mecanismo de expansão das famílias HATs e HDACs em *V. unguiculata*. Adicionalmente, a duplicação dispersa apresentou significativa participação nos mecanismos de expansão das famílias gênicas HATs e HDCs no feijão-caupi, sendo responsável por 40 e 50%, respectivamente, dos mecanismos de expansão dessas famílias gênicas na espécie em análise. Esse mecanismo pode sofrer influência da ação de elementos transponíveis (TEs), os quais são considerados os principais agentes causais da expansão e evolução genômica [26,49]. Cerca de 39% do genoma do feijão-caupi é composto por elementos transponíveis, os quais são apontados como responsáveis pelas diferenças de tamanho dos genomas de espécies do gênero *Vigna* [19].

Em genética, a razão entre a taxa de substituição não sinônima (K_a) e a taxa de substituição sinônima (K_s) de dois genes codificadores de proteínas, é considerada um indicador do histórico de seleção de genes ou regiões gênicas, determinando se há pressão seletiva atuando no gene [50]. Essa razão foi analisada para VuHATs e VuHDACs que apresentaram duplicação em tandem e segmental. Todos os pares de VuSDGs e VuJMJs apresentaram $K_a/K_s < 1$, indicando que esses genes estão sob seleção purificadora. Esses resultados sugerem que os genes VuHATs e VuHDACs duplicados não divergiram muito durante a evolução, os quais mantiveram a conservação das suas sequências de aminoácidos. Tal processo reflete o papel importante desses genes, mantendo a funcionalidade de cópias duclicadas, indicando conservação ao longo da evolução.

4.4 Genômica comparativa de VuHATs e VuHDACs

A análise de ortologia gênica auxilia na predição da conservação e das funções de genes compartilhados entre diferentes táxons que evoluíram como resultado de eventos de especiação [5]. Os genes ortólogos são derivados de um único gene no último ancestral comum de duas ou mais espécies, permitindo que compartilhem as mesmas funções em

táxons recém-evoluídos [51]. Um alto índice de ortologia de VuHATs e VuHDACs foi observado entre os diversos genomas analisados, demonstrando uma conservação significativa desses genes no genoma de diferentes espécies vegetais. Esses resultados lançam luz para estudos relacionados à funcionalidade dessas proteínas nas espécies em que foram conservadas. Além disso, os índices de ortologia refletem a distância filogenética entre as espécies [52]. Como esperado, as espécies de leguminosas apresentaram os maiores índices de ortologia com o feijão-caupi, com destaque para o feijão comum, *P. vulgaris* (93,3 e 100% de conservação dos loci VuHATs e VuHDACs, respectivamente), o que se justifica pelo gênero *Phaseolus* ser considerado grupo irmão de *Vigna* que inclui o feijão-caupi.

4.5 Mineração e identificação de elementos cis-regulatórios candidatos

Os diferentes CCRES identificados no presente trabalho indicam uma diversidade de processos dos quais os genes VuHATs e VuHDACs podem participar. Tais processos são regulados por diferentes TFs. Os TFs C2H2 compreendem uma das maiores famílias de TFs em plantas, os quais desenvolvem papel crucial na regulação transcricional da resposta das plantas a condições de estresses abióticos como, estresse oxidativo, frio e seca, dentre outros. Além disso, diferentes CCRES foram associados às famílias de TFs bHLH, bZIP e ZF-HD, as quais estão relacionadas ao crescimento e desenvolvimento da planta [53], desenvolvimento de sementes [48] e resposta a diferentes estresses (seca [54], fitopatógenos [55], entre outros), sugerindo ampla funcionalidade dos VuHATs bem como VuHDACs na fisiologia molecular de feijão-caupi.

4.6 Transcriptômica de VuHATs e VuHDACs em feijão-caupi submetido a estresses biótico e abiótico

Os membros da família HAT bem como HDAC têm sido amplamente descritos como atores cruciais de diversos processos celulares em espécies vegetais. No entanto, a funcionalidade desses grupos proteicos em feijão-caupi ainda não havia sido analisada. No presente estudo, diferentes transcritos VuHATs e VuHDACs apresentaram expressão diferencial em resposta à desidratação radicular. Em relação aos VuHATs, um aumento de transcritos induzidos foi observado no tratamento RD150 quando comparado ao tratamento RD25. Ainda, cinco transcritos que apresentaram repressão transcricional no tratamento RD25 passaram a apresentar indução no tratamento RD150. Esses resultados sugerem uma especificidade temporal dos VuHATs na resposta à desidratação radicular. Propõe-se, portanto, que em feijão-caupi os transcritos VuHATs induzidos estão associados à regulação de genes que atuam na percepção e sinalização do estresse, bem como na resposta à desidratação radicular propriamente dita. Já os transcritos VuHDACs, apresentaram, em sua maioria, repressão transcricional.

Diversos estudos têm relatado que o estresse hídrico está relacionado à indução de diferentes padrões de expressão dos genes HATs e HDACs, resultando em mudanças nos níveis de acetilação de histonas dos genes de resposta à seca. No arroz, por exemplo, a expressão de genes HATs apresentou um aumento significativo após o tratamento da seca [7]. O mesmo fenômeno foi observado em repolho chinês e *B. dystachion* [56,57]. Em *Populus trichocarpa*, essa resposta de tolerância a seca mediada por HATs foi atribuída a um mecanismo resultante da ligação de proteínas à motivos do elemento responsivo ao ácido abscísico (ABRE) situados em promotores de TFs da família NAC, genes responsivos à seca. Esse mecanismo permite que genes HATs intensifiquem os níveis de acetilação e consequentemente aumentem significativamente a expressão dos genes NAC, conferindo maior tolerância à seca [58].

Além disso, diversos estudos têm demonstrado a participação de genes HDACs na regulação de genes responsivos à seca, sendo significativamente reprimidos após a

aplicação do estresse em diferentes espécies como, soja [16] e arroz [7]. Em contrapartida, genes HDACs induzidos relacionados a maior tolerância à seca em *A. thaliana* [59], choupó [60], tomate [61], *B. distachyon* [62] e algodão [6] foram observados. Em *A. thaliana*, um gene HDAC foi relatado como ator fundamental da via de sinalização do ácido jasmônico (JA), que em condições de seca apresentam uma regulação negativa, aumentando os níveis de acetilação e consequente ativação de genes que atuam na via de sinalização do JA [63]. Assim, sugere-se que a regulação negativa desses genes HDACs está associada ao processo de ativação de genes que atuam nas vias de sinalização hormonal na resposta de defesa propriamente dita do feijão-caupi ao déficit hídrico.

Apesar da sua reconhecida importância na resposta a estresses bióticos em feijão-caupi, a participação dos genes das famílias HATs e HDACs na resposta à injúria mecânica seguida de inoculação viral foi limitada nas condições aqui analisadas, apresentando apenas um transcrito VuHATs induzido em 60 minutos no ensaio de injúria mecânica e inoculação por CPSMV e um transcrito VuHDACs induzido em 60 minutos e outro reprimido no tratamento de 16 h no ensaio de injúria mecânica e inoculação por CABMV. Em outros estudos, as funções biológicas dos genes HATs e HDACs foram relatadas na resposta a vírus. Em trigo, por exemplo, genes HATs foram observados como atores cruciais na resposta de defesa da planta após a inoculação dos vírus BSMV (vírus do mosaico da faixa da cevada), CWMV (vírus do mosaico do trigo chinês) e WYMV (vírus do mosaico amarelo do trigo), apresentando um aumento significativo da expressão do 7 ao 16º dia após a inoculação viral. Essa resposta do trigo aos diferentes vírus foi atribuída à sinalização do hormônio etileno, sugerindo a participação dos genes HATs na regulação dos genes atuantes da via de sinalização desse hormônio [10].

Um transcrito VuHDAC induzido no ensaio ‘injúria mecânica e inoculação de CABMV’ foi compartilhado com o ensaio de desidratação radicular, demonstrando sua participação na resposta a ambas condições mencionadas. Esse *crosstalk* sugere um possível envolvimento desses transcritos em resposta a múltiplos estresses. Muitos estudos têm demonstrado a participação de HATs e HDACs na resposta a uma variedade de condições desfavoráveis [44,7,8,9,10], corroborando com os nossos dados da análise dos elementos cis-regulatórios e de expressão (RNA-Seq).

5. Conclusões

Quinze genes VuHATs e 16 VuHDACs foram identificados e caracterizados em todo o genoma do feijão-caupi. Esses genes VuHATs e VuHDACs foram classificados em quatro e três classes distintas, respectivamente, sendo observado uma conservação da estrutura dos genes pertencentes a uma mesma classe. Os mecanismos de duplicação dispersa, WGD/segmental e tandem desempenham um possível papel na expansão desses genes durante a evolução da leguminosa em questão, com destaque para duplicação dispersa, a qual predomina para ambas as famílias gênicas analisadas. Além disso, esses genes apresentam um alto índice de ortologia em diferentes espécies vegetais, especialmente com a leguminosa *P. vulgaris*. A identificação dos elementos cis-regulatórios e a análise de transcriptômica dos VuHATs e VuHDACs demonstram que esses genes podem estar atuando na resposta do vegetal a diversas condições desfavoráveis, além daquelas analisadas neste estudo. Em feijão-caupi, os genes VuHATs e VuHDACs apresentam uma maior participação na resposta ao estresse de desidratação radicular, com um gene VuHDAC envolvido na resposta a mais de um estresse, indicando um possível *crosstalk* nas respostas analisadas. Dessa forma, esse estudo fornece importantes alvos a serem explorados em futuras pesquisas funcionais na leguminosa feijão-caupi.

