



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Genética

Vanessa Emanuelle Pereira Santos

**GENÔMICA ESTRUTURAL E TRANSCRIPTÔMICA DE GENES 14-3-3
EXPRESSOS EM FEIJÃO-CAUPI SOB DESIDRATAÇÃO RADICULAR E PINHÃO-
MANSO SOB ESTRESSE SALINO (NaCl)**

Recife

2022

Vanessa Emanuelle Pereira Santos

**GENÔMICA ESTRUTURAL E TRANSCRIPTÔMICA DE GENES 14-3-3
EXPRESSOS EM FEIJÃO-CAUPI SOB DESIDRATAÇÃO RADICULAR E PINHÃO-
MANSO SOB ESTRESSE SALINO (NaCl)**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutora em Genética.

Área de Concentração: Biologia
Molecular; Bioinformática

Orientador: Éderson Akio Kido

Coorientador: Manassés Daniel da Silva

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Santos, Vanessa Emanuelle Pereira.

Genômica estrutural e transcriptômica de genes 14-3-3 expressos em feijão-caupi sob desidratação radicular e pinhão-mansão sob estresse salino (NaCl). / Vanessa Emanuelle Pereira Santos. – 2022.

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

Orientador: Edérson Akio Kido.

Coorientador: Manassés Daniel da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, 2022.

Inclui referências.

1. Isoformas. 2. Fatores gerais de regulação. 3. Abiótico. 4. PPI - tolerante. I. Kido, Edérson Akio. (orient.). II. Silva, Manassés Daniel da. (coorient.). III. Título.

Vanessa Emanuelle Pereira Santos

**GENÔMICA ESTRUTURAL E TRANSCRIPTÔMICA DE GENES 14-3-3
EXPRESSOS EM FEIJÃO-CAUPI SOB DESIDRATAÇÃO RADICULAR E PINHÃO-
MANSO SOB ESTRESSE SALINO (NaCl)**

Tese apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Genética da
Universidade Federal de Pernambuco
como requisito parcial para obtenção do
título de Doutora em Genética.

Aprovada em: 23/09/2022

BANCA EXAMINADORA

Dr. Éderson Akio Kido

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tercílio Calsa Júnior

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. João Pacífico Bezerra Neto

Universidade de Pernambuco

Dr. Marcus Vinicius Loss Sperandio

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Wilson José da Silva Júnior

Universidade Federal de Pernambuco

“Estou fascinado com a ideia de que a genética é digital.
A biologia moderna está se tornando muito mais um
ramo da tecnologia da informação.”

- Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser minha fortaleza em todos os momentos da minha vida e me conceder tantas graças mesmo quando não fui merecedora. Pelo dom da minha vida e por tudo que Ele me permitiu e permite realizar.

A Nossa Senhora de Fátima por interceder sempre por mim a Deus, me acalmar e me acalantar em todos os momentos de dificuldade. Nem todos os agradecimentos do mundo seriam suficientes para expressar minha gratidão por todo Seu aconhego.

Ao meu pai Josevaldo dos Santos e minha mãe Verônica Maria Rodrigues Pereira por me mostrarem, desde criança, a importância dos estudos e me apoiarem em todas as minhas decisões.

À Lilica (*in memorian*) minha fonte de amor na Terra que é detentora da minha maior saudade e, mesmo no céu, consegue me encher de amor por meio dos muitos sonhos em que consigo sentir sua presença comigo.

À todos os meus familiares que, a sua maneira, contribuíram e me apoiaram durante toda a minha vida acadêmica, em especial, meu irmão João Victor e minhas tias Ana, Clarissa e Elizânia.

Ao meu orientador Éderson Akio Kido por ter se disponibilizado a me orientar mesmo sabendo da minha inexperiência com a maioria das análises necessárias para esta tese, por todo auxílio paciência e compreensão durante os momentos de dificuldade acadêmica e pessoal.

Ao meu coorientador Manassés Daniel da Silva, por me auxiliar em todas as etapas do trabalho e estar sempre disponível para tirar minhas muitas e repetidas dúvidas, além de se compadecer com meu problema de vista e me ajudar nas validações dos meus resultados.

Ao Dr. Antônio Félix por todo apoio dado durante a realização dos experimentos no Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, e toda preocupação e oferta de ajuda fornecida para conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Wilson pela montagem por referência do transcriptoma de *Jatropha* e por sua prontidão em tirar todas as muitas dúvidas sobre diferentes partes deste trabalho.

À minha psicóloga Laura Maria que foi essencial para que esse trabalho pudesse ser concluído, cuidando da minha saúde mental e me lembrando constantemente do meu objetivo ao ingressar no Doutorado, nas muitas vezes em que pensei em desistir diante das turbulências enfrentadas.

À todos os membros do Laboratório de Genética Molecular de Plantas, em especial Bruna, Elvia, Rahisa, Vinícius, Fernanda, Gizele e Valquíria que contribuíram diretamente com este trabalho.

Aos meus amigos Bruna Brito, Bruna Rafaelle, Elvia, Fabiana, Felipe, Fidelis, Gabriella, Iziane, Joelson, Johanderson, Josinete, Karolaine, Leylanne, Lucas, Nathaly, Rahisa, Rodrigo, Sammara, Tayslane e Will que sempre se disponibilizaram a ajudar no que fosse possível, além de me proporcionar momentos essenciais para recarregar as energias que eu precisava para confeccionar esta tese.

Ao meu melhor amigo e irmão Joelson Germano Crispim, que foi minha porta de entrada no Departamento de Genética e é, desde o mestrado, meu ponto de apoio pessoal e profissional a quem agradeço imensamente por poder partilhar a vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superiores (Capes) pela concessão da bolsa que foi essencial para minha manutenção em Recife.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos projetos que deram origem a esta tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética (PPGG) e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) pela oportunidade.

À todos que direta ou indiretamente contribuíram para o presente trabalho.

RESUMO

Estresses abióticos são os principais fatores que alteram o crescimento, desenvolvimento e produtividade dos vegetais. Para suportar tais condições, as plantas desenvolvem mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares. A resposta molecular ao estresse inclui a atividade de vários grupos de moléculas, incluindo os fatores gerais de regulação (GRF) 14-3-3s que são reguladores multifuncionais envolvidos em diversos processos desde a germinação até a resposta às condições desfavoráveis. Este estudo buscou identificar e caracterizar, a nível estrutural e funcional, a família gênica 14-3-3 de feijão-caupi e pinhão-manso. Para isto, 14-3-3s das duas espécies foram identificadas em bancos de dados e comparadas entre espécies evolutivamente próximas. Para cada espécie foram identificadas nove isoformas com estrutura conservada, as quais apresentam alta similaridade entre espécies próximas aparentadas. A análise transcriptômica (RNA-Seq e HT-SuperSAGE) identificou dois transcritos 14-3-3 de feijão-caupi induzidos sob desidratação radicular no acesso Pingo-de-Ouro-1-2, considerado tolerante ao déficit hídrico e três transcritos RNA-Seq 14-3-3 de pinhão-manso induzidos sob imposição de 150mM de NaCl no acesso 171, considerado moderadamente tolerante ao sal. Redes PPI indicam a interação de 14-3-3s de feijão-caupi com vários grupos de fosfatases e, em pinhão-manso, foi evidenciada a posição central de um heterodímero 14-3-3 interagindo com alvos relacionados a resposta ao estresse, incluindo a H⁺-ATPase de membrana plasmática. Os resultados sugerem que a família gênica 14-3-3 está envolvida na resposta aos estresses de seca e sal e indicam alvos induzidos e importantes interatores que podem ser explorados pelo melhoramento genético das espécies estudadas.

Palavras-chave: isoformas; fatores gerais de regulação, abiótico, PPI, tolerante.

ABSTRACT

Abiotic stresses are the main factors that alter plant growth, development and productivity. To support such conditions, plants develop physiological, biochemical and molecular mechanisms. Molecular stress response includes the activity of several groups of molecules, including general regulatory factors (GRF) 14-3-3s that are multifunctional regulators involved in various processes from germination to response to unfavorable conditions. This study aimed to identify and characterize, at the structural and functional level, the gene family 14-3-3 of cowpea and jatropha. For this, 14-3-3s of the two species were identified in databases and compared between evolutionary close species. For each species, nine isoforms with preserved structure were identified, which presented high similarity between related nearby species. Transcriptomic analysis (RNA-Seq and HT-SuperSAGE) identified two 14-3-3 transcripts of cowpea induced under root dehydration in the Pingo-de-Ouro-1-2 access, considered tolerant to water deficit and three RNA-Seq 14-3-3 transcripts of physic nut induced under imposition of 150mM Of NaCl at access 171, considered moderately salt tolerant. PPI networks indicate the interaction of 14-3-3s cowpea with several groups of phosphatases and, in jatropha, the central position of a heterodimer 14-3-3 interacting with targets related to stress response, including H⁺ -ATPase of cell membrane, was evidenced. The results suggest that the gene family 14-3-3 is involved in the response to drought and salt stresses and indicate induced targets and important interactors that can be explored by the genetic improvement of the studied species.

Keywords: isoforms; general regulatory factors, abiotic, PPI, tolerant.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1** Esquema ilustrativo da imposição de condições adversas à espécies vegetais e suas reações morfológicas de acordo com o nível de tolerância..... 20

Artigo I

- Figura 1** Genômica comparativa da família gênica 14-3-3 em *Vigna unguiculata*, *V. angularis*, *V. radiata*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*. 1A. Árvore filogenética, construída pelo método *Neighbor Joining*-NJ, utilizando *bootstrap* de 10000. 1B. Estrutura gênica da família gênica 14-3-3s das diferentes espécies. 1C Motivos conservados nas proteínas 14-3-3 das seis espécies..... 62
- Figura 2** Análise de ortologia gênica entre *Vigna unguiculata* (azul), *Vigna angularis* (rosa); *Vigna radiata* (laranja); *Phaseolus vulgaris* (verde); *Glycine max* (vermelho) e; *Medicago truncatula* (marrom)..... 64
- Figura 3** Alinhamento de proteínas 14-3-3 de feijão caupi, Assinaturas 14-3-3 destacadas em caixas vermelhas..... 65
- Figura 4** Análise de sítios de ligação à fatores de transcrição presentes nas regiões promotoras dos Jc14-3-3s..... 67
- Figura 5** A. Expressão *in sílico* de transcritos 14-3-3 de feijão-caupi submetido à estímulo de desidratação radicular. B. Expressão *in sílico* de transcritos 14-3-3 de feijão-caupi (acesso Pingo-de-Ouro-1-2) submetido à desidratação radicular nos tempos de 25 e 150 minutos. C. Expressão relativa de Vu14-3-3s, acessos Pingo-de-Ouro-1-2 e Santo Inácio, submetidos à desidratação radicular por 150 minutos, considerando $p\text{-value} < 0,05$ (*). D. Resumo dos resultados obtidos nas diferentes análises da expressão de Vu14-3-3s 72

Figura 6	Rede de interação proteína-proteína (PPI) entre Vu14-3-3s e seus clientes.....	73
-----------------	--	----

Artigo II

Figura 1	Genômica <i>comparativa</i> da família gênica 14-3-3 em <i>Jatropha curcas</i> , <i>Hevea brasiliensis</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Populus trichocarpa</i> e <i>Ricinus communis</i> .. 1A. Árvore filogenética, construída pelo método <i>Neighbor Joining</i> -NJ, utilizando <i>bootstrap</i> de 10000. 1B. Estrutura gênica da família gênica 14-3-3s das diferentes espécies. 1C Motivos conservados nas proteínas 14-3-3 das seis espécies.....	109
Figura 2	Alinhamento de proteínas 14-3-3 de pinhão-manso, Assinaturas 14-3-3 destacadas em caixas vermelhas.....	111
Figura 3	Análise de sítios de ligação à fatores de transcrição presentes nas regiões promotoras dos Jc14-3-3s.....	112
Figura 4	A. Expressão <i>in silico</i> de transcritos 14-3-3 de pinhão manso submetido à estímulo salino (150mM NaCl), considerando <i>p-value</i> <0,05 e FDR< 0,01 B. Expressão <i>in silico</i> de transcritos 14-3-3 de pinhão manso submetido à estímulo salino (150mM NaCl), considerando <i>p-value</i> <0,05 e FDR< 0,01 C. Resumo das abordagens utilizadas para determinar a expressão de Jc14-3-3s...	114
Figura 5	Rede de interação proteína-proteína (PPI) entre Jc14-3-3s e seus clientes.....	116

LISTA DE TABELAS

Artigo I

Tabela 1	<i>Primers</i> para análise de Vu14-3-3s em PCR em tempo real...	57
Tabela 2	Quantitativo de transcritos 14-3-3 em <i>Vigna unguiculata</i> , <i>V. radiata</i> , <i>V. angularis</i> , <i>Medicago truncatula</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Glycine max</i>	60
Tabela 3	Identificação em bancos de dados e nomenclatura utilizada para membros da família 14-3-3 de feijão-caupi.....	60
Tabela 4	Localização subcelular, massa molecular (kDA) e ponto isoelétrico de proteínas Vu14-3-3s.....	66
Tabela 5	Número de transcritos Vu14-3-3s associados aos transcritos RNA-Seq de feijão-caupi submetido à desidratação radicular.	68
Tabela S1	IDs e transcritos das 14-3-3 de <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>Vigna angularis</i> , <i>Medicago truncatula</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Glycine max</i>	167
Tabela S2	Transcritos 14-3-3 portadores de tags identificados em feijão-caupu sob estímulo de desidratação radicular e sua regulação (<i>p-value</i> <0,05 e FDR< 0,01) para os acessos sensível (Santo Inácio- SI) e tolerante (Pingo de Ouro – PO)...	169
Tabela S3	Transcritos 14-3-3 RNA-Seq identificados em feijão-caupi sob estímulo de desidratação radicular e sua regulação (<i>p-value</i> <0,05) para o acesso Pingo de Ouro (PO).....	170

Artigo II

Tabela 1	<i>Primers</i> para análise de Jc14-3-3s em PCR em tempo real.....	105
Tabela 2	Quantitativo de transcritos utilizados para identificação da família gênica 14-3-3 em pinhão-mansão.....	107
Tabela 3	Identificação em bancos de dados e nomenclatura utilizada para membros da família 14-3-3 de pinhão-mansão.....	108
Tabela 4	Localização subcelular, massa molecular (kDA) e ponto isoelétrico de proteínas Jc14-3-3s.....	110

Tabela S1	IDs e transcritos das 14-3-3 de <i>Jatropha curcas</i> , <i>Manihot esculenta</i> , <i>Ricinus communis</i> , <i>Populus trichocarpa</i> e <i>Hevea brasiliensis</i>	175
------------------	--	-----

Tabela S2	Transcritos 14-3-3 RNA-Seq identificados em pinhão-manso sob estímulo de salinidade NaCl (150Mm) e sua regulação (<i>p-value</i> <0,05) para o acesso 171.....	177
------------------	---	-----

Capítulo III

Tabela 1	Artigos publicados no período de 2016 à 2020 sobre a regulação positiva de genes 14-3-3s sob estresses abióticos em plantas.....	135
-----------------	--	-----

Tabela 2	Artigos publicados no período de 2016 à 2020 sobre transformação genética de genes 14-3-3	136
-----------------	---	-----

LISTA DE SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
ABRE	Elemento responsivo ao ABA
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
APX	Ascorbato peroxidase
BKI1	Kinase Inhibitor
BSU1	Supressor de fosfatase
CAT	Catalase
cDNA	DNA complementar
CE	Condutividade elétrica
CEes	Condutividade elétrica do extrato de saturação
CNPAF	Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão
CONAB	Companhia Nacional do Abastecimento
DAS	Dias após a semeadura
DE	Diferencialmente expresso
DR	<i>down-regulated</i>
EPACE	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará
EST	<i>Expressed Sequence tag</i>
FBN	Fixação biológica de nitrogênio
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FPKM	<i>fragments per kilobase of transcript per million</i>
FT	Fator de transcrição
GA	Ácido giberélico
G-box	Elementos em resposta à sinais ambientais
GF14	Fator de regulação 14-3-3
GRF	Fator regulatório G-box/ Fator Geral de Regulação
IITA	International Institute of Tropical Agriculture
IPA	Instituto Agrônômico de Pernambuco
ISSR	<i>Inter Simple Sequence Repeat</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NSR	<i>not-so-random</i>

PacBio	Pacific BioSciences
pb	pares de bases
PEG	polietilenoglicol
PO	Pingo-de-Ouro-1-2
qPCR	PCR em tempo real
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic</i>
RBH	<i>Bidirecional Best-Hit</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA_m	RNA mensageiro
RNA_r	RNA ribossomal
RNA_t	RNA transportador
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPM	<i>Reads</i> por milhão
RT	Transcriptase reversa
SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SI	Santo Inácio
SOD	superóxido dismutase
SOS	<i>Salt Overly Sensitive</i>
SSA	África Subsaariana
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
TrPM	Transcrito por milhão
UEPAE	Unidade de Execução de Pesquisa
UR	<i>up-regulated</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	19
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
3.1 ESTRESSES AMBIENTAIS.	20
3.1.1 Estresse por deficiência hídrica.....	21
3.1.2 Estresse salino	23
3.2 FEIJÃO-CAUPI: IMPORTÂNCIA E ASPECTOS GERAIS DA CULTURA.....	25
3.2.1 Melhoramento genético do feijão-caupi	26
3.3 PINHÃO-MANSO: IMPORTÂNCIA E ASPECTOS GERAIS DA CULTURA.....	28
3.3.1 Melhoramento genético de pinhão-manso	30
3.4 MELHORAMENTO GENÉTICO X TOLERÂNCIA À ESTRESSES	31
3.5 TECNOLOGIAS DE ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA	33
3.5.1 SAGE e derivados.....	33
3.5.2 RNA-Seq	34
3.6 BIOINFORMÁTICA: ANÁLISE COMPUTACIONAL DE DADOS BIOLÓGICOS	36
3.7 FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3.....	39
3.7.1 Funções e interações.....	40
3.7.2 Família gênica 14-3-3 em resposta à estresses abióticos.....	41
4 ARTIGO I.....	43
5 ARTIGO II.....	94
6 ARTIGO III.....	130
7 CONCLUSÕES	144
8 SÚMULA CURRICULAR.....	145
REFERÊNCIAS.....	154
APÊNDICES – ARTIGO I	167
APÊNDICE – ARTIGO II.....	175

1 INTRODUÇÃO

Estresses ambientais são os principais fatores que limitam o desenvolvimento, crescimento e produtividade das plantas, que, mediante a tais situações, tendem a desenvolver estratégias bioquímicas, fisiológicas e moleculares que as permitam suportá-las. Diante dessas condições, os vegetais precisam reprogramar seu sistema e direcionar compostos e moléculas para auxiliá-las neste processo, ocasionando redução no rendimento e na produtividade de culturas importantes como, por exemplo, as oleaginosas e as leguminosas.

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) é uma cultura de grande importância socioeconômica para o Brasil, especialmente nas regiões Norte e Nordeste, onde é utilizado como cultivo de subsistência para muitas famílias. Ocupando terceiro lugar entre os feijões mais consumidos do país, esta leguminosa é uma fonte proteica, utilizada na alimentação humana e também na alimentação animal, como feno e forragem. As regiões Norte e Nordeste são as principais produtoras de feijão-caupi, todavia, devido às corretas práticas de manejo de cultivo, aliadas a condições climáticas desejadas, é na região Centro-Oeste do país que a cultura consegue alcançar seu potencial máximo, culminando em maior produtividade.

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) é uma oleaginosa tropical e subtropical que tolera grandes períodos de estiagem, todavia, tem crescimento e rendimento reduzido diante desta condição. O estresse salino atua de forma ainda mais danosa nessa cultura, que sofre perdas significativas variadas, considerando seus diferentes acessos, os quais apresentam variabilidade nos níveis de tolerância ao sal. Esta espécie é uma forte aliada de sistemas agrícolas, funcionando como barreira natural protetiva contra o vento, além do controle da erosão do solo. Apesar de considerada tóxica para alimentação humana e animal, estudos recentes identificaram uma variedade não tóxica no México, que pode, futuramente ser introduzida à indústria alimentícia, dada a riqueza do óleo de pinhão-mansão em proteínas e carboidratos.

O melhoramento genético de plantas é essencial para garantir a produção e proteção alimentar de todo o mundo, a partir do desenvolvimento de novas cultivares com melhor rendimento e maior adaptação às diferentes condições climáticas. A resposta ao estresse abiótico é uma das principais características buscadas pelo melhoramento genético vegetal, visto que, diante da dificuldade no controle ambiental,

atuar no intuito de produzir plantas que suportem tais condições é, certamente, mais vantajoso.

De modo tradicional, espécies melhoradas são obtidas a partir de cruzamentos entre genótipos com características de interesse que, ao avançar de gerações, resultam em uma nova cultivar com os caracteres de interesse dos dois progenitores iniciais que será, posteriormente, disponibilizada no mercado. O elevado tempo demandado no avanço de gerações no melhoramento tradicional tem sido contornado com o auxílio da bioinformática e de diferentes técnicas de biologia molecular que podem prever resultados, acelerando assim o processo do desenvolvimento de cultivares melhoradas.

A nível molecular, a resposta ao estresse utiliza diversas moléculas, incluindo as proteínas reguladoras, que atuam na sinalização e transdução de sinais. As proteínas 14-3-3s são moléculas altamente conservadas, presentes em todos os eucariotos, organizadas em família com diferentes isoformas. As plantas são os eucariotos com o maior número de isoformas, variando de cinco em cevada até 26 em milho. As diferentes isoformas indicam a multifuncionalidade destas moléculas que estão envolvidas em diversos processos desde a germinação e desenvolvimento vegetal até a resposta a diferentes estímulos ambientais. Dada a variabilidade de funções, este grupo é comumente denominado como fator geral de regulação.

A atividade de ligação das proteínas 14-3-3s à seus alvos é mediada pelo reconhecimento de motivos fosforínicos e sua estrutura, composta por nove α hélices, promove a formação de um sulco anfipático, local onde os alvos são ligados. Após a interação, as 14-3-3s podem influenciar os ligantes de diferentes formas, incluindo alteração da localização, estabilidade e estado de fosforilação. Em resposta aos estresses abióticos, as proteínas 14-3-3 podem atuar influenciando genes específicos como fatores de transcrição, ou vias, como a via *Salt Overly Sensitive* (SOS) onde as diferentes isoformas regulam a expressão de diversos genes, atuando na resposta final.

A redução dos impactos ocasionados pelos estresses é um objetivo importante nos programas de melhoramento genético de plantas e entender o funcionamento das culturas diante de tais situações é o passo inicial de todo o processo. Desta forma, este estudo foi desenvolvido no intuito de caracterizar de forma estrutural e funcional, a família de fatores gerais de regulação 14-3-3 no feijão-caupi e em pinhão-mansão,

buscando indicar alvos promissores a serem explorados no melhoramento destas e de espécies relacionadas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar a família gênica 14-3-3 de feijão-caupi e pinhão-manso e analisar os transcriptomas mediante desidratação radicular em feijão-caupi e estresse salino em pinhão-manso.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 Identificar os genes que compõem a família gênica 14-3-3 de feijão-caupi e pinhão-manso.

2 Comparar seis leguminosas (*V. unguiculata*, *V. angularis*, *V. radiata*, *P. vulgaris*, *G. max* e *M. truncatula*) quanto à diversidade da família gênica 14-3-3;

3 Comparar quatro Euphorbiaceas (*Jatropha curcas*, *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta* e *Ricinus communis*) e um membro da família Salicaceae (*Populus trichocarpa*) quanto à diversidade da família gênica 14-3-3;

4 Mapear transcritos 14-3-3 de feijão-caupi e outras cinco leguminosas (*Vigna angularis*, *Vigna radiata*, *Phaseolus vulgaris*, *Glycine max* e *Medicago truncatula*);

5 Estudar a estrutura dos genes 14-3-3s de feijão-caupi e pinhão-manso, identificando éxons, íntrons e os fatores de transcrição envolvidos com as regiões promotoras dos genes;

6 Identificar transcritos 14-3-3s presentes nos transcriptomas (HT-SuperSAGE e RNA-Seq) de feijão-caupi submetido à desidratação radicular;

7 Identificar transcritos 14-3-3s presentes no transcriptoma RNA-Seq de pinhão-manso submetido à estresse salino (150mM de NaCl);

8 Validar a expressão observada *in sílico*, via PCR em tempo real (qPCR) , indicando potenciais alvos à serem utilizados por programas de melhoramento genético da espécie;

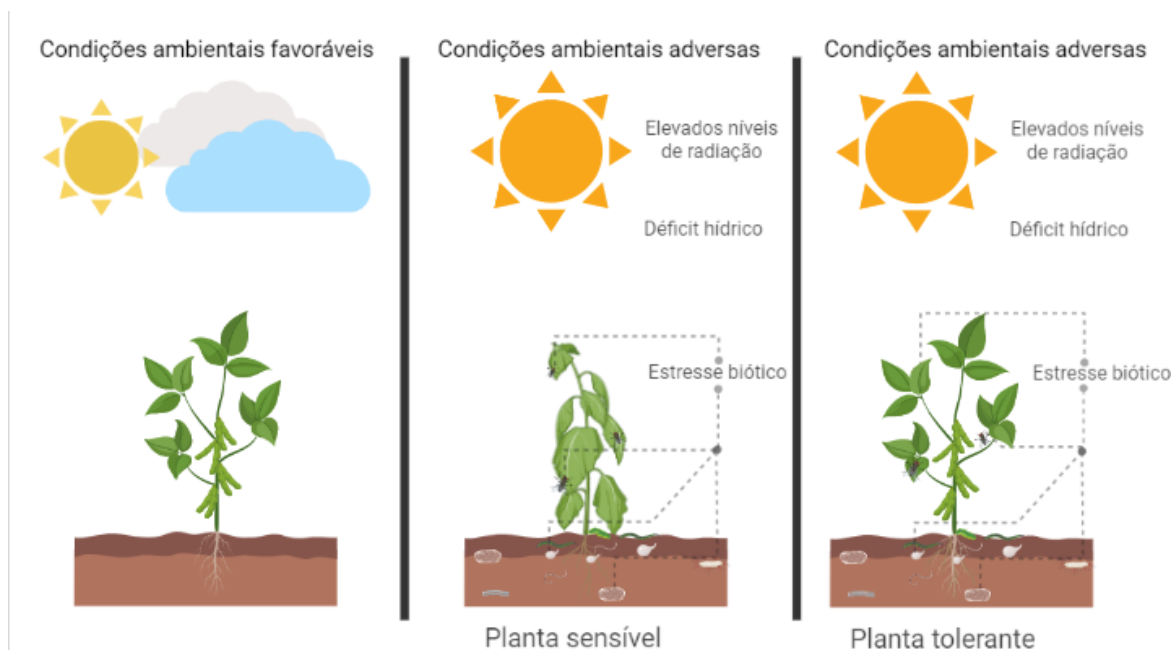
9 Construir redes de interação proteína-proteína (PPI) entre as proteínas 14-3-3s de feijão-caupi e pinhão manso.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 ESTRESSES AMBIENTAIS

As plantas, por serem sésseis, estão, constantemente, à prova de condições ambientais que as obrigam a desenvolver mecanismos que permitam contornar situações indesejadas (REJEB et al., 2014). Fatores abióticos, como: seca, salinidade, frio e calor, bem como fatores bióticos como: o ataque de pragas e patógenos, ocasionam diversas reações morfofisiológicas nas plantas incluindo lesões mecânicas, murcha, redução da capacidade fotossintética e, em casos mais severos, morte da planta (KLEPZING et al., 1995; BERNA; BERNIER, 1999; HERBETTE et al., 2011; Figura 1). O nível de tolerância aos estresses ambientais é variável entre e dentre diferentes espécies, entretanto, danos são causados, ainda que minimamente, a todas as espécies vegetais impostas à condições desfavoráveis (GULL et al., 2019; Figura 1).

Figura 1 - Esquema ilustrativo da imposição de condições adversas à espécies vegetais e suas reações morfológicas de acordo com o nível de tolerância



Fonte: O autor (2022)

Estresses abióticos têm grande impacto sobre o crescimento e desenvolvimento vegetal (CRAMER et al., 2011), sendo estes, um dos principais desafios para o desenvolvimento das plantas, ocasionando diminuição da produção agrícola e gerando perda anual de bilhões de dólares (PEREIRA et al., 2016; JOSHI

et al., 2018). A aclimação das plantas frente ao estresse abiótico é uma resposta complexa que envolve grupos de genes e suas interações com o ambiente, em todos os períodos de crescimento e fases de desenvolvimento da planta (SHARAN et al., 2017; LAKRA et al., 2017).

A produtividade agrícola é diretamente afetada pelos estresses ambientais, bióticos e abióticos, que proporcionam um redirecionamento da energia da planta que seria gasta na produção de biomassa, para que elas consigam sobreviver às condições adversas, mesmo em cultivares consideradas tolerantes (DRESSELHAUS; HÜCKELHOVEN, 2018). Sob condições adversas, uma série de alterações fisiológicas, bioquímicas e moleculares são desencadeadas para que a planta seja capaz de suportar tais condições (RAI et al., 2011). A exemplo disto, o estresse por deficiência hídrica causa alterações em parâmetros como altura da planta, área foliar, peso seco por planta, número de vagens por planta, peso seco da semente por planta e redução dos pigmentos fotossintéticos, impactando assim, no desenvolvimento das culturas (MERWAD et al., 2018).

Para suportar condições indesejadas, as plantas desenvolveram mecanismos de defesa complexos (KAZAN; LYONS, 2014; MISHRA et al., 2016). De forma geral, a estratégia de sobrevivência frente ao estresse é atingir um estado de equilíbrio, ou seja, manter a homeostase redox celular (XIONG; ZHU, 2002; BUCHANAN et al., 2015). Neste sentido, uma série de alterações na expressão gênica é desencadeada, ocasionando alterações fisiológicas e bioquímicas que visam evitar ou minimizar os danos causados pelo estresse, garantindo a sobrevivência da planta, mesmo que ocorra redução na taxa de crescimento e produtividade (HERMS; MATTSON, 1992).

3.1.1 Estresse por deficiência hídrica

O déficit hídrico é caracterizado pela baixa disponibilidade de água por um longo período de tempo (ABDELRAHEEM et al., 2019). Quando submetidas à condições de seca, as plantas reduzem a transpiração e desenvolvem sistemas radiculares profundos e vigorosos para aumentar a absorção de água e ajudar a manter o potencial de água nos tecidos (SHAVRUKOV et al., 2017). Por ser um estresse multidimensional, a seca desencadeia uma ampla variedade de respostas da planta, envolvendo níveis fisiológicos, bioquímicos e moleculares (KAUR; ASHIR, 2017).

A eficiência no transporte de água do solo para toda a planta é o que garante a abertura estomática e a fotossíntese em estado estacionário, desta forma, sob condições de estresse de seca a perda na condutância hidráulica da raiz, ocasionada pela desconexão da interação raiz – solo é o suficiente para induzir o fechamento estomático (RODRIGUEZ-DOMINGUEZ; BRODRIBB, 2020). Na maioria das plantas, a redução do número de estômatos e o fechamento estomático, caracterizam a primeira reação ao estresse hídrico que acontece para evitar a perda de água por transpiração (PIRASTEH-ANOSHEH et al., 2016).

O ácido abscísico (ABA) desempenha papel essencial na regulação da abertura estomática, atuando como primeira linha de defesa contra a seca (LI et al., 2020) estando envolvido nos processos de fechamento estomático hidroativo e hidropassivo, quando metabolicamente dependente ou não do teor de ABA nas plantas, respectivamente (PIRASTEH-ANOSHEH et al., 2016). Além do ABA, outras moléculas como o nitrogênio (N_2), sofrem influência direta do estado estomático, de modo que a redução de N_2 é associada às condições de seca (PIRASTEH-ANOSHEH et al., 2016). Adicionalmente, teores elevados de fósforo aumentam a sensibilidade estomática durante a seca a partir do aumento de citocinas nas plantas (PIRASTEH-ANOSHEH et al., 2016).

As principais respostas das plantas ao estresse hídrico são: o fechamento estomático; alterações na fotossíntese e produção hormonal; e aumento da captação de água por meio do desenvolvimento de raízes profundas e prolíficas (HEINÁK et al., 2015). Além disso, a atividade de muitas enzimas é influenciada, em especial aquelas envolvidas na síntese de ATP, osmólitos, incluindo glicinabetaína, prolina, e substância de crescimento como o ABA, os quais desempenham papéis vitais na manutenção das funções celulares durante a seca (FAROOQ et al., 2012).

A resposta precoce nas plantas acontece a partir da detecção de mudanças na pressão de turgor celular (MAATHUIS; SANDERS, 2001), desencadeando a ativação de receptores mecanossensíveis quinase ciclase, que proporcionam um acúmulo de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), inibindo o influxo de sódio pela desativação dos canais de cátions não seletivos (MAATHUIS, 2014). O acúmulo de cGMP é a base para a resposta inicial de sinalização de Ca^{2+} a partir da ativação de canais cíclicos de nucleotídeos (CNGC), dentre outros mecanismos de sinalização permitindo o influxo de Ca^{2+} apoplástico no citosol (DONALDSON et al., 2004). O déficit hídrico interrompe o transporte normal de solutos, causa a saída de elétrons da cadeia

transportadora e promove a super produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), causada, dentre outros eventos, pela resposta do ABA que, na raiz leva a NADPH oxidase a produzir EROs (HUSSAIN et al., 2019).

As espécies reativas de oxigênio são, naturalmente, produzidas pelo metabolismo vegetal, durante eventos como respiração aeróbia, onde a redução do oxigênio molecular O_2 a H_2O pode ocasionar transferência de um, dois ou três elétrons para o O_2 , e, desta forma, gerar radicais como superóxido (O_2^-) e hidroxila (OH^-), e não radicais, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singleto (1O_2) (DEMIDCHIK, 2015).

A sinalização de EROs sob condições de déficit hídrico está ligada aos fluxos de ABA e Ca^{2+} (KAUR; ASTHIR, 2017). A seca induz estresse oxidativo a partir da superprodução de espécies reativas de oxigênio e estimula várias vias de sinalização de estresse (EROs, proteína quinase ativada por mitogênio, Ca^{2+} e sinalização mediada por hormônio) (MAHMOOD et al., 2020).

O aumento na produção de EROs é controlada por um sistema antioxidante versátil e cooperativo que modula o conteúdo de EROs intracelular e define a homeostase do sistema redox da célula, composto por diversas enzimas antioxidantes que atuam na eliminação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como por exemplo, a catalase (CAT), ascorbato de peroxidase (APX), e glutathione S-transferases (GST) (MHAMDI et al., 2010; MAATHUIS, 2014; CORPAS; GONZÁLEZ-GORDO, 2020).

3.1.2 Estresse salino

Em condições de solos salinos, o crescimento e o desenvolvimento da planta podem ser comprometidos, ocasionados pelo desbalanço osmótico ou da toxidez provocada pelo excesso de íons (ZHU, 2002), desencadeando desequilíbrio no sistema redox e, conseqüentemente, estresse fisiológico (AZEVEDO et al., 2011; SREE et al., 2015).

São considerados solos salinos aqueles cuja condutividade elétrica do extrato de saturação (CEes) na zona da raiz excede 4 dS m^{-1} ($\sim 40 \text{ mM}$ de NaCl) a 25°C e possui um sódio permutável de 15%. Sob esta CEec, o rendimento da maioria das culturas é reduzido (JAMIL et al., 2011). Um dos principais motivos causadores da salinização dos solos é o manejo de irrigação inadequado, visto que, os sais contidos

na água tendem a se acumular no solo, contribuindo para o processo de salinização e inviabilizando novos cultivos agrícolas.

Estima-se que cerca de 20% do total cultivado e 33% de terras agrícolas irrigadas no mundo sejam afetadas pela salinidade (VAN SCHILFGAARDE, 1984; RAVELOMBOLA et al., 2018). Além do mau uso da irrigação, a incidência de baixas precipitações, a alta evaporação superficial e práticas de manejo de solo inadequadas têm contribuído para o aumento das áreas salinizadas. Estimativas apontam que até o ano de 2050, mais de 50% das terras aráveis sejam afetadas pela salinização (JAMIL et al., 2011).

O efeito da salinização dos solos nas plantas é complexo, desencadeando, de forma indireta, os estresses iônico e osmótico, resultando em deficiência dos principais componentes nutricionais da planta e, por consequência, afetando fases do seu desenvolvimento como: germinação, crescimento vegetativo e desenvolvimento reprodutivo (SHANNON, 1997).

O desequilíbrio iônico ocasionado pelo aumento da razão Na^+/K^+ gera desequilíbrio nutritivo na célula, provocado pela dificuldade de absorção de nutrientes (Nascimento et al., 2015; Arif et al., 2020), responsável também produção excessiva EROs que ocasionam alterações no sistema redox e danos a macromoléculas (GIL; TEJUDA 2010). Com o aumento dos teores de Na^+ na raiz da planta, ocorre diminuição do Na^+ citosólico que é, possivelmente, mediada pela ação da via sensível ao sal (SOS).

A condição de salinidade reduz a interação entre a proteína quinase SOS2 e as proteínas 14-3-3 (ZHOU et al., 2021) que liberam a SOS2 para interagir com proteína da família semelhante à calcineurina B induzida por cálcio SOS3/CBL4 (HALFTER et al., 2000). A formação do complexo SOS3/SOS2 ativa o suposto trocador Na^+/H^+ (NHX7/SOS1), que remove o Na^+ do citosol para o apoplasto do córtex, da epiderme e da raiz (BRADY et al., 2007; SHI et al., 2002). Adicionalmente, o sódio é compartimentalizado no vacúolo por transportadores NHX que são responsáveis por reduzir as concentrações de Na^+ citosólico e manter a pressão de turgor do potencial osmótico do vacúolo negativo (BASSIL et al., 2011).

A propagação do sinal de EROs está diretamente relacionada ativação do homólogo da oxidase de explosão respiratória F (RbohF), controlada por etileno (JIANG et al., 2013), e proteína quinases relacionadas a sacarose não fermentadora (SIRICHANDRA et al., 2009), proteína quinase dependente de ABA, e ligação do

ácido fosfatídico (PA) (ZHANG et al., 2009). EROs e Ca^{2+} modulam a liberação de ABA, desencadeando ao início das respostas transcricionais (ISMAIL et al., 2014).

O ácido abscísico é um hormônio essencial para as plantas e está envolvido em redes de regulação dos genes por uma via dependente ou independente de ABA (NEGRÃO et al., 2013; PRAK et al., 2008). Sob condições de salinidade, ocorre aumento dos níveis de ABA, horas após a imposição ao estresse (GENG et al., 2013), ocasionado pela clivagem de precursores de carotenoides por dioxigenases, como 9-cis-epoxicarotenoide dioxigenase-3 (NCED3) (BARRERO et al., 2006) que, posteriormente é detectada pela resistência à pirabactina (PYR), a qual, em seguida liga-se à proteína fosfatase 2C (PP2C), que é ativada e atua inibindo proteínas quinases a jusante, como a classe 3-SnRK2. Proteínas dependentes de ABA, fatores de transcrição alvo, proteínas de ligação a elementos responsivos e não responsivos ao ABA (AREB1 e ABI5), ativam genes envolvidos nas respostas de aclimação, ocasionando, por exemplo, o fechamento estomático e regulando o crescimento e as respostas de aclimação das plantas sob situações adversas (JULKOWSKA; TESTERINK, 2015).

3.2 FEIJÃO-CAUPI: IMPORTÂNCIA E ASPECTOS GERAIS DA CULTURA

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp.) é uma leguminosa cultivada em regiões tropicais que constitui uma fonte valiosa de proteína na dieta de milhões de pessoas (Boukar et al., 2019). A espécie é de origem africana e domesticação em regiões semiáridas do continente, local de maior produção da cultura (FREIRE-FILHO, 2011). No Brasil, acredita-se que a introdução do feijão-caupi se iniciou pelo Estado da Bahia e, por intermédio dos colonizadores, foi levado para outros Estados da região Nordeste e outras regiões do país (WATT, 1978), entretanto, há relatos da introdução simultânea no país, por meio dos migrantes africanos em várias regiões do Brasil (SIMON et al., 2007).

A espécie é uma leguminosa anual, herbácea, que produz frutos secos deiscentes do tipo vagem, suas flores são hermafroditas, com reprodução preferencialmente por autofecundação (aproximadamente 95%) caracterizando-se como uma espécie autógama (SELLSCHOP, 1962; VERDCOURT, 1970). O feijão-caupi apresenta ampla eficiência de fixação biológica de nitrogênio (FBN), a partir da

simbiose com bactérias rizóbios, o que permite um incremento na produtividade e sua utilização como estimulante da fertilidade do solo (DIOUF, 2011).

A maior parte da produção e consumo de feijão-caupi encontra-se na África Subsaariana (SSA), destacando-se a Nigéria com maior produção e consumo da cultura (Boukar et al., 2019). No Brasil, o cultivo do feijão-caupi é realizado em três safras: 1ª “safra das águas”, 2ª “safra da seca” e 3ª “safra de outono/inverno e a produção gira em torno de 848 mil toneladas (CONAB, 2021). A Região Nordeste é detentora da maior produção, porém, em relação a produtividade a região ocupa último lugar devido, especialmente, a falha no manejo de cultivo da espécie (JOSHI et al., 2018).

3.2.1 Melhoramento genético do feijão-caupi

O feijão-caupi é uma espécie considerada adaptada e tolerante aos estresses, incluindo o de deficiência hídrica (EHLERS; HALL, 1997), todavia, sua produtividade pode ser prejudicada por irregularidades pluviométricas, situação comum nas regiões semi-áridas, onde o caupi é predominantemente cultivado (BOUKAR et al., 2019). Diante disto, o melhoramento genético da espécie atua no desenvolvimento de cultivares tolerante aos estresses abióticos e resistente à estresses bióticos (BOUKAR et al., 2019).

O melhoramento do feijão-caupi no Brasil teve início com a seleção visual de genótipos por parte dos agricultores, entretanto, as pesquisas tiveram início em 1903. O programa de melhoramento genético do feijão-caupi surgiu a partir de uma rede nacional de pesquisas da cultura que incluía unidades descentralizadas da EMBRAPA, universidades, empresas e institutos estaduais, incluindo a Unidade de Execução de Pesquisa de Teresina (UEPAE de Teresina), a Empresa de Pesquisa Agropecuária do Ceará (EPACE) e a Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária - (IPA), onde eram realizados avanços de geração e ensaios preliminares (FREIRE FILHO, 2011).