Contribuições dos Autores: AB-I projetou os experimentos. JF-N realizou os experimentos. AB-I obteve os recursos financeiros. AB-I, JV e JF-N escreveram o manuscrito. Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Fincanciamento: Esse trabalho foi apoiado pela “Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior” (CAPES, Brazil, BioComputational Program 3377/2013; número do processo: 23038.010050/2013-04) por meio de AB-I.

Disponibilidade de dados: O conjunto de dados gerados para esse estudo podem ser encontrados online. Os nomes dos repositórios e número de acesso podem ser encontrados em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, Root dehydration | BioProject ID: PRJNA605156; Mechanical injury + CABMV | BioProject ID: PRJNA655993; Mechanical injury + MV | BioProject ID: PRJNA656211.

Agradecimentos: Os autores agradecem o apoio da Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio das bolsas de pesquisa.

Conflito de interesses: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

- Berger S.L (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447:407–412.
- Fuchs, J; Demidov, D; Houben, A; Schubert, I. Chromosomal histone modification patterns – from conservation to diversity. *Trends Plant Sci*, 2006, v.11, p.199–208.
- Kim, XJM; Sasaki, T; Ueda, M; Sako, K; Seki, M. Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. *Front Plant Sci*, 2015, v.6, p.114.
- Hollender, C and Liu, Z. Histone deacetylase genes in Arabidopsis development. *J Integr Plant Biol*, 2008, v.50, p.875–885.
- Pandey, R; Müller, A; Napoli, CA; Selinger, DA; Pikaard, CS; Richards, EJ; Bender, J; Mount, DW; Jorgensen, RA. Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res*, 2002, v.30, p.5036.
- Zhang, JB; He, SP; Luo, JW; Wang, XP; Li, DD; Li, XB. A histone deacetylase, GhHDT4D, is positively involved in cotton response to drought stress. *Plant Mol Biol*, 2020 v.104, p.67–79.
- Hou, J; Ren, R; Xiao, H; Chen, Z; Yu, J; Zhang, H; Shi, Q; Hou, H; He, S; Li, L. Characteristic and evolution of HAT and HDAC genes in Gramineae genomes and their expression analysis under diverse stress in *Oryza sativa*. *Plant*, 2021, v.253, p.72.
- Imran, M; Shafiq, S; Naeem, MK; Widemann, E; Munir, MZ; Jensen, KB; Wang, RRC. Histone Deacetylase (HDAC) Gene Family in Allotetraploid Cotton and Its Diploid Progenitors: In Silico Identification, Molecular Characterization, and Gene Expression Analysis under Multiple Abiotic Stresses, DNA Damage and Phytohormone Treatments. *Int J Mol Sci*, 2020, v.21, p.321.
- Zheng, M; Lin, J; Liu, X; Chu, W; Li, J; Gao, Y; An, K; Song, W; Xin, M; Yao, Y et al. Histone acetyltransferase TaHAG1 acts as a crucial regulator to strengthen salt tolerance of hexaploid wheat. *Plant Physiol*, 2021, v.186, p.1951–1969.

10. Gao, S; Li, L; Han, X; Liu, T; Jin, P; Cai, L; Xu, M; Zhang, T; Zhang, F; Chen, J et al. Genome-wide identification of the histone acetyltransferase gene family in *Triticum aestivum*. *BMC Genomics*, 2021, v.22, p.1–17.
11. Lagacé, M; Chantha, SC; Major, G; Matton, DP. Fertilization induces strong accumulation of a histone deacetylase (HD2) and of other chromatin-remodeling proteins in restricted areas of the ovules. *Plant Mol Biol*, 2003, v.53, p.759–769.
12. Busconi, M; Reggi, S; Fogher, C; Bavaresco, L. Evidence of a sirtuin gene family in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Physiol Biochem PPB*, 2009, v.47, p.650–652.
13. Liu, X; Luo, M; Zhang, W; Zhao, J; Zhang, J; Wu, K; Tian, L; Duan, J. Histone acetyltransferases in rice (*Oryza sativa* L.): phylogenetic analysis, subcellular localization and expression. *BMC Plant Biol*, 2012, v.12, p.145.
14. Zhao, L; Lu, J; Zhang, J; Wu, PY; Yang, S; Wu, K. Identification and characterization of Histone deacetylases in Tomato (*Solanum Lycopersicum*). *Front Plant Sci*, 2015, 0:760.
15. Peng, M; Ying, P; Liu, X; Li, C; Xia, R; Li, J; Zhao, M. Genome-Wide Identification of Histone Modifiers and Their Expression Patterns during Fruit Abscission in Litchi. *Front Plant Sci* 2017, 0:639.
16. Yang, C; Shen, W; Chen, H; Chu, L; Xu, Y; Zhou, X; Liu, C; Chen, C; Zeng, J; Liu, J et al. Characterization and subcellular localization of histone deacetylases and their roles in response to abiotic stresses in soybean. *BMC Plant Biol*, 2018, v.18, p.226.
17. Jin, P; Gao, S; He, L; Xu, M; Zhang, T; Zhang, F; Jiang, Y; Liu, T; Yang, J; Yang, J et al. Genome-Wide Identification and Expression Analysis of the Histone Deacetylase Gene Family in Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plants*, 2021, v.10, p.1–19.
18. Freire Filho, F. R. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio-Norte, 1º ed. (2011).
19. Lonardi, S; Muñoz-Amatriaín, M; Liang, Q; Shu, S; Wanamaker, SI; Lo, S., et al. The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *The Plant Journal*, 2019, v.98, v.767–782.
20. Larkin, MA; Blackshields, G; Brown, NP; Chenna, R; McGettigan, PA; McWilliam, H; Higgins, DG. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 2007, v.23(21), p.2947–2948.
21. Saitou, N and Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. 1987, v.4, p.406–425.
22. Kumar, S; Stecher, G; Tamura, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 2016, v.33(7), p.1870–1874.
23. Guo, AY; Zhu, QH; Chen, X; Luo, JC. GSDS: a gene structure display server. *Yi chuan= Hereditas*, 2007, v.29(8), p.1023–1026.
24. Hiller, K; Schobert, M; Hundertmark, C; Jahn, D; Münch, R. JVirGel: calculation of virtual two-dimensional protein gels. *Nucleic Acids Res*. 2003, v.31, p.3862–3865.
25. Yu, CS; Chen, YC; Lu, CH; Hwang, JK. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2006, v.64(3), p.643–651.
26. Wang, Y; Tang, H; DeBarry, JD; Tan, X; Li, J; Wang, X; Lee, TH; Jin, H; Marler, B; Guo, H; Kissinger, JC; Paterson, AH. MCScanX: a toolkit for detection and evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic Acids Res*, 2012, v.40(7), e49.
27. Sonnhammer, EL; Östlund, G. InParanoid 8: orthology analysis between 273 proteomes, mostly eukaryotic. *Nucleic acids research*, 2015, v.43(D1), D234–D239.
29. Bailey, TL and Elkan, C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *ISMB-94 Proceedings*, 1994, p.28–36.
30. Gupta, S; Stamatoyannopoulos, JA; Bailey, TL; Noble, WS. Quantifying similarity between motifs. *Genome biology*, 2007, v.8(2), p1–9.
31. Bastos, EA; Nascimento, SPD; Silva, EMD., Freire Filho, FR; Gomide, RL. Identification of cowpea genotypes for drought tolerance. *Revista Ciência Agronômica*, 2011, v.42(1), p.100–107.

32. Rodrigues, EV; Damasceno-Silva, KJ; Rocha, MDM; Bastos, EA; Teodoro, PE. Selection of cowpea populations tolerant to water deficit by selection index. *Revista Ciência Agronômica*, 2017, v.48(5SPE), p.889-896.
33. Rodrigues, FA., et al. Subtractive libraries for prospecting differentially expressed genes in the soybean under water deficit. *Genet. Mol. Biol.* 2012, v.35, p.304–314.
34. Hoagland, DR and Arnon, DI. The water-culture method for growing plants without soil. Circular. *California agricultural experiment station*, 1950, 347(2nd edit).
35. Rocha, MM; Lima, JAA; Freire Filho, FR; LIMA, V. Resistencia de caupi de tegumento branco a algumas estirpes de comovirus, potyvirus e cucumovirus. In Embrapa Meio-Norte-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: Reuniao Nacional de Pesquisa De Caupi, 4., 1996, Teresina. Resumos. Teresina: EMBRAPA-CPAMN, 1996, p.100-101.
36. Oliveira, CRRD; Freire Filho, FR; Nogueira, MDSDR; Barros, GB; Eiras, M; Ribeiro, VQ; Lopes, ÂCDA. Reação de genótipos de feijão-caupi revela resistência às coinfeções pelo Cucumber mosaic virus, Cowpea aphid-borne mosaic virus e Cowpea severe mosaic virus. *Bragantia*, 2012, v.71(1), p.59-66.
37. Cardoso, MJ; Freire Filho, FR; Athayde Sobrinho, C. BR 14 MULATO: nova cultivar de feijão macassar para o Estado do Piauí. (1990). EMBRAPA-UEPAE de Teresina.
38. Barna, B and Király, L. Host–pathogen relations: diseases caused by viruses, subviral organisms, and phytoplasmas. *Plant Toxicology*, 2004, p.533–568.
39. Bourgey, M; Dali, R; Eveleigh, R; Chen, C; Letourneau, L; Fillon, J; Bourque, G. GenPipes: an open-source framework for distributed and scalable genomic analyses. *GigaScience*, 8(6), giz037.
40. Aiese Cigliano, R; Sanseverino, W; Cremona, G; Ercolano, MR; Conicella, C; Consiglio, FM. Genome-wide analysis of histone modifiers in tomato: gaining an insight into their developmental roles. *BMC Genomics*, 2013, v.141, p.14:1–20.
41. Silva, HG; Sobral, RS; Magalhães, AP; Morais-Cecílio, L; Costa, MMR. Genome-Wide Identification of Epigenetic Regulators in *Quercus suber* L. *Int J Mol Sci*, 2020, v.21, p.3783.
42. Zimin, AV; Puiu, D; Hall, R; Kingan, S; Clavijo, BJ; Salzberg, SL. The first near-complete assembly of the hexaploid bread wheat genome, *Triticum aestivum*. *Gigascience*. 2017, v.6, p.1-7.
43. Zhan, G; Lu, C; Guo, J; Qiao, Z; Sui, N; Qiu, N; Wang, B. C2H2 Zinc Finger Proteins: Master Regulators of Abiotic Stress Responses in Plants. *Front Plant Sci*, 2020, 0:115.
44. Zhang, M; Teixeira da Silva, JA; Yu, Z; Wang, H; Si, C; Zhao, C; He, C; Duan, J. Identification of histone deacetylase genes in *Dendrobium officinale* and their expression profiles under phytohormone and abiotic stress treatments. *PeerJ*. 2020, v.8, e10482
46. Cannon, SB; Mitra, A; Baumgarten, A; Young, ND; May, G. The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol*, 2004, v.4, p.10.
47. Baumgarten, A; Cannon, S; Spangler, R; May, G. Genome-level evolution of resistance genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2003, v.165, p.309.
48. Wang, Z; Zhu, J; Yuan, W; Wang, Y; Hu, P; Jiao, C; Xia, H; Wang, D; Cai, Q; Li, J et al. Genome-wide characterization of bZIP transcription factors and their expression patterns in response to drought and salinity stress in *Jatropha curcas*. *Int J Biol Macromol*, 2021, v.181, p.1207–1223.
49. Kang, YJ; Satyawar, D; Shim, S; Lee, T; Lee, J; Hwang, WJ; Lee, SH. Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. *Scientific reports*, 2015, v.5(1), p.1-8.
50. Hurst, LD. The Ka/Ks ratio: diagnosing the form of sequence evolution. *Trends Genet* 2002, v.18, p.486–487.
51. Das M; Haberer, G; Panda, A; Das Laha, S; Ghosh, TC; Schöffner, AR. Expression Pattern Similarities Support the Prediction of Orthologs Retaining Common Functions after Gene Duplication Events. *Plant Physiol*, 2016, v.171, p.2343–2357.

52. Kaló, P; Seres, A; Taylor, SA; Jakab, J; Kevei, Z; Kereszt, A; Endre, G; Ellis, THN; Kiss, GB. Comparative mapping between *Medicago sativa* and *Pisum sativum*. *Mol Genet Genomics*, 2004, v.272 p.235–246.
53. Zhang, TLVW; Zhang, H; Ma, L; Li, P; Ge, L; Li, G. Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize. *BMC Plant Biol*, 2018, v.18, p.1–14.
54. Agarwal, P; Baranwal, VK; Khurana, P. Genome-wide Analysis of bZIP Transcription Factors in wheat and Functional Characterization of a TabZIP under Abiotic Stress. *Sci Reports*, 2019, v.9, p.1–18.
55. He, Q; Cai, H; Bai, M; Zhang, M; Chen, F; Huang, Y; Priyadarshani, SVGN; Chai, M; Liu, L; Liu, Y; Chen, H; Qin, Y. A soybean bZIP transcription factor GmbZIP19 confers multiple biotic and abiotic stress responses in plant. *Int J Mol Sci*. 2020, v.21, p.4701.
56. Eom, SH and Hyun, TK. Histone Acetyltransferases (HATs) in Chinese Cabbage: Insights from Histone H3 Acetylation and Expression Profiling of HATs in Response to Abiotic Stresses. *J Am Soc Hortic Sci*, 2018, v.143, p.296–303.
57. Tan, S; Gao, L; Li, T; Chen, L. Phylogenetic and expression analysis of histone acetyltransferases in *Brachypodium distachyon*. *Genomics*, 2019, v.111, p.1966–1976.
58. Li, S; Lin, Y-CJ, Wang, P; Zhang, B; Li, M; Chen, S; Shi, R; Tunlaya-Anukit, S; Liu, X; Wang, Z et al. The AREB1 Transcription Factor Influences Histone Acetylation to Regulate Drought Responses and Tolerance in *Populus trichocarpa*. *Plant Cell*, 2019, v.31, p.663–686.
63. Kim, JM; To, TK; Matsui, A; Tanoi, K; Kobayashi, NI; Matsuda, F; Habu, Y; Ogawa, D; Sakamoto, T; Matsunaga, S et al. Acetate-mediated novel survival strategy against drought in plants. *Nature Plants*, 2017, v.3, p.17097.

6 DISCUSSÃO GERAL

Em plantas, os genes codificadores de enzimas que atuam nas modificações epigenéticas vêm sendo relatados como participantes de uma variedade de processos biológicos, incluindo resposta a diferentes condições ambientais. No entanto, estudos de ampla caracterização estrutural e funcional desses grupos proteicos na videira e em feijão-caupi ainda inexistem.

Com o sequenciamento e a disponibilidade de genomas completos, a identificação de modificadores epigenéticos tem sido executada em diversas espécies vegetais. No presente trabalho, foram identificadas metiltransferases (VvMTases) e demetilases (VvdMTases) de DNA no genoma da videira. Além disso, diferentes modificadores epigenéticos como, metilases e demetilases de histonas (VuSDGs e VuJMJs, respectivamente), acetilase e deacetilases de histonas (VuHATs e VuHDACs, respectivamente) foram identificados no genoma do feijão-caupi. Os números desses modificadores epigenéticos identificados no genoma de ambas as culturas analisadas são semelhantes aos descritos para outras espécies diploides como *A. thaliana*, arroz e milho, dentre outras.

A maioria desses modificadores epigenéticos exibiu conservação de suas estruturas gênicas, refletida na composição de seus domínios e motivos. A conservação dessas estruturas é uma característica essencial desses grupos proteicos, sendo observada em diversas espécies vegetais, como *A. thaliana* e soja, dentre outras. No entanto, algumas proteínas apresentaram alterações nessas estruturas, sugerindo possíveis diferenças na funcionalidade dessas proteínas, sem descartar uma possível especificidade estrutural desses grupos proteicos na videira e no feijão-caupi. Essas alterações devem ser exploradas quanto aos impactos que podem causar no desempenho de suas respectivas funções, sendo a conservação a regra em genes biologicamente essenciais.

A diversificação de uma família gênica está intimamente relacionada ao ganho ou perda de éxons e/ou íntrons, podendo resultar em especificidade de funções. Nossos resultados sugerem que o ganho de íntrons pode contribuir significativamente para diversificação estrutural e, possivelmente, funcional dos diferentes genes identificados nesse estudo. A maioria dos modificadores epigenéticos identificados na videira e no feijão-caupi apresentaram pelo menos um íntron em suas estruturas gênicas.

No que tange à localização subcelular, as proteínas das famílias gênicas analisadas apresentaram uma localização predominantemente nuclear. Essa localização foi consistente com as suas respectivas funções de catalisar os processos de (de)metilação do DNA, (de)metilação das histonas e (de)acetilação de histonas no núcleo da célula.