O programa era de responsabilidade do Centro Nacional de Pesquisa de Arroz e Feijão (CNPAP), todavia, em 1986, com o fim da parceria com o International Institute of Tropical Agriculture (IITA), o programa se desestruturou e a responsabilidade de dar continuidade ao programa de melhoramento do feijão-caupi

passou a ser do Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte, em Teresina, Piauí, em 1991 (FREIRE FILHO, 2011).

Os métodos de melhoramento utilizados no programa eram seleção massal em populações locais, método genalógico e o método da descendência de uma única semente, o qual foi substituído pelo método da descendência de uma única vagem. As finalidades iniciais eram o aumento da produtividade de grãos e a resistência a doenças causadas por vírus, porém os objetivos foram ampliados para o melhoramento da arquitetura da planta, da qualidade de grãos e da adaptação a diferentes condições ambientais (FREIRE FILHO, 2011),

Desde o início do programa de melhoramento de feijão-caupi até o ano de 2009, 68 cultivares foram lançadas, número pequeno comparado as outras culturas anuais presentes no Brasil (FREIRE FILHO, 2011). Neste mesmo período, o IPA lançou seis variedades de feijão-caupi e em 2013 a sétima variedade (Miranda IPA 207) foi disponibilizada (Castelletti e da Costa, 2013), a qual teve incremento de produtividade comprovado ao ser analisada em detrimento às testemunhas Patativa e BRS Paraguaçu, no Estado de Pernambuco (DA COSTA et al., 2013).

A espécie *V. unguiculata* é um diplóide com $2n = 22$ que possui genoma considerado pequeno, com cerca de 620 milhões de pares de bases (BOUKAR et al., 2019). Por ser uma espécie autógama, (consequentemente de genoma estável) e de ciclo curto (aproximadamente dois meses) (Ishiyaku et al., 2005), o feijão-caupi é considerado um “perfil ideal” para um modelo experimental lucrativo (BENKO-ISEPPON et al., 2001), tanto para a própria cultura, como de outras leguminosas de interesse econômico como soja e feijão comum que também sofrem perdas decorrentes dos estresses bióticos e abióticos (CHEN et al., 2017).

Em 1993, marcadores *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) foram utilizados para caracterizar 44 acessos de diferentes espécies pertencentes a quatro subgêneros do gênero *Vigna* (FATOKUN ET al., 1993; BOUKART et al., 2019). Além destes, outros tipos de marcadores foram utilizados em estudos de diversidade genética da espécie, incluindo *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) (KAGA et al., 1996 ; SIMON et al., 2007), *Inter Simple Sequence Repeat* (ISSR) (AJIBADE et al., 2000), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLPs) (FANG et al., 2007) e *Simple Sequence Repeat* (SSR) (GUPTA; GOPALAKRISHNA, 2010 ; OGUNKANMI et al., 2008), todas estas técnicas foram importantes na análise de variabilidade da espécie e identificação de potenciais

marcadores à serem utilizados na seleção assistida, proporcionando redução de tempo de análise em campo (BOUKAR et al., 2019).

Desde o ano de 2007, os programas de melhoramento do feijão-caupi tem enfatizado projetos relacionados à identificação de fontes adicionais de tolerância ao estresse abiótico e resistência ao estresse biótico e para isto a biologia molecular tem sido imprescindível na aplicação de técnicas, como a seleção assistida por marcadores, promovendo agilidade e confiabilidade ao processo de seleção de genótipos superiores (BOUKAR et al., 2019). Atualmente, a espécie possui genoma completo depositado no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (GCF_04118075.1, LONARDI et al., 2015), utilizado como referência na busca de alvos promissores para o melhoramento da espécie.

3.3 PINHÃO-MANSO: IMPORTÂNCIA E ASPECTOS GERAIS DA CULTURA

O pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma espécie arbustiva que apresenta sistema radicular principal e quatro raízes laterais, altura variável entre 2 a 5 metros e produz látex amarelado adstringente (NEUPANE et al., 2021). É uma planta monoica que apresenta flores masculinas em maior quantidade, localizadas em posições subordinadas, e flores femininas presentes no ápice caulinar e nos ramos das inflorescências (CARELS, 2009). As flores são amareladas e possuem formato de sino e, geralmente, aparecem durante o período chuvoso (HELLER, 1996; CARELS, 2009). O fruto contém aproximadamente três sementes que amadurecem após 60 dias da frutificação, adquirindo coloração amarela e marrom (NEUPANE et al., 2021).

É uma espécie pertencente à família Euphorbiaceae, de origem contraditória, entretanto, relatos dos primeiros fósseis na América do Sul (BERRY, 1929), aliados a presença da espécie mais primitiva de *J. curcas* no México (MCVAUG, 1945; WILBUR, 1954) e um estudo de biomarcadores moleculares que demonstra a semelhança entre plantas de pinhão-manso de todo o mundo com o perfil molecular das espécies do México (BASHA et al., 2009), reforçam a ideia de que a América do Sul é o provável centro de origem de *J. curcas*, mais especificamente, o México (NEUPANE et al., 2021). Heller (1996) destaca que as navegações portuguesas foram a principal forma de entrada da espécie em outras regiões, a qual encontra-se atualmente distribuída entre todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo (KAMEL et al., 2018; NEUPANE et al., 2021).

A propagação da espécie acontece, principalmente, por estaquia, onde um galho de uma árvore é retirado para originar uma nova planta, caracterizando propagação assexuada (WAHL et al., 2012), além desta forma, a planta pode ser propagada por semeadura direta, com posterior transplante de mudas para o campo onde as sementes são obtidas por autopolinização (propagação assexuada) ou polinização cruzada (propagação sexuada) (NIETSCHE et al., 2014)

As folhas de pinhão-mansão, compostas por esterol, flavonóides, álcool e alcaloides, conferem a *J. curcas* diferentes aplicações medicinais (CHHABRA et al., 1990), incluindo o tratamento do sangramento vaginal (SING et al., 1984). A extração do óleo das sementes, permite teores elevados de óleo natural variando de 40 a 65%, garantindo alta rentabilidade (CARELS, 2009). Apesar de ser considerada tóxica, estudos recentes encontraram uma variedade não tóxica de *J. curcas* em que a torta da semente, obtida após a extração do óleo, torna-se uma nova fonte proteica promissora para a alimentação humana e animal, com teores de proteína de 25 a 30% (LEÓN-VILLANUEVA et al., 2018).

O pinhão-mansão é uma das culturas com alto potencial bioenergético para a produção de biodiesel, devido aos altos teores de ácidos oleico, linoleico e palmítico no óleo altamente rentável (aproximadamente 36%) de suas sementes (GÜBITZ et al., 1999; NEUPANE et al., 2021), todavia, a obtenção sustentável deste subproduto ainda não foi alcançada devido a fatores socioeconômicos e ecológicos, tais como o aumento de cerca de três a seis vezes mais da produção de gases do efeito estufa em áreas não cultivadas e, conseqüentemente, com alto teor de carbono, em comparação com a queima de combustíveis fósseis o que, para ser ecologicamente viável, necessitaria do aumento da produção de pinhão-mansão em três vezes mais, para neutralizar a alta emissão de gases (FUENTES et al., 2018).

O pinhão manso tem papel importante na atuação contra a erosão do solo, protegendo o impacto das gotas da água da chuva, tanto pela barreira ocasionada pela parte aérea, quanto pela ancoragem de seu sistema radicular (FERREIRA et al., 2022). A cobertura do solo proporcionada pela matéria seca de folhas de *J. curcas* melhora a atividade microbiana do solo, aumentando níveis de nitrogênio total, matéria orgânica e teor de compostos fenólicos o que pode reduzir impactos de estresses bióticos e abióticos nas plantas cultivadas (IRSHAD et al., 2022). Adicionalmente, o cultivo de *J. curcas* proporciona melhoria na qualidade do solo mantendo o estoque de carbono orgânico, com potencial para aumentar a taxa de sequestro de carbono e

nitrogênio, garantindo maior capacidade de infiltração de água contrastante aos processos de escoamento e erosão do solo (OGUNWOLE et al., 2008).

O cultivo de pinhão-mansão permite além da geração de renda devido aos subprodutos advindos da cultura, melhora na qualidade do solo a ser cultivado por diferentes culturas de interesse (OGUNWOLE et al., 2008). Estudos tem comprovado que a massa seca da parte aérea de plantas de *J. curcas* atuam como importante cobertura vegetal do solo, reduzindo a ação de processos erosivos a partir da proteção superficial, além da proteção em profundidade, advinda de seu sistema radicular pivotante que consegue ancorar em camadas mais profundas do solo (FERREIRA et al., 2022). A proteção do solo pela cobertura da massa seca de folhas de *J. curcas* foi capaz de reduzir perdas significativas de produtividade da cultura do trigo em condições de déficit hídrico (IRSHAD et al., 2022).

3.3.1 Melhoramento genético de pinhão-mansão

Considerada ainda como uma cultura não domesticada, muitas dificuldades são encontradas para o melhoramento genético da espécie que sofre, principalmente, com a falta de manutenção de características de interesse de forma padronizada nas produções de pinhão-mansão (SUJATHA, 2020). A literatura destaca que a alta hererozigosidade, baixa produtividade e poucos estudos genômicos são os principais fatores que impedem a produção compensatória de plantas de pinhão-mansão, destacando que a tecnologia aplicada ao cultivo destas plantas poderia auxiliar o uso aplicação rentável de *J. curcas* na indústria bioenergética (SUJATHA, 2020; AROCKIASAMY et al., 2021).

A variabilidade genética de *J. curcas* é advinda do mecanismo de polinização cruzada que resulta em uma infinidade de caracteres que podem ser explorados pelo melhoramento genético (NEUPANE et al., 2021). Apesar de ser considerada, de forma geral, uma planta de alta variabilidade genética, essa característica é variável devido, provavelmente, aos diferentes critérios de seleção e condições de cultivo adotados em todo o mundo (HEDGE; PATIL 2000).

No Brasil, estudos de marcadores moleculares observaram uma alta uniformidade genética entre raças nativas do país (ROSADO et al., 2010; GRAVITOL et al., 2011), contrastante ao alto nível de polimorfismos identificados em coleções de germoplasma da mesma espécie na China (CAI et al., 2010), além disto, estudo

demonstram a variação genética mesmo para plantas presentes na mesma região (NEUPANE et al., 2021).

O pinhão-mansão é uma planta caracterizada por tolerar longos períodos de estiagem, entretanto, apresenta redução de rentabilidade, principalmente quando o déficit hídrico acontece em combinação com outro tipo de estresse, sobretudo o de salinidade (ABRAR et al., 2020). Sob condições de estresse hídrico, *J. curcas* consegue controlar rapidamente a abertura e o fechamento estomático, mecanismo este também utilizado para suportar o estresse salino (ABRAR et al., 2020; POMPELLI et al., 2022). Apesar disto, a dificuldade na absorção de nutrientes sob condições de tais estresses é o principal fator limitante para o crescimento e a produção de pinhão-mansão, diante destas condições desfavoráveis (POMPELLI et al., 2022).

Assim como as diferenças genéticas relatadas por estudos anteriores, mesmo considerando plantas de *J. curcas* de uma mesma região (CAI et al., 2010; Neupane et al., 2021), respostas variadas são observadas em variedades diferentes da espécie sob condições de estresses abióticos (POMPELLI et al., 2021). Existem quatro montagens do genoma sequenciado de *J. curcas* disponíveis no NCBI, referentes aos anos 2014, 2018, 2019 e a mais recente e atualmente utilizada de 10 de maio de 2020 (GCF_014843425.1; JALALI et al., 2020). Todas as montagens encontram-se ainda em nível de *scaffold*, entretanto são essenciais para auxiliar a determinação de alvos promissores para o melhoramento da espécie.

Análises transcriptômicas e o desenvolvimento de marcadores moleculares funcionais têm sido importantes para entender o funcionamento e a variação das respostas entre diferentes genótipos de pinhão-mansão frente a condições desfavoráveis (POMPELLI et al., 2022), desta forma, espera-se que o avanço de tais estudos, assim como aplicações da engenharia genética possam contribuir com o melhoramento genético da espécie, melhorando o rendimento da cultura sob tais condições.

3.4 MELHORAMENTO GENÉTICO X TOLERÂNCIA À ESTRESSES

O melhoramento genético vegetal é essencial para garantir a produção rentável, bem como a proteção alimentar de todo o mundo (TESTER; LANGRIDGE, 2010). Para tanto, programas de melhoramento atuam no intuito do desenvolvimento de cultivares resistentes a diferentes agentes bióticos e tolerante às diferentes

condições climáticas (VON-BRAUN et al., 2005). Dada a dificuldade de se controlar o ambiente, a tolerância ao estresse abiótico é um dos principais desafios do melhoramento genético. Os programas de melhoramento genético de plantas devem buscar compreender como as plantas respondem aos estresses, a nível fisiológico e molecular, e fazer uso destas informações para o desenvolvimento e lançamento de novas cultivares cada vez mais adaptadas (NONGPIUR et al., 2016; JOSHI et al., 2018).

O processo tradicional para a obtenção de novas cultivares consiste, de forma geral, no cruzamento entre genótipos progenitores com características de interesse que, ao avançar de gerações, são transmitidas a um novo produto a ser disponibilizado no mercado (AHMAR et al., 2020). Para auxiliar o melhoramento tradicional, no intuito de reduzir o tempo gasto com o avanço de gerações, a biologia molecular tem atuado como importante área auxiliar no entendimento da resposta ao estresse (WANI et al., 2018). Além disto, técnicas de biologia molecular como transgenia e edição genômica têm sido de suma importância no desenvolvimento de plantas melhoradas (ANWAR; KIM, 2020; AHMAR et al., 2020).

As células de plantas têm a capacidade de identificar situações de estresse e respondê-las sob forma de defesa induzida, conforme necessidade do organismo (ULLAH et al., 2018). A reprogramação dos padrões de expressão gênica é um dos mecanismos-chave na aclimação e adaptação às condições ambientais desfavoráveis, atuando nos níveis moleculares, bioquímicos e fisiológicos (BARTELS; SUNKAR, 2005). Dentre os genes responsivos aos estresses, encontram-se os codificantes para osmoprotetores, enzimas antioxidantes, aquaporinas, transportadores, fatores de transcrição (FT), além de diversas proteínas regulatórias, os quais são considerados peças fundamentais nos mecanismos de regulação gênica (JOSHI et al., 2018).

Os produtos dos genes induzidos sob condições de estresse, são considerados os promotores de tolerância por meio da sua atividade na transdução de sinais em diversas vias (NAKASHIMA; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, 2009). Com o advento da tecnologia do sequenciamento de nova geração (NGS), a exploração da base genética para genes candidatos ligados à fisiologia do estresse pôde ser facilitada a partir das várias tecnologias atuais, chamadas de ômicas, que englobam a genômica, transcriptômica, metabolômica, dentre outras (MAHMOOD et al., 2020; SHAW et al., 2021).

3.5 TECNOLOGIAS DE ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA

O transcriptoma pode ser definido como um conjunto completo de transcritos em uma célula ou tecido, incluindo os RNAs do tipo: mensageiro (mRNA), ribossômico (rRNA), transportador (tRNA) e não codificador (ncRNA) (RODRIGUES et al., 2019). As moléculas de RNAs são componentes essenciais de todas as células vivas e o entendimento acerca da abundância e identidade destas moléculas, mediante condições específicas, é o intuito de toda análise transcriptômica (HRDLICKOVA et al., 2016).

A transcrição do RNA é o primeiro nível de expressão gênica e, portanto, o evento primário de controle da expressão gênica (RODRIGUES et al., 2019). Em condições adversas à homeostase celular, mudanças na expressão gênica devem acontecer para que o organismo possa se adaptar à determinadas situações, desta forma, análises transcriptômicas permitem detectar mudanças mediante condições específicas, auxiliando na compreensão das diferentes respostas fisiológicas e bioquímicas, decorrentes da regulação de diversos genes, seja a regulação positiva ou negativa (RODRIGUES et al., 2019).

Inicialmente, o sequenciamento de RNA era realizado de acordo com o método *Expressed Sequence tag* (EST), desenvolvido por Adams et al., (1992) o qual determinava a expressão gênica a partir do sequenciamento parcial de clones de DNA complementares ao RNA (cDNA) (HRDLICKOVA et al., 2016). Esta técnica teve papel fundamental na descoberta de novos genes nos genomas na década de 1990, todavia, o custo elevado e processo laborioso logo deu espaço à outros métodos de sequenciamento de RNA (HRDLICKOVA et al., 2016).

3.5.1 SAGE e derivados

O método de *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE), desenvolvido por Velculescu et al., (1995), em comparação ao EST era menos acessível e menos trabalhoso devido ao sequenciamento de apenas uma região de *tag* curta por cDNA (15 pb para o método SAGE curto e 21 pb para o método SAGE longo e 26 pb para o método SuperSAGE) (MATSUMURA et al., 2008; HRDLICKOVA et al., 2016).

Uma comparação entre os métodos EST e SAGE destaca a abordagem de múltiplos transcritos, utilizando um clone e sequenciamento único por meio da técnica

de SAGE, em contraposição ao processo de transcrição única de cada sequência no método de EST (SUN et al., 2004). Segundo os autores, esta característica viabiliza a utilização de SAGE detector um maior número de transcritos, além disso, uma maior quantidade de transcritos de baixa abundância.

Em resumo, a tecnologia de SAGE funciona inicialmente, isolando mRNA de células a partir de beads magnéticas que contém um oligo-dT, os mRNAs são convertidos em DNA de fita dupla (cDNA). Em seguida, uma enzima de ancoragem de corte frequente (sítio de restrição de 4 pb) digere o cDNA até as extremidades próximas da cauda poli-A do mRNA, posteriormente o fragmento resultante é ligado a um adaptador de ligação, o qual contém uma sequência 5'-GGGAC-3', que funciona como local de reconhecimento de uma endonuclease responsável por clivar o cDNA à 15 bp na direção 3' do local de reconhecimento, sendo este fragmento chamado '*tag*'. Por fim o fragmento liberado é clonado em vetor plasmídico e sequenciado. (MATSUMURA et al., 2005).

O método SAGE é baseado em dois princípios: uma sequência nucleotídica curta (etiqueta ou *tag*) contém informações suficientes para identificar especificamente um transcrito; e a concatemerização de *tags* permite análise de 20 a 60 *tags* por reação de sequenciamento, sendo a frequência calculada pelo número de vezes que um fragmento é sequenciado em uma biblioteca de cDNA (D INEL et al., 2005). O SuperSAGE é uma técnica variante da tecnologia SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), que permite a quantificação de transcritos por *tags* de 26 bp (MATSUMURA et al., 2008). O tamanho maior garante maior especificidade da sequência, aumentando a confiabilidade do processo.

3.5.2 RNA-Seq

A tecnologia do sequenciamento de nova geração (NGS) revolucionou a biologia molecular, disponibilizou elevada quantidade de dados precisos para compreensão das sequências de ácidos nucleicos em um curto espaço de tempo (FENG et al., 2015). Utilizando esta metodologia, a técnica RNA-Seq é uma abordagem transcriptômica que quantifica o conteúdo de RNA nas células sem necessidade de conhecimento prévio das regiões transcritas, como necessário na técnica de *microarray* (WILHELM; LANDRY, 2009).

Embora seja possível o sequenciamento direto de moléculas de RNA (OZSOLAK et al., 2009), devido à maturidade técnica, a maioria é baseada no sequenciamento de cDNA, onde bibliotecas de cDNA são construídas a partir do RNA (HRDLICKOVA et al., 2016). De forma geral, a técnica do RNA-Seq consiste nas etapas de: captura do mRNA pela cauda poli (A); conversão de mRNA em cDNA; construção de uma biblioteca de fragmentos de cDNA; ligação dos fragmentos à adaptadores e; sequenciamento das moléculas (RODRIGUES et al., 2019).

A captura do mRNA através da cauda poli (A) pode ser realizada com esferas magnéticas ou de celulose revestidas com moléculas de oligo-dT. Outras opções de seleção usam o oligo-dT *priming* para transcrição reversa (RT) (HRDLICKOVA et al., 2016). Após a poliadenilação, uma subfase importante do processo é a deleção de RNA, a qual consiste na remoção dos rRNAs, que são os tipos de RNA mais abundantes nas células (RODRIGUES et al., 2019). Neste processo, geralmente são desenvolvidas sondas específicas capazes de hibridar com os rRNAs, todavia, outras técnicas incluindo a utilização de iniciadores específicos, *not-so-random* (NSR) que se ligam às moléculas de RNA de interesse durante a RT, evitando a presença dos rRNAs também são utilizadas (HRDLICKOVA et al., 2016).

Dando continuidade ao processo, após correta seleção de RNAs poli-A, a fragmentação dos cDNAs presentes nas bibliotecas é realizada utilizando soluções alcalinas, soluções com cátions divalentes (Mg^{2+} , Zn^{2+}), ou enzimas, como RNase III, em tamanhos dependentes da capacidade do sequenciador (por exemplo, <600 pb nos sequenciadores *Illumina*) (HRDLICKOVA et al., 2016). Em seguida, as extremidades dos cDNAs são removidas, as quais são reparadas mediante adição de ligantes de identificação de amostras e por fim, o sequenciamento propriamente dito é realizado (FENG et al., 2015).

As plataformas NGS podem ter capacidade de leitura diferentes, e de acordo com isto são classificadas em Plataforma de leituras curtas ou longas (FENG et al., 2015). As plataformas NGS de leitura curta (*Illumina HiSeq* e *NextSeq*) apresentam menor custo e a maior taxa de transferência quando comparadas às plataformas 454, *Ion Torrent* e *Miseq* (plataformas de leitura longa) (GLENN, 2011), entretanto, a complexidade de montagem *de novo* de sequencias mais curtas dificultam a aplicação deste grupo (FENG et al., 2015). Alguns *softwares* de montagem *de novo*, como o *Trinity* (GRABHERR et al., 2011), *Velvet* (ZERBINO; BIRNEY, 2008) ou *Abyys* (BIROL

et al., 2009) foram bem desenvolvidos e auxiliam o uso de plataformas NGS de leitura curta (FENG et al., 2015)

A partir da sua capacidade de revelar diretamente a identidade da sequência de cDNA/RNA, o RNA-Seq se tornou uma abordagem amplamente utilizada nos estudos de expressão gênica, todavia, as tecnologias de sequenciamento continuam avançando rapidamente e muitos métodos estão sendo criados e disponibilizados em um curto espaço de tempo (Hrdlickova et al., 2016), como o Pacific BioSciences (PacBio), técnica baseada em PCR em tempo real (qPCR) com capacidade de sequenciar fragmentos de até 20kpb (RHOADS; AU, 2015; CALLEJAS-HERNÁNDEZ, et al., 2018).

3.6 BIOINFORMÁTICA: ANÁLISE COMPUTACIONAL DE DADOS BIOLÓGICOS

A análise de dados *in silico* ganhou força quando os pesquisadores de todo o mundo se uniram em uma busca comum de sequenciar, armazenar e analisar genomas completos, após o advento do NGS (ATTWOOD; MILLER, 2002). A partir da disponibilização massiva de dados, a bioinformática atua como um ramo interdisciplinar aplicado na coleta, armazenamento e análise de dados biológicos (MANISEKHAR et al., 2020), a partir do uso da abordagem computacional para trabalhar com dados (KUMAR; CHORDIA, 2017).

Apesar do maior enfoque na era pós NGS, a bioinformática surgiu há mais de 50 anos, quando os computadores não tinham capacidade de processamento como atualmente e o DNA ainda não podia ser sequenciado (GAUTHIER et al., 2019). Ainda no início dos anos 60, as bases da bioinformática foram estabelecidas a partir da aplicação de métodos computacionais para análise de sequência de proteínas (montagem *de novo* de sequências, bancos de dados e modelos de substituição) (GAUTHIER et al., 2019).

Dos anos 90 aos anos 2000, grandes melhorias na tecnologia de sequenciamento, juntamente com custos reduzidos, deram origem a um aumento exponencial de dados (ATTWOOD; MILLER, 2002). A partir de então, o grande volume de dados gerou novos desafios, especialmente, na mineração e gerenciamento de dados, exigindo mais experiência da ciência da computação para maior eficiência desta área (GAUTHIER et al., 2019).

Várias ferramentas e softwares são desenvolvidos para auxiliar a análise e interpretação da complexidade de dados biológicos, incluindo as que permitem a análise e alinhamento de sequências, modelagem molecular, anotação e simulação dinâmica para acelerar a pesquisa biotecnológica (KUMAR; CHORDIA, 2017), processos estes de ampla utilização por vários pesquisadores em todo o mundo.

Uma ferramenta bastante utilizada para comparação rápida de sequências é o BLAST - Busca de Alinhamento Local, que consiste em um algoritmo simples e robusto que pode ser implementado de várias maneiras e consiste no alinhamento de sequências com base na similaridade existente entre elas (ALTSCHUL et al., 1990). O BLAST é uma ferramenta disponível para uso online em muitos sites, com ênfase para *National Center for Biotechnology Information* – NCBI, que é um dos bancos de dados mais utilizados em todo o mundo. A aplicabilidade do BLAST consiste na possível relação existente entre diferentes espécies que possuem sequências similares e, desta forma, o algoritmo pode ajudar a inferir funções e relações evolutivas entre diferentes espécies (LOBO, 2008).

Para realizar alinhamento múltiplos de sequências, os programas do Clustal (ClustalW e ClustalX), são amplamente utilizados, os quais promovem alinhamento múltiplo automático de sequências nucleotídicas ou proteicas a partir da construção de matrizes (THOMPSON et al., 2003). Ferramentas para edição de alinhamentos foram desenvolvidas, destacando-se o *software* Jalview (CLAMP et al., 2004), que permite a integração do alinhamento com outras informações relevantes como: o grau de conservação das sequências; a sequência consenso que representa as múltiplas sequências alinhadas; além de informações como a hidrofobicidade dos aminoácidos (PROCTER et al., 2021).

O software MEGA – *Molecular Evolutionary Genetics Analysis* foi desenvolvido para estimar distâncias evolutivas, reconstruir árvores filogenéticas e calcular dados estatísticos a partir de dados moleculares utilizando o Clustal como ferramenta de alinhamento (KUMAR et al., 1994). A versão mais recente deste software (MEGA 11) contém uma diversidade de ferramentas de evolução molecular computacional, incluindo métodos de estimativa de tempo de divergência e intervalos de confiança para datação de nós confiáveis, além da adição de um método Bayesiano para estimar probabilidades evolutivas neutras de alelos em uma espécie (TAMURA et al., 2021).

No campo da análise de caracterização estrutural e funcional, a bioinformática tem sido indispensável, ajudando a entender os fundamentos básicos da evolução em

biologia molecular e permitindo inferir sobre a relação entre estrutura e função gênica com base nos mais variados *softwares* e algoritmos disponíveis (MANISEKHAR et al., 2020).

Um conjunto integrado de ferramentas para estudar motivos de sequências moleculares é ofertado gratuitamente pelo software online MEME Suites, o qual permite inferir, mediante identificação de motivos conservados em um grupo de sequências, os quais são importantes para o estudo de interações moleculares na célula (BAILEY et al., 2015). Implementado ao MEME, a ferramenta Tomtom permite a comparação dos motivos identificados em outras ferramentas, podendo compará-los com bancos de dados de motivos como, por exemplo, o JASPAR (BAILEY et al., 2015; SANDELIM et al., 2004).

Para comparar e analisar *clusters* de diferentes ortólogos em genomas completos, a ferramenta OrthoVenn, recentemente *atualizada* para a versão dois, é um servidor web gratuito e de fácil utilização que permite a análise comparativa de identificação de ortólogos em até 12 espécies diferentes simultaneamente, as quais podem indicar possíveis similaridades funcionais entre os ortólogos identificados (XU et al., 2019). Para facilitar a identificação de diferenças e semelhanças entre genomas a ferramenta Circos usa ideogramas para mostrar a relação entre as espécies a partir de um *layout* circular baseado nas posições dos genes alvos que podem ser facilmente visualizados nesta ferramenta (KRZYWINSKI et al., 2009).

O TBtools é um kit que integra mais de 130 funções, distribuídas em diferentes ferramentas de manipulação de dados, aliado a uma interface de fácil entendimento, esta plataforma é corriqueiramente atualizada e está disponível gratuitamente para auxiliar muitos pesquisadores da área de biologia molecular, com ênfase em bioinformática, sobretudo, aqueles que não tem muita intimidade com a utilização de linhas de comando e que podem, através desta ferramenta realizar diferentes análises incluindo a construção de *heatmaps* para demonstrar a expressão gênica e desvendando a estrutura gênica de um ou de vários grupos de moléculas de interesse (CHEN et al., 2020).

O volume de dados garantiu melhoria e agilidade na análise de dados biológicos, todavia, um desafio encontra-se presente em um processo importantíssimo, que é base para todas as outras análises: a mineração de dados (MANISEKHAR et al., 2020). A amplitude de dados pode acabar degradando significativamente a precisão e a eficiência de alguns algoritmos, principalmente

quando existem recursos irrelevantes ou redundantes (WANG et al., 2016) desta forma, cabe ao pesquisador optar por meios que permitam o refinamento de seus dados.

3.7 FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3

As proteínas 14-3-3 compõem uma família de moléculas reguladoras conservadas, expressas em todas as células eucarióticas, caracterizadas pela capacidade de ligação à diversas proteínas de sinalização de várias funcionalidades, incluindo, fatores de transcrição (FTs), quinases, fosfatases e receptores transmembranares (FU et al., 2000).

A partir da capacidade de ligação à diferentes alvos, as 14-3-3s atuam regulando vários processos biológicos, incluindo a transdução de sinal (YOON; KIEBER, 2013; VILSON et al. 2016), o crescimento, e desenvolvimento de vegetais, além da resposta a estresses bióticos e abióticos (LOZANO-DURÁN; ROBATZEK, 2015; CAMONI et al., 2018).

O nome “14-3-3” foi estipulado em 1967, baseado em uma classificação sistemática de proteínas cerebrais em mamíferos, utilizando eletroforese em gel de amido, na qual a eluição (14^a) de um extrato de tecido cerebral em coluna de troca iônica (fração 3.3) permitiram a denominação do grupo como proteínas 14 -3-3 (VAN HEUSDEN, 2005). Nas plantas a isoforma 14-3-3 foi identificada como parte de um complexo de proteína-G-box, sendo então chamada de GF14 ou GRF (Fator Regulatório G-box ou Fator Geral de Regulação) (ROONEY; FERL, 1995) , devido à isto, alguns trabalhos utilizam a nomenclatura “GF14” ou “GRF14” ao se referir da família 14-3-3 (LI et al., 2015; YANG et al., 2017).

Formadas por homo ou heterodímeros, as proteínas 14-3-3s podem se ligar simultaneamente a mais de um alvo, já que cada monômero possui um local de ligação (FINNIE et al., 2011). A interação entre 14-3-3s e seus alvos acontece mediante reconhecimento de motivos fosfoserínicos que funcionam como sinal para ligação e criação de complexos de sinalização de múltiplas subunidades, por sua vez, a intensidade de ligação aumenta de acordo com a similaridade da sequência de ligação ao consenso ideal (MUSLIN et al., 1996).

O mecanismo geral de interação das 14-3-3s é ocasionado pela estrutura da proteína, em que cada subunidade é formada por um conjunto de nove hélices antiparalelas conservadas que juntas formam um suco anfipático, o qual permite a ligação de seus alvos (LIU et al., 1995). No geral, as proteínas apresentam regiões centrais conservadas, com pelo menos um motivo conservado em todos os eucariotos, em contrapartida, as regiões C terminal e N terminal são variáveis (FERL et al., 2002).

Uma análise estrutural, funcional e mutacional correlacionando 30 proteínas 14-3-3 de espécies relacionadas à *Triticum aestivum* detectou mutações significativas na posição 80 do domínio conservado, causando uma alteração na estrutura e na função das proteínas ao longo da evolução (BHATTACHARYA et al., 2018). As pequenas divergências centrais e, especialmente, as variações nas regiões C e N terminais são responsáveis pela organização destas proteínas em famílias multigênicas, com diferentes isoformas, garantindo maior especificidade às funções individuais de cada isoforma (FENG et al., 2002).

As isoformas 14-3-3 subdividem-se em dois grupos, com base em suas características evolutivas: o grupo Epsilon e o grupo Não-Epsilon, os quais são caracterizados por genes formados por 3-4 (Não epsilon) ou 6-7 éxons (Epsilon) (DELLILE et al., 2001), entretanto, algumas variações podem ser observadas neste número, como em soja (WANG et al., 2019) o que não inviabiliza, evolutivamente, a subdivisão dos grupos, os quais são formados por uma quantidade maior de éxons no grupo Epsilon e menor no grupo Não-epsilon. Além dos grupos supracitados, estudos filogenéticos recentes destacam a presença de pelo menos quatro subfamílias (iota, epsilon, kappa e psi) nas angiospermas, destacando, em adicional, que grupos de isoformas 14-3-3 foram coexpressos juntos, considerando espécies evolutivamente próximas sob determinadas condições fisiológicas, ao passo que, em outras espécies, também aparentadas, é observada expressão oposta para isoformas 14-3-3, salientando a variabilidade funcional em contraste a conservação estrutural dos membros da família 14-3-3 em diferentes espécies (MIKHAYLOVA et al., 2021).

3.7.1 Funções e interações

As plantas são os eucariotos com maior número de isoformas 14-3-3 (WILSON; SUELEN; THELEN, 2016), todavia existe amplitude de variação numérica entre

espécies vegetais, incluindo menos de 10 genes em espécies como cevada (cinco genes) (SCHOONHEIM et al., 2007), arroz (oito genes) (YAO et al., 2016) e feijão comum (nove genes) (LI et al., 2015), e mais de vinte genes em soja (22 genes) (WANG et al., 2019) e milho (26 genes) (KUMAR et al., 2015).

A multifuncionalidade das isoformas 14-3-3s é determinada, dentre outros fatores, pela capacidade de se associar à alvos presentes em todos os compartimentos celulares, impactando-os de maneiras diferentes, como a mudança de localização intracelular, estabilidade, estado de fosforilação e atividade e/ou interações moleculares (DOUGHERTY; MORRISON, 2004).

A interação entre proteínas 14-3-3 e fatores de transcrição demonstra o envolvimento destas proteínas na regulação de diferentes vias, a partir do controle de estabilidade e localização de FTs como Kinase Inibitor (BKI1) e o supressor de fosfatase (BSU1), importantes na regulação de hormônios (CAMONI et al., 2018). Um estudo via transgenia confirma a interação de 14-3-3s com fatores de transcrição (*DREB1A* e *DREB1B*) e com genes presentes na via de sinalização do ABA (*ABI1*), a partir da ativação da transcrição destes fatores, mediante imposição de estresse por deficiência hídrica na gramínea *Brachypodium distachyon* (YANG et al 2017).

3.7.2 Família gênica 14-3-3 em resposta à estresses abióticos

Estudos tem se concentrado em caracterizar e analisar a resposta da família mediante diferentes estímulos ambientais, incluindo seca em salinidade em soja (CHEN et al. 2015; WANG et al., 2019), feijão comum (LI et al., 2015; LI et al., 2018), *Brassica rapa* (CHANDNA et al., 2016) e *Brachypodium distachyon* (CAO et al., 2016). Uma série de trabalhos tem constatado a indução de genes 14-3-3s em resposta aos estresses salino induzido por NaCl (WANG et al., 2019; Shang et al., 2018; Yashvardhini et al., 2018) e de deficiência hídrica, induzida por supressão de rega (LIU et al., 2018) e simulação com PEG (CAO et al., 2016), todavia a resposta variada entre as diferentes isoformas da família é também uma característica presente em todos os trabalhos, indicando assim a especificidade e multifuncionalidade das diferentes isoformas.

Além dos trabalhos a nível de expressão, as técnicas de transformação genética tem sido utilizadas para desvendar o papel das isoformas na regulação dos diferentes estresses. Análises da influência da superexpressão do gene *TaGF14b*

associadas à análises fisiológicas e bioquímicas confirmaram a eficiência do transgene, aumentando a tolerância a múltiplos estresses abióticos por meio da via de sinalização ABA, alterando processos fisiológicos e bioquímicos, como o sistema de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), fechamento estomático e expressões gênicas relacionadas ao estresse (ZHANG et al., 2018).

Apesar de muitos trabalhos confirmarem, via transgenia, o aumento da tolerância a diferentes estresses abióticos ocasionada por 14-3-3s, alguns trabalhos, como o de feijão comum, demonstram a diminuição da tolerância em plantas transformadas em comparação às selvagens (LI et al., 2018). Esta característica indica a necessidade do melhor entendimento do modo de regulação destas proteínas, no sentido de analisar, isoformas específicas em relação à alvos e condições específicas, visando desvendar e explorar melhor variabilidade de respostas e modos de regulação deste grupo de proteínas.

4 ARTIGO I

Artigo a ser submetido na revista Genetics and Molecular Biology

GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA DE GENES 14-3-3 EM *Vigna unguiculata* (L.)

WALP

Running title: Os genes 14-3-3s de feijão-caupi

Vanessa Emanuelle Pereira Santos¹; Manassés Daniel da Silva¹; Ana Maria Benko-Iseppon¹; Éderson Akio Kido¹

1 Departamento de Genética, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Genética – PPGG, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Corresponding author: kido.ufpe@ufpe.br

Resumo

O feijão-caupi é uma leguminosa de importância socioeconômica que, apesar de ser tolerante à estresses abióticos, apresenta redução de produtividade diante de tais situações. As 14-3-3s são moléculas reguladoras multifuncionais que estão envolvidas na transdução de sinais e na resposta à condições desfavoráveis. Este estudo buscou identificar e caracterizar, a nível estrutural e funcional, a família gênica 14-3-3 de feijão-caupi. Foram identificadas nove isoformas com estrutura conservada e pequenas variações nas regiões N e C terminais, distribuídos nos cromossomos dois, três, cinco, oito e nove. As 14-3-3s de feijão-caupi subdividem-se nos grupos Epsilon e não Epsilon com base na estrutura de organização éxon-ínton. Ortólogos foram encontrados em todas as seis leguminosas analisadas comparativamente. As regiões promotoras dos Vu14-3-3s apresentam sítios de ligação à vários fatores de transcrição, em especial TCP, MYB e DOF. Transcritos 14-3-3 apresentam respostas variadas ao estímulo de desidratação radicular, entretanto, sugere-se que os genes *Vu14-3-3g* e *Vu14-3-3i* estão envolvidos na resposta positiva à desidratação radicular e são alvos promissores a serem explorados no melhoramento genético da espécie. Este estudo disponibiliza, pela primeira vez, a identificação e caracterização da família 14-3-3 de feijão-caupi.

Palavras-chave: moléculas reguladoras, isoformas, multifuncional, déficit hídrico, expressão.

Abstract

Cowpea is a legume of socioeconomic importance that, despite being tolerant to abiotic stresses, presents reduced productivity in such situations. The 14-3-3s are multifunctional regulatory molecules that are involved in signal transduction and in

responding to unfavorable conditions. This study sought to identify and characterize, at a structural and functional level, the 14-3-3 gene family of cowpea. Nine isoforms with conserved structure and small variations in the N and C terminal regions were identified, distributed in chromosomes two, three, five, eight and nine. Cowpea 14-3-3s are subdivided into Epsilon and non-Epsilon groups based on exon-intron organization structure. Orthologues were found in all six legumes analyzed comparatively. The promoter regions of Vu14-3-3s have binding sites for several transcription factors, especially TCP, MYB and DOF. 14-3-3 transcripts show varied responses to the stimulus of root dehydration, however, it is suggested that the Vu14-3-3g and Vu14-3-3i genes are involved in the positive response to root dehydration and are promising targets to be explored in the genetic improvement of the species. This study provides, for the first time, the identification and characterization of the cowpea 14-3-3 family.

Keywords: regulatory molecules, isoforms, multifunctional, water deficit, expression.

Introdução

O feijão-caupi [*Vigna unguiculada* (L.) Walp.] é considerado uma importante fonte nutricional na alimentação humana e animal, em especial em regiões semi-áridas (Rivas et al., 2016). Além possuir benefícios nutricionais, o feijão-caupi, é considerado uma opção atraente para o cultivo em solos com baixos teores nutricionais e degradados, uma vez que libera matéria orgânica de alta qualidade e facilita a circulação dos nutrientes do solo, bem como a retenção de água, além de possuir a capacidade de restaurar nutrientes em solos salinos (Abiala et al., 2018; Amorim et al., 2022; Opoku et al., 2022).

Estresses abióticos são responsáveis por limitar o crescimento e o desenvolvimento de várias culturas de interesse econômico, incluindo espécies que possuem cultivares consideradas tolerantes, como *V. unguiculata* (Furtado et al., 2014; Ravelombola et al., 2018). Algumas variedades do feijão-caupi possuem tolerância natural às condições de estresses abióticos, incluindo déficit hídrico e salinidade (Mishra et al., 2012; Silva et al., 2016), e são consideradas fonte de genes a serem explorados em programas de melhoramento genético (Benko-Iseppon, 2001).

As constantes alterações climáticas fazem com que, estudos referentes à tolerância aos estresses abióticos, sejam realizados constantemente, no intuito de fornecer soluções que permitam evitar perdas na produtividade (Wang et al., 2018).

Avanços nas tecnologias de sequenciamento de dados genômicos e transcriptômicos foram fundamentais na identificação de genes funcionais e regulatórios envolvidos na adaptação a fatores ambientais (Abdelrahman et al., 2018).

As proteínas 14-3-3 constituem uma família de moléculas reguladoras conservadas, expressas em todas as células eucarióticas, que se caracterizam pela capacidade de se ligar à uma infinidade de proteínas de sinalização, funcionalmente diversas, incluindo quinases, fosfatases, receptores transmembranares (Fu et al., 2000) e fatores de transcrição, interagindo diretamente com a maquinaria de expressão gênica (Fulgosi et al., 2002; Denison et al., 2011).

Em plantas, uma isoforma 14-3-3 foi identificada como parte de um complexo de proteína com o elemento G-box, sendo denominada GF14 ou GRF (Fator Regulatório G-box ou Fator Geral de Regulação) (Rooney and Ferl, 1995), a multifuncionalidade desta família confirmada em estudos posteriores normalizaram então a nomenclatura “GF14” ou “GRF14” ao se referir a família de fatores gerais de regulação 14-3-3 (Li et al., 2015; Yang et al., 2017).

A ligação das 14-3-3s aos alvos, por meio da ligação à sítios fosfoserínicos (Muslin et al., 2006), pode alterar a localização, estabilidade, estado de fosforilação, atividade e/ou interações moleculares do seu ligante (Dougherty and Morrison, 2004). Além disso, mediante estímulos extracelulares ou intracelulares, as proteínas 14-3-3 podem modular as vias de sinalização, impactando a transdução de sinal, além de regular proteínas a jusante que provocam a resposta fisiológica (Denison et al., 2011).

O papel das 14-3-3s na resposta à estresses abióticos foi analisado em diversas culturas, incluindo as leguminosas soja (Sun et al., 2015; Wang et al., 2019) e feijão-comum (Li et al., 2015; Li et al., 2018) e a variabilidade de respostas entre espécies e isoformas diferentes demonstra a necessidade de identificação e caracterização específica para que seja possível entender o funcionamento desta família gênica em cada espécie. Diante do exposto, o presente estudo buscou, pela primeira vez, identificar e caracterizar a família gênica 14-3-3 de feijão-caupi, inferindo sob sua resposta aos estímulos de desidratação radicular e salinidade.

Material e métodos

Abordagem genômica

Identificação da família gênica 14-3-3 em feijão-caupi e espécies filogeneticamente correlacionadas

Transcritos 14-3-3 de *Vigna unguiculata*, *Phaseolus vulgaris* (L.), *Glycine max* (L.), *Medicago truncatula* (Gaertn), *Vigna angularis* (Willd.) Ohwi & H. Ohashi e *Vigna radiata* (L.) foram obtidos por meio de busca por palavras-chave, utilizando os termos “14-3-3”, “GRF14” e “GF14”, no banco de dados RefSeq do *National Center for*

Biotechnology Information - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Adicionalmente, utilizando o mesmo artifício de pesquisa, foram identificadas sequências 14-3-3 no banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) para as espécies *V. unguiculata*, *P. vulgaris*, *G. max* e *M. truncatula*.

As sequências dos transcritos 14-3-3 de cada espécie, previamente identificadas, foram alinhadas com seus respectivos transcriptomas de referência, disponíveis no NCBI (*V. unguiculata* – GCF_04118075.1; *V. radiata* – GCF_000741045.1; *V. angularis* – GCF_001190045.1; *P. vulgaris* – GCF_000499845.1; *G. max* – GCF_000004515.1; *M. truncatula* - GCF_000219495.1) e no Phytozome (*V. unguiculata* – v1.1 *cowpea* ID469 ; *P. vulgaris* – v2.1 *common bean* ID442; *G. max* – Wm82.a2.v1 ID275; *M. truncatula* – Mt4.0v1 ID285), no intuito identificar possíveis sequências ainda não anotadas.

Os transcritos 14-3-3 das seis espécies, identificados e confirmados, foram alinhados contra o transcriptoma de referência de feijão-caupi (GCF_04118075.1) via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-20}$) e classificados pelo método *best hit* (maior score, maior identidade, maior tamanho de alinhamento e menor $e\text{-value}$ ($<e^{-95}$), visando identificar todos os transcritos 14-3-3 presentes em *V. unguiculata*.

Além dos transcritos, polipeptídeos 14-3-3 das seis espécies foram obtidos no RefSeq do NCBI, levando em consideração, para a escolha da sequência representativa do *loci* gênico, a que apresentava maior tamanho. As prováveis proteínas 14-3-3 tiveram domínio completo confirmado pelo *Batch CD Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>; Marchler-Bauer e Derbyshire, 2015) e foram utilizadas para as análises estruturais subsequentes. Os componentes 14-3-3 de cada espécie foram nomeados considerando as iniciais de seus nomes científicos, seguidas do termo “14-3-3” e a designação alfabética,

ordenada com base em sua localização cromossômica. Os números dos identificadores correspondentes às respectivas sequências de cada espécie, bem como a nomenclatura adotada neste estudo, foram listados na Tabela S1.

Genômica estrutural comparativa da família gênica 14-3-3

Alinhamento múltiplo de sequências

As sequências proteicas 14-3-3 das leguminosas aqui estudadas foram alinhadas pelo ClustalW e, em seguida, uma árvore fenética foi construída pelo método de *Neighbour Joining*-NJ, utilizando *bootstrap* de 10000, no software MEGA 11 (Tamura et al., 2021), no intuito de identificar os possíveis grupos representativos das 14-3-3s.

Identificação de motivos conservados entre as proteínas 14-3-3s das seis leguminosas

Os motivos conservados das proteínas 14-3-3 de todas as espécies foram identificados no *software* MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>), utilizando a ferramenta MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>; Bailey et al., 2009) e visualizados pelo TBTools (Chen et al., 2018), afim de observar o padrão de conservação existente entre as espécies analisadas.

Análise da estrutura gênica (organização éxon-íntron)

A estrutura gênica da família 14-3-3 de cada espécie, baseada na organização éxon-íntron foi analisada utilizando como *input* os identificadores de transcritos e o arquivo GTF do genoma de referência de cada espécie, ambos obtidos no banco de

dados NCBI e visualizada pela ferramenta *Biosequence Structure*, implementada no TBTools,

Mapeamento *in silico* dos genes da família 14-3-3 e análise de ortologia gênica

A localização de genes individuais e comprimento dos cromossomos para cada uma das seis espécies foram obtidos no NCBI. A similaridade entre as sequências foi calculada a partir de *clusters*, onde cada um foi formado por ortólogos e parálogos das espécies. A análise foi realizada na ferramenta OrthoVeen 2 (Xu et al., 2019) e segue o método *Bidirecional Best-Hit - RBH* ($e\text{-value} < 1e^{-15}$), sendo utilizadas sequências provenientes da própria plataforma para as espécies: *V. unguiculata*; *G. max* *P. vulgaris* e; *M. truncatula* e o *input* das sequências proteicas obtidas no NCBI das espécies *V. radiata* e *V. angularis*. A ferramenta Circos 0.64 (Krzywinski et al., 2009) foi utilizada para visualização da localização dos genes de feijão-caupi e seus ortólogos em ideogramas circulares.

Mecanismos de expansão e cálculo da razão Ka/Ks

O mecanismo de expansão dos genes 14-3-3 foi determinado por duas metodologias diferentes: 1) Proposta por Cannon et al. (2004), que considera duplicação em *tandem* para genes parálogos com distância < 50 Kb presentes no mesmo cromossomo e duplicação segmentar para genes homólogos em blocos cromossômicos duplicados; 2) Descrita por Wang et al. (2012) que utiliza Varredura de Colineariedade Múltipla (MCScanX) a partir da ferramenta McScan Wrapper, implementada no TBTools e determina duplicação em *tandem* a partir de matrizes de pontuação, considerando como um só, genes separados por até cinco diferentes genes. Resumidamente, a metodologia proposta por Wang et al. (2012) faz uso dos

arquivos: 2a) GFF do genoma de referência de cada espécie, contendo apenas o identificador e sua localização cromossômica e; 2b) o resultado de um alinhamento via BLASTp ($e\text{-value} < e^{-5}$) entre o proteoma de referência e as proteínas 14-3-3, considerando apenas os cinco melhores alinhamentos e, assim, com base nos acertos do BLASTp, os genes são classificados seguindo a seguinte ordem de prioridade: segmentar>*tandem*>proximal>dispersos.

A pressão de seleção existente entre os eventos de duplicação em *tandem* foi observada pela razão de substituições não-sinônimas para sinônimas (Ka/Ks), calculada pelo método *Nei-Gojobori* (modelo Jukes-Cantor), implementado no MEGA 7 (Kumar et al., 2008), utilizando como entrada o alinhamento das sequências codificadoras (CDS) dos genes 14-3-3, realizado pelo Clustal 2.0, considerando seleção negativa para Ka/Ks <1; seleção neutra para Ka/Ks = 1 e; seleção positiva, para Ka/Ks >1.

Caracterização físico-química, análise de similaridade e localização subcelular das proteínas Vu14-3-3

Além das características identificadas por meio das análises comparativas, a família Vu14-3-3 foi avaliada quanto aos padrões de conservação, localização subcelular, ponto isoelétrico e massa molecular. Para tanto, as sequências polipeptídicas das Vu14-3-3s foram alinhadas pelo método ClustalW (Thompson et al., 2004), no software JalView (Clamp et al., 2004), visando analisar os padrões de conservação por identidade. A localização subcelular foi identificada pelo programa DeepLoc, versão 2.0 (Thummuluri et al., 2022) e os valores de ponto isoelétrico e massa molecular foram calculados pela ferramenta JVirGel (Hiller et al., 2006).

Identificação de elementos *cis* regulatórios presentes na promotora de genes *Vu14-3-3s*

A região promotora (1000 pb à montante do local de início da transcrição) de cada um dos genes 14-3-3 de feijão-caupi identificados foi obtida no banco de dados Phytozome, na ferramenta PhytoMINE. Os motivos candidatos à ligação de fatores de transcrição, presentes na região promotora, foram identificados no MEME, considerando aceitáveis motivos com *e-value* < 0,05.

A identificação de elementos *cis* regulatórios correspondentes aos motivos identificados foi realizada no software MEME Suites (<https://meme-suite.org/meme/>), a partir das ferramentas: 1) MEME, utilizada para identificar os motivos presentes nas regiões promotoras dos genes *Vu14-3-3s* e; 2) Tomtom v.4.11.2 (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>; Gupta et al., 2007). No Tomtom, foi utilizado o arquivo “XML” obtido pela análise anterior realizada no MEME (1) como *input* e, em seguida foi realizada uma comparação dos motivos com o banco JASPAR2022_CORE_plants_non-redundant, considerando alinhamentos aceitos aqueles com *p-value* < 0,05. Para identificar os fatores de transcrição associados aos motivos identificados, foi realizada uma busca utilizando os identificadores JASPAR no banco em questão (<https://jaspar.genereg.net/>; Sandelin et al. 2004), conforme descrito por Ferreira-Neto et al. (2021).

Os fatores de transcrição enriquecidos foram identificados na ferramenta *Binding Site Prediction* (*p-value* ≤ 1e⁻⁵) da plataforma online *PlantRegMap* (<http://plantregmap.gao-lab.org>; Tian et al. 2020), utilizando dados depositados no banco PlantTFDB v5.0 (Plant *Transcription* Factor Database - <http://planttfdb.gao-lab.org/>) para a espécie *Phaseolus vulgaris*, devido a ausência de *Vigna unguiculata* no portal. Predições de regulação também puderam ser observadas pela ferramenta

Regulation Prediction da mesma plataforma, utilizando as regiões promotoras previamente identificadas no PhytoMINE e os dados para a espécie *Phaseolus vulgaris* como referência.

Abordagem transcriptômica

Material biológico e bibliotecas de HT-SuperSAGE e RNA-Seq

Para o presente trabalho, bibliotecas transcriptômicas já disponíveis foram utilizadas, as quais foram obtidas a partir dos seguintes ensaios:

- Bibliotecas HT-SuperSAGE de feijão-caupi submetido à estímulo de desidratação radicular: Dois acessos de *V. unguiculata*: Pingo-de-Ouro-1-2 (PO; tolerante) e Santo Inácio (SI, sensível), foram submetidos à desidratação radicular pela equipe técnica da Embrapa Soja (Londrina, PR). O experimento foi conduzido em casa de vegetação, e, posteriormente, mudas foram transplantadas para suportes de poliestireno (30 L), deixando as raízes totalmente submersas em solução nutritiva (pH 6,6). Atingindo o estágio vegetativo V2 (primeira folha trifoliolada desenvolvida), as plantas foram submetidas à desidratação radicular, a partir da suspensão das raízes e exposição ao ar, em seis tempos consecutivos (0, 25, 75, 100, 125 e 150 minutos). Nos respectivos tempos, as raízes foram amostradas, imersas em nitrogênio líquido e, posteriormente, armazenadas à -80 °C até o momento da extração de RNA, síntese de cDNA e construção das bibliotecas HT-SuperSAGE.
- Bibliotecas RNA-Seq de feijão caupi submetido à estímulo de desidratação radicular: Metodologia similar ao supracitado, conduzido em sistema hidropônico, utilizando a cultivar Pingo-de-Ouro-1-2 em dois tempos de exposição das raízes ao ar (25 e 150 minutos), as quais foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas à -80 °C até

o momento da extração de RNA, síntese de cDNA e construção das bibliotecas de RNA-Seq.

As bibliotecas RNA-Seq foram construídas a partir da extração de RNAs totais das amostras radiculares, usando o reagente TRIZOL® (Invitrogen), os quais foram quantificados em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis e tiveram integridade confirmada em gel de agarose 1%. Os RNAs foram convertidos em cDNA usando o *kit ImProm-II™ Reverse Transcription System*® (Promega Corp., USA), conforme recomendações do fabricante. Os cDNAs foram sequenciados *Illumina HiSeq 2500 (paired-end 100 pb reads)*, gerando bibliotecas “controle” e “tratamento”. Foram construídas três bibliotecas RNA-Seq, considerando “controle” (tempo 0 min.), “tratamento 1” (tempo 25 min.) e “tratamento 2” (150 min.).

Duas bibliotecas HT-SuperSAGE foram construídas para avaliar a expressão gênica sob desidratação radicular (controle negativo - tempo 0min e tratamento - *bulk* dos tempos 0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 min) para cada um dos acessos analisados (Santo Inácio e Pingo-de-Ouro-1-2), totalizando quatro bibliotecas HT-SuperSAGE.

Montagem das bibliotecas transcriptômicas e determinação da expressão *in silico*

As *unitags* (*tags* diferentes) de cada um dos transcriptomas HT-SuperSAGE foram contadas e normalizadas para *reads* por milhão (RPM) e aquelas com contagem total de “um” foram retiradas da análise (Kido et al., 2013). As *unitags* consideradas diferencialmente expressas (DEs) foram obtidas a partir da comparação entre o número de contagens de cada *unitag* nas bibliotecas tratadas (após estímulo) e seu respectivo controle negativo, sendo consideradas apenas aquelas com $p < 0,05$ após

testes baseados na distribuição de Poisson (teste Audic Claverie) implementado no software DiscoverySpace (Robertson et al., 2007).

O valor de *Fold Change* (FC) foi calculado pela razão entre frequências normalizadas das *unitags* na biblioteca tratada em relação ao seu controle negativo. Frequências igual a 0 no denominador foram substituídas por 1 e em casos em que a razão foi menor que 1, o valor de FC correspondeu a $-1/\text{razão}$. Valores de FC negativos indicaram *unitags down-regulated* (DR) e valores positivos *unitags up-regulated* (UR) após o estímulo.

As *unitags* foram alinhadas via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-4}$) contra transcritos RefSeq de *V. unguiculata* (NCBI, GCF_004118075.1; agosto de 2019) (Lonardi et al., 2019) e aqueles associados à ncRNA ou miscRNA foram descartados da análise. Alinhamentos aceitos consideraram CATG integro (sítio da enzima NlaIII atuante no protocolo SAGE); máximo de um erro em 26 pb e; *unitag* identificada na fita codificadora do transcrito.

Os totais de *tags* alinhadas por transcrito foram normalizados pelo total de *tags* sequenciadas de cada biblioteca e convertidos para transcrito por milhão (TrPM). As contagens de TrPM nas comparações entre tratamento x controle foram verificadas por testes de hipóteses, pressupondo distribuições de Poission com médias iguais (ou proporcional) ao tamanho da amostra, via teste Audic-Claverie, disponível online na plataforma ACDtool 2 (Claverie and Ta, 2019). As frequências nulas de cada comparação foram removidas para não influenciar no número total de testes e as estimativas de *p-values* foram ajustadas para correção de erros tipo I - *False Discovery Rate* (FDR) (Benjamini; Hochberg, 1995) com auxílio da ferramenta Myriads (Carvajal-Rodrigues, 2017).

Os valores FC dos transcritos foram calculado pela razão entre as frequências TrPM nas bibliotecas tratadas e controle, da mesma forma como realizado para as *unitags*. Transcritos portadores de *tags* com $p\text{-value} < 0,05$ e $\text{FDR} < 0,01$ foram considerados diferencialmente expressos, sendo aqueles com $\text{FC} > 0$ UR e $\text{FC} < 0$ DR após aplicação do estímulo.

As *reads* das bibliotecas RNA-Seq tiveram qualidade avaliada pelo programa FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e uma filtragem inicial foi realizada no Trimmomatic v. 0.36 (Bolger et al., 2014) para remover as *reads* de baixa qualidade, bem como as sequências de adaptadores. *Reads* com $\text{phred} \geq 20$ foram montadas pela abordagem *de novo* no programa Trinity (Grabherr et al., 2011) e a contagem das *reads* foi normalizada por *fragments per kilobase of transcript per million* (FPKM) para mensurar os níveis de expressão dos transcritos. O pacote EdgeR (Robinson et al., 2010) foi utilizado para análise de expressão diferencial dos transcritos, sendo considerados diferencialmente expressos aqueles com $p\text{-value} < 0,05$. Transcritos *up-regulated* foram determinados pelos valores de $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ (Log_2FC) ≥ 1 e *down-regulated* por $\text{Log}_2\text{FC} \leq -1$.

Expressão *in silico* e validação via RT-qPCR da família gênica 14-3-3 de feijão-caupi

Transcritos Vu14-3-3 identificados e confirmados pelas análises supracitadas foram associados aos transcritos portadores de *tags* HT-SuperSAGE (CATG íntegro $e\text{-value} < e^{-4}$, máximo de um erro a cada 26 pb e tag identificada na fita codificadora do transcrito) e alinhados contra o transcriptoma RNA-Seq via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-20}$). Os transcritos RNA-Seq alinhados foram classificados pelo método *best hit* (maior score, maior identidade, maior tamanho de alinhamento e menor $e\text{-value} < e^{-93}$),

visando identificar corretamente os transcritos Vu14-3-3 presentes no transcriptoma RNA-Seq de feijão-caupi submetido à desidratação radicular.

A expressão *in silico* dos transcritos 14-3-3 presentes nas bibliotecas HT-SuperSAGE e RNA-Seq foram ilustradas em *heatmaps*, utilizando o pacote Seaborn e função `clustermap` (<https://seaborn.pydata.org/generated/seaborn.clustermap.html>), considerando dados de modulação da expressão dos transcritos em relação aos controles, utilizando dados de *fold change* (FC) para HT-SuperSAGE e Log₂FC para RNA-Seq.

Com base nos transcritos Vu14-3-3 identificados no transcriptoma RNA-Seq e nos transcritos portadores de *tags* HT-SuperSAGE, associados aos Vu14-3-3 de referência, foram desenhados *primers* com auxílio do *software* Primer 3 (Rozen and Skaletsky, 2000), com modificações nos parâmetros: tamanho do *amplicon* (entre 70 e 200 pb), temperatura de *melting* [entre 40 °C (mínima), 50 °C (ótima) e 60 °C (máxima)], e conteúdo de GC [entre 45-55% (ótimo de 50 %)] (Tabela 1).

Tabela 1. *Primers* para análise de Vu14-3-3s em PCR em tempo real

ID	Left primer	Right primer	Eficiência
Vu14-3-3a	GATCATGCAGCTGTTGAGAGAC	CTCGGTAGGTTTGGCTTCTTC	95,88
Vu14-3-3b	TCCATGAAAGCGTATGAGACAG	CAGAGAAGTTCAAAGCCAGACC	X
Vu14-3-3c	ATCTTGTTCCCTTCTCCACCTC	CATATCCCTTCAGTGATTGCTC	99,78
Vu14-3-3d	TCACCAGATCGTGCTTGTAATC	TGTCTGATGTCCACAAAGTCAG	98,39
Vu14-3-3e	TAAGACCGGCAATGAGAAGAAG	TAAAGCTAGACCCAATCGGATG	106,25
Vu14-3-3f	CCACAAATATTGCAGAGTCCAC	AGTGCTAGCAGCTGTCTGATATG	102,82
Vu14-3-3g	CTCCGCCTACAAATCTGCAC	GAGAAGTTCAGAGCAAGACCAAG	96,75
Vu14-3-3h	AACCAGTCTGATAAAGCGTGTG	CATTATGAGCGTGCTGTCTTTG	92,43
Vu14-3-3i	ATCTGCGACGGTATTCTCAAAC	GAGGTAGAAGACCTTGAATCG	93,92

A validação da expressão gênica dos Vu14-3-3s foi conduzida seguindo a metodologia do protocolo MIQE (Bustin et al., 2009), utilizando três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para cada tratamento analisado (com e sem imposição de desidratação radicular) e para cada acesso avaliado no experimento de obtenção do

transcriptoma HT-SuperSAGE (Santo Inácio e Pingo-de-Ouro-1-2). As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em placas de 96 poços no equipamento LineGene9660 (Bioer), utilizando como método de detecção o *SYBR Green*.

As amostras de RNA utilizadas foram oriundas do ensaio que deu origem ao transcriptoma RNA-Seq analisado neste trabalho, sendo considerando o tempo de 150 minutos como representativo para determinação da expressão dos analisados no transcriptoma HT-SuperSAGE. As amostras foram avaliadas quanto quantidade e qualidade usando espectrofotômetro NanoDrop-1000 UV-vis (*Thermo Fisher Scientific*). Para obtenção do cDNA (DNA complementar) a ser utilizado na qPCR, as amostras de RNA foram reversamente transcritas usando o kit *Improm-IITM Reverse Transcriptional System* (Promega) com *primers oligo dT* e seguindo recomendações do fabricante. As configurações de ciclgem da qPCR, determinação da eficiência dos primers sintetizados, amplificação e curva de *melting* foram desenvolvidas de acordo com Amorim et al. (2022).

Os genes de referência utilizados para normalização de dados foram (ACT) e ubiquitina E2, variante (UE21D), os quais foram previamente selecionados por Amorim et al. (2018). Para análise da expressão relativa diferencial o *software* Rest2009 foi utilizado para comparar os valores dos genes de referência e dos Vu14-3-3 em situações de controle e tratamento (com e sem estímulo salino). Por fim, para determinar se as diferenças na expressão dos transcritos foram significativas ou não, testes de hipótese ($p\text{-value} < 0,05$) foram empregados.

Predição da rede de interação proteína-proteína (PPI) de Vu14-3-3s

O banco de dados STRING v. 11.5 (<https://string-db.org/>) foi utilizado para prever prováveis interações proteína-proteína (PPI) entre Vu14-3-3 e seus

associados. Devido a ausência de PPI para *Vigna unguiculata*, a rede foi construída com base em dados disponíveis no banco para *Glycine max*, os quais foram associados, via BLASTp realizado no próprio STRING, às proteínas Vu14-3-3 na opção “*Multiple Sequences*”.

Para a construção da rede foram utilizadas fontes de interação referentes à: mineração de texto; experimentos; bancos de dados; co-expressão; vizinhança; fusão gênica e; co-ocorrência, além de um valor de 0,7 de *threshold*, que representa um *score* de interação de alto grau de confiança entre as interações. O número máximo de interações foi definido em “não mais que 10 interações” na opção *1st shell* e “não mais que 20 interações” na opção *2st shell*.

Resultados

Identificação de 14-3-3s em feijão caupi e espécies filogeneticamente correlacionadas

Foram identificados 119 e 101 transcritos codificados por 68 genes, considerando os bancos Phytozome e NCBI, respectivamente. Os transcritos 14-3-3 de feijão-caupi indicam a presença de nove genes, dois destes com possibilidade de gerar transcritos alternativos, de acordo com o banco Phytozome, e quatro, de acordo com NCBI (Tabela 2).

Considerando que a espécie *Glycine max* é um poliplóide, diferente das demais espécies aqui avaliadas, era esperado um maior quantitativo de 14-3-3 identificadas, totalizando, em média, o dobro de sequências identificadas em *Vigna unguiculata*, *V. angularis*, *V. radiata*, *Phaseolus vulgaris* e *Medicago truncatula*, observando para tais, de 12 a 18 transcritos 14-3-3, encontrados em nove a 11 genes.

Tabela 2. Quantitativo de transcritos 14-3-3 em *Vigna unguiculata*, *V. radiata*, *V. angularis*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*

Espécie	Locus gênico	Locus com transcritos alternativos (Phytozome)	Locus com transcritos alternativos (NCBI)	Transcritos 14-3-3 totais (Phytozome/NCBI)	Total de transcritos na referência (Phytozome/NCBI)
<i>Vigna unguiculata</i>	9	2 (3)	4 (6)	12/15	42287/41082
<i>Vigna radiata</i>	10	-	5 (8)	18	42284
<i>Vigna angularis</i>	9	-	2 (3)	12	37769
<i>Medicago truncatula</i>	11	3 (3)	0	14/11	62319/42683
<i>Phaseolus vulgaris</i>	9	6 (8)	4 (5)	17/14	36995/32720
<i>Glycine max</i>	20	12 (26)	5 (11)	46/31	88647/74248
Total	68			119/101	

Fonte: Bancos de dados Phytozome e NCBI

Foram localizadas 15 sequências, correspondentes aos nove genes identificados. Os correspondentes dos nove loci gênicos 14-3-3 de feijão caupi, foram anotados como: *Vu14-3-3a*, *Vu14-3-3b*, *Vu14-3-3c*, *Vu14-3-3d*, *Vu14-3-3e*, *Vu14-3-3f*, *Vu14-3-3g*, *Vu14-3-3h* e *Vu14-3-3i* (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação em bancos de dados e nomenclatura utilizada para membros da família 14-3-3 de feijão-caupi

ID	Transcritos (Phytozome)	Transcritos (NCBI)	Proteínas (NCBI)	Locus gênico	Sentido
Vu14-3-3a	Vigun02g050200 .1	XM_028055860 .1	XP_027911661 .1	LOC11417037 9	-
Vu14-3-3b1	Vigun03g099100 .2	XM_028063511 .1	XP_027919312 .1	LOC11417791 2	-
Vu14-3-3b2	Vigun03g099100 .2	XM_028063512 .1	XP_027919313 .1	LOC11417791 2	-
Vu14-3-3b3	Vigun03g099100 .2	XM_028063513 .1	XP_027919314 .1	LOC11417791 2	-
Vu14-3-3c	Vigun03g203200 .1	XM_028065303 .1	XP_027921104 .1	LOC11417908 8	-

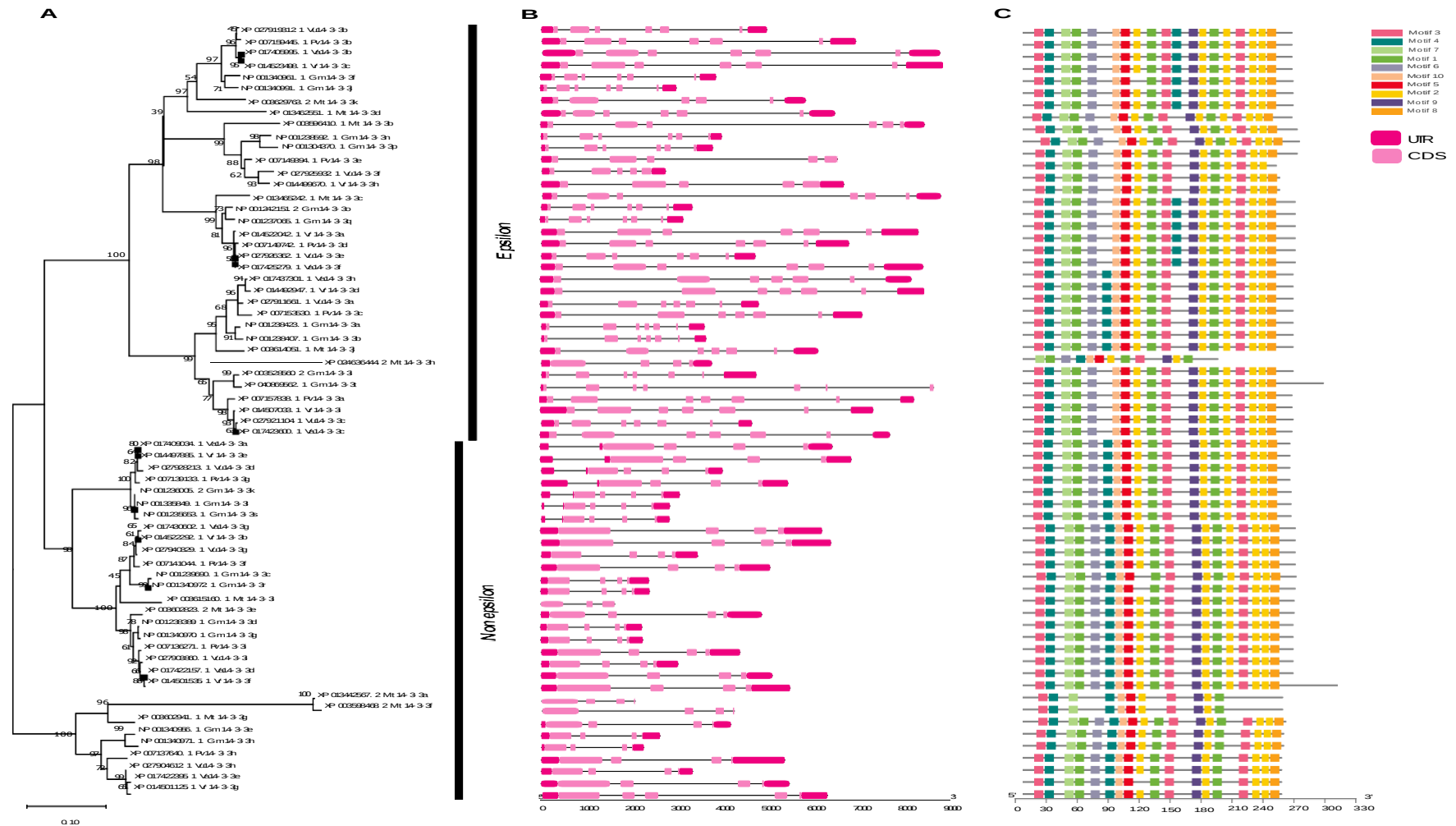
Vu14-3-3d1	Vigun05g004800	XM_028072412	XP_027928213	LOC11418497	-
	.1	.1	.1	0	
Vu14-3-3d2	Vigun05g004800	XM_028072413	XP_027928214	LOC11418497	-
	.1	.1	.1	0	
Vu14-3-3d3	Vigun05g004800	XM_028072414	XP_027928215	LOC11418497	-
	.1	.1	.1	0	
Vu14-3-3e	Vigun05g208700	XM_028070561	XP_027926362	LOC11418351	+
	.1	.1	.1	7	
Vu14-3-3f1	Vigun05g185700	XM_028070131	XP_027925932	LOC11418320	+
	.1	.1	.1	3	
Vu14-3-3f2	Vigun05g185700	XM_028070132	XP_027925933	LOC11418320	+
	.1	.1	.1	3	
Vu14-3-3g	Vigun08g103200	XM_028084528	XP_027940329	LOC11419436	+
	.1	.1	.1	1	
Vu14-3-3h	Vigun09g183900	XM_028048811	XP_027904612	LOC11416422	-
	.1	.1	.1	4	
Vu14-3-3i1	Vigun09g178000	XM_028048059	XP_027903860	LOC11416375	+
	.1	.1	.1	5	
Vu14-3-3i2	Vigun09g178000	XM_028048060	XP_027903861	LOC11416375	+
	.1	.1	.1	5	

As denominações em números (1-3) após a nomenclatura dos transcritos, indica transcritos alternativos correspondentes ao mesmo locus gênico.

Genômica estrutural comparativa

A análise fenética (Figura 1a) das sequências de aminoácidos correspondentes aos 14-3-3 identificados nas seis espécies de leguminosas demonstra uma subdivisão em dois grupos, os quais consistem nos grupos não epsilon e epsilon, em que são categorizados genes com 3-4 éxons e 5-6 éxons, respectivamente (Figura 1b). A análise de motivos mostra a alta conservação da família entre as espécies analisadas, mesmo considerando a divisão dos grupos epsilon e não epsilon, sendo possível observar a presença dos 10 motivos em todas as proteínas 14-3-3s analisadas (Figura 1c).

Figura 1. Genômica comparativa da família gênica 14-3-3 em *Vigna unguiculata*, *V. angularis*, *V. radiata*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*. 1A. Árvore filogenética, construída pelo método *Neighbor Joining-NJ*, utilizando *bootstrap* de 10000. 1B. Estrutura gênica da família gênica 14-3-3s das diferentes espécies. 1C Motivos conservados nas proteínas 14-3-3 das seis espécies.



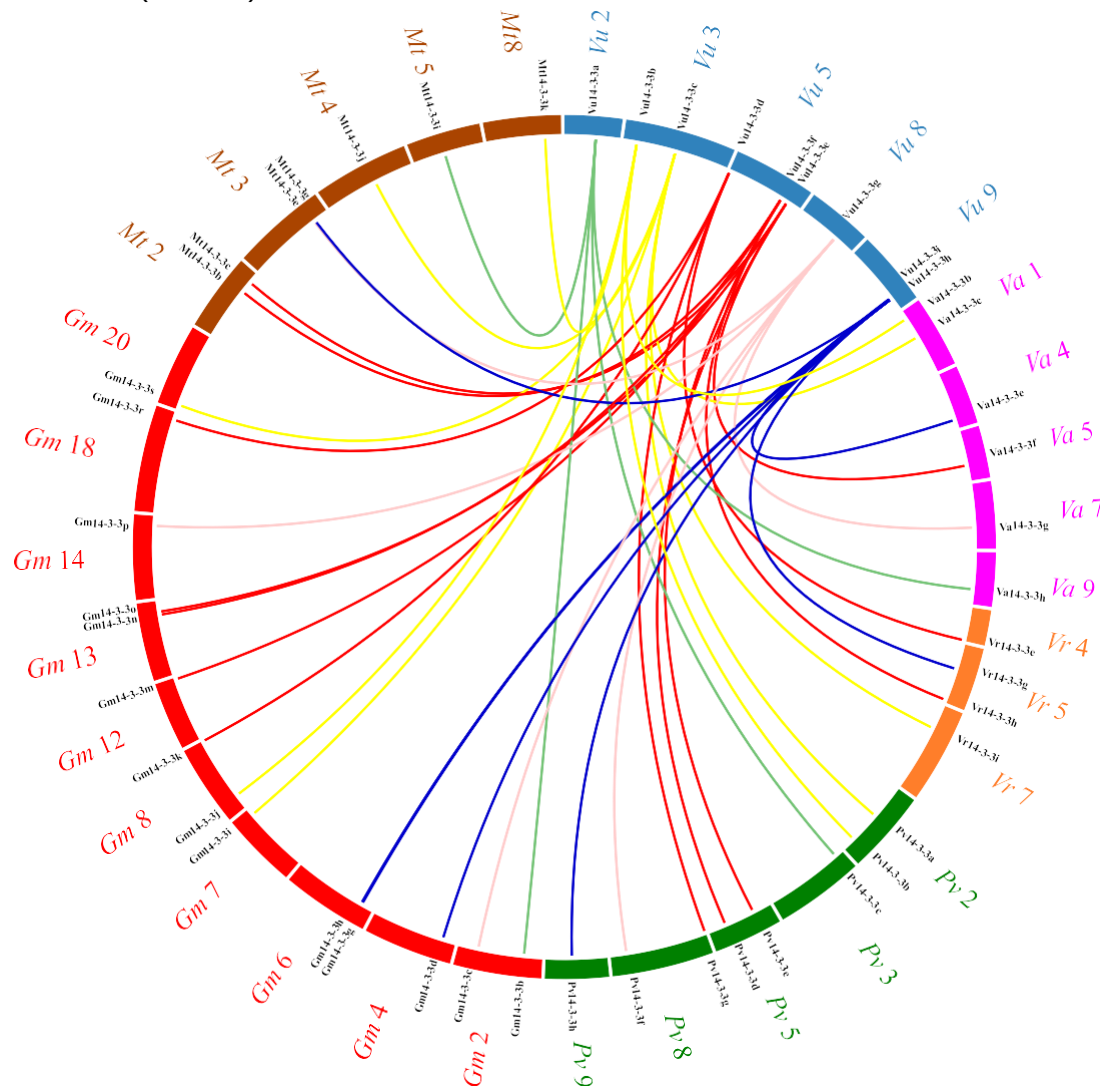
Mapeamento *in sílico* e identificação de ortólogos

Os genes *Vu14-3-3* localizam-se em cinco dos 11 cromossomos do genoma haplóide do feijão-caupi (dois, três, cinco, oito e nove), com maior número de genes presente no cromossomo cinco e menor número no cromossomo dois, o qual contém apenas um gene *Vu14-3-3* (Figura 2). O gene *Vu14-3-3b* apresenta ortólogos nas cinco espécies analisadas comparativamente, indicando conservação do gene no grupo das leguminosas. Os genes *Vu14-3-3a*, *Vu14-3-3c*, *Vu14-3-3d*, *Vu14-3-3f*, *Vu14-3-3g* e *Vu14-3-3i* apresentam dois ortólogos em soja (Figura 2).

Mecanismos de expansão e cálculo Ka/Ks

Eventos de duplicação em *tandem* e duplicação segmentar estão presentes na formação da família 14-3-3 de feijão-caupi e demais leguminosas aqui avaliadas, sendo a duplicação segmentar predominantemente atuante na formação dessa família. Em feijão-caupi os pares de genes *Vu14-3-3e* – *Vu14-3-3f* e *Vu14-3-3h* e *Vu14-3-3i* parecem ter origem por duplicação em *tandem* de acordo com Cannon et al. (2004), sendo os demais formados por duplicação segmentar. Diferentemente da metodologia anterior, o procedimento descrito por Wang et al. (2012) indica apenas duplicação segmentar como evento de formação da família 14-3-3. A razão de substituições não sinônimas e sinônimas (Ka/Ks) apresentou valor médio de 0,93 ao comparar todas as leguminosas analisadas, indicando possível seleção negativa ou purificadora na formação da família 14-3-3 deste grupo. O valor da razão Ka/Ks da família 14-3-3 unicamente de caupi foi de 0,1 indicando ainda maior conservação de isoformas, considerando sua composição na mesma espécie.

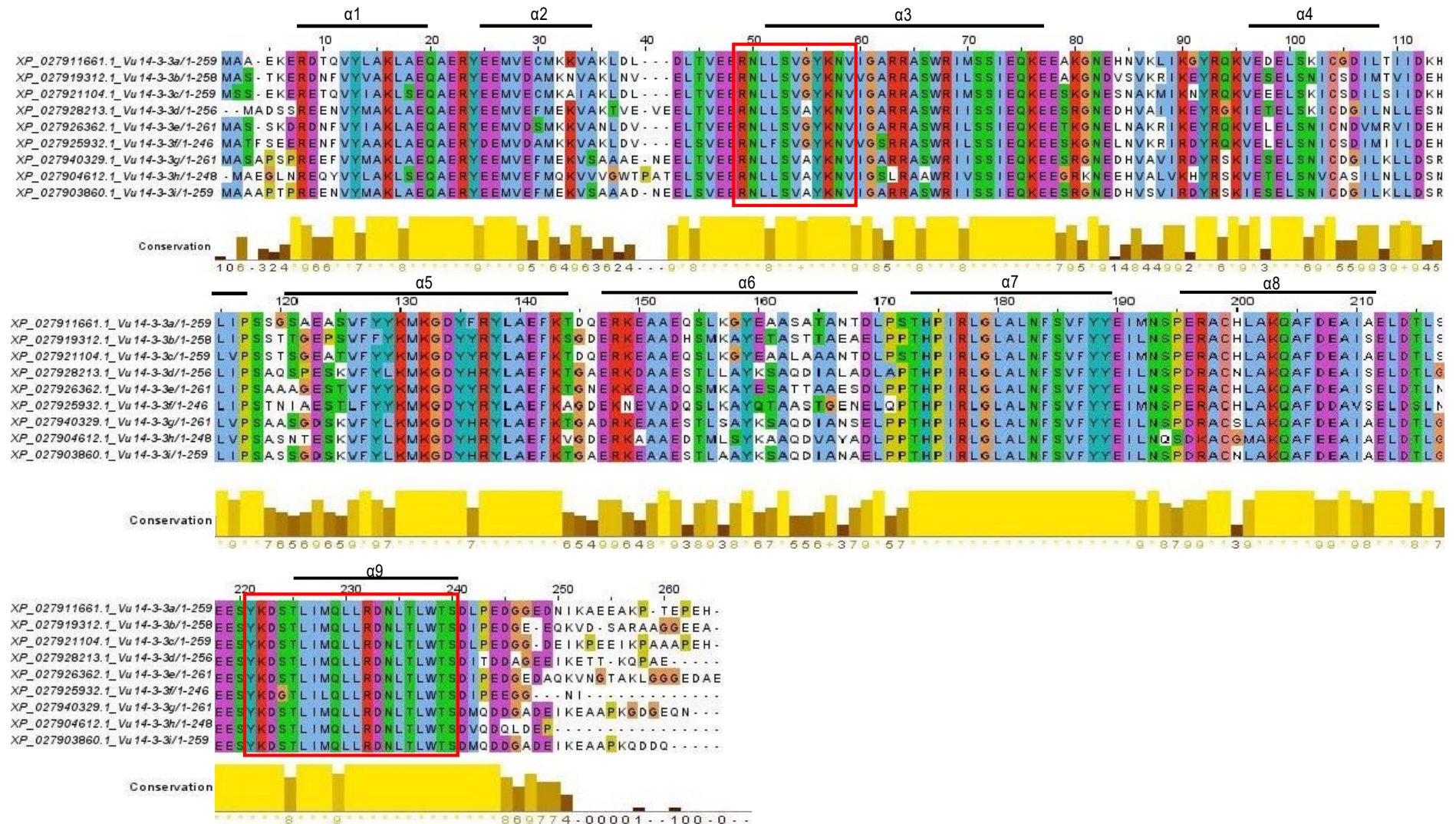
Figura 2. Análise de ortologia gênica entre *Vigna unguiculata* (azul), *Vigna angularis* (rosa); *Vigna radiata* (laranja); *Phaseolus vulgaris* (verde); *Glycine max* (vermelho) e; *Medicago truncatula* (marrom).