A duplicação gênica é um importante mecanismo na evolução das espécies vegetais, podendo contribuir significativamente para expansão de famílias gênicas, bem como para o surgimento de novas funções biológicas. No que tange às famílias (de)metilase de DNA, a duplicação WGD/segmental e em tandem foram as principais responsáveis pela expansão dessas famílias gênicas na videira. Esses tipos de duplicação são considerados os principais mecanismos evolutivos que resultam na expansão de (de)metilase de DNA em diferentes espécies vegetais. Por sua vez, a duplicação dispersa foi a principal responsável pela expansão das famílias (de)metilase e (de)acetilase de histonas no feijão-caupi, sugerindo que tal tipo de duplicação desempenha um papel significativo na expansão dessas famílias gênicas em espécies vegetais. Existem evidências de que esses genes duplicados por esse mecanismo podem ter surgido a partir da ação de elementos transponíveis (TEs), processo relatado em diversos organismos. Em vegetais superiores, o genoma é comumente composto por uma quantidade elevada de TEs, sendo o feijão-caupi composto por cerca de 39% de elementos transponíveis.

Um alto índice de homologia de VvMTases, VvdMTases, VuSDGs, VuJMJs, VuHATs e VuHDACs foi observado entre os genomas de diferentes espécies analisadas, demonstrando uma conservação significativa desses genes nos genomas analisados. Nossos resultados abrem novas perspectivas de estudos relacionados à função dessas proteínas nas espécies em que foram conservadas.

A mineração e a identificação de elementos cis-regulatórios (CCREs), ancorados em regiões promotoras dos modificadores epigenéticos analisados, permitiram a identificação de diversos CCREs *bona fide*, associados a diferentes fatores de transcrição como Dof-Type, bZIP e bHLH, dentre outros. Os CCREs *bona fide* descobertos podem ser usados para identificar possíveis processos fisiológicos ou adaptativos nos quais esses modificadores epigenéticos participam, associando TFs e seus processos biológicos intrínsecos. No caso dos

CCREs *bona fide* associados aos modificadores epigenéticos em questão, observa-se reconhecido envolvimento na resposta de plantas a estresses (como frio, seca e ataque patogênico) ou a outros processos fisiológicos (como desenvolvimento da planta), sugerindo uma possível participação desses modificadores epigenéticos da videira e do feijão-caupi nesses mecanismos.

A participação de modificadores epigenéticos na resposta aos estresses bióticos e abióticos tem sido bem documentada. Os dados de transcriptômica para os acessos Red Globe (suscetível) e IAC-572 (tolerante) da videira a Xcv não apresentam modulação significativa de VvMTases e VvdMTases na resposta da videira submetida à inoculação bacteriana, nas condições aqui analisadas. Considerando os dados da qPCR, fica evidente a participação de VvMTases e VvdMTases na resposta da videira à bactéria Xcv. Adicionalmente, foi possível observar uma maior indução de VvMTases e VvdMTases no genótipo tolerante quando comparado ao genótipo suscetível. Esses dados sugerem, portanto, que VvMTases e VvdMTases apresentam papel na regulação de genes associados à resposta do genótipo tolerante a Xcv, possivelmente conferindo ao genótipo em questão uma maior tolerância a Xcv.

Os dados de RNA-Seq do feijão-caupi apontam para uma maior participação de VuSDGs, VuJMJs, VuHATs e VuHDACs na resposta à desidratação radicular, quando comparada ao ensaio de injúria mecânica seguida de inoculação viral (CPSMV e CABMV). Diversos estudos têm demonstrado o papel desses modificadores epigenéticos na resposta à seca, como no presente caso.

Em suma, os resultados agregam valor ao entendimento da dinâmica desses modificadores epigenéticos na resposta de vegetais a estresses, evidenciando sua importância e pluralidade estrutural e funcional.

7 CONCLUSÕES

O número de genes codificantes de modificadores epigenéticos identificado no genoma de ambas as culturas analisadas são compatíveis ao observado em outras espécies vegetais com o mesmo nível de ploidia.

A maioria dos modificadores epigenéticos identificados nos genomas analisados apresenta, em sua estrutura, a configuração canônica conhecida em outras espécies vegetais, com as características essenciais para o desenvolvimento dos seus papéis. Um grupo reduzido, porém, não apresenta a estrutura esperada, indicando possíveis diferenças na funcionalidade dessas proteínas.

Mecanismos como duplicação dispersa, WGD/segmental e em tandem desempenham um possível papel na expansão dos genes analisados durante a evolução das espécies em questão. Além disso, os genes analisados apresentam um alto índice de ortologia em diferentes espécies vegetais.

A identificação dos elementos cis-regulatórios e a análise transcriptômica dos modificadores epigenéticos analisados demonstram que esses genes podem estar atuando na resposta do vegetal a diversas condições desfavoráveis, além daquelas analisadas neste estudo.

Os dados de transcriptômica para os acessos Red Globe (suscetível) e IAC-572 (tolerante) da videira a Xcv não apresentam modulação significativa de VvMTases e VvdMTases na videira submetida à inoculação bacteriana. No entanto, os dados da qPCR, demonstram a participação de VvMTases e VvdMTases na resposta da videira à bactéria Xcv, especialmente no genótipo tolerante. Já os dados de RNA-Seq do feijão-caupi, apontam para um maior número de VuSDGs, VuJMJs, VuHATs e VuHDACs induzidos sob desidratação radicular (estresse abiótico), quando comparado às condições bióticas analisadas (injúria mecânica + inoculação com os vírus CPSMV e CABMV). Tal fato agrega valor à dinâmica dos modificadores epigenéticos na fisiologia de vegetais, evidenciando sua pluralidade de ações.

REFERÊNCIAS

- ABID, G. et al. Analysis of DNA methylation patterns associated with stress response in faba bean (*Vicia faba* L.) using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Environmental and Experimental Botany**, v. 142, p. 34–44, 2017.
- AGIUS, F.; KAPOOR, A.; ZHU, J-K. Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 11796–11801, 2006.
- AHMAD, A.; ZHANG, Y.; CAO, X-F. Decoding the Epigenetic Language of Plant Development. **Molecular Plant**, v. 3, p. 719-728, 2010.
- AHN, C.; PARK, U.; PARK, P. B. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 415, n. 4, p. 669–674, 2011.
- ALMADA, R.; CABRERA, N.; CASARETTO, J. A.; PEÑA-CORTÉS, H.; RUIZ-LARA, S.; VILLANUEVA, G. Epigenetic Repressor-like Genes are Differentially Regulated During Grapevine (*Vitis vinifera* L.) **Development. Plant Cell Reports**, v. 30, p. 1959-1968, 2011.
- ANYIA, A. O.; HERZOG, H. Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. **Eur J Agron**, v. 20, p. 327–339, 2004.
- ARAUJO, J. S. P.; ROBBS, C. F. Sintomatologia, patogenicidade e controle do cancro bacteriano da videira (*Xanthomonas campestris* pv. *viticola*) no Brasil. **Agronomia (UFRRJ), Seropédica**, v. 34, p. 83-86, 2000.
- ARAÚJO, J. S. P. et al. Movimento sistêmico de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, p.53-54, 2002.
- ATHAYDE, S. C.; VIANA, F. M. P.; SANTOS, A. A. Doença do Feijão-caupi. In: Cardoso MJ (ed.) A cultura do feijão-caupi no Meio-Norte do Brasil. Teresina, Embrapa Meio-Norte, p. 157–177, 2000.
- BANNISTER, A. J.; KOUZARIDES, T. Regulation of Chromatin by Histone Modifications. **Cell Res**, v. 21, p. 381-395, 2011.
- BARÁNEK, M.; CECHOVÁ, J.; RADDOVÁ, J.; HOLEINOVÁ, V.; ONDRUSÍKOVÁ, E.; PIDRA, M. Dynamics and Reversibility of the DNA Methylation Landscape of Grapevine Plants (*Vitis vinifera*) Stressed by In Vitro Cultivation and Thermotherapy, **PLOS ONE**, v. 10:e0126638, 2015.
- BARROS, G. B. Identificação e caracterização de plantas de feijão-caupi obtidas por meio de retrocruzamento resistentes aos vírus Cowpea severe mosaic virus (CPSMV) e Cowpea aphid borne mosaic virus (CABMV), 54 p, 2010.

BARTEE, L.; MALAGNAC, F.; BENDER, J. Arabidopsis cmt3 Chromomethylase Mutations Block Non-CG Methylation and Silencing of an Endogenous Gene. **Genes Dev**, p. 1753–1758, 2001.

BARTELS, D.; SOUER, E. Molecular responses of higher plants to dehydration. In: HIRT, H., Shinozaki, K. (Org.), *Plant Responses to Abiotic Stress*, [S.l.], Springer, Berlin, Heidelberg. p. 9–38, 2003.

BASTOS, E. A. A cultura do feijão-caupi no Brasil. Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí, 71 p, 2016.

BASTOS, E. A.; DO NASCIMENTO, S. P.; DA SILVA, E. M.; FILHO, F. R. F.; GOMIDE, R. L. Identificação de genótipos de feijão-caupi tolerantes à seca. **Rev Cienc Agron**, v. 42, p. 100–107, 2011.

BENKO-ISEPPON, A. M.; SOARES-CAVALCANTI, N. M.; BELARMINO, L. C.; BEZERRA-NETO, J. P.; AMORIM, L. L. B.; FERREIRA-NETO, J. R. C.; PANDOLFI, V.; AZEVEDO, H. M. A.; SILVA, R. L. O.; SANTOS, M. G.; ALVES, M. V. S.; KIDO, E. A. Prospecção de genes de resistência à seca e à salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 6, p. 1112-1134, 2011.

BIGEARD J, COLCOMBET J AND HIRT H (2015). Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular Plant**, 8:521-539.

BOCCHINI, M.; BARTUCCA, M. L.; CIANCALEONI, S.; MIMMO, T.; CESCO, S.; PII, Y.; ALBERTINI, E.; BUONO, D. D. Iron deficiency in barley plants: phytosiderophore release, iron translocation, and DNA methylation. **Front. PlantSci**, v. 6, p. 1-12, 2015.

BOUKAR, O.; FATOKUN, C. A.; HUYNH, B-L.; ROBERTS, P. A.; CLOSE, T. J. Genomic Tools in Cowpea Breeding Programs: Status and Perspectives. **Front Plant Sci**, v. 7, p. 1–13, 2016.

BRIOSO, P. S. T.; DUQUE, F. F.; SAYÃO, F. LOURO, R. P.; KITAJIMA, E. W. OLIVEIRA, D. E. Vírus do mosaico severo do caupi - infecção natural em mungo green, *Vigna radiata*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, p. 420–429, 1994.

BULL, C. T.; BOER, S.; DENNY, T.; FIRRARO, G. Comprehensive list of names of plant pathogenic bacteria, 1980-2007. **Journal of Plant Pathology**, v. 92, p. 551-92, 2010.

CAETANO, B. S. et al. Principais doenças na cultura da videira. **Revista Conexão Eletrônica**, 14, 2017.

CAMARÇO, R.; NASCIMENTO, A.; ANDRADE, E.; LIMA, J. Biological, serological and molecular comparison between isolates of Cowpea severe mosaic virus. **Trop Plant Pathol**, v. 34, p. 239–244, 2009.

CAO, X.; JACOBSEN, S. E. Role of the Arabidopsis DRM Methyltransferases in *de novo* DNA Methylation and Gene Silencing. **Curr. Biol**. v. 12, p. 1138-1144, 2002.

CAO, X.; AUFSATZ, W.; ZILBERMAN, D.; METTE, M. F.; HUANG, M. S.; MATZKE, M.; JACOBSEN, S. E. Role of the DRM and CMT3 Methyltransferases in RNA-Directed DNA Methylation. **Curr. Biol.** v. 13, p. 2212-2217, 2003.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. **NIH Public Access**, v. 136, p. 642-655, 2009.

CARVALHO, F. C. Q. Termoterapia e controle biológico para manejo do cancro bacteriano em videira. Tese (Doutorado em fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, p.91, 2016.

CASTRO, C. N. A Agricultura no Nordeste Brasileiro: Oportunidades e Limitações ao Desenvolvimento. Boletim regional, urbano e ambiental. v. 08, p. 77-89, 2013.

Cepea – Centro de Estudo Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-brasileiro.aspx>> Acessado em 10 de novembro de 2021.

CHAN, S. W-L.; ZILBERMAN, D.; XIE, Z.; JOHANSEN, L. K.; CARRINGTON, J. C.; JACOBSEN, S. E. RNA Silencing Genes Control *de novo* DNA methylation. **Science** v. 303, p. 1336, 2004.

CHAN, S. W-L, HENDERSON, I. R.; JACOBSEN, S. E. Gardening the Genome: DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p. 351-360, 2005.

CHAND, R. Source of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Indian Institute of Horticultural Research**. v. 31, p. 83-86, 1992.

CHEN, L-T.; LUO M, WANG, Y-Y.; WU, K. Involvement of *Arabidopsis* histone deacetylase HDA6 in ABA and salt stress response. **J. Exp.Bot** v. 61, p. 3345–3353, 2010.

CHINNUSAMY, V.; ZHU J.-K. Epigenetic Regulation of Stress Responses in Plants. **Curr. Opin. Plant Biol.** v. 12, p. 133–139, 2009.

CHOI, Y.; GEHRING, M.; JOHNSON, L.; HANNON, M.; HARADA, J. J.; GOLDBERG, R. B.; JACOBSEN, S. E.; FISCHER, R. L. DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in *Arabidopsis*. **Cell** v. 110, p. 33–42, 2002.

CLAPIER, C. R.; CAIRNS, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. **Annu Rev Biochem** v. 78, p. 273-304, 2009.

COSTA, C. L.; LIN, M. T.; KITAJIMA, E. W.; SANTOS, A. A.; MESQUITA, R. C. M.; FREIRE-FILHO, F. R. *Ceratomyxa arcuata* (Oliv.), um crisomelídeo vector do mosaico da Vigna no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 3, p. 81–82, 1978.

DANGL, J. L.; HORVATH, D. M.; STASKAWICZ, B. J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v. 341, p. 746–751, 2013.

DE-LA-PEÑA, C.; RANGEL-CANO, A.; ALVAREZ-VENEGAS, R. Regulation of disease-responsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of *Arabidopsis*–*Pseudomonas*. **Mol. Plant Pathol** v. 13, p. 388–398, 2012.

DOWEN, R. H.; PELIZZOLA, M.; SCHMITZ, R. J.; LISTER, R.; DOWEN, J. M.; NERY, J. R.; DIXON, J. E.; ECKER, J. R. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. **Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A**, v. 109, p. 2183–2191, 2012.

DOYES, J.; BIRDT, A. DNA Methylation via a Methyl-CpG Inhibits Transcription Binding Protein Indirectly. **Cell**. v. 64, p. 1123-1134, 1991.

EL-SHAMI, M.; PONTIER, D.; LAHMY, S.; BRAUN, L.; PICART, C.; VEGA, D.; HAKIMI, M-A.; JACOBSEN, S. E.; COOKE, R.; LAGRANGE, T. Reiterated WG/GW Motifs Form Functionally and Evolutionarily Conserved ARGONAUTE-Binding Platforms in RNAi-Related Components. **Genes Dev** v. 21, p. 2539-2544, 2007.

EMBRAPA ARROZ E FEIJÃO. Dados conjunturais da produção de feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) e caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) no Brasil (1985 a 2020): área, produção e rendimento. Disponível em: <<http://www.cnpaf.embrapa.br/socioeconomia/index.htm>> Acessado em 10 de novembro de 2020).

ERDEL, F.; KRUG, J.; LANGST, G.; RIPPE, K. Targeting Chromatin Remodelers: Signals and Search Mechanisms. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1809, p. 497–508, 2011.

FAO – Food and Agriculture Organization Of The United Nations. Faostat – Agriculture (2008-2018). Disponível em: <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em: 12 agosto de 2018.

FENG, S.; JACOBSEN, S. E.; REIK, W. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. **Science**. v. 330, p. 622-627, 2010.

FERREIRA-NETO, J. R. C.; SILVA, M.; PANDOLFI, V.; CROVELLA, S.; BENKO-ISEPPON, A. M.; EDERSON, A. K. Epigenetic Signals on Plant Adaptation: a Biotic Stress Perspective. **Curr Protein Pept Sci** v. 18, p. 352–367, 2017.

FREIRE, F.; DAS, C. O. E.; DE OLIVEIRA, A. D. S. Ocorrência do cancro bacteriano da videira no estado do Ceará. Comunicado Técnico-Embrapa. Fortaleza-CE, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, p.2, 2001.

FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; FREIRE-FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; BARRETO, P. D.; SANTOS, A. A. Melhoramento genético. In: Freire-Filho FR, Lima JAA and Ribeiro VQ (eds) Feijão-caupi: Avanços tecnológicos. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, pp 27–92.CAF (1999) Melhoramento genético de Caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) na Região do Nordeste. In: Queiroz MA, Goedert CO and Ramos SRR (eds.). Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro. Petrolina, Embrapa-CPATSA; Brasília, Embrapa-Cenargen, 2005.

FREIRE-FILHO, F. R. et al. Feijão-Caupi no Brasil Produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Teresina, Embrapa Meio-Norte, 2011.

FREY, A. et al. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. **The Plant Journal**, v. 70, n. 3, p. 501–512, 2012.

FU, J. et al. OSJAZ1 attenuates drought resistance by regulating JA and ABA signaling in rice. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 2017.

GAMA, M. A. S. et al.. Taxonomic Repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include Pigmented Isolates Pathogenic to Cashew Plant. **Phytopathology** v. 108, p. 1143-1153, 2018.

GARRIDO, L.; DA, R.; OLAVO, S. E.; VANDERLEI, G.; Fungos associados com o declínio e morte de videiras no estado do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**. v. 29, p. 322-324, 2004.

GARRITY, G. M.; HOLT, J. G. An overview of the road map to the manual: Systematic bacteriology. 2 ed. **New York: Springer**, p.20, 2000.

GENG, S.; KONG, X.; SONG, G.; JIA, M.; GUAN, J.; WANG, F.; QIN, Z.; WU, L.; LAN, X.; LI, A.; MAO, L. DNA methylation dynamics during the interaction of wheat progenitor *Aegilops tauschii* with the obligate biotrophic fungus *Blumeria graminis* f. sp. tritici. **New Phytol.** v. 221, p. 1023-1035, 2019.