Caracterização das proteínas 14-3-3 em feijão-caupi

As sequências polipeptídicas referentes aos transcritos Vu14-3-3 foram alinhadas, sendo possível observar que as proteínas deduzidas desta família gênica são altamente conservadas, com pequenas variações nas regiões C-terminal e N-terminal (Figura 3). As regiões de α hélices, bem como duas assinaturas, características do domínio 14-3-3, também puderam ser observados, indicando a presença do domínio conservado em todas as sequências, o qual foi confirmado no *Batch Cd-Search*

Figura 3. Alinhamento de proteínas 14-3-3 de feijão caupi, Assinaturas 14-3-3 destacadas em caixas vermelhas.



As proteínas deduzidas são formadas por 246 à 261 aminoácidos, apresentam massas moleculares variando de 28,21 à 29,55 kDa e ponto isoelétrico entre 4,41 e 4,69 (Tabela 4).

Tabela 4. Localização subcelular, massa molecular (kDa) e ponto isoelétrico de proteínas Vu14-3-3s

Proteína	ID NCBI	Ponto isoelétrico	Massa molecular (MW)	nº de aminoácidos	Localização subcelular
Vu14-3-3a	XP_027911661.1	4,69	29,44	259	Citoplasma
Vu14-3-3b	XP_027919312.1	4,58	29,22	258	Citoplasma
Vu14-3-3c	XP_027921104.1	4,65	29,50	259	Citoplasma
Vu14-3-3d	XP_027928213.1	4,46	29,03	256	Citoplasma
Vu14-3-3e	XP_027926362.1	4,56	29,55	261	Citoplasma
Vu14-3-3f	XP_027925932.1	4,51	28,21	246	Citoplasma
Vu14-3-3g	XP_027940329.1	4,42	29,28	261	Citoplasma/Núcleo
Vu14-3-3h	XP_027904612.1	4,59	28,21	248	Citoplasma
Vu14-3-3i	XP_027903860.1	4,41	29,16	259	Citoplasma/Núcleo

Identificação dos elementos *cis* regulatórios presentes na promotora de genes

Vu14-3-3

As regiões promotoras dos nove genes da família 14-3-3 possuem diversos sítios de ligação à fatores de transcrição (FTs), sendo possível notar a presença do sítios de ligação à elementos TCP, MYB e DOF, os quais são FTs diretamente relacionados com a resposta ao estresse abiótico e podem estar contribuindo para a expressão de Vu14-3-3s (Figura 4).

Figura 4. Análise de sítios de ligação à fatores de transcrição presentes nas regiões promotoras dos *Vu14-3-3s*

Transcritos 14-3-3 identificados no transcriptoma HT-SuperSAGE de feijão-caupi submetido à estímulo de desidratação radicular

Os 119 transcritos 14-3-3 das seis espécies de leguminosas foram alinhados via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-20}$) contra transcritos portadores de *tags* HT-SuperSAGE do transcriptoma de feijão-caupi submetido à desidratação radicular, resultando em 14 transcritos portadores de *tags*, os quais encontram-se entre os 15 previamente identificados por este trabalho no transcriptoma de referência da espécie, incluindo os transcritos alternativos (Tabela 3, tabela S2).

Os transcritos alinhados, correspondem aos genes *Vu14-3-3a*, *Vu14-3-3b*, *Vu14-3-3b2*, *Vu14-3-3b3*, *Vu14-3-3d1*, *Vu14-3-3d2*, *Vu14-3-3d3*, *Vu14-3-3e*, *Vu14-3-3f1*, *Vu14-3-3f2*, *Vu14-3-3g*, *Vu14-3-3h* e *Vu14-3-3i1* e *Vu14-3-3i2*, desta forma sugere-se que oito dos nove genes da família 14-3-3 de feijão-caupi são transcritos sob desidratação radicular.

Transcritos 14-3-3 identificados no transcriptoma RNA-seq de feijão-caupi submetido à desidratação radicular

O total de 119 transcritos de referência com domínios confirmados para 14-3-3 foi alinhado ao transcriptoma RNA-Seq via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-20}$) e após seleção dos *best-hits* 90 transcritos RNA-seq foram selecionados, dos quais 88 correspondem à 12 transcritos 14-3-3 de feijão-caupi (incluindo os dois alternativos de Vu14-3-3b e um alternativo de Vu14-3-3i) e dois à transcritos 14-3-3 de feijão comum (Phvul.008G162500.1 – Pv14-3-3f ; Phvul.005G066600.2 – Pv14-3-3e) (Tabela S4).

A quantidade de transcritos RNA-seq correspondentes aos transcritos 14-3-3 de feijão-caupi está disposta na tabela 5, onde é possível observar que Vu14-3-3d teve maior número de transcritos associados e Vu14-3-3c menor quantidade de transcritos RNA-Seq associados.

Tabela 5. Número de transcritos Vu14-3-3s associados aos transcritos RNA-Seq de feijão-caupi submetido à desidratação radicular

Transcritos Vu14-3-3s	Número de transcritos RNA-Seq alinhados	Número de transcritos RNA-Seq com domínio confirmado	Número de transcritos RNA-Seq com domínio completo confirmado
Vu14-3-3a	7	5	2
Vu14-3-3b1	11	10	5
Vu14-3-3b2	6	3	2
Vu14-3-3b3	2	0	0
Vu14-3-3c	3	3	0
Vu14-3-3d	21	11	9
Vu14-3-3e	5	3	2
Vu14-3-3f	7	6	2
Vu14-3-3g	14	5	5
Vu14-3-3h	6	3	2
Vu14-3-3i1	2	2	1
Vu14-3-3i2	4	2	2
Pv14-3-3e	1	0	0
Pv14-3-3f	1	1	0
Total	90	54	32

Os 90 transcritos RNA-Seq associados foram traduzidos e 54 deles apresentaram domínios 14-3-3 confirmados, dos quais, 32 contém domínios completos. Dos 54 transcritos com domínio confirmados, 53 foram correspondentes aos 12 transcritos 14-3-3 de feijão caupi e um foi alinhado a um transcrito 14-3-3 de *P. vulgaris* (Phvul.008G162500.1 – Pv14-3-3f) (Tabela S4).

Os transcritos associados ao gene *Vu14-3-3c*, apesar de presentes na montagem do transcriptoma, não apresentaram valores de regulação para o estímulo de desidratação radicular, indicando que este gene não é transcrito em tais condições, assim como foi observado no transcriptoma HT-SuperSAGE. Além destes, os transcritos RNA-Seq associados aos de *P. vulgaris* também não apresentaram valores de regulação, indicando a não existência destes transcritos no transcriptoma de feijão-caupi sob estímulo de desidratação radicular (Tabela S4).

Análise de expressão *in silico* e validação via RT-qPCR

Os transcritos alternativos *Vu14-3-3* apresentaram mesma regulação no transcriptoma HT-SuperSAGE (tabela S2) e, por isso, foram representados juntos no *heatmap* (Figura 5A). O acesso tolerante (Pingo-de-Ouro-1-2) apresentou regulação significativa para sete dos oito transcritos 14-3-3, sendo UR para cinco transcritos, correspondentes aos genes *Vu14-3-3d*, *Vu14-3-3e*, *Vu14-3-3g*, *Vu14-3-3h*, e *Vu14-3-3i* e DR para os transcritos *Vu14-3-3b* e *Vu14-3-3a*. O acesso sensível (Santo Inácio) apresentou regulação significativa para cinco transcritos (*Vu14-3-3e*, *Vu14-3-3b*, *Vu14-3-3d*, *Vu14-3-3g* e *Vu14-3-3f*), todos *down-regulated*. Os resultados de regulação dos acessos mostram respostas contrastante entre os materiais, em especial ao analisar os transcritos *Vu14-3-3d*, *Vu14-3-3e* e *Vu14-3-3g* que foram DR no acesso sensível e UR no acesso tolerante (Tabela S2, figura 5a).

Os transcritos RNA-Seq representativos de cada transcrito 14-3-3 foram escolhidos com base, primeiramente, na confirmação de domínio, e em seguida, nos critérios do *best-hit*. Com exceção de uma das duas formas alternativas do transcrito Vu14-3-3b, todos os outros tiveram pelo menos um representante com domínio 14-3-3 confirmado, todavia, os genes Vu14-3-3a, Vu14-3-3g e a forma alternativa do gene Vu14-3-3i não apresentaram regulação significativa em nenhum dos tempos analisados. Aos 25 minutos de imposição do estímulo, três transcritos Vu14-3-3s (Vu14-3-3e, Vu14-3-3d e Vu14-3-3f) foram UR e três (Vu14-3-3b, Vu14-3-3h e Vu14-3-3i) DR. No tempo de 150 minutos apenas três Vu14-3-3s tiveram expressão significativa, todos *down-regulated* (Tabela S3, figura 5B).

A expressão relativa dos Vu14-3-3s no acesso Pingo-de-Ouro-1-2, determinada por PCR em tempo real (qPCR), apresentou significância para Vu14-3-3a, Vu14-3-3b, Vu14-3-3g e Vu14-3-3i, sendo o primeiro *down-regulated* e os outros três *up-regulated* (Figura 7). Considerando o transcriptoma HT-SuperSAGE os transcritos Vu14-3-3a e Vu14-3-3b tiveram expressão inversa do observado na análise *in-silico* e Vu14-3-3g e Vu14-3-3i corroboraram com o observado (UR) (Figuras 5 e 7). Para o acesso Santo Inácio, houve significância apenas para Vu14-3-3f, tal qual esteve reprimido (DR) em ambas as abordagens de análise (Figuras 5A e 5C).

A metodologia de análise *in silico* por transcriptoma RNA-Seq não teve nenhum transcrito com expressão validada, considerando significância, entretanto, é possível observar algumas tendências como a indução significativa da expressão relativa de Vu14-3-3b, que também foi UR no RNA-Seq, porém com diferença não significativa comparado ao seu controle (sem estímulo de desidratação radicular), e a tendência de Vu14-3-3e e Vu14-3-3f, ainda que não estatisticamente significativos, serem reprimidos, considerando a qPCR (Figuras 6 e 7). Ao comparar as metodologias *in*

sílico, com a validação por qPCR, sugere-se que os genes UR Vu14-3-3g, Vu14-3-3h e Vu14-3-3i possam estar envolvidos no mecanismo de tolerância do feijão-caupi ao estresse hídrico.

As redes de interação proteína-proteína construídas com base nas Gm14-3-3s, mostram seus clientes, categorizando-os com base em seus domínios proteicos (Figura 8A) e os processos biológicos que estão envolvidos (Figura 8B). As redes PPI demonstram a interação entre todas as proteínas Vu14-3-3s e uma proteína CDC25 (proteína de controle do ciclo celular), que interage com uma ampla gama de proteínas, sugerindo que as Vu14-3-3s regulam alvos chave para o ciclo vital das plantas. Os demais ligantes de Vu14-3-3s tratam-se de fosfatases de diferentes grupos, sendo este, o possível mecanismo utilizado pelas Vu14-3-3s, ativando, ou reprimindo, a expressão de genes envolvidos em vários processos celulares.

Figura 5. A. Expressão *in silico* de transcritos 14-3-3 de feijão-caupi submetido à estímulo de desidratação radicular. Símbolos foram usados para representar a significância da expressão considerando $p\text{-value}<0,05$ e $FDR<0,01$: (*) – significativo para os dois acessos; (Δ) significativo apenas para Santo Inácio; ($\diamond$) significativo apenas para Pingo-de-Ouro-1-2. Os acessos estão indicados por SI – Santo Inácio (sensível) e PO – Pingo-de-Ouro-1-2 (tolerante). **B.** Expressão *in silico* de transcritos 14-3-3 de feijão-caupi (acesso Pingo-de-Ouro-1-2) submetido à desidratação radicular nos tempos de 25 e 150 minutos. Símbolos foram usados para representar a significância da expressão considerando $p\text{-value}<0,05$: (*) significativo para os dois tempos; (Δ) significativo apenas no tempo de 150min; ($\diamond$) significativo apenas no tempo de 25min. **C.** Expressão relativa de Vu14-3-3s, acessos Pingo-de-Ouro-1-2 e Santo Inácio, submetidos à desidratação radicular por 150 minutos, considerando $p\text{-value}<0,05$ (*). **D.** Resumo dos resultados obtidos nas diferentes análises da expressão de Vu14-3-3s.

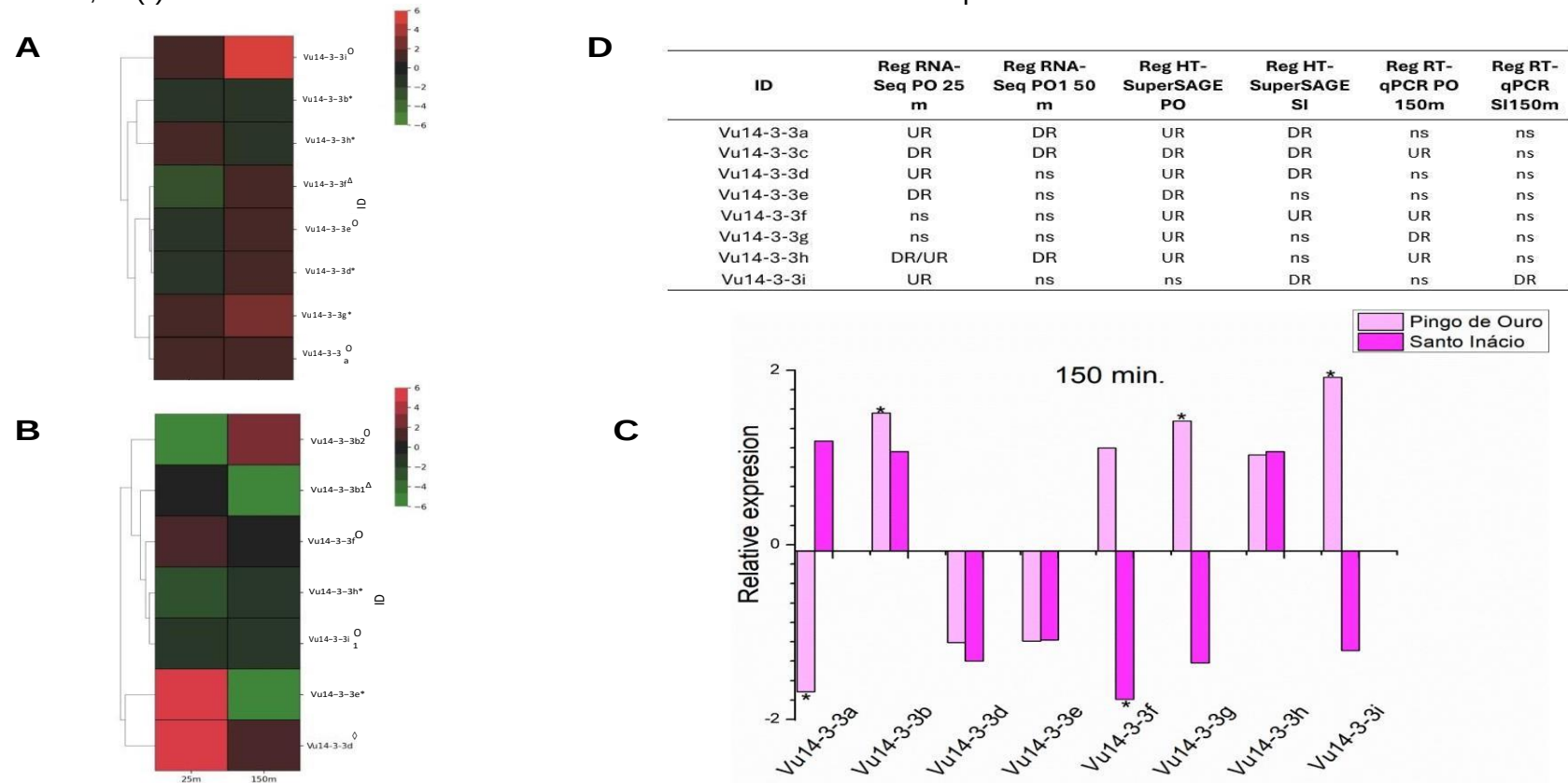
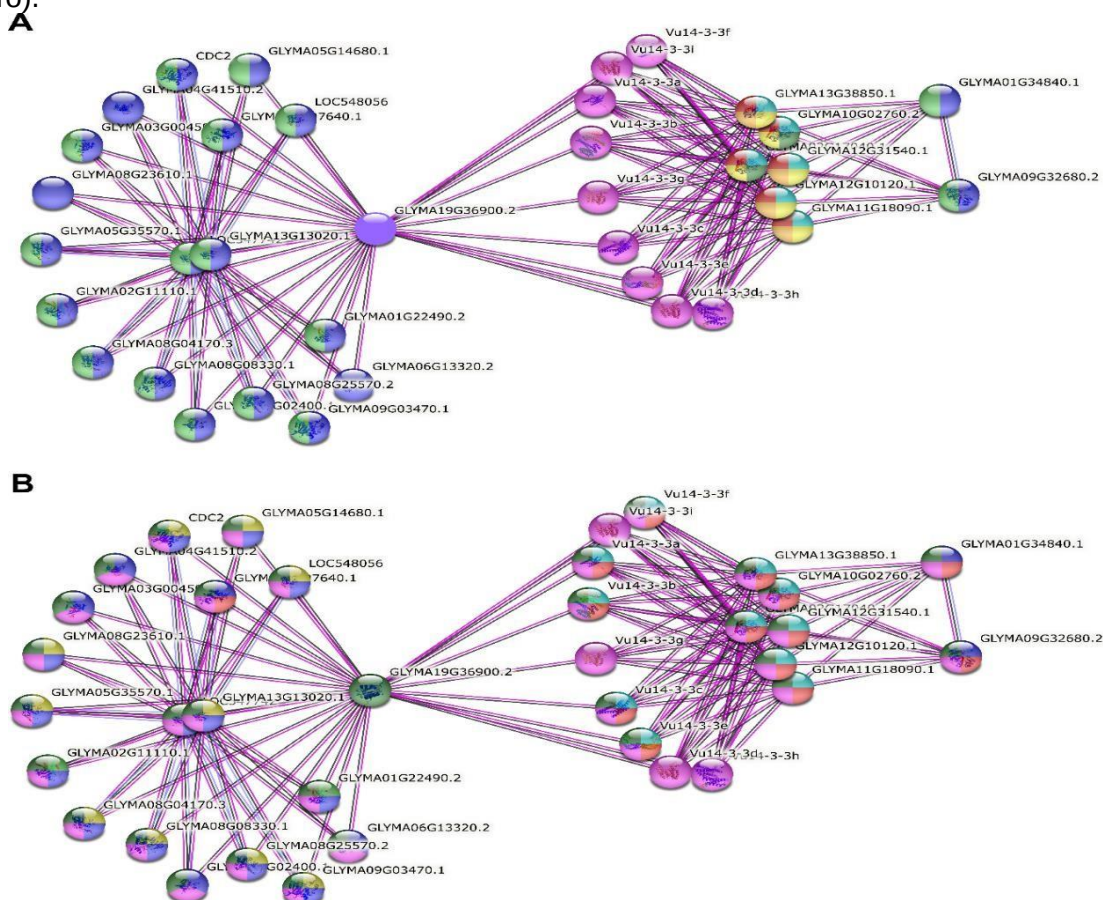


Figura 6. Rede de interação proteína-proteína (PPI) entre Vu14-3-3s e seus clientes. Arestas rosas indicam interações por dados experimentais; arestas pretas indicam co-expressão e arestas azuis indicam bancos de dados curados. A. Rede PPI definida com base nos domínios proteicos: 14-3-3 (rosa); galactose oxidase (azul claro e amarelo); domínio *kelch* (laranja); cálcio fosfoesterase (vermelho); quinase (azul escuro); tirosina quinase (verde claro) e; serina treonina fosfatase (verde escuro). B. Rede PPI definida com base no processo biológico: regulação de processos biológicos (rosa); aclimatação fotossintética (verde escuro); fosforilação proteica (azul escuro); ciclo celular (amarelo); transdução de sinais (vermelho); via de sinalização mediada por brassinosteróides (azul claro).



Discussão

As 14-3-3s são proteínas multifuncionais conservadas, presentes em todos os eucariotos e organizadas em famílias com diferentes isoformas (Fu et al., 2000; Ferl et al., 2002). Devido à sua capacidade de interagir com diferentes proteínas alvo, mediante fosforilação em resíduos de fosfoserina (Muslin et al., 2006, Roberts et al., 2002), estas proteínas desempenham papéis importantes em vários processos biológicos, incluindo a transdução de sinal (Yoon and Kieber 2013; Wilson et al., 2016),

o crescimento, e desenvolvimento de vegetais, além da resposta a estresses bióticos (Lozano-Durán and Robatzek, 2015) e abióticos (Camoni et al., 2018). Diversos estudos tem se concentrado em caracterizar e analisar a resposta da família mediante diferentes estímulos ambientais, incluindo déficit hídrico (Ren et al., 2019), salinidade (Li et al., 2018; Liu et al., 2020) e diferentes temperaturas (Wang et al., 2019).

As plantas são os eucariotos com maior número de isoformas 14-3-3 (Wilson et al., 2016), entretanto esta quantidade varia consideravelmente entre as espécies. Diversos trabalhos tem identificado a composição gênica da família nas plantas, a qual é formada por cinco genes em cevada (Schoonheim et al., 2007), oito em arroz (Yao et al., 2016), nove em feijão comum (Li et al., 2015), 10 em *Medicago truncatula* (Qin et al., 2016), 13 genes em *Arabidopsis* (Rosenquist et al., 2001; DeLille et al., 2001), 18 em *Vigna radiata* (Chakraborty et al., 2022), 22 em soja (Wang et al., 2019) e 26 em milho (Kumar et al., 2015). No presente estudo, após busca e confirmação de dados, determina-se a presença de nove genes compondo a família 14-3-3 em feijão-caupi, além disto, encontramos o mesmo quantitativo identificado em trabalhos anteriores para *V. radiata* (considerando as proteínas originárias de transcritos alternativos) *P. vulgaris* e *M. truncatula*. Adicionalmente, identificamos 20 das 22 14-3-3 previstas para soja, resultado que pode ter sido diferente devido à constante atualização do genoma de referência da espécie no banco de dados NCBI.

A divisão da família 14-3-3 nos grupos epsilon e não epsilon foi a principal divisão evolutiva entre os membros desta família gênica (Mikhaylova et al., 2021). Esses grupos são divididos com base na organização éxon-íntron dos genes 14-3-3, caracterizados pela presença de um maior número de éxons nos genes pertencentes ao grupo Epsilon (DeLille et al., 2001). Nas leguminosas avaliadas no presente estudo é possível observar a divisão dos dois grupos, caracterizada pela presença de 3 ou 4

éxons no grupo Epsilon e 5 ou 6 éxons no grupo não Epsilon. Assim como identificado anteriormente em soja (Wang et al., 2019), os motivos encontrados em proteínas 14 - 3-3 das seis leguminosas avaliadas, segue um elevado padrão de conservação mesmo entre proteínas dos distintos grupos epsilon e não epsilon, desta forma, sugere-se que tais motivos devem ser essenciais para essa família gênica.

Os *Vu14-3-3s* distribuem-se em cinco cromossomos da espécie, com máximo de três genes nos cromossomos, resultados semelhantes foram encontrados em *M. truncatula* (Qin et al., 2016) e *P. vulgaris* (Li et al., 2015), sugerindo que a distribuição destes genes em diferentes cromossomos pode estar relacionada à proximidade evolutiva entre espécies. A análise de ortologia gênica mostra um representante *Vu14-3-3* agrupado com um representante de cada uma das espécies, com exceção de soja que, de forma geral, possui dois membros *Gm14-3-3s* associados a cada *Vu14-3-3*. Essa característica, pode ser explicada pela história evolutiva de *G. max*, espécie esta que sofreu duas duplicações do genoma (Schmutz et al., 2010; Sun et al., 2015), diferentemente das outras leguminosas estudadas neste trabalho.

Famílias gênicas podem surgir por duplicação segmentar ou duplicação/amplificação em *tandem*, considerando uma taxa de evolução lenta ou rápida, respectivamente (Cannon et al., 2004). A maioria dos *Vu14-3-3s* presentes no mesmo cromossomo encontram-se distantes, com exceção dos genes *Vu14-3-3e* e *Vu14-3-3f*, presentes no cromossomo cinco e *Vu14-3-3h* e *Vu14-3-3i*, no cromossomo nove, pares estes que, de acordo com a metodologia proposta com Cannon et al. (2004), encontram-se em *tandem*, assim como observado para feijão comum (Li et al., 2015). Em contraste, conforme metodologia descrita por Wang et al. (2012) todos os membros da família gênica 14-3-3 das seis espécies analisadas surgiram por duplicação segmentar, assim como observado em soja (Wang et al., 2019). Apesar

dos diferentes resultados, obtidos por metodologias diferentes, é possível determinar que a duplicação segmentar é o principal evento atuante na formação da família gênica 14-3-3 das espécies avaliadas, como confirmado por Wang et al. (2019) e Li et al. (2015), onde mesmo identificando a presença de pares de genes em tandem em feijão comum, o quantitativo é menor do que os originários por duplicação segmentar.

A seleção predominante na formação de uma família gênica pode ser identificada pela razão entre substituições não sinônimas e sinônimas (Ka/Ks), a qual caracteriza seleção positiva quando resulta em valores maiores que um; seleção neutra para valores iguais a um e; seleção negativa ou purificadora, para valores inferiores a um (Li et al., 1985). A razão Ka/Ks para a família gênica 14-3-3 entre as espécies aqui analisadas apresentou valor inferior a um, indicando seleção negativa ou purificadora como principal mecanismo associado a diversificação das isoformas

14-3-3s das leguminosas aqui avaliadas. Estes resultados corroboram com os encontrados em estudos anteriores para feijão comum (Li et al., 2015) e soja (Wang et al., 2019) demonstrando a alta conservação da família gênica 14-3-3 entre as leguminosas, a qual foi formada conservando sua estrutura ao longo dos ciclos evolutivos.

Acredita-se que a diversificação das diferentes isoformas 14-3-3 ocorre devido as divergências nas regiões C-terminal e N-terminal, contrastantes à elevada conservação da região central destas proteínas (Ferl et al., 2002). Neste estudo é possível observar variações nestas regiões, em especial na região C-terminal conforme observado em trabalhos, incluindo as leguminosas soja (Wang et al., 2019), feijão comum (Li et al., 2015) e *M. truncatula* (Qin et al., 2016). Essas variações são responsáveis pelos diferentes grupos que se associam as 14-3-3s para regular diversos processos biológicos (Lozano-Durán e Robatzek, 2015; Camoni et al., 2018).

A família gênica 14-3-3 é caracterizada pela presença de nove α hélices, as quais supostamente servem como sulco anfipático para ligação de proteínas alvo e sinal de exportação nuclear (Liu et al., 1995). A partir do alinhamento é possível identificar as regiões de α hélices conservadas, especialmente $\alpha 3$, $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$, dentre as quais encontram-se duas assinaturas 14-3-3 presentes nas regiões de $\alpha 3$ e $\alpha 9$ que caracterizam o domínio “14-3-3” (Li et al., 2015). As proteínas Vu14-3-3s são formadas por 246 a 261 resíduos de aminoácidos e apresentam ponto isoelétrico e massa molecular variando 4,41 a 4,69 e de 28,21 a 29,55 kDa, resultados semelhantes ao encontrado em outras leguminosas como *M. truncatula* (Qin, 2016) e *P. vulgaris* (Li et al., 2015).

A região promotora dos Vu14-3-3s identificados apresenta sítios de ligações à diferentes fatores de transcrição, incluindo TCP, MYB, DOF, WRKY e bZIP. O papel principal do fator de transcrição TCP é o desenvolvimento das plantas e ainda não há relatos da interação direta deste FT com proteínas 14-3-3, entretanto, recentemente a função de um tipo de TCP, denominado CIN, tem sido relatada, frente a situações de estresses bióticos e abióticos, a qual ainda não possui mecanismo completamente identificado (Lan and Quin, 2020). A interação entre 14-3-3 e o fator de transcrição MYB de soja acontece via resíduos de serina e treonina fosforilados em MYB que se ligam ao homodímero SGF14d (Dhaubhadel and Li, 2011). Em feijão comum e trigo a interação entre MYB e 14-3-3 promoveu aumento na tolerância ao estresse salino (Li et al., 2018; Shao et al., 2021). Fatores de transcrição DOF foram também encontrados em promotores 14-3-3 de batata (Spoza et al., 2003), os quais, apesar de ainda não serem constatados relatos desta interação voltada a resposta a estresses bióticos e abióticos, influenciam o metabolismo de carbono e nitrogênio, importantes processos vitais dos vegetais.

A atuação da família 14-3-3 mediante estresses abióticos, tem sido estudada em diversas plantas de interesse comercial, incluindo a resposta sob seca e salinidade em soja (Wang, et al., 2019), arroz (Yashvardhini et al., 2018) e feijão comum (Li et al., 2015; Li et al., 2018). A indução de genes 14-3-3 em resposta à estresses é confirmada por estudos em diferentes espécies, incluindo algodão (Sun et al., 2011) e arroz (Chen et al., 2006) submetidos à salinidade (NaCl) e déficit hídrico (PEG); milho submetido à déficit hídrico (PEG) (Campo et al., 2012) e tomate submetido à estresse alcalino induzido por diferentes valores de pH em solução de plantas cultivadas em hidroponia (Xu et al., 2013).

Duas metodologias transcriptômicas foram utilizadas para avaliar a resposta das 14-3-3 de feijão-caupi, mediante desidratação radicular, em uma delas duas cultivares contrastantes foram analisadas com base em um *bulk* dos tempos de análise e em outra um único acesso (Pingo-de-ouro1-2 tolerante) foi avaliado em relação a dois tempos de imposição ao estresse. Os dados *in sílico* foram validados em pelo menos um dos acessos via qPCR para os genes *Vu14-3-3f* (DR no acesso sensível), *Vu14-3-3g* (UR no acesso tolerante) e *Vu14-3-3i* (UR no acesso tolerante). Os genes *Vu14-3-3f* e *Vu14-3-3i* apresentam fatores MYB em suas regiões promotoras, o qual tem ação confirmada na resposta ao estresse abiótico (Li et al., 2018; Shao et al., 2021), além disto, apesar da não significância do teste estatístico, os dois genes apresentaram resposta contrastantes em acessos diferentes.

Em todas as bibliotecas analisadas, assim como na validação da família via PCR em tempo real (qPCR) o transcrito referente ao gene *Vu14-3-3c* não foi encontrado. Em feijão comum, uma situação semelhante foi identificada onde, dos nove genes que compõe a família, apenas oito são transcritos mediante estresses abióticos (Li et al., 2015). A região promotora do gene *Vu14-3-3c* é a que apresenta

menor quantidade de sítios de ligação a fatores de transcrição, sendo esta, uma das justificativas para ausência do transcrito correspondente ao gene mediante estímulo de desidratação radicular, adicionalmente, a multifuncionalidade dessa família gênica pode necessitar deste transcrito atuando apenas em algum outro processo que a família esteja envolvida (Fu et al., 2000; Ferl et al., 2002; Chakraborty et al., 2022).

A eficiência das 14-3-3 no aumento da tolerância à estresses tem sido confirmada, via transformação genética, em diferentes espécies, como *Triticum aestivum*, onde o transgene *TaGF14b* aumentou a tolerância a múltiplos estresses abióticos a partir da via de sinalização ABA, alterando processos que incluem o sistema de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), fechamento estomático e expressões gênicas relacionadas ao estresse (Zhang et al. 2018). Em *Brachypodium distachyon*, a eficiência das 14-3-3s na tolerância por deficiência hídrica foi comprovada e explicada pela interação de 14-3-3s com fatores de transcrição (*DREB1A* e *DREB1B*) e genes presentes na via de sinalização do ABA, como o gene *ABI1* (Yang et al 2017).

Uma rede de interação proteína-proteína (PPI) foi construída com base nos dados disponíveis para soja no banco STRING para desvendar os principais mecanismos da família 14-3-3 envolvidos na resposta ao estresse. A rede mostra uma interação direta entre todas as proteínas 14-3-3s e um alvo de controle do ciclo celular envolvido no crescimento radicular (CDC25) que é uma das muitas funções das 14-3-3s. Em adicional, as proteínas interagem com quinases e fosfatases, as quais são os principais ligantes de proteínas 14-3-3 a partir de sua interação com motivos fosfoserínicos (Muslin et al., 2006; Sluchanko et al., 2013).

A rede de interação das Vu14-3-3s com alvos de diferentes funcionalidades, confirma seu amplo envolvimento nos processos biológico, sendo a regulação da

atividade proteínas clientes o principal mecanismo utilizado pela família 14-3-3 de caupi e que pode ser utilizado para auxiliar a tolerância da planta ao déficit hídrico, sobretudo, pela ação dos genes *Vu14-3-3g* e *Vu14-3-3i*, os quais tiveram regulação induzida mediante desidratação radicular. Adicionalmente, este estudo demonstrou a interação de fatores MYB com as regiões promotoras dos genes *up-regulated* no acesso tolerante, desta forma, uma alternativa promissora seria a superexpressão dos FTs MYB para o aumento da tolerância ao estresse por seca, a qual foi eficiente em trabalhos para arroz (Tang et al., 2019) e algodão (Zhao et al., 2019).

Conclusões e Perspectivas

A família gênica 14-3-3 de pinhão-mansão é composta por nove genes, distribuídos em cinco cromossomos e, possivelmente, originária de eventos de duplicação segmentar. As proteínas Vu14-3-3s são altamente conservadas e distribuem-se nos grupos epsilon e não epsilon, característicos da família. A região promotora dos genes Vu14-3-3s apresenta sítios de ligação a fatores de transcrição relacionados à resposta ao estresse como MYB. Em resposta ao estímulo de desidratação radicular, a indução dos transcritos Vu14-3-3g e Vu14-3-3i na cultivar de feijão-caupi tolerante à seca, sugere que estes são potenciais alvos a ser explorados no melhoramento genético da espécie, bem como, os fatores de transcrição MYB, que encontram-se presentes nas regiões promotoras desses genes. A rede de interação proteína-proteína mostra a interação de Vu14-3-3s e diferentes fosfatases sugerindo que este é o principal mecanismo utilizado pela família para regular processos celulares, incluindo a resposta ao déficit hídrico.

Referências

- Abdelrahman M, Jogaiah S, Burritt DJ and Tran LSP (2018) Legume genetic resources and transcriptome dynamics under abiotic stress conditions. *Plant, cell & environment* 41(9): 1972-1983.
- Abiala MA, Abdelrahman M, Burritt DJ and Tran LSP (2018) Salt stress tolerance mechanisms and potential applications of legumes for sustainable reclamation of salt-degraded soils. *Land Degradation & Development* 29(10): 3812-3822.
- Amorim LLB, Ferreira-Neto JRC, Bezerra-Neto JP, Pandolfi V, de Araujo, FT, da Silva Matos MK et al (2018). Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. *Plant Methods* 14:88. doi: 10.1186/s13007-018-0354-z
- Amorim MR, Mendes LW, Antunes JEL, de Souza Oliveira LM, Melo VMM, Oliveira, FAS, Aquino JP, Rocha SMB, Pereira APA, Costa AF, Oliveira JP, Araujo FF, Figueiredo MVB and Araujo ASF (2022) Cowpea nodules host a similar bacterial community regardless of soil properties. *Applied Soil Ecology* 172: 104354.
- Bailey TL, Johnson J, Grant, CE and Noble WS (2015) The MEME suite. *Nucleic acids research* 43(W1): W39-W49.
- Benjamini Y and Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B* 57:289–300.

- Benko-Iseppon AM (2001) Estudos moleculares no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. Embrapa Documentos 56: 327-332.
- Bolger AM, Lohse M and Usadel B (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30(15): 2114-2120.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan MW, Pfaffl GL, Shipley GL, Vandesompele J and Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.
- Camoni L, Visconti S, Aducci P and Marra M (2018) 14-3-3 proteins in plant hormone signaling: doing several things at once. *Frontiers in plant science* 9: 297.
- Campo SPPC, Montesinos L, Peñas G, Messeguer J and San Segundo B (2012) Expression of the maize *ZmGF14-6* gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. *Journal of experimental botany* 63(2): 983-999.
- 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 biology* 4(1): 1-21.
- Carvajal-Rodríguez A (2017) Myriads: *P-value* based multiple testing correction. *Bioinformatics* 34:1043–1045.

- Chang I, Tong Z, Peng C, Wang D, Kong H, Yang Q, Luo M, Guo A, Xu, B (2020) Genome-wide analysis and phosphorylation sites identification of the 14-3-3 gene family and functional characterization of *MeGRF3* in cassava. *Physiology Plantarum* 69(2): 244 – 257.
- Chakraborty S, Soudararajan P and Kumar S (2022) Genome-wide identification, characterization, and expression profiling of 14-3-3 genes in legumes. *Plant Biotechnology Reports*: 1-19.
- Chen C, Chen H, He Y, and Xia R (2018) TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface. *BioRxiv*, 289660.
- Chen F, Li Q, Sun L and He Z (2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA research* 13(2): 53-63.
- Clamp M, Cuff J, Searle SM and Barton GJ (2004) The Jalview java alignment editor. *Bioinformatics* 20(3): 426-427.
- Claverie JM and Ta TN (2019) ACDtool: A web-server for the generic analysis of large data sets of counts. *Bioinformatics* 35:170–171.
- Dhaubhadel S and Li X (2010). A new client for 14-3-3 proteins: GmMYB176, an R1 MYB transcription factor. *Plant signaling & behavior* 5(7): 921-923.

- Delille JM, Sehnke PC and Ferl RJ (2001) The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiology* 126(1): 35-38.
- Dougherty MK and Morrison DK (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of cell science* 117(10) 1875-1884.
- Denison FC, Paul AL, Zupanska AK and Ferl RJ (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. In *Seminars in cell & developmental biology* 22(7): 720-727.
- Ferl RJ, Manak MS and Reyes MF (2002) The 14-3-3s. *Genome biology* 3(7): reviews3010.
- Ferreira-Neto JRC, Borges ANDC, da Silva MD, Morais DADL, Bezerra-Neto JP, Bourque G, Kido EA and Benko-Iseppon AM (2021) The cowpea kinome: Genomic and transcriptomic analysis under biotic and abiotic stresses. *Frontiers in Plant Science* 12:945.
- Fu H, Subramanian RR and Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40(1):617-647.
- Fulgosi H, Soll J, deFariaMS, Korthout HA, Wang M and Testerink C (2002) 14-3-3 proteins and plant development. *Plant molecular biology* 50(6): 1019-1029.

- Furtado GF, Sousa Júnior, JR, Xavier DA, Andrade EMG and Sousa JRM (2014) Pigmentos fotossintéticos e produção de feijão *Vigna unguiculata* L. Walp. sob salinidade e adubação nitrogenada. *Revista Verde* 9: 291-299.
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R and Zeng Q (2011) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nature biotechnology* 29(7), 644.
- Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL and Noble WS (2007) Quantifying similarity between motifs. *Genome biology* 8(2): 1-9.
- Hiller K, Grote A, Maneck M, Münch R and Jahn D (2006). JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics* 22(19): 2441-2443.
- Kido EA, Neto JRF, Kido SAB, Pandolfi V and Benko-Iseppon AM (2013) DeepSuperSAGE in a friendly bioinformatic approach: Identifying molecular targets responding to abiotic stress in plants. In: Gaur RK and Sharma P (eds) *Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress*. 1st edition. CRC Press, SI, pp 108-126.

- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D., J-Jones S and Marra MA (2009) Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome research* 19(9): 1639-1645.
- Kumar S, Nei M, Dudley J and Tamura, K (2008) MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in bioinformatics* 9(4): 299-306.
- Kumar K, Muthamilarasan M, Bonthala VS, Roy R and Prasad M (2015). Unraveling 14-3-3 proteins in C4 panicoids with emphasis on model plant *Setaria italica* reveals phosphorylation-dependent subcellular localization of RS splicing factor. *PloS one* 10(4): e0123236.
- Lan J and Qin G (2020) The regulation of CIN-like TCP transcription factors. *International Journal of Molecular Sciences* 21(12) 4498, 2020.
- Li WH, Wu CI and Luo CC (1985) A new method for estimating synonymous and nonsynonymous rates of nucleotide substitution considering the relative likelihood of nucleotide and codon changes. *Molecular biology and evolution* 2(2): 150-174.
- Li R, Jiang X, Jin D, Dhaubhadel S, Bian S and Li X. (2015) Identification of 14-3-3 family in common bean and their response to abiotic stress. *PLoS one* 10(11): e0143280.

- Li X, Gao G, Li Y, Sun W, He X, Li R, Jin D, Qi X, Liu Z and Bian S (2018) Functional roles of two 14-3-3s in response to salt stress in common bean. *Acta Physiologiae Plantarum* 40(12): 209.
- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H and Liddington R (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, 376(6536): 191-194.
- Liu J, Jiang C, Kang L, Zhang H, Song Y, Zou Z and Zheng W (2020) Over-Expression of a 14-3-3 Protein From Foxtail Millet Improves Plant Tolerance to Salinity Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 11: 449.
- Lonardi S, Muñoz-Amatriaín M, Liang Q, Shu S, Wanamaker SI, Lo S, Tanskanen J, Schulman AH, Zhu T and Luo MC et al. (2019) The genome of cowpea (*Vigna unguiculata* [L.] Walp.). *Plant J* 98:767–782.
- Lozano-Durán R and Robatzek S (2015) 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(5): 511-518.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer LY, Geer RC, He J and Gwadz M (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* 43(D1): D222-D226.
- Mikhaylova YV, Puzanskiy RK and Shishova MF (2021) Evolution of 14-3-3 proteins in angiosperm plants: recurring gene duplication and loss. *Plants* 10(12): 2724.

- Mishra KB, Lannacone R, Petrozza A, Mishra A, Armentano N, Giovanna LV, Trtilek M, Cellini F and Nedbal L (2012) Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Sci* 182: 79-86.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM and Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84(6): 889-897.
- Opoku VA, Yawson DO, Asare PA, Afutu E, Kotochi MC, Amoah KK and Adu MO (2022) Root hair and rhizosheath traits contribute to genetic variation and phosphorus use efficiency in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *Rhizosphere* 21: 100463.
- Qin C, Cheng L, Shen J, Zhang Y, Cao H, Lu D and Shen C (2016) Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 family genes in *Medicago truncatula*. *Frontiers in plant science* 7: 320.
- Ravelombola W, Shi A, Weng Y, Mou B, Motes D, Clark J, Chen P, Srivastava V, Qin J, Dong L, Yang W, Bhattarai G and Sugihara Y (2018). Association analysis of salt tolerance in cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) at germination and seedling stages. *Theor Appl Genet* 131: 79-91.
- Ren YR, Yang YY, Zhang R, You CX, Zhao Q and Hao YJ (2019) *MdGRF11*, an apple 14-3-3 protein, acts as a positive regulator of drought and salt tolerance. *Plant Science* 288: 110219.

- Rivas R, Falcão HM, Ribeiro RV, Machado EC, Pimentel C, Santos MG (2016) Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. *South African Journal of Botany*, Pietermaritzburg 103:101-107.
- Robertson N, Oveisi-Fordorei M, Zuyderduyn SD, Varhol RJ, Fjell C, Marra M., Jones S and Siddiqui A (2007). DiscoverySpace: an interactive data analysis application. *Genome biology* 8(1): 1-13.
- Robinson MD, McCarthy DJ and Smyth GK (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1), 139-140.
- Roberts MR, Salinas J and Collinge DB (2002) 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. *Plant molecular biology* 50(6): 1031-1039.
- Rosenquist M, Alsterfjord M, Larsson C and Sommarin M (2001) Data mining the *Arabidopsis* genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. *Plant physiology* 127(1): 142-149.
- Sandelin A, Alkema W, Engström P, Wasserman WW and Lenhard B (2004) JASPAR: an open-access database for eukaryotic transcription factor binding profiles. *Nucleic acids research* 32(suppl_1): D91-D94.

- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T, Nelson W, Hyten DL, Song Q, Thelen JJ and Cheng J (2010). Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463(7278): 178-183.
- Schoonheim PJ, Sinnige MP, Casaretto JA, Veiga H, Bunney TD, Quatrano RS and de Boer AH (2007). 14-3-3 adaptor proteins are intermediates in ABA signal transduction during barley seed germination. *The Plant Journal* 49(2): 289-301.
- Shao W, Chen W, Zhu X, Zhou X, Jin Y, Zhan C, Liu G, Liu X, Ma D and Qiao Y (2021) Genome-wide identification and characterization of wheat 14-3-3 genes unravels the role of TaGRF6-A in salt stress tolerance by binding MYB transcription factor. *International journal of molecular sciences*, 22(4): 1904.
- Sluchanko NN, Chebotareva NA and Gusev NB (2013) Modulation of 14-3-3/phosphotarget interaction by physiological concentrations of phosphate and glycerophosphates. *PLoS One* 8(8): e72597.
- Szopa J, Łukaszewicz M, Aksamit A, Korobczak A and Kwiatkowska D (2003) Structural organisation, expression, and promoter analysis of a 16R isoform of 14-3-3 protein gene from potato. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(5), 417-423.
- Sun G, Xie F and Zhang B (2011) Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Functional & integrative genomics* 11(4): 627-636.

- Sun X, Sun M, Jia B, Chen C, Qin Z, Yang K, Shen Y, Meiping Z, Mingyang C and Zhu Y (2015) A 14-3-3 family protein from wild soybean (*Glycine soja*) regulates ABA sensitivity in Arabidopsis. *PloS one* 10(12): e0146163.
- Tamura K, Stecher G and Kumar S (2021). MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution* 38(7): 3022-3027.
- Tang Y, Bao X, Zhi Y, Wu Q, Guo Y, Yin X, Zeng L, Li J, Zhang J, He W, Liu W, Wang Q, Jia C, Li Z and Liu K. (2019). Overexpression of a MYB family gene, *OsMYB6*, increases drought and salinity stress tolerance in transgenic rice. *Frontiers in plant science* 10: 168.
- Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2003) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics* (1): 2-3.
- Tian F, Yang DC, Meng YQ, Jin J and Gao G (2020) PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Research* 48(D1): D1104-D1113.
- Thummuluri V, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Nielsen H, Winther O. (2022). DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic acids research*, 50(W1), W228-W234.
- Wang Y, Tang H, DeBarry JD, Tan X, Li J, Wang X, Lee T, Jin H, Marler B, Guo H, Kissinger Jc and Paterson, A. H. (2012). MCScanX: a toolkit for detection and

evolutionary analysis of gene synteny and collinearity. *Nucleic acids research* 40(7): e49-e49.

Wang C, Chen Q, Xiang N, Liu Y, Kong X, Yang Y and Hu X (2018) SIP1, a novel SOS2 interaction protein, is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 124: 167-174

Wang Y, Ling L, Jiang Z, Tan W, Liu Z, Wu L, Zhao Y, Xia S, Ma J and Wang G W (2019) Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in soybean (*Glycine max*). *PeerJ* 7: e7950.

Wilson RS, Swatek KN and Thelen JJ (2016) Regulation of the regulators: post-translational modifications, subcellular, and spatiotemporal distribution of plant 14-3-3 proteins. *Frontiers in plant science* 7: 611.

Xu W, Jia L, Shi W, Baluška F, Kronzucker HJ, Liang J and Zhang J (2013) The tomato 14-3-3 protein TFT4 modulates H⁺ efflux, basipetal auxin transport, and the PKS5-J3 pathway in the root growth response to alkaline stress. *Plant physiology* 163(4): 1817-1828.

Xu L, Dong Z, Fang L, Luo Y, Wei Z, Guo Zhang G, Gu YQ, Coleman-Derr D and Xia Q (2019) OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic acids research* 47(W1): W52-W58.

- Yang L, You J, Wang Y, Li J, Quan W, Yin M, Wang Q, Chan Z (2017) Systematic analysis of the G-box Factor 14-3-3 gene family and functional characterization of GF14a in *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiology and Biochemistry* 117:1-11.
- Yao Y, Du Y, Jiang L and Liu JY (2007) Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa*. *BMB Reports* 40(3): 349-357.
- Yashvardhini N, Bhattacharya S, Chaudhuri S and Sengupta DN (2018). Molecular characterization of the 14-3-3 gene family in rice and its expression studies under abiotic stress. *Planta* 247(1): 229-253.
- Yoon GM and Kieber JJ (2013) 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(3): 1016-1028.
- Zhang Y, Zhao H, Zhou S, He Y, Luo Q, Zhang F, Qiu D, Feng J, Wei Q, Chen L et al (2018) Expression of *TaGF14b*, a 14-3-3 adaptor protein gene from wheat, enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. *Planta* 248(1):117-137.
- Zhao Y, Yang Z, Ding Y, Liu L, Han X, Zhan J, Wei X, Diai Y, Qin W, Wang P, Liu P, Sajjad M, Zhang X and Ge X (2019) Over-expression of an R2R3 MYB Gene, *GhMYB73*, increases tolerance to salt stress in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Science* 286: 28-36.

5 ARTIGO II

Artigo a ser submetido na revista Genetics and Molecular Biology

GENÔMICA E TRANSCRIPTÔMICA DE GENES 14-3-3 em *Jatropha curcas*

Running title: As 14-3-3s de pinhão-mansô

Vanessa Emanuelle Pereira Santos¹; Manassés Daniel da Silva¹; Éderson Akio Kido¹

1 Departamento de Genética, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Genética – PPGG, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Corresponding author: kido.ufpe@ufpe.br

Resumo

O pinhão-manso (*Jatropha curcas*) é uma oleaginosa rica em proteína, utilizada como barreira em sistemas agrícolas e com potencial para indústria do biodiesel. É uma espécie considerada moderadamente tolerante aos estresses de seca e salinidade e apresenta variabilidade de resposta entre diferentes acessos. A salinidade é significativamente prejudicial as plantas, dificultando a absorção de nutrientes e ocasionando diminuição de rendimento. As proteínas 14-3-3 são moléculas reguladoras multifuncionais que estão envolvidas na transdução de sinais e na resposta à condições desfavoráveis, incluindo a salinidade. Este estudo buscou identificar e caracterizar, a nível estrutural e funcional, a família gênica 14-3-3 de pinhão-manso. Foram identificadas nove isoformas com estrutura conservada e pequenas variações nas regiões N e C terminais. As 14-3-3s subdividem-se nos grupos Epsilon e não Epsilon com base na estrutura de organização éxon-íntron. Promotores de Jc14-3-3s apresentam sítios de ligação a diversos fatores de transcrição, incluindo MICK-MADS, DOF e TCP. Três transcritos 14-3-3 foram *up-regulated* para *J. curcas* submetida a 150 mM de NaCl. Uma rede PPI relata a interação entre um heterodímero 14-3-3 e H⁺ ATPase, bem como outros ligantes importantes para o desenvolvimento da planta. Este estudo disponibiliza, pela primeira vez, a identificação e caracterização da família 14-3-3 de pinhão-manso, indicando a importância das proteínas Jc14-3-3c e Jc14-3-3d, formadores do heterodímero e dos genes induzidos *Jc14-3-3f*, *Jc14-3-3h* e *Jc14-3-3i*, para a resposta positiva da planta frente a condições de salinidade.

Palavras-chave: pinhão-manso, fator geral de regulação, salinidade, isoformas, expressão.

Abstract

Jatropha curcas (*Jatropha curcas*) is an oleaginous plant rich in protein, used as a barrier in agricultural systems and with potential for the biodiesel industry. It is a species considered to be moderately tolerant to drought and salinity stresses and shows variability in response between different accessions. Salinity is significantly harmful to plants, hindering the absorption of nutrients and causing a decrease in yield. 14-3-3 proteins are multifunctional regulatory molecules that are involved in signal transduction and in response to unfavorable conditions, including salinity. This study sought to identify and characterize, at a structural and functional level, the *Jatropha* 14-3-3 gene family. Nine isoforms with conserved structure and small variations in the N and C terminal regions were identified. The 14-3-3s are subdivided into Epsilon and non-Epsilon groups based on the exon-intron organization structure. Jc14-3-3s promoters have binding sites for several transcription factors, including MICK-MADS, DOF and TCP. Three 14-3-3 transcripts were up-regulated for *J. curcas* subjected to 150 mM NaCl. A PPI network reports the interaction between a 14-3-3 heterodimer and H⁺ ATPase, as well as other important ligands for plant development. This study provides, for the first time, the identification and characterization of the *jatropha* 14-3-3 family, indicating the importance of the proteins Jc14-3-3c and Jc14-3-3d, formers of the heterodimer and of the induced genes Jc14-3-3f, Jc14-3-3h and Jc14-3-3i, for the positive response of the plant to salinity conditions.

Keywords: *jatropha*, general regulation factor, salinity, isoforms, expression.

Introdução

O pinhão-mansão (*Jatropha curcas*) é um arbusto, tropical e subtropical, que cresce em condições diferentes de clima e solo e é bastante utilizado em sistemas

agrícolas como barreira contra o vento e controle de erosão do solo (Liu et al., 2019; Maghuly and Lamer, 2013). É uma planta oleaginosa, pertencente a família Euphorbiaceae que apresenta quantidade abundante de óleo em suas sementes e é tida como promissora para a indústria do biodiesel (Liu et al., 2019). Ainda que considerada tóxica para ingestão humana e animal, alguns genótipos de *J. curcas* encontrados no México apresentam característica não tóxica e, a torta prensada como subproduto destes genótipos, torna-se promissora para a alimentação humana e animal, com teores de proteína de 25 a 30% (León-Villanueva et al., 2018).

Apesar de apresentar redução de rendimento e diminuição no crescimento das plantas, *J. curcas* é considerada moderadamente tolerante ao déficit hídrico, sendo a osmorregulação o mecanismo chave utilizado para suportar longos períodos de estiagem (Yang et al., 2015). Sob condições de salinidade, a espécie também apresenta tolerância moderada, entretanto, com perdas ainda mais significativas no rendimento da cultura (Niu et al., 2012; Abrar et al., 2020). Há ainda uma grande variabilidade de resposta ao estímulo salino ao analisar diferentes acessos de *J. curcas*, mesmo em condições iguais de salinidade (Lozano-Isla et al., 2018), variações estas que podem ser fonte de genes para acessos menos tolerantes, bem como, espécies aparentadas.

As plantas apresentam respostas complexas frente a condições de salinidade, culminando na ocorrência de processos de toxicidade iônica, estresse osmótico e estresse oxidativo (Cassells and Cury, 2001; Karuppanapandian and Kim, 2013). Tais processos proporcionam redução da produção dos principais componentes nutricionais da planta, afetando quase todas as fases do seu desenvolvimento (Bano and Fátima, 2009). A homeostase dos íons é essencial para a manutenção das funções fisiológicas celulares normais, necessárias para a correta absorção de

nutrientes das plantas (Arif et al., 2020). O desequilíbrio iônico, como o aumento da razão Na^+/K^+ gera um desequilíbrio nutritivo na célula, que é provocado pela interferência na absorção de nutrientes, além disto, o aumento da concentração de íons tóxicos na célula é responsável pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) que provocam sérios distúrbios metabólicos, incluindo alterações no sistema redox e danos a macromoléculas (Gil and Tujeda, 2010).

Estudos recentes sobre os mecanismos de resposta à salinidade em plantas, têm destacado um mecanismo de regulação na via SOS (*Salt Overly Sensitive*) mediado por proteínas 14-3-3 e outros interatores que, em situações normais, reprimem SOS2 e em condições de estresse, os repressores de SOS2 são degradados e liberam-na para fosforilar SOS1 (Zhao et al., 2021). A interação entre a SOS2 e um transportador permeável do Ca^{2+} é responsável pela sinalização do cálcio, que é considerado um mensageiro universal e tem o sinal decodificado por proteínas 14-3-3 e SOS3 que ativam e inativam SOS2 e a proteína quinase PKS5 para regular a homeostase do Na^+ mediando coordenadamente o antiporte de membrana Na^+/H^+ e a atividade de H^+/ATPase de membrana (Yang et al., 2019; Zhao et al., 2021).

As proteínas 14-3-3 são fatores gerais de regulação (GRF), expressas em todas as células eucarióticas e com estrutura conservada, caracterizadas pela capacidade de se ligar à alvos, funcionalmente diversos, incluindo quinases, fosfatases, receptores transmembranares (Fu et al., 2000) e fatores de transcrição, interagindo diretamente com a maquinaria de expressão gênica (Fulgosi et al., 2002; Denison et al., 2011), podendo alterar a localização, estabilidade, estado de fosforilação, atividade e/ou interações moleculares do seu ligante (Dougherty; Morrison, 2004). Adicionalmente, as proteínas 14-3-3 podem modular as vias de

sinalização e, por consequência, impactar a transdução de sinais (Denison et al., 2011).

A resposta da família gênica 14-3-3 à estresses abióticos tem sido estudadas em muitas espécies incluindo mandioca, milho, arroz e feijão, sendo perceptível a variabilidade de resposta entre diferentes espécies e mesmo entre diferentes isoformas da mesma espécie. Diante do exposto, o presente estudo buscou identificar e caracterizar a família gênica 14-3-3 de pinhão-mansão, analisando, adicionalmente, sua resposta sob condições de salinidade.

Material e métodos

Abordagem genômica

Identificação da família gênica 14-3-3 em pinhão-mansão e espécies filogeneticamente correlacionadas

Sequências 14-3-3 de *Jatropha curcas*, *Ricinus communis*, *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* e *Populus trichocarpa*, foram obtidas por meio de busca por palavras-chave, utilizando os termos “14-3-3”, “GRF14” e “GF14”, no banco de dados RefSeq do NCBI. As sequências dos transcritos 14-3-3 de cada espécie, previamente identificados, foram alinhados com seus respectivos transcriptomas de referência, disponíveis no NCBI (*J. curcas* – GCF_014843425.1; *Ricinus communis* – GCF_019578655.1; *Manihot esculenta* – GCF_001659605.2; *Hevea brasiliensis* – GCF_001654055.1; *Populus trichocarpa* – GCF_GCF_000002775.4), no intuito identificar possíveis sequências ainda não anotadas.

Os transcritos 14-3-3 das cinco espécies, identificados e confirmados, foram alinhados contra o transcriptoma de referência de *J. curcas* (GCF_014843425.1), via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-20}$) e classificados pelo método *best hit* (maior score, maior

identidade, maior tamanho de alinhamento e menor *e-value* $< e^{-90}$), visando identificar todos os transcritos 14-3-3 presentes em pinhão-mansão.

Além dos transcritos, polipeptídeos 14-3-3 das cinco espécies foram obtidos no RefSeq do NCBI, levando em consideração, para a escolha da sequência representativa do *loci* gênico, a que apresentava maior tamanho. As prováveis proteínas 14-3-3 tiveram domínio completo confirmado pelo *Batch CD Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>; Marchler-Bauer e Derbyshire, 2015) e foram utilizadas para as análises estruturais subsequentes.

Os componentes 14-3-3 de cada espécie foram nomeados considerando as iniciais de seus nomes científicos, seguidas do termo “14-3-3” e a designação alfabética, ordenada com base em sua localização cromossômica. Os números dos identificadores correspondentes às respectivas sequências de cada espécie, bem como a nomeação adotada neste estudo, foram listados na Tabela S1.

Genômica estrutural comparativa da família gênica 14-3-3

Alinhamento múltiplo de sequências

As sequências proteicas 14-3-3 das leguminosas aqui estudadas foram alinhadas pelo ClustalW e, em seguida, uma árvore fenética foi construída pelo método de *Neighbour Joining*-NJ, utilizando *bootstrap* de 10000, no software MEGA 11 (Tamura et al., 2021), no intuito de identificar os possíveis grupos representativos das 14-3-3s.

Identificação de motivos conservados entre as proteínas 14-3-3s das seis leguminosas

Os motivos conservados das proteínas 14-3-3 de todas as espécies foram identificados no *software* MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>), utilizando a ferramenta MEME (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>; Bailey et al., 2009) e visualizados pelo TBTools (Chen et al., 2018), afim de identificar o padrão de conservação existente entre as espécies analisadas.

Análise da estrutura gênica (organização éxon-íntron)

A estrutura gênica da família 14-3-3 de cada espécie, baseada na organização éxon-íntron foi analisada utilizando como *input* os identificadores de transcritos e o arquivo GTF do genoma de referência de cada espécie, ambos obtidos no banco de dados NCBI e visualizada pela ferramenta *Biosequence Structure*, implementada no TBTools,

Caracterização físico química, análise de similaridade e localização subcelular das proteínas Jc14-3-3

Além das características identificadas por meio das análises comparativas, a família Jc14-3-3 foram avaliados padrões de conservação, localização subcelular, ponto isoelétrico e massa molecular. Para tanto, as sequências polipeptídicas das Vu14-3-3s foram alinhadas pelo método ClustalW (Thompson et al., 2004), no *software* JalView (Clamp et al., 2004), visando analisar os padrões de conservação por identidade. A localização subcelular foi identificada pelo programa DeepLoc 2.0 (Thummuluri et al., 2022) e os valores de ponto isoelétrico e massa molecular foram calculados pela ferramenta JVirGel (Hiller et al., 2006).

Identificação de elementos *cis* regulatórios presentes na promotora de genes *Jc14-3-3*

As regiões promotoras dos genes 14-3-3 de *J. curcas* (1000pb) foram extraídas do genoma de referência pelo pacote GFF-Ex (Genome Feature Extraction Package - <http://bioinfo.icgeb.res.in/gff/>; Rastogi and Gupta 2014), utilizando a linha de comando: "caminho da pasta"/gffex -in [gff] -db [sequence]. Os motivos candidatos à ligação de fatores de transcrição foram identificados no MEME, considerando aceitáveis motivos com *e-value* < 0,05.

A identificação de elementos *cis* regulatórios correspondentes aos motivos identificados foi realizada no software MEME Suites (<https://meme-suite.org/meme/>), a partir das ferramentas: 1) MEME, utilizada para identificar os motivos presentes nas regiões promotoras dos genes *Vu14-3-3s* e; 2) Tomtom v.4.11.2 (<https://meme-suite.org/meme/tools/tomtom>; Gupta et al., 2007). No Tomtom, foi utilizado o arquivo "XML" obtido pela análise anterior realizada no MEME (1) como *input* e, em seguida foi realizada uma comparação dos motivos com o banco JASPAR2022_CORE_plants_non-redundant, considerando alinhamentos com *p-value* < 0,05. Para identificar os fatores de transcrição associados aos motivos identificados, foi realizada uma busca utilizando os identificadores JASPAR no banco em questão (<https://jaspar.genereg.net/>; Sandelin et al. 2004), conforme descrito por Ferreira-Neto et al. (2021).

Os fatores de transcrição enriquecidos foram identificados na ferramenta *Binding Site Prediction* (*p-value* $\leq 1e^{-5}$) da plataforma online PlantRegMap (<http://plantregmap.gao-lab.org>; Tian et al. 2020), utilizando dados depositados no banco PlantTFDB v5.0 (Plant *Transcription* Factor Database - <http://planttfdb.gao-lab.org/>) para a espécie. Predições de regulação também puderam ser observadas

pela ferramenta *Regulation Prediction* da mesma plataforma, utilizando as regiões promotoras previamente extraídas do genoma de referência da espécie.

Abordagem transcriptômica

Material biológico e bibliotecas RNA-Seq

Bibliotecas transcriptômicas RNA-Seq disponibilizadas e descritas anteriormente por Souza et al. (2020) e Lima Cabral et al. (2020) foram utilizadas neste estudo, as quais são provenientes de um ensaio realizado na cidade de Rio Largo-AL, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas (CECA-UFAL), utilizando os acessos Jc183 e Jc171, escolhidos em ensaios prévios (Lozano-Isla et al., 2018), submetidos a exposição de NaCl a 150mM por três horas.

O ensaio supracitado foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, usando três plantas meio-irmãs de cada acesso (três réplicas biológicas) e dois tratamentos (com e sem estímulo salino). Amostras de raízes oriundas de cada tratamento foram armazenadas em freezer -80°C e, em seguida, tiveram RNA extraído utilizando o kit *SV Total RNA Isolation* (Promega, Madison, USA), seguindo as instruções do fabricante e enviados para o Centro de Genômica da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ/USP) onde RNAs com RIN (*RNA Integrity Number*) maiores que oito, foram utilizados para montar as bibliotecas RNA-Seq (*Illumina TruSeq Stranded mRNA Sample Prep LS Protocol*), sequenciadas em *HiSeq Flow Cell* v4, usando leituras pareadas de 100 pb.

A montagem por referência das bibliotecas RNA-Seq foi conduzida utilizando *reads* avaliados pelo *FastQC* v.2.3.5.1 e com adaptadores removidos pelo *Cutadapt* v.3.7, que foram filtrados pelo *Sickle* v.1.2.3, considerando critérios de qualidade e comprimento (20 para ambos). Os *reads* filtrados foram alinhados contra o

transcriptoma de referência de *Jatropha curcas* (GCF_014843425.1, disponível no *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e indexados no *bowtie* v.2.3.5.1) pelo *Tophat2* v.2.1.1 e as planilhas e cálculos estatísticos foram gerados pelo *Cufflinks* v.2.2.1, sendo considerados diferencialmente expressos (DEs), transcritos com $FDR < 0,01$ e valores de $\text{Log}_2 \text{FoldChange}$ (Log_2FC) ≥ 1 induzidos (UR, *up-regulated*) e $\text{Log}_2FC \leq -1$ reprimidos (DR, *down-regulated*).

Análise de expressão *in silico* e validação via RT-qPCR de Jc14-3-3

Transcritos Jc14-3-3 identificados e confirmados pelas análises supracitadas foram diretamente associados aos transcritos RNA-Seq, visto que, trata-se de uma montagem por referência, na qual, o mesmo transcriptoma foi utilizado nas análises estruturais (GCF_014843425.1). A expressão *in silico* dos transcritos 14-3-3 de pinhão-mansão sob estímulo salino foram ilustradas em *heatmaps*, utilizando o TBtools (<https://github.com/CJ-Chen/TBtools>), considerando dados de modulação da expressão dos transcritos em relação aos controles, a partir dos valores de Log_2FC . Com base nos transcritos Jc14-3-3 presentes no transcriptoma e na montagem por referência, foram desenhados *primers* com auxílio do *software* Primer 3 (Rozen, e Skaletsky, 2000), com modificações nos parâmetros: tamanho do *amplicon* (entre 70 e 200 pb), temperatura de *melting* [entre 40 °C (mínima), 50 °C (ótima) e 60 °C (máxima)], e conteúdo de GC [entre 45-55% (ótimo de 50 %)] (Tabela 1).

Tabela 1. Primers para análise de Jc14-3-3s em PCR em tempo real

ID	Left primer	Right primer	Eficiência
Jc_14-3-3a	GAATTCTCCTGATCGTGCTTG	TGAGTCTTCTCCCAAGTGTATCG	106,29
Jc_14-3-3b	GGTGATGATCGTAAAGAAGCTG	AAGCCTGATTGGATGCGTAG	97,83
Jc_14-3-3c	GGGTGAGGAGTCATACAAGGAC	GCTGTTCTTCAGTGGGTTTAGC	92,38
Jc_14-3-3d	CCTACTCACCCAATAAGGCTTG	TGTGTCAAGCTCAGAAATAGCC	91,46
Jc_14-3-3e	GCAGCTATTGAGGGACAATCTC	TTTAGCACTGTTGTCCAGCTTC	93,21
Jc_14-3-3f	ACCTCACTTTGTGGACGTCTG	ATCACCTTCATCCTACCACAC	94,93
Jc_14-3-3g	ATGCAGTTGTTGAGAGACAACC	CTTCTGCAGGTTTGGATTCTTC	X
Jc_14-3-3h	CATCCGATCAGATTAGGACTGG	TTCCTCTCCCAAAGTGTCTAGC	98,76
Jc_14-3-3i	GGGTTGGCACTTAATTACTCAG	GTAGGATTCTCACCCAAAGTG	92,64

A validação da expressão gênica dos Jc14-3-3s foi conduzida seguindo a metodologia do protocolo MIQE (Bustin et al., 2009), utilizando três réplicas biológicas e três réplicas técnicas para cada tratamento analisado (com e sem imposição de estímulo salino). As reações de PCR em tempo real (qPCR) foram realizadas em placas de 96 poços no equipamento LineGene9660 (Bioer), utilizando como método de detecção o *SYBR Green*.

As amostras de RNA utilizadas foram oriundas do ensaio que deu origem ao transcriptoma RNA-Seq analisado neste trabalho, as quais foram avaliadas quanto quantidade e qualidade usando espectrofotômetro NanoDrop-1000 UV-vis (*Thermo Fisher Scientific*). Para obtenção do cDNA (DNA complementar) a ser utilizado na qPCR, as amostras de RNA foram reversamente transcritas usando o kit *Improm-IITM Reverse Transcriptional System* (Promega) com *primers oligo dT* e seguindo recomendações do fabricante. As configurações de ciclgem da qPCR, determinação da eficiência dos primers sintetizados, amplificação e curva de melting foram desenvolvidas de acordo com Souza et al. (2020).

Os genes de referência utilizados para normalização de dados foram Actina e Tubulina, os quais foram testados em trabalhos anteriores, conduzidos com o mesmo material do presente trabalho, por Souza et al. (2020) e Lima Cabral (2020). Para

análise da expressão relativa diferencial o *software* Rest2009 foi utilizado para comparar os valores dos genes de referência e dos Jc14-3-3 em situações de controle e tratamento (com e sem estímulo salino). Por fim, para determinar se as diferenças na expressão dos transcritos foram significativas ou não, testes de hipótese (*p-value* < 0,05) foram empregados.

Predição da rede de interação proteína-proteína (PPI) de Jc14-3-3 e seus associados

O banco de dados STRING v. 11.5 (<https://string-db.org/>) foi utilizado para predizer prováveis interações proteína-proteína (PPI) entre Jc14-3-3 e seus associados. A rede foi construída com base em dados disponíveis no banco para *Jatropha curcas*, a partir do *input* do arquivo FASTA contendo as proteínas Jc14-3-3 na opção “*Multiple Sequences*”, que foram associadas ao disponível no banco STRING.

Para a construção da rede foram utilizadas fontes de interação referentes à: experimentos; bancos de dados e co-expressão, além de um valor de 0,7 de *threshold*, que representa um *score* de interação de alto grau de confiança entre as interações. O número máximo de interações foi definido em “não mais que 10 interações” na opção *1st shell* e “não mais que 20 interações” na opção *2st shell*

Resultados

Identificação de 14-3-3s em pinhão-mansão e espécies filogeneticamente correlacionadas

As 14-3-3s de pinhão-mansão, foram identificadas usando transcritos 14-3-3 da espécie e de outras quatro (*Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta*, *Populus*

trichocarpa e *Ricinus communis*), totalizando 96 transcritos, incluindo os alternativos de cada das espécies. Os transcritos 14-3-3 de *J. curcas* indicam a presença de nove genes, um deles com possibilidade de gerar um transcrito alternativo, de acordo com o banco NCBI.

Considerando que as espécies *Manihot esculenta*, *Hevea brasiliensis* e *Populus trichocarpa* possuem quase o dobro de cromossomos que as demais, era esperado um maior quantitativo de 14-3-3 identificadas. *Ricinus comunis* e *Jatropha curcas* apresentam o mesmo número total de transcritos, ainda que *J. curcas* tenha mais *lóci* que *R. comunis*, conforme observado na tabela 2.

Tabela 2. Quantitativo de transcritos utilizados para identificação da família gênica 14-3-3 em pinhão-mansão

Espécie	Locus gênico	Locus com transcritos alternativos	Transcritos 14-3-3 totais	Total de transcritos no transcriptoma de referência
<i>Jatropha curcas</i>	9	1 (1)	10	29586
<i>Hevea brasiliensis</i>	20	8 (14)	34	58062
<i>Manihot esculenta</i>	16	7 (8)	24	49290
<i>Populus trichocarpa</i>	14	4 (4)	18	51717
<i>Ricinus communis</i>	7	2 (3)	10	33187
Total	66		96	

Fonte: Bancos de dados NCBI

Após confirmação, via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-20}$), entre transcritos 14-3-3 e transcriptomas de referência de cada espécie, o total foi mantido e, em seguida, alinhado contra o transcriptoma de referência de *J. curcas*. Após remoção de duplicatas e seleção dos melhores alinhamentos foram localizadas 10 sequências, correspondentes aos nove genes identificados, todos com anotação confirmada. Os correspondentes dos nove genes 14-3-3 de feijão caupi, foram identificados como: *Jc14-3-3a*, *Jc14-3-3b*, *Jc14-3-3c*, *Jc14-3-3d*, *Jc14-3-3e*, *Jc14-3-3f*, *Jc14-3-3g*, *Jc14-3-3h* e *Jc14-3-3i* (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação em bancos de dados e nomenclatura utilizada para membros da família 14-3-3 de pinhão-manso

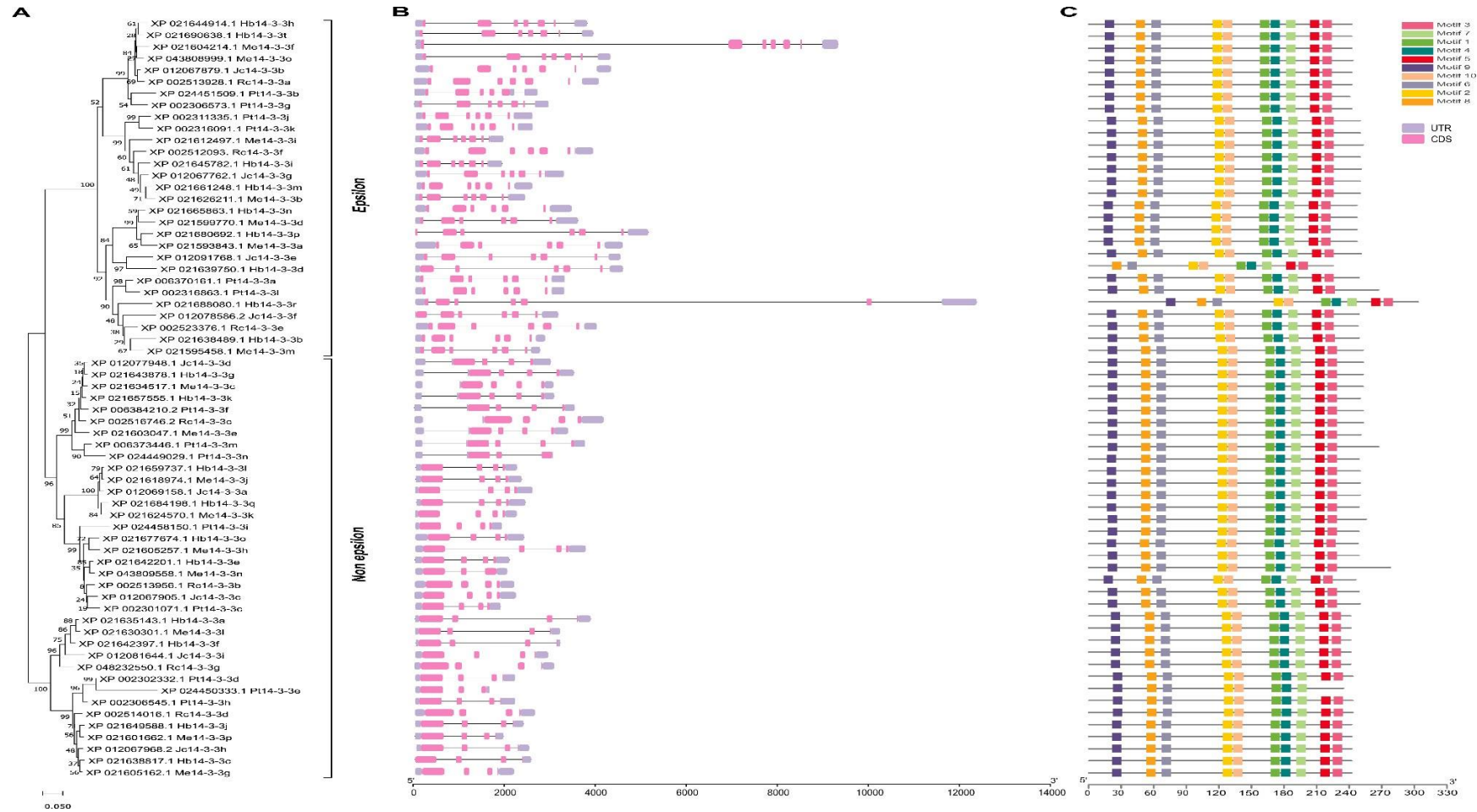
Transcritos	Proteínas	Gene	Nomenclatura utilizada	Sentido
XM_012213768.3	XP_012069158.1	LOC105631597	Jc14-3-3a	+
XM_012212489.3	XP_012067879.1	LOC105630618	Jc14-3-3b	-
XM_012212515.3	XP_012067905.1	LOC105630641	Jc14-3-3c	+
XM_012222558.2	XP_012077948.1	LOC105638710	Jc14-3-3d	-
XM_012236378.3	XP_012091768.1	LOC105649664	Jc14-3-3e	+
XM_012223196.3	XP_012078586.2	LOC105639213	Jc14-3-3f	+
XM_012212372.3	XP_012067762.1	LOC105630532	Jc14-3-3g	-
XM_012212578.3	XP_012067968.2	LOC105630684	Jc14-3-3h	+
XM_012226254.3	XP_012081644.1	LOC105641669	Jc14-3-3i	-
XM_012226255.3	XP_012081645.1	LOC105641669	Jc14-3-3i2	-

Fonte: Banco de dados NCBI

Genômica estrutural comparativa

A análise fenética (Figura 1a) das sequências de aminoácidos correspondentes às proteínas 14-3-3 identificadas nas cinco espécies demonstra uma subdivisão nos dois grupos característicos da família 14-3-3: grupo epsilon e não epsilon, nos quais são categorizados genes com 5-6 éxons e 3-4 éxons, respectivamente, conforme demonstrado pela estrutura gênica dos *Jc14-3-3s* (Figura 1b). A alta conservação de diferentes motivos da família 14-3-3 das espécies analisadas também é evidenciada, mesmo entre os membros dos distintos grupos epsilon e não epsilon.

Figura 1. Genômica comparativa da família gênica 14-3-3 em *Jatropha curcas*, *Hevea brasiliensis*, *Manihot esculenta*, *Populus trichocarpa* e *Ricinus communis*. 1A. Árvore filogenética, construída pelo método *Neighbour Joining-NJ*, utilizando *bootstrap* de 10000. 1B. Estrutura gênica da família gênica 14-3-3s das diferentes espécies. 1C Motivos conservados nas proteínas 14-3-3 das seis espécies.



Caracterização de proteínas 14-3-3 em pinhão-mansão

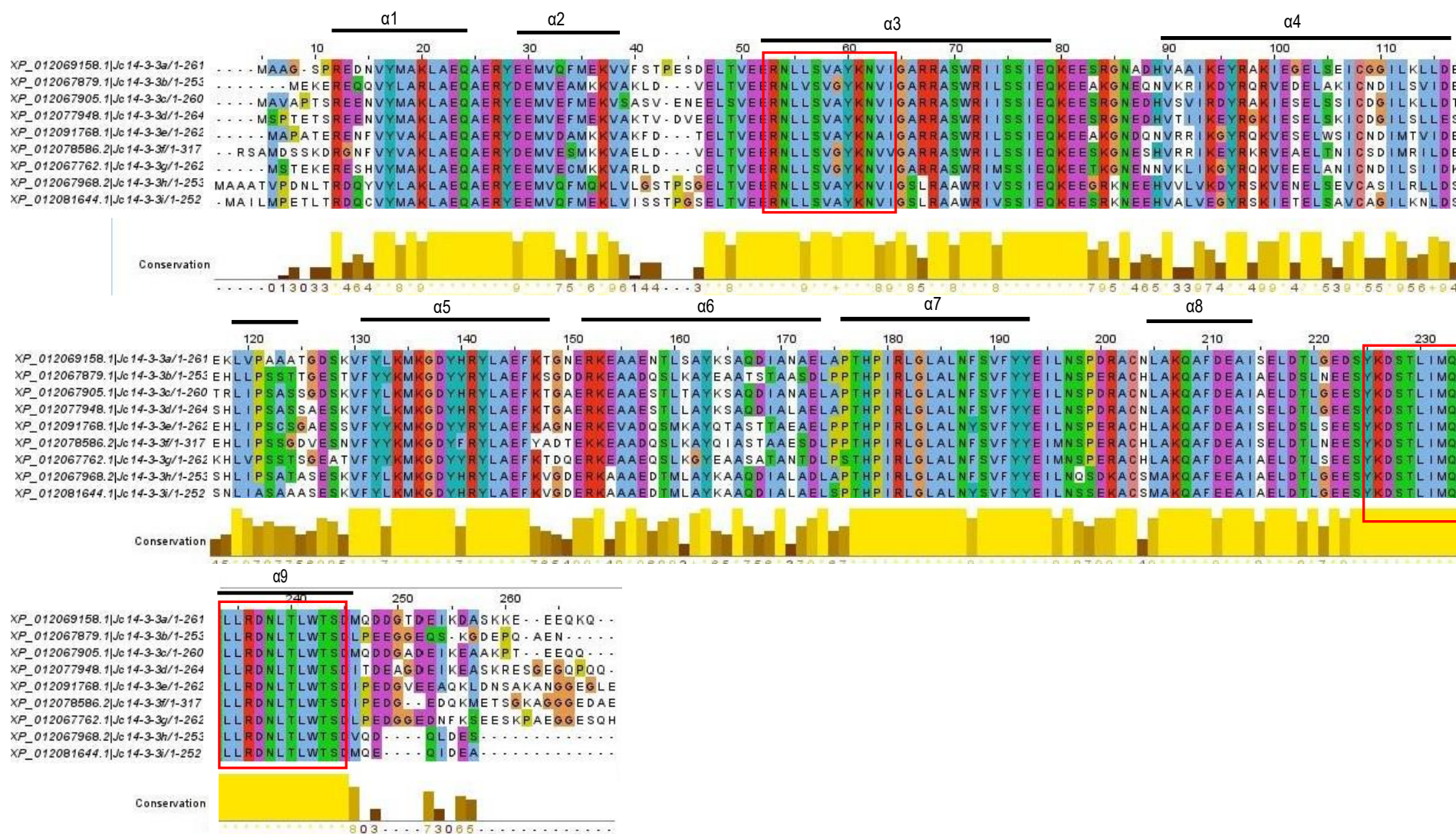
O alinhamento das sequências polipeptídicas das Jc14-3-3s mostra que as proteínas desta família gênica são altamente conservadas, com pequenas variações nas regiões C-terminal e N-terminal (Figura 2). As regiões de α hélices, bem como duas assinaturas, características do domínio 14-3-3, também puderam ser observados, demonstrando a presença do domínio conservado em todas as sequências, a qual foi confirmada no *Batch Cd-Search*.

As proteínas Jc14-3-3s são formadas por 252 à 317 aminoácidos, apresentam massas moleculares variando de 28,38 à 36,08 kDa e ponto isoelétrico entre 4,50 e 4,66, mostrando a alta conservação também para estas características, além da localização subcelular, onde a maioria das proteínas preditas encontram-se no citoplasma podendo também estar presentes no núcleo celular e complexo de Golgi.