GIANOGLIO, S.; MOGLIA, A.; ACQUADRO, A.; COMINO, C.; PORTIS, E The genome-wide identification and transcriptional levels of DNA methyltransferases and demethylases in globe artichoke. **PLoS One**, v. 12:e0181669, 2017.

GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v. 46, p. 189-215, 2008.

GONG, Z.; MORALES-RUIZ, T.; ARIZA, R. R.; ROLDÁN-ARJONA, T.; DAVI, L.; ZHU, J-K. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell*, v. 111, p. 803–814, 2002.

GONZÁLEZ, R. M.; RICARDI, M. M.; LUSEM, N. D. Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. **Epigenetics**, v. 8, p. 864–872, 2013.

GRANT, M. R.; KAZAN, K.; MANNERS, J. M. Exploiting pathogens tricks of the trade for engineering of plant disease resistance: challenges and opportunities. **Microbial Biotechnology**, v. 6, p. 212-222, 2013.

GRAY, S. M. Plant virus protein involved in natural vector transmission. **Trends in Microbiology**, v. 4, p. 259–264, 1996.

- HAMIDOU, F.; ZOMBRE, G.; BRACONNIER, S. Physiological and biochemical responses of cowpea genotypes to water stress under glasshouse and field conditions. **J Agron Crop Sci**, v. 193, p. 229–237, 2007.
- HOGENHOUT, S. A.; VANDERHOON, R. A. L.; TERAUCHI, R.; KAMOUN, S. Emerging Concepts in Effector Biology of Plant-Associated Organisms. **Mol Plant-Microbe Interact**, v. 22, p. 115–122, 2009.
- HONGS, L.; SCROTH, G. P.; MATTHEWS, H. R.; YAU, P.; BRADBURY, E. M. Studies of the DNA Binding Properties of Histone H4 Amino Terminus. **J. Biol. Chem**, v. 268, p. 305-314, 1993.
- HOWDEN, A. J. M.; HUITEMA, E. Effector-triggered post-translational modifications and their role in suppression of plant immunity. **Front Plant Sci**. v. 3, p. 1–6, 2012.
- HUETTEL, B.; KANNO, T.; DAXINGER, L.; AUFSATZ, W.; MATZKE, A. J. M.; MATZKE, M. Endogenous targets of RNA- directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. **EMBO J**. v. 25, p. 2828–2836, 2006.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/pesquisa/15/0?indicador=11866>> Acessado em 15 de fevereiro de 2020.
- IKEDA, Y.; KINOSHITA, T. DNA Demethylation: A Lesson from the Garden. **Chromosoma**, v. 118, p. 37-41, 2009.
- IPCC (2007) Climate change: the physical science basis. In: Solomon S, Qin D, Manning M, Chen Z, Marquis M, Averyt KB, Tignor M and Miller HL (eds.) Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, Cambridge.
- IPEA – Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Disponível em: <https://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=37530&Itemid=7> Acessado em 10 de novembro de 2021.
- ITO, T.; IKEHARA, T.; NAKAGAWA, T.; KRAUS, W. L.; MURAMATSU, M. p300-mediated Acetylation Facilitates the Transfer of Histone H2A-H2B Dimers from Nucleosomes to a Histone Chaperone. **Genes Dev**, v. 14, p. 1899-1907, 2000.
- JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, p. 323–329, 2006.
- JONES, L.; RATCLIFF, F.; BAULCOMBE, D. C. RNA-Directed Transcriptional Gene Silencing in Plants Can Be Inherited Independently of the RNA Trigger and Requires Met1 for Maintenance. **Curr. Biol**. v. 11, p. 747-757, 2001.
- JOSHI, R. et al. Transcription factors and plants response to drought stress: Current understanding and future directions. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 1029, 2016.

KEEN, N. T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions. **Annual Review of Genetics**, v. 24, p. 447-463, 1990.

KIM, J. M.; SASAKI, T.; UEDA, M.; SAKO, K.; SEKI, M. Chromatin changes in response to drought, salinity, heat, and cold stresses in plants. **Frontiers Plant Science**. v. 6, p. 1-12, 2015.

KIMURA, A.; MATSUBARA, K.; HORIKOSHI, M. A decade of histone acetylation: marking eukaryotic chromosomes with specific codes. **Journal of Biochem**. v. 138, p. 647-662, 2005.

KISHINO, A. Y. E.; MARUR, C. J. Fisiologia da Planta. In: Kishino, A, Y.; Carvalho, S. L. C.; Roberto, S. R. Viticultura tropical: o sistema de produção do Paraná. Londrina: IAPAR, cap. 4, p. 95-116, 2007.

KONG, L.; LIU, Y.; WANG, X.; CHANG, C. Insight into the Role of Epigenetic Processes in Abiotic and Biotic Stress Response in Wheat and Barley. **Int J Mol Sci**. v. 21, p. 1480, 2020.

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**. v. 128, p. 693–705, 2007.

KUBIŚ, J.; FLORYSZAK, W.J.; ARASIMOWICZ, J.M. Polyamines induce adaptive responses in water deficit stressed cucumber roots. **Journal of Plant Research**, v. 127, n. 1, p. 151–158, 2014.

KUHN, G. B. FARJADO, T. V. M. Uvas Americanas e Híbridas para Processamento em Clima Temperado. Embrapa Uva e Vinho. Sistemas de Produção. v.2 Versão Eletrônica disponível em: <
<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvaAmericanaHibridaClimaTemperado/virus.htm>> Acesso em: 20 dez. 2017.

LANS, H.; MARTEIJN, J. A.; VERMEULEN, W. ATP-Dependent Chromatin Remodeling in the DNA-Damage Response. **Epigenetics Chromatin**, v. 5, p. 4, 2012.

LATZEL, V.; ZHANG, Y.; MORITZ, K. K.; FISCHER, M.; BOSSDORF, O. Epigenetic Variation in Plant Responses to Defence Hormones. **Ann. Bot**. v. 110, p. 1423–1428, 2012.

LAW, J. A.; JACOBSEN, S. E. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nat. Rev. Genet**. v. 11, p. 204–220, 2010.

LAW, J. A.; VASHISHT, A. A.; WOHLSCHEGEL, J. A.; JACOBSEN, S. E. SHH1, a Homeodomain Protein Required for DNA Methylation, as Well as RDR2, RDM4, and Chromatin Remodeling Factors, Associate with RNA Polymerase IV. **PLoS Genet**. v. 7:e1002195, 2011.

LAZZAROTTO, J. J.; FIORAVANÇO, J. C. Tendências e sazonalidades nas exportações e importações brasileiras de uva de mesa. **Informações Econômicas**, v. 43, p. 1-16, 2013.

LEE, D. Y.; HAYES, J. J.; PRUSS, D.; WOLFFE, A. P. A Positive Role for Histone in Transcription Factor Access to Nucleosomal DNA. **Cell**, v. 72, p. 73-84, 1993.

LI, Z. et al. Metabolic pathways regulated by abscisic acid, salicylic acid and γ -aminobutyric acid in association with improved drought tolerance in creeping bentgrass (*Agrostis stolonifera*). **Physiologia Plantarum**, v. 159, n. 1, p. 42–58, 2017.

LIMA, J. A. A.; SITTOLIN, I. M.; LIMA, R. C. A. Diagnoses e Estratégias de Controle de Doenças Ocasionadas por Vírus. Melhoramento Genético. In: Freire-Filho FR, Ribeiro VQ, Lima JAA, Silva PHS. Feijão-Caupi: Avanços Tecnológicos. P. 405–459, 2005

LIMA, M. F. Cancro bacteriano da videira, causado por *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Embrapa Semiárido - Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E). Disponível em <
<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/134322>> Acesso em: 23 dez 2017.

LIMA, M. F.; FERREIRA, M. A. S. V.; MOREIRA, W. A.; DIANESE, J. C. Bacterial canker of grapevine in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 24, p. 440-443, 1999.

LINDROTH, A.; CAO, X.; JACKSON, J. P.; ZILBERMAN, D.; MCCALLUM, C. M.; HENIKOFF, S.; JACOBSEN, S. E. Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for Maintenance of CpXpG Methylation. **Science**, v. 292, p. 2077–2080, 2001.

LIU, R. et al. A DEMETER-like DNA demethylase governs tomato fruit ripening. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 112, p. 10804–10809, 2015.

LIU, Z. W.; SHAO, C-R.; ZHANG, C-J.; ZHOU, J-X.; ZHANG, S-W.; LI, L.; CHEN, S.; HUANG, H-W.; CAI, T.; HE, X-J. The SET domain proteins SUVH2 and SUVH9 are required for Pol V occupancy at RNA-directed DNA methylation loci. **PLoS Genetics**. v. 10, p. 1-14, 2014.

LOPEZ, A.; RAMÍREZ, V.; GARCÍA-ANDRADE, J.; FLORS, V.; VERA, P. The RNA silencing enzyme RNA polymerase v is required for plant immunity. **PLOS Genet**. v. 7, p. 1-10, 2011.