Tabela 4. Localização subcelular, massa molecular (kDA) e ponto isoelétrico de proteínas Jc14-3-3

ID	Número de aminoácidos (aa)	Ponto Isoelétrico (PI)	Massa molecular (MW)	Localização subcelular
Jc14-3-3a	261	4,52	29,42	Citoplasma
Jc14-3-3b	253	4,53	28,90	Citoplasma
Jc14-3-3c	260	4,45	29,34	Citoplasma
Jc14-3-3d	264	4,54	29,86	Citoplasma, Núcleo e Complexo de Golgi
Jc14-3-3e	262	4,60	29,73	Citoplasma/Núcleo
Jc14-3-3f	317	4,50	36,08	Citoplasma/Núcleo
Jc14-3-3g	262	4,66	29,90	Citoplasma/Núcleo
Jc14-3-3h	253	4,57	28,57	Citoplasma/Núcleo
Jc14-3-3i	252	4,52	28,38	Citoplasma/Núcleo

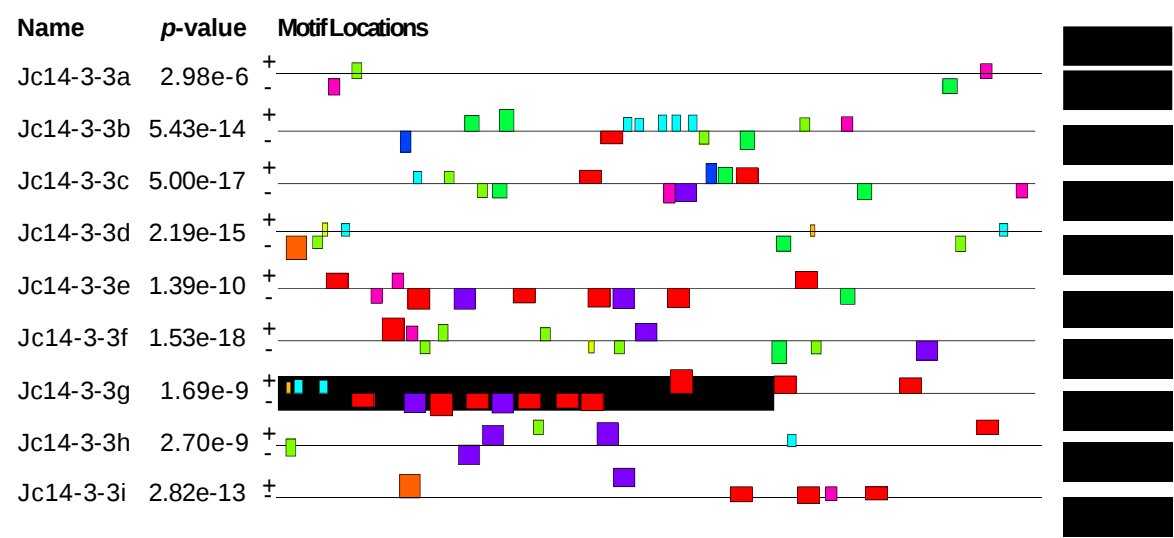
Figura 2 Alinhamento de proteínas 14-3-3 de pinhão-mansó, Assinaturas 14-3-3 destacadas em caixas vermelhas.



Identificação dos elementos *cis* regulatórios presentes na promotora de genes *Jc14-3-3*

As regiões promotoras dos nove genes da família 14-3-3 possuem diversos sítios de ligação à fatores de transcrição responsivos a estresses, sendo possível notar a presença em elevada quantidade do sítios de ligação à elementos DOF, TCP e MICK, sendo os dois últimos considerados enriquecidos com base no resultado do PlantRegMap. Adicionalmente, é possível observar regiões propícias à ligação de fatores de transcrição DREB e WRKY que também são conhecidos FTs de resposta ao estresse (Figura 3). A predição de regulação identificou a presença de 79 regulações ente 57 FTs nas regiões promotoras dos *Jc14-3-3s*.

Figura 3. Análise de sítios de ligação à fatores de transcrição presentes nas regiões promotoras dos *Jc14-3-3s*



Análise de expressão *in silico* e validação via RT-qPCR

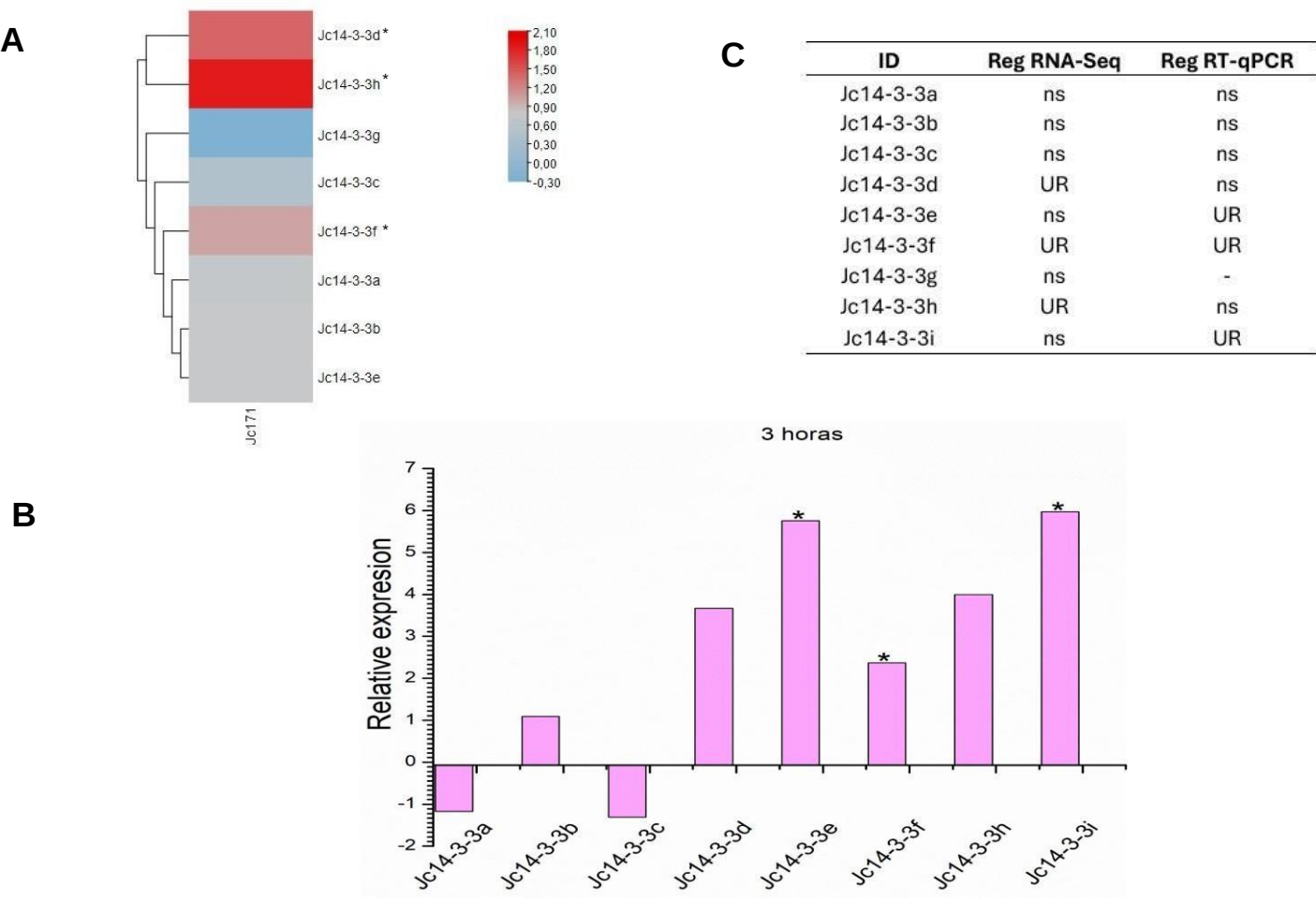
Transcritos *Jc14-3-3* identificados e confirmados nas análises anteriores foram diretamente associados ao transcriptoma RNA-Seq de pinhão-mansó sob estímulo salino (150 mM de NaCl), onde foram encontrados oito dos nove 14-3-3s previamente identificados (*Jc14-3-3a*, *Jc14-3-3b*, *Jc14-3-3c*, *Jc14-3-3d*, *Jc14-3-3e*, *Jc14-3-3f*,

Jc14-3-3g, Jc14-3-3h). Os transcritos alternativos apresentaram regulação idêntica, sendo portanto, considerados como representativos os codificadores de proteínas com maior tamanho, conforme análises anteriores.

O *heatmap* representa a expressão *in silico* de todos os Jc14-3-3s encontrados no acesso 171, entretanto, houve significância estatística apenas para Jc14-3-3d, Jc14-3-3f e Jc14-3-3h, os quais foram induzidos (UR) mediante imposição de 150 mM de NaCl. O acesso 183 não apresentou expressão diferencial significativa para nenhum dos transcritos Jc14-3-3 (Figura 4a).

A análise de PCR em tempo real quantitativa foi realizada para todos os genes, incluindo *Jc14-3-3i*, que não foi encontrado na biblioteca RNA-Seq. A indução dos genes *Jc14-3-3f* e *Jc14-3-3h* foi confirmada na qPCR, porém o nível de expressão do gene *Jc14-3-3d* foi não significativo, apesar de demonstrar tendência a indução (Figura 4b). O gene *Jc14-3-3e* que não foi significativo se mostrou *up-regulated* (UR) e o gene *Jc14-3-3i*, que não foi identificado na biblioteca RNA-Seq também foi UR, demonstrando uma variação entre os resultados do sequenciamento e da quantificação relativa da RTqPCR (Figura 4c). Estes resultados indicam que três genes da família gênica 14-3-3 podem estar atuando no mecanismo de tolerância ao estresse salino em *Jatropha curcas* (Figura 4d)

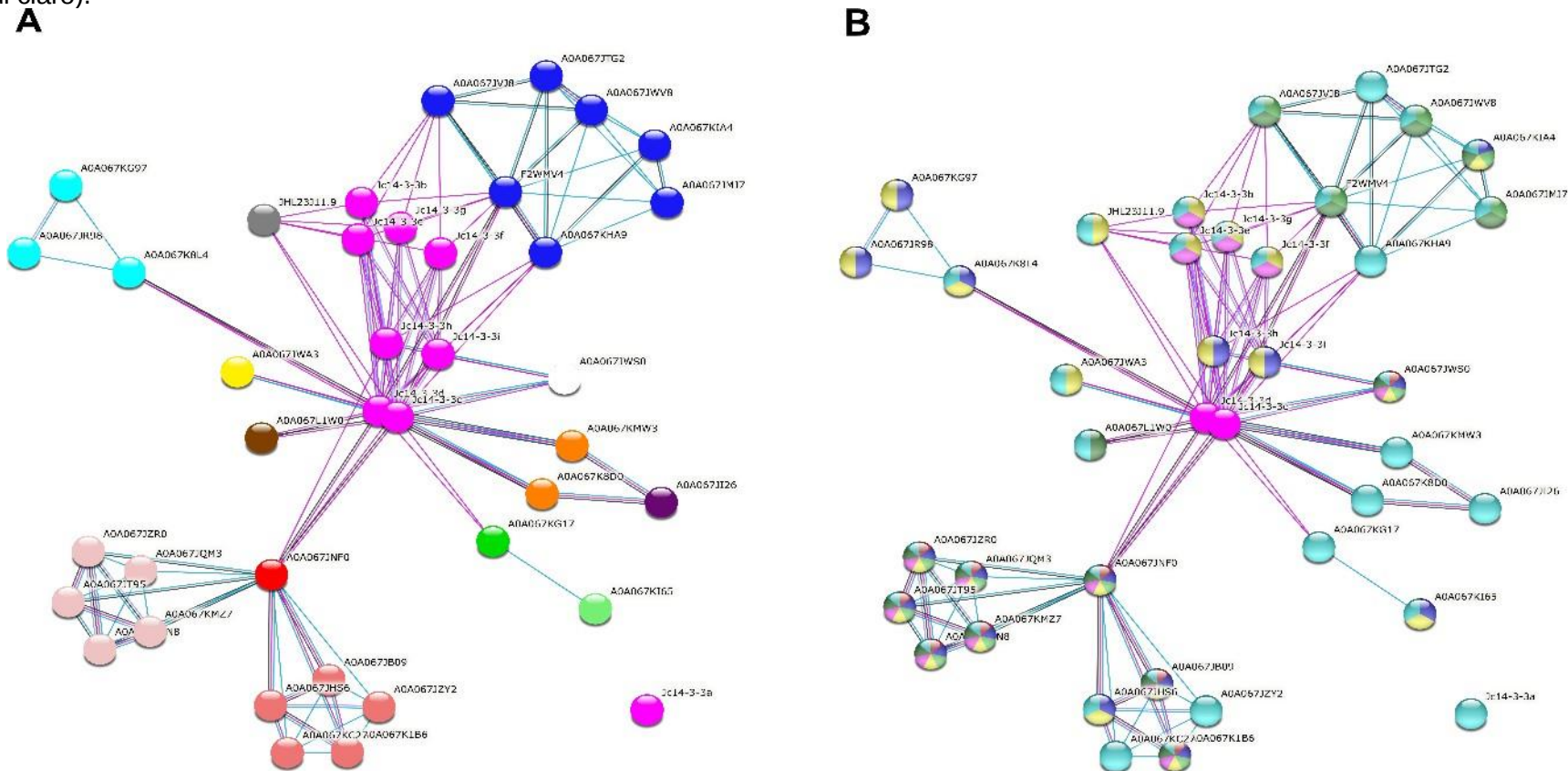
Figura 4. A. Expressão *in silico* de transcritos 14-3-3 de pinhão manso submetido à estímulo salino (150mM NaCl), considerando $p\text{-value}<0,05$ e $FDR<0,01$ B. Expressão *in silico* de transcritos 14-3-3 de pinhão manso submetido à estímulo salino (150mM NaCl), considerando $p\text{-value}<0,05$ e $FDR<0,01$ C. Resumo das abordagens utilizadas para determinar a expressão de Jc14-3-3s.



Duas redes de interação proteína-proteína foram construídas para *J. curcas* considerando: o grupo no qual as proteínas se encontram (Figura 5A) e o processo biológico em que estão envolvidas (Figura 5B). É possível observar, no centro das redes, a presença de Jc14-3-3c e Jc14-3-3d (em lilás), as quais parecem formar heterodímeros para regular uma gama de proteínas importantes para as plantas (Figuras 5A e 5B).

As redes PPI demonstram ampla variabilidade de ligantes, incluindo tanto proteínas envolvidas, diretamente, na resposta ao estresse salino, como a ATPase, quanto proteínas que, mesmo não diretamente relacionadas podem estar atuando no auxílio da planta para suportar tais condições como, por exemplo, as proteínas de reparo. A diversidade de ligantes Jc14-3-3 confirma a multifuncionalidade de regulação desta família, considerada como fator geral de regulação (FGR).

Figura 5. A. Redes de interação proteína proteína (PPI) entre Jc14-3-3s e seus clientes. Arestas rosas indicam interações por dados experimentais; arestas pretas indicam co-expressão e arestas azuis-piscina indicam bancos de dados curados e arestas azuis escuras indicam co-ocorrência. B. Rede PPI entre 14-3-3s de pinhão manso (rosa) e os grupos: proteínas de reparo (vermelho; vermelho claro – reparo de DNA; vermelho escuro – reparo de RNA); metabolismo dos ácidos graxos (azul escuro); transportadores de cátion ATPase (verde); transporte nucleoplasmático (laranja); mudança no ciclo de vida (roxo); proteína do ciclo celular RAD (branco); nucleação de microtúbulos (amarelo); alongação da raiz (marrom); desidrogenases redutases (azul piscina) e; regulação do florescimento de forma fotodependente (cinza). B. Ontologia gênica dos membros da rede PPI de Jc14-3-3: reparo de DNA (vermelho); resposta ao estresse (azul escuro); processo metabólico (verde claro); resposta ao estímulo (amarelo); resposta celular ao estímulo (rosa); metabolismo do nitrogênio (verde escuro) e; processo celular (azul claro).



Discussão

As proteínas 14-3-3s são fatores regulatórios essenciais para as plantas e estão associadas a diversos processos biológicos (Mikhsylova et al., 2021), desde o crescimento e desenvolvimento (Lozano-Durán and Robatzek, 2015), até a transdução de sinais e resposta aos estresses ambientais (Yoon and Kieber 2013; Wilson et al., 2016; Camoni et al., 2018). Dada sua importância, muitos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de entender o funcionamento desta família em diferentes espécies como *Arabidopsis thaliana* (Wu et al., 1997), mandioca (Shang et al., 2018), algodão (Sun et al., 2011), milho (Vetten and Ferl, 1994), arroz (Chen et al., 2006); feijão (Li et al., 2015), tomate (Xu and She, 2006) e manga (Xia et al., 2022). Em *Jatropha curcas*, apesar de alguns estudos proteômicos terem indicado o potencial de regulação das 14-3-3s, não havia, até este estudo, uma análise focada diretamente nesta importante família gênica.

A família gênica 14-3-3 está presente em todos os eucariotos e é formada por diferentes isoformas, as quais variam em quantidade e função, mesmo entre espécies evolutivamente próximas (Mikhsylova et al., 2021). O maior número de isoformas 14-3-3s é encontrado nas plantas (Wilson et al., 2016) com quantidade variável de cinco isoformas em cevada (Schoonheim et al., 2007) a 26 em milho (Kumar et al., 2015). No presente estudo, após busca e confirmação de dados, determina-se a presença de nove membros compondo a família 14-3-3 de *J. curcas*, sete isoformas para *Ricinus communis*, uma isoforma a mais do que as 15 previamente identificadas para *Manihot esculenta* (Shang et al., 2018), 10 isoformas a mais do que as 10 anteriormente identificadas para *Hevea brasiliensis* (Yang et al., 2014), além da confirmação de 14 membros compondo a família gênica 14-3-3 de *Populus trichocarpa* (Tian et al., 2015).

Em contraste à variação em quantidade e função, a estrutura das proteínas 14-3-3 é altamente conservada, como demonstrado na análise fenética, considerando cinco espécies evolutivamente próximas. A separação dos grupos epsilon e não epsilon também é evidenciada neste trabalho, sendo esta, a principal divisão evolutiva da família gênica 14-3-3 (Mikhsylova et al., 2021), caracterizada pela presença de uma quantidade maior de éxons no grupo epsilon (Delille et al., 2001). Os motivos identificados para as cinco espécies seguem um padrão de conservação mesmo entre os dois diferentes grupos, ressaltando a alta conservação estrutural da família 14-3-3.

Acredita-se que a multifuncionalidade da família 14-3-3, mesmo com a elevada conservação estrutural, é ocasionada pelas variações nas regiões C-terminal e N-terminal que permitem a interação destas proteínas com uma grande variedade de alvos (Ferl et al., 2002). O alinhamento das Jc14-3-3s confirma a variação das regiões terminais que flanqueiam regiões centrais altamente conservadas onde é possível identificar duas assinaturas 14-3-3, bem como, as nove α hélices características da família, sendo as quatro primeiras essenciais para a formação do dímero (Tian et al., 2015) e as demais responsáveis pela ligação das 14-3-3s às suas proteínas alvo, formando um sulco de ligação (Liu et al., 1995). As características de número de aminoácidos (252 a 317), ponto isoelétrico (4,50 a 4,66) e massa molecular (28,38 a 36, 08 kDa) das proteínas Jc14-3-3s são semelhantes ao encontrado em outras espécies aqui avaliadas como *P. trichocarpa* (Tian et al., 2015) e *M. esculenta* (Shang et al., 2018).

A região promotora dos Jc14-3-3s identificados apresenta sítios de ligações à diferentes fatores de transcrição, incluindo DOF, TCP, MICK-MADS box, WRKY e DREB. A interação entre 14-3-3 e o fator TCP tem sido estudada, sendo confirmado o potencial deste FT na biossíntese do óleo das sementes (Sun, 2020; Kong et al.,

2020), atividade esta regulada por proteínas 14-3-3 e, supostamente, presente *J. curcas*, uma planta oleaginosa considerada tóxica, todavia que, recentemente, teve genótipos não tóxicos relatados no México, sugerindo sua utilização como fonte de proteína para alimentação humana e animal (León-Villanueva et al., 2018). Fatores MICK-MADS box, com atividade regulada por proteínas 14-3-3 tem sido descrita em trabalhos anteriores que destacam a função desta ligação para a transdução de sinais nas plantas (Cooper et al., 2003). O fator DOF foi relatado como membro importante para o metabolismo no nitrogênio e do carbono (Noguero et al., 2013), sendo este um processo em que as proteínas 14-3-3 podem estar auxiliando-o, diante da função semelhante desta família no controle do metabolismo destes elementos (Zhao et al., 2021). A interação entre 14-3-3 e FTs DREB, foi um dos motivos explicativos pelo aumento tolerância ao déficit hídrico em *Brachypodium distachyon* (Yang et al 2017), indicando um potencial papel desta interação em *Jatropha curcas* para o aumento da tolerância a estresses abióticos, incluindo o de salinidade.

A atuação da família 14-3-3 mediante estresses abióticos, tem sido estudada em diversas plantas de interesse comercial, incluindo a resposta sob estresse osmótico e frio em mandioca (Shang et al., 2018), frio, salinidade e desidratação em arroz (Yashvardhini et al., 2018) e seca em milho (Li et al., 2016). A indução de alguns genes 14-3-3s em resposta à estresses abióticos é confirmada por estudos em diferentes espécies, incluindo sete genes em mandioca (Shang et al., 2018) e quatro em arroz (Chen et al., 2006) submetidos à salinidade (NaCl). Neste estudo foram identificados três Jc14-3-3s significativamente induzidos sob estímulo salino (Jc14-3-3e, Jc14-3-3f e Jc14-3-3i) no acesso 171, os quais apresentam FTs relacionados a transdução de sinais (MICK e MADS box) em suas regiões promotoras e podem estar envolvidos com o aumento da tolerância ao sal no acesso 171 de *J. curcas* aqui

analisado. O acesso 183 não apresentou expressão significativa para nenhum membro 14-3-3, o que pode ter acontecido pela não necessidade de ativação desta família dada a concentração de sal imposta, ou, a atuação precoce das 14-3-3s ainda nos primeiros minutos de estresse, dada a função da família na transdução de sinais (Denison et al., 2011), o que portanto, não pôde ser observado três horas após o estímulo.

As interações entre as 14-3-3s e seus alvos, ocorre por meio da ligação à sítios fosfoserínicos (Muslin et al., 2006), podendo alterar as atividades da proteína associada (Dougherty; Morrison, 2004), assim como modular vias de sinalização, impactando a transdução de sinal (Denison et al., 2011). A rede de interação proteína-proteína (PPI) desenvolvida neste estudo para *J. curcas*, mostra diferentes alvos de ligação das proteínas que, possivelmente, estão atuando em uma grande diversidade de processos biológicos. É possível notar no centro da rede PPI a união das proteínas Jc14-3-3c e Jc14-3-3d, as quais, possivelmente, atuam em heterodímeros para regular, não somente proteínas alvos mas, outros membros da família 14-3-3.

As proteínas 14-3-3 são conhecidas por serem mediadoras de sinais de estresse e uma de suas atividades frequentemente relatada é a interação com a H⁺ ATPase de membrana (Wu et al., 2021). A rede PPI mostra a interação do heterodímero formado entre Jc14-3-3c e Jc14-3-3d com a H⁺ ATPase, interação esta observada também em mandioca (Shang et al., 2018). De forma geral, as proteínas 14-3-3 são tidas como reguladores positivos da atividade da H⁺ ATPase, ligando-se a região C- terminal e estimulando a bomba de prótons, regulando a abertura estomática (Chen et al., 2006). Curiosamente, estudos apontam que membros do grupo não-epsilon se ligam melhor a H⁺ ATPase (Mykhaylova et al., 2021) grupo este, onde encontram-se os formadores do heterodímero central Jc14-3-3 (Jc14-3-3c e Jc14-3-

3d). Em adicional, ainda que com resultados estatisticamente não significativos, é possível observar que Jc14-3-3c e Jc14-3-3d tem respostas contrastantes na análise de qPCR, indicando que, possivelmente, um membro liga, enquanto o outro atua desligando a bomba de prótons H⁺ ATPase, a depender da necessidade da planta.

A eficiência das 14-3-3 no aumento da tolerância ao estresse salino tem sido confirmada, via engenharia genética, em diferentes espécies, como *Brachypodium distachyon*, em que a transformação do gene BdGF14d em tabaco, promoveu o aumento da tolerância à salinidade nas plantas transformadas que tiveram menores teores de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e malondialdeído (MDA), além do aumento da expressão de genes marcadores relacionados ao estresse salino (He et al., 2017). Adicionalmente, em *M. esculenta* uma mutação em duas regiões diferentes do gene MeGRF3 puderam também confirmar a relação do gene com o aumento da tolerância ao sal (Chang et al. 2020). A partir dos resultados sugere-se que os três genes Jc14-3-3 induzidos, bem como as proteínas que formam heterodímeros são potenciais alvos a serem explorados no melhoramento genético de pinhão-manso visando o aumento da tolerância a salinidade.

Conclusões e perspectivas

A família gênica 14-3-3 de pinhão-manso é formada por nove genes altamente conservados que distribuem-se nos grupos epsilon e não epsilon, característicos da família. A região promotora dos genes Jc14-3-3s mostra a interação com fatores de transcrição relacionados à transdução de sinais e ao metabolismo do nitrogênio e do carbono. Três genes foram induzidos mediante estímulo de salinidade (*Jc14-3-3f*, *Jc14-3-3h* e *Jc14-3-3i*) e duas proteínas foram identificadas formando heterodímeros em uma rede de interação proteína proteína (Jc14-3-3c e Jc14-3-3d), desta forma

estes cinco genes são potenciais alvos a serem trabalhados no melhoramento genético da espécie, visando a tolerância a salinidade.

Referências

- Abrar MM, Saqib M, Abbas G, Atiq-ur-Rahman M, Mustafa A, Shah SAA, Mehmood K, Maitlo AA, Hassan M, Sun N and Xu M (2020) Evaluating the contribution of growth, physiological, and ionic components towards salinity and drought stress tolerance in *Jatropha curcas*. *Plants*, 9(11), 1574.
- Bailey TL, Johnson J, Grant, CE and Noble WS (2015) The MEME suite. *Nucleic acids research* 43(W1): W39-W49.
- Bano A and Fatima M (2009) Salt tolerance in *Zea mays* (L). following inoculation with *Rhizobium* and *Pseudomonas*. *Biology and Fertility of Soils* 45(4) 405-413.
- Camoni L, Visconti S, Aducci P and Marra M (2018) 14-3-3 proteins in plant hormone signaling: doing several things at once. *Frontiers in plant science* 9: 297.
- Cassells AC and Curry RF (2001) Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers. *Plant cell, tissue and organ culture* 64(2): 145-157.
- Chang I, Tong Z, Peng C, Wang D, Kong H, Yang Q, Luo M, Guo A and Xu, B (2020) Genome-wide analysis and phosphorylation sites identification of the 14-3-3 gene

family and functional characterization of *MeGRF3* in cassava. *Physiologia Plantarum* 69(2) 244 – 257.

Chen C, Chen H, He Y, and Xia R (2018) TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface. *BioRxiv*, 289660.

Chen F, Li Q, Sun L and He Z (2006) The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. *DNA research* 13(2): 53-63.

Clamp M, Cuff J, Searle SM and Barton GJ (2004) The jalview java alignment editor. *Bioinformatics* 20(3): 426-427.

Cooper B, Clarke JD, Budworth P, Kreps J, Hutchison D, Park S, Guimil S, Dunn M, Luginbühl P, Ellero C, Goff SA and Glazebrook J (2003) A network of rice genes associated with stress response and seed development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100(8): 4945-4950.

Delille JM, Sehnke PC and Ferl RJ (2001) The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. *Plant Physiology* 126(1): 35-38.

Dougherty MK and Morrison DK (2004) Unlocking the code of 14-3-3. *Journal of cell science* 117(10) 1875-1884.

- Denison FC, Paul AL, Zupanska AK and Ferl RJ (2011) 14-3-3 proteins in plant physiology. In *Seminars in cell & developmental biology* 22(7): 720-727.
- Ferl RJ, Manak MS and Reyes MF (2002) The 14-3-3s. *Genome biology* 3(7): reviews3010.
- Fu H, Subramanian RR and Masters SC (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 40(1):617-647.
- Fulgosi H, Soll J, deFariaMS, Korthout HA, Wang M and Testerink C (2002) 14-3-3 proteins and plant development. *Plant molecular biology* 50(6): 1019-1029.
- He Y, Zhang Y, Chen L, Wu C, Luo Q, Zhang F, Wei Q, Li K, Chang J, Yang G and He G (2017) A member of the 14-3-3 gene family in *Brachypodium distachyon*, *BdGF14d*, confers salt tolerance in transgenic tobacco plants. *Frontiers in plant science* 8: 340.
- Hiller K, Grote A, Maneck M, Münch R and Jahn D (2006). JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics* 22(19): 2441-2443.
- Karuppanapandian T and Kim W (2013) Cobalt-induced oxidative stress causes growth inhibition associated with enhanced lipid peroxidation and activates

antioxidant responses in Indian mustard (*Brassica juncea* L.) leaves. *Acta physiologiae plantarum* 35(8) 2429-2443.

Kong Q, Yang Y, Low PM, Guo L, Yuan L and Ma W (2020) The function of the WRI1-TCP4 regulatory module in lipid biosynthesis. *Plant Signaling & Behavior* 15(11): 1812878.

Kumar K, Muthamilarasan M, Bonthala VS, Roy R and Prasad M (2015). Unraveling 14-3-3 proteins in C4 panicoids with emphasis on model plant *Setaria italica* reveals phosphorylation-dependent subcellular localization of RS splicing factor. *PloS one* 10(4): e0123236.

León-Villanueva A, Huerta-Ocampo JA, Barrera-Pacheco A, Medina-Godoy S and de la Rosa APB (2018) Proteomic analysis of non-toxic *Jatropha curcas* byproduct cake: fractionation and identification of the major components. *Industrial Crops and Products* 111: 694-704.

Li R, Jiang X, Jin D, Dhaubhadel S, Bian S and Li X. (2015) Identification of 14-3-3 family in common bean and their response to abiotic stress. *PLoS one* 10(11): e0143280.

Li T, Sun Y, Ruan Y, Xu L, Hu Y, Hao Z ... and Chen B (2016) Potential role of D-myo-inositol-3-phosphate synthase and 14-3-3 genes in the crosstalk between *Zea mays* and *Rhizophagus intraradices* under drought stress. *Mycorrhiza* 26(8): 879-893.

- Liu D, Bienkowska J, Petosa C, Collier RJ, Fu H and Liddington R (1995) Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. *Nature*, 376(6536): 191-194.
- Liu H, Wang FF, Peng XJ, Huang JH and Shen SH (2019) Global phosphoproteomic analysis reveals the defense and response mechanisms of *Jatropha curcas* seedling under chilling stress. *International journal of molecular sciences* 20(1): 208.
- Lozano-Durán R and Robatzek S (2015) 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28(5): 511-518.
- Lozano-Isla F, Campos MLO, Endres L, Bezerra-Neto E and Pompelli MF (2018) Effects of seed storage time and salt stress on the germination of *Jatropha curcas* L. *Ind Crops Prod* 118:214–224. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.03.052
- Maghuly F and Laimer M (2013) *Jatropha curcas*, a biofuel crop: functional genomics for understanding metabolic pathways and genetic improvement. *Biotechnology journal* 8(10): 1172-1182.
- Marchler-Bauer A, Derbyshire MK, Gonzales NR, Lu S, Chitsaz F, Geer LY, Geer LY, Geer RC, He J and Gwadz M (2015). CDD: NCBI's conserved domain database. *Nucleic acids research* 43(D1): D222-D226.

- Mikhaylova YV, Puzanskiy RK and Shishova MF (2021) Evolution of 14-3-3 proteins in angiosperm plants: recurring gene duplication and loss. *Plants* 10(12): 2724.
- Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM and Shaw AS (1996) Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. *Cell* 84(6): 889-897.
- Niu G, Rodriguez D, Mendoza M, Jifon J and Ganjegunte G (2012) Responses of *Jatropha curcas* to salt and drought stresses. *International Journal of Agronomy* 632026:1-7.
- Noguero M, Atif RM, Ochatt S and Thompson RD (2013) The role of the DNA-binding One Zinc Finger (DOF) transcription factor family in plants. *Plant Science* 209: 32-45.
- Sun G, Xie F and Zhang B (2011) Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Functional & integrative genomics* 11(4): 627-636.
- Sun T (2020) Unexpected Role of a TCP Transcription Factor in Seed Oil Biosynthesis, *Plant Physiology* 184(2):550–551.
- Thompson JD, Gibson TJ and Higgins DG (2003) Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics* (1): 2-3.

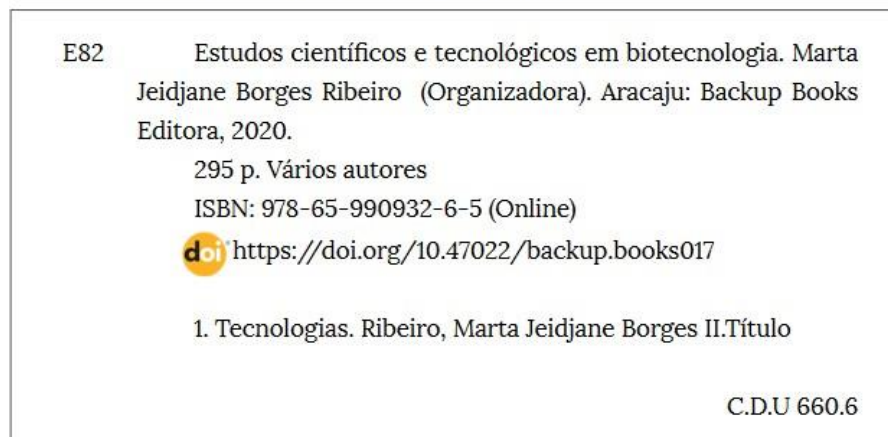
- Tian F, Wang T, Xie Y, Zhang J and Hu J (2015). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of 14-3-3 gene family in *Populus*. *PLoS one* 10(4): e0123225.
- Thummuluri V, Almagro Armenteros JJ, Johansen AR, Nielsen H, Winther O. (2022). DeepLoc 2.0: multi-label subcellular localization prediction using protein language models. *Nucleic acids research*, 50(W1), W228-W234.
- Vetten NC and Ferl, RJ (1994) Two genes encoding GF14 (14-3-3) proteins in *Zea mays* (structure, expression, and potential regulation by the G-box-binding complex). *Plant physiology* 106(4):1593-1604.
- Wilson RS, Swatek KN and Thelen JJ (2016) Regulation of the regulators: post-translational modifications, subcellular, and spatiotemporal distribution of plant 14-3-3 proteins. *Frontiers in plant science* 7: 611.
- Wu K, Rooney MF and Ferl RJ (1997) The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. *Plant Physiology* 114(4): 1421-1431.
- Wu H, Hill CB, Stefano G and Bose J (2021) New insights into salinity sensing, signaling and adaptation in plants. *Frontiers in Plant Science* 11: 604139.
- Xia L, He X, Huang X, Yu H, Lu T, Xie X, Zeng X, Zhu J and Luo C (2022). Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in mango (*Mangifera indica* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1593.

- Yang ZP, Li HL, Guo D, Tang X and Peng SQ (2014). Identification and characterization of the 14-3-3 gene family in *Hevea brasiliensis*. *Plant physiology and biochemistry* 80: 121-127.
- Yang SL, Chen K, Wang SS and Gong M (2015) Osmoregulation as a key factor in drought hardening-induced drought tolerance in *Jatropha curcas*. *Biologia Plantarum* 59(3): 529-536.
- Yang L, You J, Wang Y, Li J, Quan W, Yin M, Wang Q, Chan Z (2017) Systematic analysis of the G-box Factor 14-3-3 gene family and functional characterization of GF14a in *Brachypodium distachyon*. *Plant Physiology and Biochemistry* 117:1-11.
- Yang Z, Wang C, Xue Y, Liu X, Chen S, Song C, Yang Y, Guo Y (2019) Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance. *Nature communications* 10(1): 1-12.
- Yoon GM and Kieber JJ (2013) 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 25(3): 1016-1028.
- Zhao S, Zhang Q, Liu M, Zhou H, Ma C and Wang P (2021) Regulation of plant responses to salt stress. *International Journal of Molecular Sciences* 22(9): 4609.

6 ARTIGO III

Capítulo de livro publicado na Editora Backup Books

Ficha Catalográfica elaborada pela Backup Books Editora



CORPO EDITORIAL

Editora Chefe - Dra. Suzana Leitão Russo - API/UFS - Brasil

Conselho Consultivo

Dr. Irineu Afonso Frey - Universidade Federal de Santa Catarina - Brasil

Dra Luísa M. C. Carvalho – Instituto Politécnico de Setúbal - Portugal

Dra. Maria Emilia Camargo - Universidade de Caxias do Sul - Brasil

Dr. José Paulo Rainho - Universidade do Aveiro - Portugal

Dr. Paulo M. M. Rodrigues - Universidade de Lisboa - Portugal

Dr Pedro Reis - INIAV - Instituto Nacional de Investigação Agrária - Portugal

Comitê Editorial

Dra. Ana Eleonora Almeida Paixão - Universidade Federal De Sergipe - Brasil

Dra. Angela Isabel dos Santos Dullius - Universidade Federal de Santa Maria - Brasil

Dr Antonio Vanderlei dos Santos - Universidade Regional Integrada do alto Uruguai e
das Missões - Brasil

Dra. Carla Rimkus - Universidade Federal de Sergipe - Brasil

Dra. Carmen Regina Dorneles Nogueira - Universidade Federal do Pampa - Campus
Jaguarão - Brasil

Dra. Célia M. Q. Ramos - ESGHT da Universidade do Algarve - Portugal

Dra. Cristina M. Quintella - Universidade Federal da Bahia - Brasil

Dra. Deise Juliana Francisco - Universidade Federal de Alagoas - Brasil

Dra. Fátima Regina Zan - Instituto Federal Farroupilha - Brasil

Dr. Gesil Sampaio Amarante Segundo - Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC) -
Brasil

Dr. José Aprígio Carneiro Neto - Instituto Federal de Sergipe - Brasil

Dr Jonas Pedro Fabris - Universidade Federal de Sergipe - Brasil

Dra Lana Grasiela Alves Marques – Fiocruz/RJ - Brasil

Dr. Lucindo José Quintans-Júnior - Universidade Federal de Sergipe - Brasil

Dr. Luis Felipe Dias Lopes - Universidade Federal de Santa Maria - Brasil

Dra. Maria Augusta Silveira Netto Nunes – UNIRIO - Brasil

Dra. Maria da Gloria Bandeira - Universidade Federal do Maranhão - Brasil

Dra. Marta Elisete Ventura da Motta - Universidade de Caxias do Sul - Brasil

Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos - Universidade Federal do Piauí - UFPI Brasil

Dr. Reinaldo Castro e Souza - Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro
- Brasil

Dra. Renata Silva Mann - Universidade Federal de Sergipe - Brasil

Dra. Simone de Cássia Silva - Universidade Federal de Sergipe - Brasil

Dr. Norberto Nuno Pinto Santos - Universidade de Coimbra - Portugal

Dra. Vivianni Marques Leite dos Santos - Universidade Federal do Vale do São
Francisco - Brasil

Dr. Walter Priesnitz Filho - Universidade Federal de Santa Maria - Brasil



PROTEÍNAS 14-3-3: ESTRUTURA, FUNÇÃO E ATUAÇÃO NA RESPOSTA AOS ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS

1 Introdução

Estresses abióticos são os principais fatores limitantes do crescimento e desenvolvimento das plantas, influenciando diretamente na redução da produtividade (FURTADO *et al.*, 2014; RAVELOMBOLA *et al.*, 2018). Devido às constantes alterações climáticas, estudos referentes à tolerância aos estresses abióticos, devem ser realizados constantemente, com rapidez e eficácia, no intuito de fornecer soluções que permitam evitar perdas na produtividade agrícola (WANG *et al.*, 2018).

O estímulo do sinal ambiental pode ser reconhecido por proteínas regulatórias, dentre as quais destacam-se as 14-3-3s, proteínas estas que podem modular vias de sinalização, impactando a transdução de sinal e/ou regulando proteínas que provocam a resposta fisiológica (DENISON *et al.*, 2011), por meio da ligação à sítios fosfoserínicos presentes em seus alvos (FINNIE; BORCH; COLLINGE, 1999).

As proteínas 14-3-3 são moléculas reguladoras conservadas, encontradas em todos os eucariotos, que tem capacidade de se ligar a várias proteínas de sinalização, incluindo quinases, fosfatases e receptores transmembranares (FU; SUBRAMANIAN; MASTERS 2000). Caracterizadas pela organização em famílias multigênicas, esse grupo de proteínas multifuncional pode influenciar processos desde à germinação até o metabolismo de nutrientes das plantas (DENISON *et al.*, 2011).

Uma rede de interações entre 14-3-3s e seus alvos, relacionados a sinalização e a homeostase hormonal, demonstra a complexidade do entendimento da atividade destas proteínas de forma global, sendo imprescindível o desenvolvimento de estudos da relação entre isoformas e cada alvo específico para compreender o processo como um todo (CAMONI *et al.*, 2018).

A presença de diferentes isoformas formando as famílias gênicas 14-3-3 explica as diferentes respostas e ações especializadas, as quais precisam ser conhecidas e entendidas para clareza do modo de ação destas proteínas e como elas podem auxiliar na tolerância aos estresses abióticos. O conhecimento estrutural e funcional da família gênica 14-3-3 pode ajudar no desenvolvimento de organismos geneticamente modificados (OGMs) tolerantes à estresses abióticos (BHATTACHARYA *et al.*, 2018).

2 Proteínas 14-3-3

A família gênica 14-3-3 foi estudada pela primeira vez em tecidos nervosos de mamíferos (FULGOSI *et al.* 2002) e, apesar de ter sido identificada em 1967, o estudo do seu papel na biologia celular teve início quase 25 anos depois, quando se descobriu a capacidade de interação com outras proteínas, incluindo proteínas sinalizadoras (DOUGHERTY;

MORRISON, 2004). As proteínas 14-3-3 são uma família de moléculas reguladoras conservadas, expressas em todas as células eucarióticas (FU; SUBRAMANIAN; MASTERS 2000). A ação destas proteínas é mediada pelo reconhecimento de fosfoserina que funciona como sinal para ligação de proteínas 14-3-3s e a criação de complexos de sinalização de múltiplas subunidades (MUSLIN *et al.* 1996).

É sabível que esse grupo de proteínas atua na regulação de vários alvos, incluindo quinases, fatores de transcrição (FTs) e proteínas relacionadas à defesa estando, portanto, diretamente relacionadas às funções fisiológicas nas plantas (DENISON *et al.*, 2011). As proteínas 14-3-3s são afetadas pelo ambiente extracelular e intracelular da planta e, de acordo com isto, promovem a modulação das vias de sinalização que transduzem os sinais ambientais e as proteínas a jusante, provocando resposta fisiológica (DENISON *et al.*, 2011).