LUGER, K.; MADER, A. W.; RICHMOND, R. K.; SARGENT, D. F.; RICHMOND, T. J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, p. 251–260, 1997.

LUNA, E.; BRUCE, T. J. A.; ROBERTS, M. R.; FLORS, V.; TON, J. Next-generation systemic acquired resistance. **Plant Physiol**. v. 158, p. 844–853, 2012.

LUO, M.; LIU, X.; SINGH, P.; CUI, Y.; ZIMMERLI, L.; WU, K. Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1819, p. 129–136, 2012.

MACHO, A. P.; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Mol Cell**, v. 54, p. 263–272, 2014.

MAGWANGA, R. O. et al. Characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) proteins family and their role in drought stress tolerance in upland cotton, **BMC Genetics**, v. 19, n. 1, 2018.

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

MALAVOLTA JR, V.A.; ALMEIDA, I. M. G. Resistência de variedades de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo**, v. 70, p. 373-376, 2003.

MALAVOLTA JR, V. A. et al. Ocorrência de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* em videira no Brasil. **Summa Phytopathologica**. v. 25, p. 262-264, 1999.

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa. Instrução Normativa Nº 38, DE 1º de outubro de 2018. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, ed. 190, seção 1, p.14. Disponível em: <
https://www.in.gov.br/materia/asset_publisher/Kujrw0TZC2Mb/content/id/43461167/do1-2018-10-02-instrucao-normativa-n-38-de-1-de-outubro-de-2018-43461024 >
Acesso em: 12 agosto de 2020.

MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. Sensitivity to copper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, p. 406-411, 2009.

MATZKE, M. A.; MOSHER, R. A. RNA- directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. **Nat. Rev. Genet.** v. 15, p. 394–408, 2014.

MOGLIA, A.; GIANOGLIO, S.; ACQUADRO, A.; VALENTINO, D.; MILANI, A. M.; LANTERI, S.; COMINO, C. Identification of DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum melongena* L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses. **PLoS One**, v. 14: e0223581, 2019.

MORALES-RUIZ, T.; ORTEGA-GALISTEO, A. P.; PONFERRADA-MARÍN, M. I.; MARTÍNEZ-MACÍAS, M. I.; ARIZA, R. R.; ROLDÁN-ARJONA, T. DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 103, p. 6853–6858, 2006.

MUHAMMAD, T. et al . Overexpression of a mitogen-activated protein kinase SIMAPK3 positively regulates tomato tolerance to cadmium and drought stress, **Molecules**, v. 24, n. 3, 2019.

NAKAYAMA, J.; RICE, J. C.; STRAHL, B. D.; ALLIS, C. D.; GREWAL, S. I. Role of Histone H3 Lysine 9 Methylation in Epigenetic Control of Heterochromatin Assembly. **Science**, v. 292, p. 110-113, 2001.

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

- NASCIMENTO, A. R. P.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. **Ciência Rural**, v. 36, p.1-7, 2006.
- NASCIMENTO, S. P.; BASTOS, E. A.; ARAÚJO, E. C. E.; FILHO, F. R. F.; SILVA, E. M. Tolerância ao déficit hídrico em genótipos de feijão-caupi Tolerance to water deficit of cowpea genotypes. **Rev Bras Eng Agrícola e Ambient**, v. 15, p. 853–860, 2011.
- NAUE, C. R (2013). Tratamento de bacelos, sobrevivência de *Xanthomonas capestris* pv. *viticola* em tesouras de raleio, desinfestação desta ferramenta e de água utilizada na produção de mudas de videira. Tese (Doutorado em fitopatologia) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Agronomia, Recife, p.71.
- NAYUDU, M. V. *Pseudomonas viticola* sp. nov., incitant of a new bacterial disease of grape. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 73, p. 183-186, 1972.
- NOREEN, S. et al. Interactive effects of watering regimes and exogenously applied osmoprotectants on earliness indices and leaf area index in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) crop. **Pak. J. Bot**, v.45, n.6, p. 1873- 1881, 2013.
- OLIVEIRA, M. L. Anuário HF 2016. Campo & Negócios. 5 Edição, 2016.
- ORTEGA-GALISTEO, A. P.; MORALES-RUIZ, T.; ARIZA, R. R.; ROLDÁN-ARJONA, T. Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. **Plant Mol. Biol.** v. 67, p. 671–681, 2008.
- PADMAVATHI, T. A. V.; RAO, D. M. Differential accumulation of osmolytes in 4 cultivars of peanut (*Arachis hypogaea* L.) under drought stress. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 151–159, 2013.
- PANDEY, G. K. Emergence of a novel calcium signaling pathway in plants: CBL-CIPK signaling network. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 14, n. 2, p.51-68, 2008.
- PARK, B. J. et al. Increased tolerance to salt- and water-deficit stress in transgenic lettuce (*Lactuca sativa* L.) by constitutive expression of LEA. **Plant Growth Regulation**, v. 45, n. 2, p. 165–171, 2005.
- PEDRO JÚNIOR, M. J.; SENTELHAS, P. C. Clima e Produção. In: Pommer, C. V. (Ed.). Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco Continentes, p.63-107, 2003.
- PENTERMAN, J.; ZILBERMAN, D.; HUH, J. H.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S.; Fischer, R. L. DNA demethylation in the Arabidopsis genome. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v. 104, p. 6752–6757.
- PINHEIRO, C.; CHAVES, M. M. Photosynthesis and drought: Can we make metabolic connections from available data? **J Exp Bot**, v. 62, p. 869–882, 2011.

PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P.; ASSIS FILHO, F. M. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata*). In: Kimati H, Amorim L, Bergamim Filho A, Camargo LEA e Rezende J.A.M. (eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo, Agronômica Ceres, v. 2, p, 215-222, 2005.

PIRONE, T. P. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. **Seminars in Virology**, v. 2, p. 81-87, 1991.

POMMER, C. V.; MAIA, M. L. Introdução. In: Pommer, C. V. (Ed). Uva: tecnologia da produção, pós-colheita e mercado. Porto Alegre: Cinco continentes, p. 11-36, 2003.

PROTAS, J. F DA S.; CAMARGO, U. A.; MELLO, L. M. R. Vitivinicultura brasileira: regiões tradicionais e pólos emergentes. Informe Agropecuário, EPAMIG: Belo Horizonte v. 27, p. 7-15, 2006.

QIAN, Y.; XI, Y.; CHENG, B.; ZHU, S. Genome-Wide Identification and Expression Profiling of DNA Methyltransferase gene Family in Maize. **Plant Cell Reports**, v. 33, p. 1661-1672, 2014.

QUEIROZ-VOLTAN, R. B.; PIRES, E. J. P. A videira. In: Pommer, C. V. (Ed). Uva: tecnologia de produção, pós-colheita, mercado. Porto Alegre: Cinco continentes, p. 37-61, 2003.

RANGANAYAKULU, S. G.; SUDHAKAR, C.; REDDY, S. P. Effect of water stress on proline metabolism and leaf relative water content in two high yielding genotypes of groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with contrasting drought tolerance. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v.3, n.1, p.97-103, 2015.

ROBERT-SEILANIANTZ, A. GRANT, M.; JONES, J. D. G. Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. **Annu Rev Phytopathology**, v. 49, p. 317–343, 2011.

SAHU, P. P.; PANDEY, G.; SHARMA, N.; PURANIK, S.; MUTHAMILARASAN, M.; PRASAD, M. Epigenetic Mechanisms of Plant Stress Responses and Adaptation. **Plant Cell Reports**, v. 32, p. 1151-1159, 2013.

SÁNCHEZ, A. L.; STASSEN, J. H. M.; FURCI, L.; SMITH, L. M.; TON, J. The role of DNA (de)methylation in immune responsiveness of Arabidopsis. **The Plant Journal**. v. 88, p. 361-374, 2016.

SAVCHENKO, T. al. Functional convergence of oxylipin and abscisic acid pathways controls stomatal closure in response to drought, **Plant Physiology**, v. 164, n. 3, p. 1151–1160, 2014.