A estrutura das proteínas 14-3-3 formando homo ou heterodímeros, permite a ligação de mais de um alvo, já que cada monômero tem um local de ligação (FINNIE, BORCH E COLLINGE, 1999). A forma dimérica de 14-3-3 liga-se a moléculas com repetições de motivos fosfoserínicos, e a interação entre os alvos e 14-3-3 é determinada pela extensão em que o motivo de ligação corresponde à sequência de consenso ideal (MUSLIN *et al.*, 1996). A capacidade das proteínas 14-3-3 de se associar à alvos presentes em todos os compartimentos celulares é um indicativo de sua multifuncionalidade (DOUGHERTY; MORRISON, 2004). A associação proteína-proteína, mediada por 14-3-3 pode impactar seus alvos de formas diferentes, como a mudança de localização, estabilidade, estado de fosforilação e atividade e/ou interações moleculares (DOUGHERTY; MORRISON, 2004).

A presença de proteínas 14-3-3s, entre diferentes compartimentos subcelulares, e a regulação de localização de seus alvos já foi relatada por trabalhos, que confirmam o papel de proteínas 14-3-3 no controle da translocação de proteínas do retículo citoplasmático e endoplasmático para a membrana plasmática (DOUGHERTY; MORRISON, 2004). Devido à variedade de alvos, estas proteínas regulam muitos processos celulares envolvidos no metabolismo celular, transporte de moléculas e resposta as condições adversas (CAMONI *et al.*, 2018).

Nas plantas, estudos iniciais constataram o papel das proteínas 14-3-3s na regulação da membrana plasmática H^+ -ATPase, mediada pela interação da isoforma GF14-*phi* e os últimos 98 aminoácidos C-terminais da membrana plasmática H^+ -ATPase (JAHM *et al.* 1997). Essas proteínas regulam o desenvolvimento das plantas desde a germinação das sementes, atuando como ativadoras deste processo (FULGOSI *et al.* 2002).

Cada subunidade de uma proteína 14-3-3 consiste em um conjunto de nove hélices antiparalelas conservadas, que formam um sulco anfipático, o qual permite a ligação de outras proteínas, sendo este, o mecanismo geral de interação das 14-3-3s com seus alvos (LIU *et al.* 1995). As regiões C terminal e N terminal das proteínas são divergentes entre isoformas, indicando a possibilidade de atividade específica de cada uma com seus alvos (FERL; MANAK; REYES, 2002). As diferentes isoformas 14-3-3 subdividem-se em dois grupos, com base em suas características evolutivas: o grupo Epsilon e o grupo Não-Epsilon, os quais são caracterizados com base na organização éxon-ínton dos genes 14-3-3s (DELLILE, SHANK E FERL, 2001).

Todas as proteínas 14-3-3 apresentam um domínio conservado característico, entretanto, recentemente, uma análise estrutural, funcional e mutacional detalhada de 30 proteínas 14-3-3 relacionadas detectou mutações significativas na posição 80 do domínio conservado, causando uma alteração na estrutura e na função das proteínas ao longo da evolução (BHATTACHARYA *et al.* 2018). Este é considerado o motivo da diversidade de isoformas, as quais adquiriram especificidade funcional ao longo da evolução, e das respostas aos constantes eventos impostos às espécies portadoras.

2 Interações 14-3-3

Proteínas 14-3-3 podem integrar múltiplas vias devido à capacidade de controle da estabilidade ou localização de fatores de transcrição, a exemplo da regulação de fatores ABFs na sinalização da giberelina (GA) e do ácido abscísico (ABA) (CAMONI *et al.* 2018). A superexpressão de um gene 14-3-3 em *Brachypodium distachyon* (*BdGF14a*) aumentou a tolerância ao déficit hídrico, por meio de interações entre proteínas 14-3-3 e elementos de resposta à desidratação (*DREB1A* e *DREB1B*), além da regulação positiva da expressão de *ABI1* (*gene responsivo ao ABA*), indicando a função de *BdGF14a* como regulador positivo na resposta à seca (YANG *et al.* 2017).

O papel das 14-3-3s no metabolismo de nutrientes foi confirmado, via técnicas de espectrometria de massa e PCR em tempo real (qPCR), as quais confirmaram a interação de 14-3-3s com transportadores e enzimas como glutamina sintetase (GS) e glutamato descarboxilase e a modulação da expressão desses genes em situações de privação de nutrientes (SHIN *et al.* 2011).

A nível pós-traducional, proteínas 14-3-3 podem regular vias modulando a atividade das proteínas ligadas em cascatas de sinalização, ou em vias biossintéticas, podendo atuar diferentemente dentro da mesma via ou regulando alvos que participam de diferentes (CAMONI *et al.* 2018). O envolvimento de 14-3-3 na via SOS foi confirmado em estudos que constataram a ligação destas proteínas ao Ca^{2+} , o qual modula a regulação da atividade das quinases SOS2 e PKS5, de forma dependente das 14-3-3s (YANG *et al.* 2019). Os autores sugerem que proteínas 14-3-3 se ligam e reprimem SOS2 ou PKS5, na ausência ou presença de sal, ocasionando aumento da afinidade de ligação ao cálcio pela proteína 14-3-3, essencial para a capacidade da planta em se adaptar ao estresse salino.

Em feijão comum também pode ser constatada a interação de 14-3-3s com SOS2 e uma proteína FT MYB (responsiva ao estresse salino) na regulação da tolerância ao sal (LI *et al.* 2018). Em *Arabidopsis*, a interação 14-3-3 x SOS2 foi estudada constatando a inibição da atividade de quinase de SOS2, a qual teve sua atividade reprimida mediante ausência de estresse salino (ZHOU *et al.* 2014).

Dados proteômicos de alto rendimento e triagem de duplo-híbrido demonstraram a interação entre 14-3-3 e muitas proteínas envolvidas na biossíntese ou nas vias de sinalização dos principais fitohormônios, corroborando com o papel de regulação fundamental destas proteínas em diferentes vias simultaneamente (CAMONI *et al.* 2018) ainda que proporcionem regulações diferentes de alvos presentes nas mesmas vias ou em vias diferentes (QIN *et al.* 2016).

3 Envolvimento de proteínas 14-3-3 em estresses abióticos

As proteínas 14-3-3s desempenham papel significativo em resposta aos três principais estresses abióticos: déficit hídrico, altas temperaturas e salinidade (BHATTACHARYA *et al.* 2018). Evidências genéticas (CAMPO *et al.* 2012; HE *et al.* 2015) e bioquímicas (SHIN *et al.*, 2011) demonstraram que as proteínas 14-3-3 de plantas, atuam como moderadores de sinais, regulando genes e vias responsáveis pela tolerância ao estresse abiótico (CAMONI *et al.* 2018).

A primeira comprovação da influência das proteínas 14-3-3, na resposta à estresses abióticos, foi a introdução do gene de *Arabidopsis* *GF14 λ* (que codifica uma proteína 14-3-3) em plantas de algodão, ocasionando tolerância ao estresse de déficit hídrico, promovendo mais sobrevivência de plantas transformadas, submetidas à déficit hídrico, em comparação com plantas não transformadas (YAN *et al.* 2004). O trabalho constatou que as proteínas 14-3-3 atuaram na regulação do processo de abertura estomática, mediante regulação de alguns transportadores, como o H^+ -ATPase, cujas atividades são controladas pela interação com proteínas 14-3-3.

Após descrição da importância das proteínas 14-3-3 na regulação de vias e genes que promovem tolerância aos estresses abióticos, diversos trabalhos foram desenvolvidos no intuito de entender seu funcionamento mediante imposição destes estresses. Nos últimos cinco anos (2016-2020) 10 artigos foram publicados disponibilizando dados que comprovam a indução dos genes 14-3-3 em espécies submetidas a estresses abióticos (Tabela 1). Ainda neste período de análise, oito artigos publicados confirmaram o efeito das 14-3-3s via transformação genética (Tabela 2).

Tabela 1. Artigos publicados no período de 2016 à 2020 sobre a regulação positiva de genes 14-3-3s sob estresses abióticos em plantas

Espécie	Gene (s)	Tratamento	Referência	Ano
<i>Glycine max</i>	<i>GmGF14a</i> / b / g	PEG 20%/0,1,6,12h	Wang <i>et al.</i>	2019
<i>Glycine max</i>	<i>GmGF14a</i> / b / c / e / g / i / q / r / t	NaCl 250 mM / 0,1,6,12h	Wang <i>et al.</i>	2019
<i>Oryza sativa</i>	<i>Os 14-3-3f</i> / g	NaCl 200 mM / 0,3,6,12 e 24h	Yashvardhini <i>et al.</i>	2018
<i>Oryza sativa</i>	<i>Os 14-3-3f</i> / g	PEG 20%/0,3,6,12 e 24h	Yashvardhini <i>et al.</i>	2018
<i>Oryza sativa</i>	<i>Os 14-3-3f</i> / g	4°C/0,3,6,12 e 24h	Yashvardhini <i>et al.</i>	2018
<i>Oryza sativa</i>	<i>Os 14-3-3f</i> / g	ABA 100 µM/0,3,6,12 e 24h	Yashvardhini <i>et al.</i>	2018
<i>Vitis davidii</i>	<i>VdGRF9b</i> /14/ 15/16 /17/ like2	25 °C, 2 h e 47 °C, 40 min	Cheng <i>et al.</i>	2018
<i>Vitis davidii</i>	<i>VdGRF9a</i> / 11 / 15 / 16 / 17 /like2	4 °C, 0,12 h	Cheng <i>et al.</i>	2018
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MeGRF-4</i> , -6 , -7 e -10	4°C/48h	Shang <i>et al.</i>	2018
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MeGRF-3</i> , -4, -5 , -6 , -11 , -12 e -13	NaCl 300 Mm/14 d	Shang <i>et al.</i>	2018
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MeGRF-3</i> , -5 , -6 , -10 , -11 e -12	manitol 200 mM	Shang <i>et al.</i>	2018
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MeGRF-3</i> , -4 , -5 , -6 , -11 e -12	ABA 100 uM/24 h	Shang <i>et al.</i>	2018
<i>Manihot esculenta</i>	<i>MeGRF-2</i> , -4, -9 , e -10	H ₂ O ₂ 10% /24 h	Shang <i>et al.</i>	2018
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaGF14c</i> , <i>TaGF14d</i> , <i>TaGF14g</i> , <i>TaGF14h</i> e <i>TaGF14j</i>	desidratação/1, 6h	Guo <i>et al.</i>	2018
<i>Triticum aestivum</i>	<i>TaGF14c/d</i> / g / h / j	desidratação/6h	Guo <i>et al.</i>	2018
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>BdGF14a/g</i>	supressão de rega/0,5,10,15d	Yang <i>et al.</i>	2017
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>BdGF14b/c/d/e/f/g</i>	NaCl 200mM/0,3,6,12h	Yang <i>et al.</i>	2017
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>BdGF14c/d/e/g</i>	4°C/0,3,6,12h	Yang <i>et al.</i>	2017
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>BdGF14b/c/d/f/g</i>	42°C/0,30m, 1h, 3h	Yang <i>et al.</i>	2017
<i>Brachypodium distachyon</i>	<i>BdGF14b/ c/ d/ e/ f/ g</i>	NaCl 200 mM/6h	Cao <i>et al.</i>	2016

<i>Brachypodium distachyon</i>	BdGF14b/c/d/e/f/g	PEG 20%/6h	Cao <i>et al.</i>	2016
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdGF14a/b/d/e	42°C/2h	Cao <i>et al.</i>	2016
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdGF14f	4°C/2h	Cao <i>et al.</i>	2016
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdGF14b/c/d/e/f/g	ABA 100µM /6h	Cao <i>et al.</i>	2016
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdGF14b/c/d/e/f/g	ASA 100µM ABA/6h	Cao <i>et al.</i>	2016
<i>Brachypodium distachyon</i>	BdGF14b/c/d/e/f/g	H ₂ O ₂ 20 mM/6h	Cao <i>et al.</i>	2016
<i>Musa acuminata</i>	MaGRFs12/16/15/24	NaCl 300 mM/7d	Li <i>et al.</i>	2016
<i>Musa acuminata</i>	MaGRFs12/16/15/24	4°C/22h	Li <i>et al.</i>	2016
<i>Musa acuminata</i>	MaGRFs12/16/15/24	manitol 200mM/7d	Li <i>et al.</i>	2016
<i>Brassica rapa</i>	BraA.GRF14.0/k/l/m	4°C/15m,30m,3h,6h	Chandna <i>et al.</i>	2016
<i>Brassica rapa</i>	BraA.GRF14.0/k/l/m	37°C/15m,30m,3h,6h	Chandna <i>et al.</i>	2016
<i>Brassica rapa</i>	BraA.GRF14.0/k/l/m	NaCl/300mM/15m,30m,3h,6h	Chandna <i>et al.</i>	2016
<i>Brassica rapa</i>	BraA.GRF14.0/k/l/m	desidratação/15m,30m,3h,6h	Chandna <i>et al.</i>	2016

Fonte: Autoria Própria (2020)

Tabela 2. Artigos publicados no período de 2016 à 2020 sobre transformação genética de genes 14-3-3

Espécie/trangene	Planta GM	Resposta	Tipo de estresse	Referência	Ano
<i>Triticum aestivum</i> / TaGF14b	<i>N. tabacum</i>	+	hídrico, salino e hormonal	Zhang <i>et al.</i>	2018
<i>Brachypodium distachyon</i> / BdGF14a	<i>Arabidopsis</i>	+	Hírdirco	Yang <i>et al.</i>	2017
<i>Manihot esculenta</i> / MeGRF3	<i>Arabidopsis</i>	+	Salino	Chang <i>et al.</i>	2020
<i>Manihot esculenta</i> / MeGRF3	<i>Arabidopsis</i>	-	Déficit hídrico	Chang <i>et al.</i>	2020
<i>Phaseolus vulgaris</i> /PvGF14g e PvGF14a	<i>Arabidopsis</i>	-	Salino	Li <i>et al.</i>	2018
<i>Arabidopsis</i> /14-3-3 λ	<i>Arabidopsis</i>	+	Salino	Tan <i>et al.</i>	2016
<i>Arabidopsis</i> /14-3-3ε e 14-3-3ω	<i>Arabidopsis</i>	+	Frio	Visconti <i>et al.</i>	2019
<i>Brachypodium distachyon</i> / BdGF14d	<i>N. tabacum</i> L.	+	Salino	He <i>et al.</i>	2017
<i>Setaria italica</i> / SiGRF1-OE	<i>Arabidopsis</i>	+	Salino	Liu <i>et al.</i>	2020

Fonte: Autoria Própria (2020). (+) aumento da tolerância; (-) redução da tolerância.

Em uma espécie de uva (*Vitis davidii*) seis genes 14-3-3 tiveram expressão significativamente regulada em resposta a estímulos de frio, dentre os quais, quatro foram responsivos também à imposição de estresse térmico, indicando o papel da família 14-3-3 na

resposta a estresses múltiplos (CHENG *et al.* 2018). Em banana, alguns genes 14-3-3 também apresentaram regulação positiva a partir de tratamento osmótico, de baixa temperatura e salino, em duas variedades (LI *et al.* 2016). Em trigo, cinco genes foram regulados positivamente mediante imposição de déficit hídrico, os mesmos foram regulados negativamente sob imposição de estresse de baixa temperatura, indicando assim, a variação de respostas em se tratando de estresses diferentes (GUO *et al.* 2018) (Tabela 1).

Estudos em mandioca demonstraram a variabilidade de isoformas 14-3-3s que respondem a estresses osmótico, salino, hormonais e de seca, além de analisar a relação destas proteínas em redes de interação, confirmando a ligação à diversos alvos, incluindo O- metiltransferase, proteínas quinases, proteína fosfatase 2C e ascorbato peroxidase (SHANG *et al.* 2018). Em *Brassica napá*, 21 isoformas 14-3-3s foram identificadas, das quais quatro apresentaram regulação positiva mediante estresses de déficit hídrico, salino e de altas e baixas temperaturas (CHANDNA *et al.* 2016) (Tabela 1).

Em arroz, foi constatada a regulação positiva de dois genes 14-3-3 em plantas submetidas à estresses de déficit hídrico, baixa temperatura, salino e de aplicação exógena do ABA (YASHVARDHINI *et al.* 2018). O estudo sugere que a estratégia utilizada pelas proteínas 14-3-3 no aumento de tolerância aos estresses avaliados é mediada pela regulação positiva da expressão do ABA, conforme proposto anteriormente por Cao *et al.* (2016) em estudos com *Brachypodium distachyon* submetido à estresses de seca, salinidade e fitohormonais (Tabela 1)

Ainda analisando a expressão de genes 14-3-3 em *B. distachyon* foi possível observar diversos genes induzidos nos estresses de seca, salinidade e temperaturas altas e baixas (YANG *et al.* 2017) (Tabela 1). Para confirmar a influência da família na resposta ao estresse, o gene *BdGF14a* foi superexpresso em *Arabidopsis*, aumentando a tolerância ao estresse hídrico por meio do aumento do teor de água nas folhas e diminuição do vazamento de eletrólitos (Tabela 2).

Em maçã, um mesmo gene foi induzido por estresses de déficit hídrico, salino, osmótico e de baixa temperatura (REN *et al.* 2019) (Tabela 1). Posteriormente, a superexpressão do gene em *Arabidopsis* aumentou a tolerância aos tratamentos com NaCl e PEG 6000, confirmando a regulação positiva aos estresse salino e de déficit hídrico (REN *et al.* 2019). Analisando a resposta das proteínas ao estresse de baixas temperaturas em *Arabidopsis*, a partir da superexpressão de 14-3-3s, foi possível identificar a indução de proteínas responsivas ao frio em plantas superexpressas com 14-3-3 ϵ e 14-3-3 ω (VISCANTI *et al.* 2019) (Tabela 2).

Em *Brachypodium distachyon* genes mostraram alterações significativas na expressão sob vários estresses abióticos, incluindo osmóticos e de temperatura, indicando a participação das 14-3-3s, principalmente por meio da participação em sinalização dependente de ABA e cascata de sinalização (CAO *et al.*, 2016). Posteriormente a superexpressão do gene *BdGF14d* confirmou o aumento da tolerância ao estresse salino em plantas transformadas (HE *et al.* 2017) (Tabela 2).

O transgene *TaGF14b* de tabaco aumentou a tolerância a múltiplos estresses abióticos por meio da via de sinalização ABA, alterando processos fisiológicos e bioquímicos, incluindo sistema de eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS), fechamento estomático, osmólitos compatíveis e expressões gênicas relacionadas ao estresse (ZHANG *et al.* 2018). A influência das proteínas 14-3-3 na regulação de genes presentes na via SOS foi confirmada pela análise de um mutante de *Arabidopsis*, a qual permitiu identificar, além disto, que a ação das proteínas 14-3-3 na tolerância ao estresse salino regulando SOS2, é influenciada por sua estabilidade e a localização subcelular (TAN *et al.* 2016) (Tabela 2).

Mais recentemente foi relatada a eficiência de um gene 14-3-3 de *Setaria italica* no aumento da tolerância ao estresse salino em *Arabidopsis*, acelerando o período da floração em milho e garantindo a conclusão de seu ciclo de vida mais rápido (LIU *et al.* 2020). Os autores relataram que o gene 14-3-3 regula a data de início da floração a partir da regulação positiva do

nível de transcrição do FT *WRKY71* (LIU *et al.* 2020). Uma análise de mutação em duas regiões diferentes do gene *MeGRF3* de *Manihot esculenta* confirmou a influência do gene no aumento da tolerância ao sal e a não relação com o estresse hídrico também avaliado, indicando a especificidade de isoformas da família, mesmo em situações de estresses correlacionados como estes (CHANG *et al.* 2020) (Tabela 2).

Apesar da regulação positiva demonstrada em diversos trabalhos de análise de expressão e superexpressão de 14-3-3s, em alguns casos, como em feijão comum, observou-se que a superexpressão de dois desses genes regularam negativamente a tolerância ao sal (LI *et al.* 2018). Em madioca, a superexpressão de um gene 14-3-3 conferiu tolerância ao sal em níveis de 125 e 150mM porém, não foi significativa para o estresse hídrico, confirmando a variabilidade de respostas das proteínas 14-3-3, mesmo em estresses correlacionados, conforme salientado anteriormente (CHANG *et al.* 2020) (Tabela 2). Em *Brassica napá* (CHANDNA, 2016) e em soja (WANG *et al.* 2019) os níveis de expressão das proteínas 14-3-3 variaram consideravelmente dentre as diferentes isoformas, demonstrando a importância de estudos relacionados à cada espécie e à cada isoforma, visto que, apesar da elevada conservação, as funções destas proteínas podem variar entre espécies, isoformas, e alvos diferentes (Tabela 1).

4 Considerações Finais

As proteínas 14-3-3 atuam como importantes reguladores de diferentes vias e proteínas que impactam no aumento ou diminuição da tolerância das plantas à estresses abióticos. A multifuncionalidade, atrelada as diferentes isoformas, exige conhecimento prévio de sua ação mediante estímulos específicos. A confirmação da ação das proteínas a partir de técnicas de interação proteína-proteína e transformação genética permite identificar corretamente a função das isoformas 14-3-3s específicas e, desta forma, manipulá-las conforme necessário ao melhor desenvolvimento das plantas, principalmente em situações de cultivo nem sempre favoráveis, e sujeito a potenciais estresses abióticos e danos econômicos.

5 Agradecimentos

Agradecimentos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa destinada à este estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq nº311894/2017-8, nº454112/2014-9 e nº 28/2018), a EMBRAPA (nº 0209010050000), ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Instituto Federal do Tocantins – Campus Araguatins e a Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

6 Referências

- BHATTACHARYA, S.; BANERJEE, A.; SAH, P. P.; MAL, C.; RAY, S. Mutations and functional analysis of 14-3-3 stress response protein from *Triticum aestivum*: An evolutionary analysis through in silico structural biochemistry approach. **Computational biology and chemistry**, v. 77, p. 343-353, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30466043/>>. Acesso em: 05 jul. 2020.
- CAMONI, L.; VISCONTI, S. ADUCCI, P.; MARRA, M. 14-3-3 proteins in plant hormone signaling: doing several things at once. **Frontiers in plant science**, v. 9, p. 297, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00297/full>>. Acesso em: 01 jul. 2020.

CAMPO, S.; PERIS-PERIS, C.; MONTESINOS, L.; PEÑAS, G.; MESSEGUER, J.; SEGUNDO, B. S. Expression of the maize *ZmGF14-6* gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 2, p. 983-999, 2012. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jxb/article/63/2/983/507620>>. Acesso em: 25 jul. 2020.

CAO, H.; XU, Y.; YUAN, L.; BIAN, Y.; WANG, L.; ZHEN, S.; HU, Y.; YAN, Y. Molecular characterization of the 14-3-3 gene family in *Brachypodium distachyon* L. reveals high evolutionary conservation and diverse responses to abiotic stresses. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1099, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01099/full>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

CHANDNA, R.; AUGUSTINE, R.; KANCHUPATI, P.; KUMAR, R.; KUMAR, P.; ARYA, G. C.; BISHT, N. C. Class-specific evolution and transcriptional differentiation of 14-3-3 family members in mesohexaploid *Brassica rapa*. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 12, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00012/full>>. Acesso em: 10 jul. 2020.

CHANG, L.; TONG, Z.; PENG, C.; WANG, D.; KONG, H.; YANG, Q.; LUO, M.; GUO, A.; XU, B. Genome-wide analysis and phosphorylation sites identification of the 14-3-3 gene family and functional characterization of *MeGRF3* in cassava. **Physiologia Plantarum**, v. 69, n. 2, p. 244 – 257, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ppl.13070>>. Acesso em: 11 jul. 2020

CHENG, C.; WANG, Y.; CHAI, F.; LI, S.; XIN, H.; LIANG, Z. Genome-wide identification and characterization of the 14–3–3 family in *Vitis vinifera* L. during berry development and cold-and heat-stress response. **BMC genomics**, v. 19, n. 1, p. 579, 2018. Disponível em: <<https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-018-4955-8>>. Acesso em: 05 Jun. 2020.

DELILLE, J. M.; SEHNKE, P. C.; FERL, R. J. The *Arabidopsis* 14-3-3 family of signaling regulators. **Plant Physiology**, v. 126, n. 1, p. 35-38, 2001. Disponível em: <<http://www.plantphysiol.org/content/126/1/35>>. Acesso em: 02 jun. 2020.

DENISON, F. C.; PAUL, A. L.; ZUPANSKA, A. K. 14-3-3 proteins in plant physiology. In: Seminars in cell & developmental biology. **Academic Press**, v. 22, p. 720-727, 2011. Disponível em: <<https://europepmc.org/article/med/21907297>>. Acesso em: 01 jun. 2020.

DOUGHERTY, M. K.; MORRISON, D. K. Unlocking the code of 14-3-3. **Journal of cell science**, v. 117, n. 10, p. 1875-1884, 2004. Disponível em: <<https://jcs.biologists.org/content/117/10/1875>>. Acesso em: 05 jun. 2020.

FERL, R. J.; MANAK, M. S.; REYES, M. F. The 14-3-3s. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. 1-7, 2002. Disponível em: <<https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2002-3-7-reviews3010>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

FINNIE, C.; BORCH, J.; COLLINGE, D. B. 14-3-3 proteins: eukaryotic regulatory proteins with many functions. **Plant molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 545-554, 1999. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/226276065_14-3-3_Proteins_Eukaryotic_regulatory_proteins_with_many_functions>. Acesso em: 25 jul. 2020.

FU, H.; SUBRAMANIAN, R. R.; MASTERS, S. C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 40, n. 1, p. 617-647, 2000. Disponível em:

<<https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pharmtox.40.1.617>>. Acesso em: 10 jun. 2020.

FULGOSI, H.; SOLL, J.; MARASCHIN, S. F.; KORTHOUT, H. A. A. J.; WANG, M.; TESTERINK, C. 14-3-3 proteins and plant development. **Plant molecular biology**, v. 50, n. 6, p. 1019-1029, 2002. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1021295604109>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

FURTADO, G. F.; SOUSA JÚNIOR, J. R.; XAVIER, D. A.; ANDRADE, E. M. G.; SOUSA, J. R. M. Pigmentos fotossintéticos e produção de feijão *Vigna unguiculata* L. Walp. sob 468 salinidade e adubação nitrogenada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 2, p. 291-299, 2014. Disponível em: <https://editoraverde.org/gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/2900>. Acesso em: 07 jul. 2020.

GUO, J.; DAI, S. LI, H.; LIU, A.; LIU, C.; CHENG, D.; CAO, X.; CHU, X.; ZHAI, S.; LIU, J.; ZHAO, Z.; SONG, J. Identification and expression analysis of wheat *TaGF14* Genes. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 12, 2018. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2018.00012/full>>. Acesso em: 13 jun. 2020.

HE, Y.; WU, J.; LV, B.; LI, J.; GAO, Z.; XU, W.; BALUSKA, F.; SHI, W.; SHAW, P. C.; ZHANG, J. Involvement of 14-3-3 protein GRF9 in root growth and response under polyethylene glycol-induced water stress. **Journal of experimental botany**, v. 66, n. 8, p. 2271-2281, 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25873671/>>. Acesso em: 28 jun. 2020.

HE, Y.; ZHANG, Y.; CHEN, L.; WU, C.; LUO, Q.; ZHANG, F.; WEI, Q.; LI, K.; CHANG, J.; YANG, G.; HE, G. A member of the 14-3-3 gene family in *Brachypodium distachyon*, *BdGF14d*, confers salt tolerance in transgenic tobacco plants. **Frontiers in plant science**, v. 8, p. 340, 2017. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00340/full>>. Acesso em: 28 jul. 2020.

JAHN, T.; FUGLSANG, A. T.; OLSSON, A.; BRÜNTRUP, I. M.; COLLINGE, M. D. B.; VOLKMANN, D.; SOMMARIN M.; PALMGREN M. G.; LARSSON, C. The 14-3-3 protein interacts directly with the C-terminal region of the plant plasma membrane H (+)-ATPase. **The Plant Cell**, v. 9, n. 10, p. 1805-1814, 1997. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/content/9/10/1805.short>> Acesso em: 20 jul. 2020.

LI, M.; REN, L.; XU, B.; YANG, X.; XIA, Q.; HE, P.; XIAO, S.; GUO, A.; HU, W.; JIN, Z. Genome-wide identification, phylogeny, and expression analyses of the 14-3-3 family reveal their involvement in the development, ripening, and abiotic stress response in banana. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 1442, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.01442/full>> Acesso em: 20 jul. 2020.

LI, X.; GAO, G.; BIAN, S. Functional roles of two 14-3-3s in response to salt stress in common bean. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, n. 12, p. 209, 2018. Disponível em: <<https://www.semanticscholar.org/paper/Functional-roles-of-two-14-3-3s-in-response-to-salt-Li-Gao/4c600bb544577d715dcf18a3a55d0caedc1d93ce>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

LIU, D.; BIENKOWSKA, J.; PETOSA, C.; COLLIER, R. J.; FU, H.; LIDDINGTON, R. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 191-194, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7603574/>>. Acesso em 01 jul. 2020.

- LIU, J.; JIANG, C.; KANG, L.; ZHANG, H.; SONG, Y.; ZOU, Z.; ZHENG, W. Over-Expression of a 14-3-3 Protein From Foxtail Millet Improves Plant Tolerance to Salinity Stress in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 449, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00449/full>>. Acesso em 10 jun. 2020.
- MUSLIN, A.; TANNER, J. W.; ALLEN, P. M.; SHAW, A. S. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 889-897, 1996. Disponível em: <[https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674\(00\)81067-3](https://www.cell.com/fulltext/S0092-8674(00)81067-3)>. Acesso em: 19 jun. 2020.
- QIN, C.; CHENG, L.; SHEN, J.; ZHANG, Y.; CAO, H.; LU, D.; SHEN, C. Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 family genes in *Medicago truncatula*. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 320, 2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2016.00320/full>>. Acesso em: 14 jun. 2020.
- RAVELOMBOLA, W. S.; SHI, A.; WENG, Y.; CLARK, J.; MOTES, D.; CHEN, P.; SRIVASTAVA, V. Evaluation of salt tolerance at germination stage in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp]. **HortScience**, v. 52, n. 9, p. 1168-1176, 2017. Disponível em: <<https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/52/9/article-p1168.xml>>. Acesso em: 05 jul. 2020.
- REN, Y. R.; YANG, Y. Y.; ZHANG, R.; YOU, C. X.; ZHAO, Q.; HAO, Y. J. *MdGRF11*, an apple 14-3-3 protein, acts as a positive regulator of drought and salt tolerance. **Plant Science**, v. 288, p. 110219, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168945219306387>>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- SHANG, S. WU, C.; HUANG, C.; TIE, W.; YAN, Y.; DING, Z.; XIA, Z.; WANG, W.; PENG, M.; TIAN, L.; HU, W. Genome-wide analysis of the GRF family reveals their involvement in abiotic stress response in cassava. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 110, 2018. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2073-4425/9/2/110>>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- SHIN, R.; JEZ, J. M.; BASRA, A.; ZHANG, B.; SCHACHTMAN, D. P. 14-3-3 proteins fine-tune plant nutrient metabolism. **FEBS letters**, v. 585, n. 1, p. 143-147, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579310009300>>. Acesso em: 22 jun. 2020.
- TAN, T.; CAI, J.; ZHAN, E.; YANG, Y.; ZHAO, J.; GUO, Y.; ZHOU, H. Stability and localization of 14-3-3 proteins are involved in salt tolerance in *Arabidopsis*. **Plant molecular biology**, v. 92, n. 3, p. 391-400, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27503471/>>. Acesso em: 27 jun. 2020.
- VISCONTI, S.; D'AMBROSIO, C.; FIORILLO, A.; ARENA, S.; MUZI, C.; ZOTTINI, M.; ADUCCI, P.; MARRA, M.; SCALONI, A.; CAMONI, L. Overexpression of 14-3-3 proteins enhances cold tolerance and increases levels of stress-responsive proteins of *Arabidopsis* plants. **Plant Science**, v. 289, p. 110215, 2019. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/mdl-31623776>>. Acesso em: 30 jun. 2020.
- WANG, L.; ZHU, J.; LI, X.; WANG, S.; WU, J. Salt and drought stress and ABA responses related to bZIP genes from *V. radiata* and *V. angularis*. **Gene**, v. 651, p. 152-160, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111918301355?casa_token=Dfs4GFa5Lb4AAAAA:HNrI2knRd3iPVQwWs2cJhrtHgp6Q32rsnnqvQkeiWV2yLc2M7iwmcnPHxB8_bnczOoy6X2HKHPF>. Acesso em: 15 jul. 2020.

WANG, Y.; LING, L.; JIANG, Z.; TAN, W.; LIU, Z.; WU, L.; ZHAO, Y.; XIA, S.; MA, J.; WANG, G.; LI, W. Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in soybean (*Glycine max*). **PeerJ**, v. 7, p. e7950, 2019. Disponível em: <<https://peerj.com/articles/7950/>>. Acesso em: 01 jun. 2020.

YAN, J.; HE, C.; WANG, J.; MAO, Z.; HOLADAY, S. A.; ALLEN, R. D.; ZHANG, H. Overexpression of the *Arabidopsis* 14-3-3 protein GF14 λ in cotton leads to a “stay-green” phenotype and improves stress tolerance under moderate drought conditions. **Plant and Cell Physiology**, v. 45, n. 8, p. 1007-1014, 2004. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/8358367_Overexpression_of_the_Arabidopsis_14-3-3_Protein_GF14_in_Cotton_Leads_to_a_Stay-Green_Phenotype_and_Improves_Stress_Tolerance_under_Moderate_Drought_Conditions>. Acesso em: 18 jun. 2020.

YANG, L.; YOU, J.; WANG, Y.; LI, J.; QUAN, W.; YIN, M.; WANG, Q.; CHAN, Z. Systematic analysis of the G-box Factor 14-3-3 gene family and functional characterization of GF14a in *Brachypodium distachyon*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 117, p. 1-11, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575641/>>. Acesso em: 20 jun. 2020.

YANG, Z.; WANG, C.; XUE, Y.; LIU, X.; CHEN, S.; SONG, C.; YANG, Y.; GUO, Y. Calcium-activated 14-3-3 proteins as a molecular switch in salt stress tolerance. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1-12, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-09181-2>>. Acesso em: 02 jun. 2020.

YASHVARDHINI, N.; BHATTACHARYA, S.; CHAUDHURI, S.; SENGUPTA, D. N. Molecular characterization of the 14-3-3 gene family in rice and its expression studies under abiotic stress. **Planta**, v. 247, n. 1, p. 229-253, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28956163/>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

ZHANG, Y.; ZHAO, H.; ZHOU, S.; HE, Y.; LUO, Q.; ZHANG, F.; QIU, D.; FENG, J.; WEI, Q.; CHEN, L.; CHEN, M.; CHANG, J.; YANG, G.; HE, G. Expression of *TaGF14b*, a 14-3-3 adaptor protein gene from wheat, enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco. **Planta**, v. 248, n. 1, p. 117-137, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29616395/>>. Acesso em: 22 jun. 2020.

ZHOU, H.; LIN, H.; CHEN, S.; BECKER, K.; YANG, Y.; ZHAO, J.; KUDLA, J.; SCHUMAKER, K. S.; GUO, Y. Inhibition of the *Arabidopsis* salt overly sensitive pathway by 14-3-3 proteins. *The Plant Cell*, v. 26, n. 3, p. 1166-1182, 2014. Disponível em: <<http://www.plantcell.org/content/26/3/1166>>. Acesso em: 23 jun. 2020.

SOBRE OS AUTORES

Nome: Vanessa Emanuelle Pereira Santos

Formação: Me. em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas/UFPB

Instituição de atuação: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife/PE - Brasil

Departamento ou Programa: Programa de Pós-graduação em Genética - PPGG

<http://lattes.cnpq.br/4509260838040737>

Nome: Éderson Akio Kido

Formação: Dr. em Ciências/USP

Instituição de atuação: Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife/PE - Brasil

Departamento ou Programa: Programa de Pós-graduação em Genética – PPGG/ Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - PPGCB
<http://lattes.cnpq.br/6460993939012827>

TÍTULO DO E-BOOK AO QUAL SE CANDIDATA: "ESTUDOS CIENTÍFICOS E TECNOLÓGICOS EM BIOTECNOLOGIA"

7. CONCLUSÕES

As famílias gênicas 14-3-3 de feijão-caupi e de pinhão-manso é formada por nove genes, os quais codificam proteínas conservadas, com pequenas variações nas regiões N e C terminais, responsáveis pelas diferentes isoformas da família.

O mecanismo de expansão predominante na formação da família gênica 14 - 3- 3 de feijão-caupi é o de seleção purificadora, conservando aminoácidos ao longo da evolução.

As regiões promotoras dos genes 14-3-3s das duas espécies apresentam sítios de ligação à fatores de transcrição de resposta aos estresses ambientais incluindo MYB em feijão-caupi e MICK-MADS em pinhão-manso.

Os transcritos Vu14-3-3g e Vu14-3-3i foram induzidos no acesso tolerante de feijão-caupi sob desidratação radicular e os transcritos Jc14-3-3f e Jc14-3-3h e Jc14-3-3i em pinhão-manso sob imposição de 150 mM de NaCl, os quais podem ser alvos promissores a serem explorado no melhoramento genético das espécies.

Redes de interação proteína-proteína confirmam a interação das Vu14-3-3s com fosfatases e das Jc14-3-3s com a H⁺ ATPase de membrana, sugerindo ser estes, mecanismos envolvidos na tolerância das espécies aos estresses abióticos aqui avaliados.

8 SÚMULA CURRICULAR

Vanessa Emanuelle Pereira Santos

Curriculum Vitae

Nome civil

Nome Vanessa Emanuelle Pereira Santos

Dados pessoais

Filiação Josevaldo dos Santos e Verônica Maria Rodrigues Pereira Santos

Nascimento 26/11/1993 - Brasil

Carteira de Identidade 33883700 SSP - SE - 30/06/2016

CPF 007.472.301-45

Endereço residencial Rua João Ramalho. n 1138
Santa Luzia - Penedo
57200000, AL - Brasil
Telefone: 82 96585865
Celular 82 96585854

Endereço eletrônico

E-mail para contato : vanessa_eps@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

- 2018** Doutorado em Genética.
Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
Título: Genômica Estrutural e Transcriptômica de Genes 14-3-3 Expressos em Feijão-caupi sob Estresse Abiótico de seca e sal (NaCl)
Orientador: Éderson Akio Kido
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2016 - 2018** Mestrado em Agronomia (Melhoramento Genético de Plantas).
Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, Brasil
Título: Evolução e análise de DNA repetitivo em Hancornia speciosa Gomes, Ano de obtenção: 2018
Orientador: Edson Ferreira da Silva
Co-orientador: Cícero Carlos de Souza Almeida
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2011 - 2016** Graduação em Agronomia.
Universidade Federal de Alagoas, UFAL, Maceio, Brasil
Título: Análise diferencial de plastomas no gênero Spondias
Orientador: Cícero Carlos de Souza Almeida
- 2008 - 2010** Ensino Médio (2o grau) .
Colégio Diocesano de Penedo, CDP, Brasil, Ano de obtenção: 2010
-

Formação complementar

2017 - 2018	Extensão universitária em Respostas Fisiológicas e Moleculares de Plantas sob Estresse. (Carga horária: 60h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2016 - 2016	Curso de curta duração em Filogenia Molecular. (Carga horária: 3h). Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
2012 - 2012	Curso de curta duração em Açúcar e Alcool. (Carga horária: 96h). Prepara Cursos, PC, Brasil
2004 - 2005	American Shine. . (Carga horária: 164h). Centro Cultural de Inglês, CCI, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Vínculo institucional

2019 - 2020	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Estagiária a docência , Carga horária: 8, Regime: Parcial
2018 - Atual	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Doutoranda em Genética , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva

2. Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

Vínculo institucional

2017 - 2018	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Mestranda em Melhoramento Genético de Plantas , Carga horária: 40, Regime: Dedicação exclusiva
--------------------	---

3. Universidade Federal de Alagoas - UFAL

Vínculo institucional

2015 - 2015	Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Monitoria voluntária - Hidráulica Aplicada , Carga horária: 12, Regime: Parcial
2015 - 2016	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de iniciação científica/Pesquisador , Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva
2014 - 2015	Vínculo: Bolsista , Enquadramento funcional: Bolsista de Iniciação Científica/Pesquisador , Carga horária: 20, Regime: Dedicação exclusiva

4. Fundação Antônio Jorge da Silva - FAJS

Vínculo institucional
2012 - 2013Vínculo: Colaborador , Enquadramento funcional: Colaborador,
Regime: Parcial

Projetos

Projetos de pesquisa

2017 - Atual Inferências Genômicas e Biotecnológicas aplicadas às Plantas do Nordeste Brasileiro

Descrição: O projeto avaliará o potencial biotecnológico de categorias moleculares específicas: peptídeos antimicrobianos, fatores de transcrição e genes responsivos à seca e à salinidade ou da resposta cruzada em plantas. Os estudos incluirão: prospecção em transcriptomas já gerados pelo grupo, de espécies adaptadas às condições estressantes do nordeste Brasileiro, incluindo a leguminosa arbórea Catingueira (*Cenostigma pyramidallis*), a leguminosa arbustiva *Stylosanthes scabra*, e espécie *Calotropis procera* (Apocynaceae), usada na medicina popular. Todas suportam condições extremadas de estresse, sendo potenciais doadoras de genes/proteínas bioativas. Estão também disponíveis para o projeto, transcriptomas de plantas cultivadas [videira (*Vitis vinifera*), feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), soja (*Glycine max*)], sob condições de estresse biótico (interação com bactéria, vírus e fungo, respectivamente) e abiótico (déficit hídrico e salinidade), cujos os transcriptomas já foram anotados e ancorados em genomas de referência (quando disponíveis), estando os dados e os proteomas conceituais em plataformas multiusuários. Adicionalmente, genomas completos de 60 espécies bacterianas dos gêneros *Xanthomonas* e *Acidovorax*, cujas ilhas de patogenicidade e virulência estão sendo identificadas para docagem de seus efetores contra genes de resistência de plantas em estudo, estarão também disponíveis ao projeto. Chamada MCTIC/CNPq Nº 28/2018 - Universal/Faixa C - De R\$ 0,00 a R\$ 120.000,00.