SCARPARE, F. V. Determinação de índices biometeorológicos da videira ‘Nigara Rosada’ (*Vitis labrusca* L.) podadas em diferentes épocas e fases do ciclo vegetativo. 75 p. Dissertação (Mestrado em Física do Ambiente Agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

- SCHNITZLER, G. R. In: Nutrients and Epigenetics; Choi, S.-W.; Friso, S., Ed.; CRC Press v. 1, p. 67-104, 2009.
- SCHULZE, E. et al. Plant Ecology. **Springer**, Berlin Heidelberg, New York, p.692, 2005.
- SCHWESSINGER, B.; RONALD, P. C. Plant Innate Immunity: Perception of Conserved Microbial Signatures. **Annu Rev Plant Biol**, v. 63, p. 451–482, 2012.
- SEO, J.S. et al. OsbHLH148, a basic helix-loop-helix protein, interacts with OsJAZ proteins in a jasmonate signaling pathway leading to drought tolerance in rice. **The Plant Journal**, v. 65, n. 6, p. 907–921, 2011.
- SHI, Y.; LAN, F.; MATSON, C.; MULLIGAN, P.; WHETSTINE, J. R.; COLE, P. A.; CASERO, R. A.; SHI, Y. Histone Demethylation Mediated by the Nuclear Amine Oxidase Homolog LSD1. **Cell**, v. 119, p. 941–953, 2004.
- SILVA, P. C. G.; CORREIA, R. C. Caracterização social e econômica da cultura da videira. In: LEAO, P. C. de S. (Org.). Cultivo da videira. 2ed. Petrolina-PE: Embrapa Semiárido, p.1-10, 2010.
- SINGH, S. K.; KAKANI, V. G.; SURABHI, G. K.; REDDY, K. R. Cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.) genotypes response to multiple abiotic stresses. **J Photochem Photobiol B Biol**, v. 100, p. 135–146, 2010.
- SINGH, M. et al. Roles of osmoprotectants in improving salinity and drought tolerance in plants: a review. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 14, p. 407-424, 2015.
- Sociedade Nacional de Agricultura, Disponível em:
<https://issuu.com/sociedadnacionaldeagricultura/docs/a_lavoura_705/50>
Acessado em 21 de outubro de 2021.
- SOUZA, R.; MACHADO, E. C.; SILVA, J. A. B.; LAGÔA, A. M. M. A.; SILVEIRA, J. A. G. Photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and some associated metabolic changes in cowpea (*Vigna unguiculata*) during water stress and recovery. **Environ Exp Bot**, v. 51, p. 45–56, 2004.
- SPOEL, S. H.; DONG, X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. **Nat Rev Immunol**, v. 12, p. 89–100, 2012.
- STANKIEWICZ, A. M.; SWIERGIEL, A. H.; LISOWSKI, P. Epigenetics of Stress Adaptations in the Brain. **Brain Res. Bull**, v. 98, p. 76–92, 2013.
- TAKITA, M. A. et al. A região rpf (regulation of pathogenicity factors) distingue espécie de Xanthomonas. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 253-54, 2004.
- THILMONEY, R.; UNDERWOOD, W.; HE, S. Y. Genome-wide transcriptional analysis of the *Arabidopsis thaliana* interaction with the plant pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and the human pathogen *Escherichia coli* O157:H7. **Plant Journal**. v. 46, p. 34–53, 2006.

TSUDA, K.; KATAGIRI, F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. **Curr Opin Plant Biol**, v. 13, p. 459–465, 2010.

TSUDA, K.; SATO, M.; GLAZEBROOK, J.; COHEN, J. D.; KATAGIRI, F. Interplay between MAMP-triggered and SA-mediated defense responses. **Plant J.** v. 53, p. 763–775, 2008.

TSUKADA, Y.-I.; FANG, J.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; WARREN, M. E.; BORCHERS, C. H.; TEMPST, P.; ZHANG, Y. Histone Demethylation by a Family of JmjC Domain-Containing Proteins. **Nature**, v. 439, p. 811–816, 2006.

USDA - Economic Research Service. U.S. Department of Agriculture. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/agricultural-baseline-database/>> Acessado em 10 de novembro de 2021.

VARGA-WEISZ, P. ATP-Dependent Chromatin Remodeling Factors: Nucleosome Shufflers with Many Missions. **Oncogene**, v. 20, p. 3076-3085, 2001.

VERBSKY, M. L.; RICHARDS, E. J. Chromatin Remodeling in Plants. **Curr. Opin. Plant Biol.**, v. 4, p. 494–500, 2001.

VETTESE-DADEY, M.; GRANT, P. A.; HEBBES, T. R.; CRANE-ROBINSON, C.; ALLIS, C. D.; WORKMAN, J. L. Acetylation of Histone H4 Plays a Primary Role in Enhancing Transcription Factor Binding to Nucleosomal DNA *in vitro*. **EMBO J.**, v. 15, p. 2508-2518, 1996.

WALLEY, J. W.; ROWE, H. C.; XIAO, Y.; CHEHAB, E. W.; KLIEBENSTEIN, D. J.; WAGNER, D.; DEHESH, K. The Chromatin Remodeler SPLAYED Regulates Specific Stress Signaling Pathways. **PLoS Pathog.**, v. 4:e1000237, 2008.

WANG, M.; QIN, L.; XIE, C.; LI, W. Induced and Constitutive DNA Methylation in a Salinity-Tolerant Wheat Introgression Line. **Plant Cell Physiol.**, v. 55, p. 1354–1365, 2014.

WANG, Y. N. C.; ZHANG, X.; YAO, J.; ZHANG, Y.; SUN, Y.; YU, F.; AMADOR, D. M.; MOU, Z. The Arabidopsis Elongator Complex subunit2 Epigenetically Regulates Plant Immune Responses. **Plant Cell**, v. 25, p. 762–776, 2013.

WATANABE, T. et al. Role for piRNAs and noncoding RNA in de novo DNA methylation of the imprinted mouse Rasgrf1 locus. **Science**, v. 332, p. 848–852, 2011.

WATT, F.; MOLLOY, P. L. Cytosine Methylation Prevents Binding to DNA of a HeLa Cell Transcription Factor Required for Optimal Expression of the Adenovirus Major Late Promoter. **Genes Dev.**, v. 2, p. 1136–1143, 1988.

WIERZBICKI, A. T.; HAAG, J. R.; PIKAARD, C. S. Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and Adjacent Genes. **Cell**, v. 135, p. 635-648, 2008.

WIERZBICKI, A. T.; REAM, T. S.; HAAG, J. R.; PIKAARD, C. S. RNA Polymerase V Transcription Guides ARGONAUTE4 to Chromatin. **Nat. Genet.**, v. 41, p. 630-634, 2009.

WIN, J. et al. Effector biology of plant-associated organisms: concepts and perspectives. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 77, p. 235–247, 2012.

XIE, H.; KONATE, M.; SAI, N.; TESFAMICAEL, K. G.; CAVAGNARO, T.; GILLIHAM, M.; BREEN, J.; METCALFE, A.; STEPHEN, J. R.; BEI, R.; COLLINS, C.; LOPEZ, C. M. R. Global DNA Methylation Patterns Can Play a Role in Defining Terroir in Grapevine (*Vitis vinifera* cv. Shiraz). **Front. Plant Sci.** v. 8, p. 1-16, 2017.

XIE, Z.; JOHANSEN, L. K.; GUSTAFSON, A. M.; KASSCHAU, K. D.; LELLIS, A. D.; SILBERMAN, D.; JACOBSEN, S. E.; CARRINGTON, J. C. Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. **PLoS Biol.** v. 2:e104, 2004.

YOUNG, J. M.; DYE, D. W.; BRADBURY, J. F.; PANAGOPOULOS, C. G.; ROBBS, C. F. A proposed nomenclature and classification for pathogenic bacteria. **New Zeland Journal of Agricultural Research**, v. 21, p. 153-177, 1978.

YU, A.; LEPÈRE, G.; JAY, F.; WANG, J.; BAPAUME, L.; WANG, Y.; ABRAHAM, A.-L.; PENTERMAN, J.; FISCHER, R. L.; VOINET, O.; NAVARRO, L. Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. **Proc. Natl.Acad.Sci.U.S.A.** v. 110, p. 2389–2394, 2013.

ZEMACH, A.; KIM, M. Y.; HSIEH, P.-H.; COLEMAN-DERR, D. The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. **Cell.** v. 153, p. 193–205, 2013.

ZHANG, K.; SRIDHAR, V. V.; ZHU, J.; KAPOOR, A.; ZHU, J.-K. Distinctive Core Histone Post-Translational Modification Patterns in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS One**, v. 2, p. 1210, 2007.

ZHOU, S. et al. Overexpression of the Wheat Aquaporin Gene, TaAQP7, Enhances Drought Tolerance in Transgenic Tobacco, **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.

ZHU, C.; ZHANG, S.; ZHOU, C.; CHEN, L.; FU, H.; LI, X.; LIN, Y.; LAI, Z.; GUO, Y. Genome-wide investigation and transcriptional analysis of cytosine-5 DNA methyltransferase and DNA demethylase gene families in tea plant (*Camellia sinensis*) under abiotic stress and withering processing. **PeerJ**, v. 2020:e8432, 2020.

ZHU, J. K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. **Annu. Rev. Genet.** v. 43, p. 143–166, 2009.

ZHU, Y. The Epigenetic Involvement in Plant Hormone Signaling. **Chinese Sci. Bull.**, v. 55, p. 2198–2203, 2010.

ZIPFEL, C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 414-420, 2009.

ZOU, B.; SUN, Q.; ZHANG, W.; DING, Y.; YANG, D-L.; SHI, Z.; JIAN, H. The Arabidopsis Chromatin-Remodeling Factor CHR5 Regulates Plant Immune Responses and Nucleosome Occupancy. **Plant and Cell Physiology**. v. 58, p. 2002-2016, 2017.

ZVEREVA, A. S.; POOGGIN, M. M. Silencing and innate immunity in plant defense against viral and non-viral pathogens. **Viruses**, v. 4, p. 2578–2597, 2012.