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Vanessa Emanuelle Pereira Santos; Kido, Éderson Akio; Benko-Iseppon, Ana Maria (Responsável)

2015 - 2016 Sequenciamento do genoma plastidial de espécies do gênero *Spondias*

Descrição: O gênero *Spondias* pertence à família Anacardiaceae, apresenta importância econômica e social e algumas espécies são utilizadas na agroindústria, no entanto, problemas são encontrados na identificação e nas relações filogenéticas entre as espécies. Essas espécies são negligenciadas quanto a estudos genéticos/genômicos, ocasionando uma lacuna de informações científicas importantes para a organização e manejo de recursos genéticos. Alguns estudos têm sido conduzidos com o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites e relação genética entre as espécies usando bandejamento cromossômico e filogenia usando DNA barcoding. Entre as espécies mais conhecidas, pode-se citar *S. tuberosa* (umbu), *S. venulosa* (Cajázinho) e *Spondias* sp (umbucajá) poderem mais apreciadas devido ao consumo natural de seus frutos. Entre as abordagens genéticas, o conhecimento dos genomas plastidiais é a primeira etapa para estudos genômicos no gênero, pelo fato de serem utilizados nos estudos de filogeografia, filogenia molecular identificação molecular (DNA barcoding). Além disso, os cloroplastos apresentam

papel essencial no processo de fotossíntese das plantas. Para obtenção dos genomas plastidiais completos das espécies *S. tuberosa*, *S. venulosa* e *Spondias* sp, serão sequenciados aproximadamente 12 milhões de fragmentos de DNA com 100 pares de bases, totalizando 120 milhões de nucleotídeos usando Sequenciamento de Nova geração na Plataforma Illumina HiSeq 2500.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Vanessa Emanuelle Pereira Santos; Karla Emanuella Souza dos Santos; Cícero Carlos de Souza Almeida (Responsável); Flávia França

2015 - 2018 Diversidade e estrutura genética de populações naturais de mangabeira (*Hancornia speciosa* var. *speciosa* Gomes) no Brasil

Descrição: A mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes) é uma frutífera nativa do Brasil, amplamente distribuída no cerrado e nos tabuleiros costeiros. Principalmente por produzir frutos saborosos, nutritivos e de ampla utilização, esta espécie tem grande potencial para exploração econômica e encontra-se em estágio inicial de domesticação. No entanto, as populações naturais de *H. speciosa* estão sofrendo fortemente processo de erosão genética, sem que tenha sido realizado estudo sobre a diversidade e estrutura genética dessas populações naturais, abrangendo as áreas de ocorrência da espécie, o que limita a eficiência de estratégia de coleta e de conservação dos recursos genéticos. Além disso, os bancos de germoplasma de mangabeira existentes ainda são modestos e não contemplam a diversidade genética desta espécie. O presente projeto visa a avaliar a diversidade e estrutura genética dentro e entre populações de *H. speciosa* no âmbito da área de ocorrência da espécie no Brasil. Para tanto, serão construídos primers de microssatélites específicos para *H. speciosa*, os quais serão utilizados para gerar os dados necessários ao estudo de diversidade e estrutura genética e entre e dentro de populações em seis áreas de ocorrência dessa espécie nos Estados de Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Bahia, Sergipe e Pará. Tais informações darão subsídios tanto para aumentar a eficiência em coletas de germoplasma, como para otimizar a conservação *ex situ* e *in situ* dos recursos genéticos da espécie. Além dos estudos de diversidade e estrutura genética, serão coletados materiais propagativos de genótipos indicados como superiores ou de boas características agrônômicas que serão destinados ao enriquecimento de bancos de germoplasma de mangabeira e para pesquisas de pré-melhoramento genético.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Vanessa Emanuelle Pereira Santos; Edson Ferreira da Silva (Responsável); Jackeline Terto

2014 - 2015 Genômica comparativa em espécies neotropicais do gênero *Spondias*

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Integrantes: Vanessa Emanuelle Pereira Santos; Eliane Albino da Paz; Karla Emanuella Souza dos Santos; Cícero Carlos de Souza Almeida (Responsável)

Projeto de extensão

2012 - 2013 Horta como Ferramenta Socioeducativa de Jovens da Fundação Antônio Jorge da Silva

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão

Integrantes: Vanessa Emanuelle Pereira Santos; Karla Emanuella Souza dos Santos; Daniela Cavalcanti de Medeiros Furtado (Responsável)

Revisor de projeto de agência de fomento

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Vínculo

2019 - 2019

Regime: Parcial

Outras informações:

Seleção do Programa de Bolsas de Iniciação Científica/PIBIC - UFPE Edital 2019-2020

Áreas de atuação

1. Agronomia
-

Idiomas

Inglês Lê Bem

Espanhol Lê Bem

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. **SANTOS, VANESSA**; ALMEIDA, CÍCERO

The complete chloroplast genome sequences of three Spondias species reveal close relationship among the species. GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY (ONLINE VERSION). , v.42, p.132-138 - , 2019.

2. **SANTOS, VANESSA**; SILVA, EDSON FERREIRA DA; ALMEIDA, CÍCERO

Genome size and identification of repetitive DNA sequences using low coverage sequencing in Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae: Gentianales). GENETICS AND MOLECULAR BIOLOGY (ONLINE VERSION). , v.43, p.e20190175 - , 2020.

Livros publicados

1. **Vanessa Emanuelle Pereira Santos**; Kido, Éderson Akio
Estudos científicos e tecnológicos em Biotecnologia, 2020

Capítulos de livros publicados

1. **Santos, Vanessa Emanuelle Pereira**; SOUZA, K. P.; Kido, Éderson Akio

PROTEÍNAS 14-3-3: ESTRUTURA, FUNÇÃO E ATUAÇÃO NA RESPOSTA AOS ESTRESSES ABIÓTICOS EM PLANTAS In: Estudos científicos e tecnológicos em Biotecnologia. 1ed ed. Aracaju: Backup Books, 2020, p. 1-195.

2. Kido, Éderson Akio; Ferreira-Neto, José Ribamar Costa; da Silva, Manassés Daniel; **Santos, Vanessa Emanuelle Pereira**; da Silva Filho, Jorge Luís Bandeira; Benko-Iseppon, Ana Maria Osmoprotectant-Related Genes in Plants Under Abiotic Stress: Expression Dynamics, In Silico Genome Mapping, and Biotechnology In: Osmoprotectant-Mediated Abiotic Stress Tolerance in Plants. 1ed ed.: Springer International Publishing, 2019, p. 1-40.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. **SANTOS, V. E. P.**; SOUZA, B. B.; SILVA, R. H.; da Silva, Manassés Daniel; Kido, Éderson Akio **ANÁLISE ESTRUTURAL DA FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3 NO TRANSCRIPTOMA DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDO À ESTRESSE DE SECA** In: I Encontro de Biociências, 2019, Recife.
I Encontro de Biociências. , 2019.

2. **SANTOS, V. E. P.**; SILVA, R. H.; da Silva, Manassés Daniel; Kido, Éderson Akio **“ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E ESTRUTURAL DA FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3 SOB ESTRESSE SALINO EM FEIJÃO-CAUPI** In: VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética, 2018, Recife.
VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética. , 2018.

3. **SANTOS, V. E. P.**; SILVA, E. F.; ALMEIDA, C. C. S.
Caracterização da fração repetitiva do genoma de *Hancornia speciosa* Gomes In: XXII Encontro de Genética do Nordeste, 2018, Natal.
XXII Encontro de Genética do Nordeste. , 2018.

4. **SANTOS, V. E. P.**; FIRMINO, S. M.; SILVA, M. S.; ALMEIDA, C. C. S.
DNA barcoding e filogenia de espécies do gênero *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) In: IX Congresso Latino Americano de Entomologia, 2016, Maceió.
IX Congresso Latino Americano de Entomologia. , 2016.

5. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.; SANTOS, K. E. S.; FRANCA, F.
Spondias tuberosa and *S. bahiensis* plastomes and phylogenetic analysis in Sapindales In: XXI Encontro de Genética do Nordeste, 2016
XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

6. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.
Syagrus coronata plastomes and phylogenetic analysis in Arecoideae (Arecaceae) In: XXI Encontro de Genética do Nordeste
XXI Encontro de Genética do Nordeste. , 2016.

7. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.; SILVA, M. S.
DNA Barcoding and phylogeny of species of ant genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae) In: 60º Congresso Brasileiro de Genética, 2014, Guarujá - SP.
DNA Barcoding and phylogeny of species of ant genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae). , 2014.

Apresentação de trabalho e palestra

1. **SANTOS, V. E. P.**; SOUZA, B. B.; SILVA, R. H.; da Silva, Manassés Daniel; Kido, Éderson Akio **ANÁLISE ESTRUTURAL DA FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3 NO TRANSCRIPTOMA DE FEIJÃO-CAUPI SUBMETIDO À ESTRESSE DE SECA**, 2019. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

2. **SANTOS, V. E. P.**; da Silva, Manassés Daniel; SILVA, R. H.; SOUZA, B. B.; Kido, Éderson Akio **“ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E ESTRUTURAL DA FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3 SOB ESTRESSE SALINO EM FEIJÃO-CAUPI**, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

3. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.; SILVA, E. F.

Caracterização da fração repetitiva do genoma de *Hancornia speciosa* Gomes, 2018. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

4. **SANTOS, V. E. P.**; SILVA, M. S.; FIRMINO, S. M.; ALMEIDA, C. C. S.

DNA barcoding e filogenia de espécies do gênero *Atta* (Formicidae: Myrmicinae), 2016. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

5. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.; FRANCA, F.; SANTOS, K. E. S.

***Spondias tuberosa* and *S. bahiensis* plastomes and phylogenetic analysis in Sapindales**, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)

6. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.

***Syagrus coronata* plastomes and phylogenetic analysis in Arecoideae (Arecaceae)**, 2016. (Outra, Apresentação de Trabalho)

7. **SANTOS, V. E. P.**

Evolução e análise diferencial de elementos transponíveis e família de DNA repetitivo em espécies do gênero *Spondias*, 2015. (Outra, Apresentação de Trabalho)

8. **SANTOS, V. E. P.**; ALMEIDA, C. C. S.; SILVA, M. S.

DNA Barcoding and phylogeny of species of ant genus *Atta* (Formicidae: Myrmicinae), 2014. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **SANTOS, V. E. P.**

Desenho de primers para qPCR, 2021. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Educação e Popularização de C&T

Curso de curta duração ministrado

1. **SANTOS, V. E. P.**

Desenho de primers para qPCR, 2021. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Demais produções técnicas

1. **SANTOS, V. E. P.**

Desenho de primers para qPCR, 2021. (Extensão, Curso de curta duração ministrado)

Eventos

Eventos

Participação em eventos

1. **XI Jornada da Pós-graduação em Genética**, 2021. (Congresso)

Identificação e caracterização da família gênica 14-3-3 em *Jatropha curcas* sob condições de salinidade.

2. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **I Encontro de Biociências**, 2019. (Encontro)

ANÁLISE ESTRUTURAL DA FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3 NO TRANSCRIPTOMA DE FEIJÃO-CAUPI

SUBMETIDO À ESTRESSE DE SECA.

3. **I Workshop em Biossegurança de Transgênicos**, 2019. (Simpósio)

.

4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **Encontro de Genética do Nordeste - ENGENE**, 2018. (Encontro)

Caracterização da fração repetitiva do genoma de *Hancornia speciosa* Gomes.

5. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **VIII Jornada de Pós-Graduação em Genética**, 2018. (Simpósio)

"ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA E ESTRUTURAL DA FAMÍLIA GÊNICA 14-3-3 SOB ESTRESSE SALINO EM FEIJÃOCAUPI.

6. **Crédito Rural**, 2016. (Simpósio)

.

7. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)

Spondias tuberosa and *S. bahiensis* plastomes and phylogenetic analysis in Sapindales.

8. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **XXI Encontro de Genética do Nordeste**, 2016. (Encontro)

Syagrus coronata plastomes and phylogenetic analysis in Arecoideae (Arecaceae).

9. **Terceira Semana da Água: "ÁGUA: Das chuvas às torneiras- necessidades e desperdícios"**, 2015. (Feira)

.

10. Apresentação Oral no(a) **XXV ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFAL**, 2015. (Encontro)

EVOLUÇÃO E ANÁLISE DIFERENCIAL DE ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS E FAMÍLIA DE DNA REPETITIVO EM ESPÉCIES DO GÊNERO SPONDIAS.

11. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **60º Congresso Brasileiro de Genética**, 2014. (Congresso)

DNA Barcoding and phylogeny of Species of ant genus *atta* (Formicidae: Myrmicinae).

12. **II Seminário sobre plantas medicinais e fitoterápicos de Alagoas**, 2014. (Seminário)

.

13. **V Semana da Agronomia e 1º Simpósio da Pós-Graduação em em Agricultura e Ambiente**, 2014. (Simpósio)

.

Organização de evento

1. SANTOS, V. E. P.

XI Jornada da Pós-graduação em Genética, 2021. (Congresso, Organização de evento)

2. Santos, Vanessa Emanuelle Pereira

I Encontro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, 2019. (Congresso, Organização de evento)

Bancas

Bancas

Participação em banca de trabalhos de conclusão

Graduação

1. **SANTOS, V. E. P.;** CRISPIM, J. G.; ARAUJO, F. C.

Participação em banca de Elenilson de Souza Santos. **Efeitos bioquímicos da superexpressão de gene para fator de transcrição WRKY do feijão-caupi em plantas transgênicas de Arabidopsis thaliana sob estresse salino**, 2021

(Ciências Biológicas) Universidade Federal de Pernambuco

Totais de produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódico.....	2
Livros publicados.....	1
Capítulos de livros publicados.....	2
Trabalhos publicados em anais de eventos.....	7
Apresentações de trabalhos (Congresso).....	2
Apresentações de trabalhos (Simpósio).....	3
Apresentações de trabalhos (Outra).....	3

Produção técnica

Curso de curta duração ministrado (extensão).....	1
---	---

Eventos

Participações em eventos (congresso).....	2
Participações em eventos (seminário).....	1
Participações em eventos (simpósio).....	4
Participações em eventos (encontro).....	5
Organização de evento (congresso).....	2
Participação em banca de trabalhos de conclusão (graduação).....	1

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHEEM, Abdelraheem et al. Progress and perspective on drought and salt stress tolerance in cotton. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 118-129, 2019.
- ABRAR, Muhammad Mohsin et al. Evaluating the contribution of growth, physiological, and ionic components towards salinity and drought stress tolerance in *Jatropha curcas*. **Plants**, v. 9, n. 11, p. 1574, 2020.
- ADAMS, Mark D. et al. Sequence identification of 2,375 human brain genes. **Nature**, v. 355, n. 6361, p. 632-634, 1992.
- AHMAR, Sunny et al. Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: recent advances and future outlook. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 7, p. 2590, 2020.
- AJIBADE, S. R.; WEEDEN, N. F.; CHITE, S. M. Inter simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. **Euphytica**, v. 111, p. 47-55, 2000.
- ANWAR, Ali; KIM, Ju-Kon. Transgenic breeding approaches for improving abiotic stress tolerance: recent progress and future perspectives. *International journal of molecular sciences*, v. 21, n. 8, p. 2695, 2020.
- ARAÚJO, Edilene daniel de et al. Genotypic variation on the antioxidative response of cowpea cultivars exposed to osmotic stress. **Revista Caatinga**, v. 30, p. 928-937, 2017.
- ARIF, Yamshi et al. Salinity induced physiological and biochemical changes in plants: An omic approach towards salt stress tolerance. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 156, p. 64-77, 2020.
- AROCKIASAMY, S. et al. Breeding and biotechnological efforts in *Jatropha curcas* L. for sustainable yields. **Oil Crop Science**, v. 6, n. 4, p. 180-191, 2021.
- ATTWOOD, T. K.; MILLER, C. J. Progress in bioinformatics and the importance of being earnest. 2002.
- AZEVEDO, Ricardo A. et al. Sugarcane under pressure: an overview of biochemical and physiological studies of abiotic stress. **Tropical Plant Biology**, v. 4, p. 42-51, 2011.
- BAILEY, Timothy L. et al. The MEME suite. **Nucleic acids research**, v. 43, n. W1, p. W39-W49, 2015.
- BARTELS, Dorothea; SUNKAR, Ramanjulu. Drought and salt tolerance in plants. **Critical reviews in plant sciences**, v. 24, n. 1, p. 23-58, 2005.

BASHA, S. D. et al. A comparative study of biochemical traits and molecular markers for assessment of genetic relationships between *Jatropha curcas* L. germplasm from different countries. **Plant Science**, v. 176, n. 6, p. 812-823, 2009.

BENKO-ISEPPOM Ana Maria. Estudos moleculares no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas. Embrapa Documentos, v. 56, p. 327-332, 2001;

BERNA, Anne; BERNIER, François. Regulation by biotic and abiotic stress of a wheat germin gene encoding oxalate oxidase, a H₂O₂-producing enzyme. **Plant molecular biology**, v. 39, n. 3, p. 539, 1999.

BERRY, Edward W. An eogene tropical forest in the Peruvian desert. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 15, n. 4, p. 345-346, 1929.

BHATTACHARYA, Shreya et al. Mutations and functional analysis of 14-3-3 stress response protein from *Triticum aestivum*: An evolutionary analysis through in silico structural biochemistry approach. **Computational biology and chemistry**, v. 77, p. 343-353, 2018.

BIROL, I. et al. De novo transcriptome assembly with ABySS Bioinformatics (2009) Vol. 25 no. 21 2009. **doi**, v. 10, p. 28722877, 2009.

BOHNERT, Hans J.; NELSON, Donald E.; JENSEN, Richard G. Adaptations to environmental stresses. **The plant cell**, v. 7, n. 7, p. 1099, 1995.

BOUKAR, Ousmane et al. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. **Plant Breeding**, v. 138, n. 4, p. 415-424, 2019.

BRADY, Siobhan M. et al. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. **Science**, v. 318, n. 5851, p. 801-806, 2007.

BUCHANAN, Bob B.; GRUISSEM, Wilhelm; JONES, Russell L. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. John wiley & sons, 2015.

CAI, Yu et al. ISSR-based genetic diversity of *Jatropha curcas* germplasm in China. **Biomass and Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1739-1750, 2010.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, Francisco et al. Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 14631, 2018.

CAMPO, Sonia et al. Expression of the maize ZmGF14-6 gene in rice confers tolerance to drought stress while enhancing susceptibility to pathogen infection. **Journal of experimental botany**, v. 63, n. 2, p. 983-999, 2012.

CARELS, N. *Jatropha curcas*: a review, in "Advances in Botanical Research". Kader, JC; Delseny, M. Eds. 2009.

CASTELLETTI, Carlos Henrique Madeiros; DA COSTA, Antonio Félix. Feijão-caupi: alternativa sustentável para os sistemas produtivos. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 1-2, 2013.

CHEN, Chengjie et al. TBtools, a toolkit for biologists integrating various biological data handling tools with a user-friendly interface. **BioRxiv**, v. 289660, n. 10.1101, p. 289660, 2018.

CHEN, Fang et al. The rice 14-3-3 gene family and its involvement in responses to biotic and abiotic stress. **DNA research**, v. 13, n. 2, p. 53-63, 2006.

CHEN, Honglin et al. De novo transcriptomic analysis of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) for genic SSR marker development. **BMC genetics**, v. 18, p. 1-12, 2017.

CHOU, Kuo-Chen et al. Cell-PLOC 2.0: an improved package of web-servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. **Natural Science**, v. 2, n. 10, p. 1090, 2010.

CLAMP, M. et al. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*20: 426–427. **Google Scholar There is no corresponding record for this reference**, 2004.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 2019/20, quarto levantamento, v.7, n.4, p. 63, 2021.

CLAMP, M. et al. The Jalview Java alignment editor. *Bioinformatics*20: 426–427. **Google Scholar There is no corresponding record for this reference**, 2004.

CRAMER, Grant R. et al. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC plant biology**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2011.

COSTA, Antonio Félix et al. Miranda IPA 207, nova cultivar de feijão-caupi para o nordeste brasileiro. **Pesquisa Agropecuária Pernambucana**, v. 18, n. 1, p. 39-43, 2013.

DELILLE, Justin M.; SEHNKE, Paul C.; FERL, Robert J. The Arabidopsis 14-3-3 family of signaling regulators. **Plant Physiology**, v. 126, n. 1, p. 35-38, 2001.

DENISON, Fiona C. et al. 14-3-3 proteins in plant physiology. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2011. p. 720-727.

DINEL, Stéphanie et al. Reproducibility, bioinformatic analysis and power of the SAGE method to evaluate changes in transcriptome. **Nucleic acids research**, v. 33, n. 3, p. e26-e26, 2005.

DIOUF, Diaga. Recent advances in cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.]“omics” research for genetic improvement. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 15, p. 2803-2810, 2011.

DOUGHERTY, Michele K.; MORRISON, Deborah K. Unlocking the code of 14-3-3. **Journal of cell science**, v. 117, n. 10, p. 1875-1884, 2004.

DRESSELHAUS, Thomas; HÜCKELHOVEN, Ralph. Biotic and abiotic stress responses in crop plants. **Agronomy**, v. 8, n. 11, p. 267, 2018.

EHLERS, J. D.; HALL, A. E. Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.). **Field crops research**, v. 53, n. 1-3, p. 187-204, 1997.

FANG, Jinggui et al. Genetic diversity of cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] in four West African and USA breeding programs as determined by AFLP analysis. **Genetic resources and crop evolution**, v. 54, p. 1197-1209, 2007.

FAROOQ, Muhammad et al. Drought stress in plants: an overview. **Plant responses to drought stress: From morphological to molecular features**, p. 1-33, 2012.

FATOKUN CA et al. Enhancing cowpea productivity and production in drought- prone areas of Sub-Saharan Africa. In T. Abate (Ed.), Four seasons of learning and engaging smallholder farmers: Progress of phase 1:81– 112. **International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics**, v.1, p. 81-112, 2012.

FENG, Yan-Jie et al. Parallel tagged amplicon sequencing of relatively long PCR products using the Illumina HiSeq platform and transcriptome assembly. **Molecular Ecology Resources**, v. 16, n. 1, p. 91-102, 2016.

FERL, Robert J.; MANAK, Michael S.; REYES, Matthew F. The 14-3-3s. **Genome biology**, v. 3, p. 1-7, 2002.

FERREIRA, Olavo José Marques et al. Root System of *Jatropha curcas* Provides Resistance and Strengthens to the Soil. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, p. 1-13, 2022.

FREIRE FILHO, Francisco Rodrigues et al. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio Norte, 1-84, 2011.

FU, Haian; SUBRAMANIAN, Romesh R.; MASTERS, Shane C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 40, n. 1, p. 617-647, 2000.

FUENTES, Alfredo et al. Life cycle assessment of *Jatropha curcas* biodiesel production: a case study in Mexico. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 20, p. 1721-1733, 2018.

FULGOSI, Hrvoje et al. 14-3-3 proteins and plant development. **Plant molecular biology**, v. 50, p. 1019-1029, 2002.

FURTADO, Guilherme de Freitas et al. Pigmentos fotossintéticos e produção de feijão, *Vigna unguiculata* L. Walp, sob salinidade e adubação nitrogenada. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 2, p. 40, 2014.

GAUTHIER, Jeff et al. A brief history of bioinformatics. **Briefings in bioinformatics**, v. 20, n. 6, p. 1981-1996, 2019.

GLENN, Travis C. Field guide to next-generation DNA sequencers. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 5, p. 759-769, 2011.

GRABHERR, Manfred G. et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature biotechnology**, v. 29, n. 7, p. 644-652, 2011.

GRATIVOL, Clícia et al. High efficiency and reliability of inter-simple sequence repeats (ISSR) markers for evaluation of genetic diversity in Brazilian cultivated *Jatropha curcas* L. accessions. **Molecular biology reports**, v. 38, p. 4245-4256, 2011.

GÜBITZ, Georg M.; MITTELBACH, Martin; TRABI, Manuela. Exploitation of the tropical oil seed plant *Jatropha curcas* L. **Bioresource technology**, v. 67, n. 1, p. 73-82, 1999.

GULL, Audil; LONE, Ajaz Ahmad; WANI, Noor Ul Islam. Biotic and abiotic stresses in plants. **Abiotic and biotic stress in plants**, p. 1-19, 2019.

GUPTA, S. et al. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biology*. 2007.

GUPTA, S. K.; GOPALAKRISHNA, T. Development of unigene-derived SSR markers in cowpea (*Vigna unguiculata*) and their transferability to other *Vigna* species. **Genome**, v. 53, n. 7, p. 508-523, 2010.

HEJNÁK, V. et al. Growth and photosynthesis of Upland and Pima cotton: response to drought and heat stress. **Plant, Soil and Environment**, v. 61, n. 11, p. 507-514, 2015.

HELLER, Joachim. Physic nut, *Jatropha curcas* L. **Biodiversity International**, 1996.

HERBETTE, Stéphane et al. Transgenic tomatoes showing higher glutathione peroxidase antioxidant activity are more resistant to an abiotic stress but more susceptible to biotic stresses. **Plant Science**, v. 180, n. 3, p. 548-553, 2011.

HERMS, D. A.; MATTSON, W. J. The dilemma of plants: to grow or defend. *QR Biol* 67: 283–335. 1992.

HILLER, Karsten et al. JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. **Bioinformatics**, v. 22, n. 19, p. 2441-2443, 2006.

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

HUSSAIN, Sajjad et al. Oxidative stress and antioxidant defense in plants under drought conditions. **Plant Abiotic Stress Tolerance: Agronomic, Molecular and Biotechnological Approaches**, p. 207-219, 2019.

IRSHAD, Muhammad et al. Mulching impact of *Jatropha curcas* L. leaves on soil fertility and yield of wheat under water stress. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 8891, 2022.

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

ISMAIL, Ahmed; TAKEDA, Shin; NICK, Peter. Life and death under salt stress: same players, different timing?. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 12, p. 2963-2979, 2014.

JALALI, Saakshi et al. Exploitation of Hi-C sequencing for improvement of genome assembly and in-vitro validation of differentially expressing genes in *Jatropha curcas* L. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-9, 2020.

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

JIANG, Caifu et al. An Arabidopsis soil-salinity-tolerance mutation confers ethylene-mediated enhancement of sodium/potassium homeostasis. **The Plant Cell**, v. 25, n. 9, p. 3535-3552, 2013.

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

JULKOWSKA, Magdalena M.; TESTERINK, Christa. Tuning plant signaling and growth to survive salt. **Trends in plant science**, v. 20, n. 9, p. 586-594, 2015.

KAGA, Akito et al. Species relationships in the subgenus *Ceratotropis* (genus *Vigna*) as revealed by RAPD analysis. **Euphytica**, v. 88, p. 17-24, 1996.

KAMEL, Dena A. et al. Smart utilization of jatropha (*Jatropha curcas* Linnaeus) seeds for biodiesel production: Optimization and mechanism. **Industrial crops and products**, v. 111, p. 407-413, 2018.

KAUR, G.; ASTHIR, B. Molecular responses to drought stress in plants. **Biologia Plantarum**, v. 61, p. 201-209, 2017.

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

KLEPZIG, Kier D. et al. Effects of biotic and abiotic stress on induced accumulation of terpenes and phenolics in red pines inoculated with bark beetle-vectored fungus. **Journal of Chemical Ecology**, v. 21, p. 601-626, 1995.

KRZYWINSKI, Martin et al. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. **Genome research**, v. 19, n. 9, p. 1639-1645, 2009.

KUMAR, Karunesh et al. Unraveling 14-3-3 proteins in C4 panicoids with emphasis on model plant *Setaria italica* reveals phosphorylation-dependent subcellular localization of RS splicing factor. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0123236, 2015.

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

LI, Ruihua et al. Identification of 14-3-3 family in common bean and their response to abiotic stress. **PLoS one**, v. 10, n. 11, p. e0143280, 2015.

LI, Xuyan et al. Functional roles of two 14-3-3s in response to salt stress in common bean. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 40, p. 1-13, 2018.

LI, Shenglan et al. ABA-mediated modulation of elevated CO₂ on stomatal response to drought. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 56, p. 174-180, 2020.

LIU, Dong et al. Crystal structure of the zeta isoform of the 14-3-3 protein. **Nature**, v. 376, n. 6536, p. 191-194, 1995.

LIU, Jiaming et al. Over-expression of a 14-3-3 protein from foxtail millet improves plant tolerance to salinity stress in *Arabidopsis thaliana*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 449, 2020.

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

LOZANO-DURÁN, Rosa; ROBATZEK, Silke. 14-3-3 proteins in plant-pathogen interactions. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 28, n. 5, p. 511-518, 2015.

MAHAJAN, Shilpi; PANDEY, Girdhar K.; TUTEJA, Narendra. Calcium-and salt-stress signaling in plants: shedding light on SOS pathway. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 471, n. 2, p. 146-158, 2008.

MAHMOOD, Tahir et al. Insights into drought stress signaling in plants and the molecular genetic basis of cotton drought tolerance. **Cells**, v. 9, n. 1, p. 105, 2019.

MANISEKHAR, S. R.; SIDDESH, G. M.; MANVI, Sunilkumar S. Introduction to bioinformatics. **Statistical Modelling and Machine Learning Principles for Bioinformatics Techniques, Tools, and Applications**, p. 3-9, 2020.

MARCHLER-BAUER, Aron et al. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic acids research**, v. 43, n. D1, p. D222-D226, 2015.

MATSUMURA, Hideo et al. SuperSAGE. **Cellular microbiology**, v. 7, n. 1, p. 11-18, 2005.

MATSUMURA, Hideo et al. SuperSAGE: a modern platform for genome-wide quantitative transcript profiling. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 9, n. 5, p. 368-374, 2008.

MCVAUGH, Rogers. The genus *Jatropha* in America: principal intrageneric groups. **Bulletin of the Torrey Botanical Club**, p. 271-294, 1945.

MERWAD, Abdel-Rahman MA; DESOKY, El-Sayed M.; RADY, Mostafa M. Response of water deficit-stressed *Vigna unguiculata* performances to silicon, proline or methionine foliar application. **Scientia Horticulturae**, v. 228, p. 132-144, 2018.

MHAMDI, Amna et al. Catalase function in plants: a focus on Arabidopsis mutants as stress-mimic models. **Journal of experimental botany**, v. 61, n. 15, p. 4197-4220, 2010.

MISHRA, Kumud Bandhu et al. Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. **Plant Science**, v. 182, p. 79-86, 2012.

MUNNS, Rana. Comparative physiology of salt and water stress. **Plant, cell & environment**, v. 25, n. 2, p. 239-250, 2002.

MUSLIN, Anthony J. et al. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. **Cell**, v. 84, n. 6, p. 889-897, 1996.

NAKASHIMA, Kazuo; ITO, Yusuke; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, Kazuko. Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in Arabidopsis and grasses. **Plant physiology**, v. 149, n. 1, p. 88-95, 2009.

NIETSCHE, Silvia et al. Assessment of reproductive characteristics of *Jatropha curcas* L. in south Florida. **Gcb Bioenergy**, v. 6, n. 4, p. 351-359, 2014.

NONGPIUR, Ramsong Chantre; LATA SINGLA-PAREEK, Sneha; PAREEK, Ashwani. Genomics approaches for improving salinity stress tolerance in crop plants. **Current genomics**, v. 17, n. 4, p. 343-357, 2016.

OGUNKANMI, L. A. et al. Genetic diversity in wild relatives of cowpea (*Vigna unguiculata*) as revealed by simple sequence repeats (SSR) markers. **J. Food Agric. Environ**, v. 6, n. 3&4, p. 263-268, 2008.

OGUNWOLE, J. O. et al. Contribution of *Jatropha curcas* to soil quality improvement in a degraded Indian entisol. **Acta Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science**, v. 58, n. 3, p. 245-251, 2008.

OZSOLAK, Fatih et al. Direct RNA sequencing. **Nature**, v. 461, n. 7265, p. 814-818, 2009.

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

PIRASTEY-ANOSHEH, H. et al. Stomatal responses to drought stress. *Water Stress and Crop Plants: A Sustainable Approach*, 1–2 (June), 24–40. 2016.

POMPELLI, Marcelo F. et al. Physiological, metabolic, and stomatal adjustments in response to salt stress in *Jatropha curcas*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 168, p. 116-127, 2021.

POMPELLI, Marcelo F.; JARMA-OROZCO, Alfredo; RODRÍGUEZ-PÁEZ, Luis Alfonso. Salinity in *Jatropha curcas*: A review of physiological, biochemical, and molecular factors involved. **Agriculture**, v. 12, n. 5, p. 594, 2022.

PORTER, Sandra G.; SMITH, Todd M. Bioinformatics for the Masses: The need for practical data science in undergraduate biology. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v. 23, n. 6, p. 297-299, 2019.

QIN, Cheng et al. Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 family genes in *Medicago truncatula*. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 320, 2016.

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

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

REJEB, Ines Ben; PASTOR, Victoria; MAUCH-MANI, Brigitte. Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. **Plants**, v. 3, n. 4, p. 458-475, 2014.

REN, Yi-Ran et al. *MdGRF11*, an apple 14-3-3 protein, acts as a positive regulator of drought and salt tolerance. **Plant Science**, v. 288, p. 110219, 2019.

RHOADS, Anthony; AU, Kin Fai. PacBio sequencing and its applications. **Genomics, proteomics & bioinformatics**, v. 13, n. 5, p. 278-289, 2015.

RIVAS, R. et al. Drought tolerance in cowpea species is driven by less sensitivity of leaf gas exchange to water deficit and rapid recovery of photosynthesis after rehydration. **South African Journal of Botany**, v. 103, p. 101-107, 2016.

ROBERTS, Michael R.; SALINAS, Julio; COLLINGE, David B. 14-3-3 proteins and the response to abiotic and biotic stress. **Plant molecular biology**, v. 50, p. 1031-1039, 2002.

RODRIGUES, Daniela F. et al. Methods for the analysis of transcriptome dynamics. **Toxicology Research**, v. 8, n. 5, p. 597-612, 2019.

RODRIGUEZ-DOMINGUEZ, Celia M.; BRODRIBB, Timothy J. Declining root water transport drives stomatal closure in olive under moderate water stress. **New Phytologist**, v. 225, n. 1, p. 126-134, 2020.

ROONEY, Michael F.; FERL, Robert J. Sequences of three Arabidopsis general regulatory factor genes encoding GF14 (14-3-3) proteins. **Plant Physiology**, v. 107, n. 1, p. 283, 1995.

ROSADO, Tatiana B. et al. Molecular markers reveal limited genetic diversity in a large germplasm collection of the biofuel crop *Jatropha curcas* L. in Brazil. **Crop Science**, v. 50, n. 6, p. 2372-2382, 2010.

ROSENQUIST, Magnus et al. Data mining the Arabidopsis genome reveals fifteen 14-3-3 genes. Expression is demonstrated for two out of five novel genes. **Plant physiology**, v. 127, n. 1, p. 142-149, 2001.

SCHENA, Mark et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 467-470, 1995.

SCHMUTZ, Jeremy et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **nature**, v. 463, n. 7278, p. 178-183, 2010.

SELLSCHOP JPF. Cowpea: *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Field Crop Abstracts**, v. 15, n. 4, p. 259-266, 1962.

SHANNON, Michael C. Adaptation of plants to salinity. **Advances in agronomy**, v. 60, p. 75-120, 1997.

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

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

SHAW, Rahul; TIAN, Xin; XU, Jian. Single-cell transcriptome analysis in plants: advances and challenges. **Molecular Plant**, v. 14, n. 1, p. 115-126, 2021.

SIMON, M. V. et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna* Savi germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting. **Genome**, v. 50, n. 6, p. 538-547, 2007.

SIRICHANDRA, Caroline et al. The guard cell as a single-cell model towards understanding drought tolerance and abscisic acid action. **Journal of experimental botany**, v. 60, n. 5, p. 1439-1463, 2009.

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

SUN, Guiling; XIE, Fuliang; ZHANG, Baohong. Transcriptome-wide identification and stress properties of the 14-3-3 gene family in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). **Functional & integrative genomics**, v. 11, p. 627-636, 2011.

SUN, Miao et al. SAGE is far more sensitive than EST for detecting low-abundance transcripts. **BMC genomics**, v. 5, p. 1-4, 2004.

SUN, Xiaoli et al. A 14-3-3 family protein from wild soybean (*Glycine Soja*) regulates ABA sensitivity in *Arabidopsis*. **PloS one**, v. 10, n. 12, p. e0146163, 2015.

TESTER, Mark; LANGRIDGE, Peter. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. **Science**, v. 327, n. 5967, p. 818-822, 2010.

THOMPSON, Julie D.; GIBSON, Toby J.; HIGGINS, Des G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Current protocols in bioinformatics**, n. 1, p. 2.3. 1-2.3. 22, 2003,

VAN HEUSDEN, H; PAUL, G. 14-3-3 Proteins: Regulators of numerous eukaryotic proteins. **IUBMB life**, v. 57, n. 9, p. 623-629, 2005.

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

VAN HEUSDEN, H; PAUL, G. 14-3-3 Proteins: Regulators of numerous eukaryotic proteins. **IUBMB life**, v. 57, n. 9, p. 623-629, 2005.

VAN-SCHILFGAARDE J. Drainage design for salinity control. In "Soil Salinity and Imigation-Processes and Management" . Springer-Verlag, v. 6, p. 190-197, 1964.

VELCULESCU, Victor E. et al. Serial analysis of gene expression. **Science**, v. 270, n. 5235, p. 484-487, 1995.

VERDCOURT, B. Studies in the Leguminosae-Papilionoideae for the 'Flora of tropical East Africa': III. **Kew Bulletin**, p. 379-447, 1970.

VON BRAUN, Joachim et al. **New risks and opportunities for food security: scenario analyses for 2015 and 2050**. Intl Food Policy Res Inst, 2005.

WAHL, Nepomuk et al. Insights into jatropha projects worldwide-key facts & figures from a global survey. **Centre for Sustainability Management (CSM), Leuphana Universität Lüneburg**, 2012.

WANG, Chuntao et al. SIP1, a novel SOS2 interaction protein, is involved in salt-stress tolerance in *Arabidopsis*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 124, p. 167-174, 2018.

WANG, Lipo; WANG, Yaoli; CHANG, Qing. Feature selection methods for big data bioinformatics: A survey from the search perspective. **Methods**, v. 111, p. 21-31, 2016.

WANG, Yongbin et al. Genome-wide identification and expression analysis of the 14-3-3 gene family in soybean (*Glycine max*). **PeerJ**, v. 7, p. e7950, 2019.

WANI, Shabir H. et al. Marker-assisted breeding for abiotic stress tolerance in crop plants. **Biotechnologies of Crop Improvement, Volume 3: Genomic Approaches**, p. 1-23, 2018.

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

WIELSTRA, Ben et al. Parallel tagged amplicon sequencing of transcriptome-based genetic markers for *Triturus newts* with the Ion Torrent next-generation sequencing platform. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 5, p. 1080-1089, 2014.

WILBUR, Robert L. A synopsis of *Jatropha*, subsection *Eucurcas*, with the description of two new species from Mexico. **Journal of the Elisha Mitchell Scientific Society**, v. 70, n. 1, p. 92-101, 1954.

WILHELM, Brian T.; LANDRY, Josette-Renée. RNA-Seq—quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. **Methods**, v. 48, n. 3, p. 249-257, 2009.

WILSON, Rashaun S.; SWATEK, Kirby N.; THELEN, Jay J. Regulation of the regulators: post-translational modifications, subcellular, and spatiotemporal distribution of plant 14-3-3 proteins. **Frontiers in plant science**, v. 7, p. 611, 2016.

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

XU, Ling et al. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. **Nucleic acids research**, v. 47, n. W1, p. W52-W58, 2019.

XU, Weifeng et al. The tomato 14-3-3 protein TFT4 modulates H⁺ efflux, basipetal auxin transport, and the PKS5-J3 pathway in the root growth response to alkaline stress. **Plant physiology**, v. 163, n. 4, p. 1817-1828, 2013.

YANG, Li et al. Systematic analysis of the G-box Factor 14-3-3 gene family and functional characterization of GF14a in *Brachypodium distachyon*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 117, p. 1-11, 2017.

YAO, Yuan et al. Molecular analysis and expression patterns of the 14-3-3 gene family from *Oryza sativa*. **BMB Reports**, v. 40, n. 3, p. 349-357, 2007.

YASHVARDHINI, Niti et al. Molecular characterization of the 14-3-3 gene family in rice and its expression studies under abiotic stress. **Planta**, v. 247, p. 229-253, 2018.

YOON, Gyeong Mee; KIEBER, Joseph J. 14-3-3 regulates 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase protein turnover in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, v. 25, n. 3, p. 1016-1028, 2013.

ZERBINO, Daniel R.; BIRNEY, Ewan. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. **Genome research**, v. 18, n. 5, p. 821-829, 2008.

ZHANG, Yanyan et al. Phospholipase D α 1 and phosphatidic acid regulate NADPH oxidase activity and production of reactive oxygen species in ABA-mediated stomatal closure in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v. 21, n. 8, p. 2357-2377, 2009.

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

ZIELIŃSKI, Piotr et al. Development, validation and high-throughput analysis of sequence markers in nonmodel species. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 2, p. 352-360, 2014.

APÊNDICES – ARTIGO I

Tabela S1. IDs e transcritos das 14-3-3 de *Vigna unguiculata*, *Vigna radiata*, *Vigna angularis*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* e *Glycine max*.

Transcrito	ID Phytozome	ID_NCBI_transcrito	ID_NCBI_proteína
Gm14-3-3a	Glyma.01G058000	NM_001251494.2	NP_001238423.1
Gm14-3-3b	Glyma.02G115900	NM_001251478.2	NP_001238407.1
Gm14-3-3c	Glyma.02G208700	NM_001252761.2	NP_001239690.1
Gm14-3-3d	Glyma.04G092600	NM_001251460.2	NP_001238389.1
Gm14-3-3e	Glyma.04G099900	NM_001354027.1	NP_001340956.1
Gm14-3-3f	Glyma.05G158100	NM_001354032.1	NP_001340961.1
Gm14-3-3g	Glyma.06G094400	NM_001354041.1	NP_001340970.1
Gm14-3-3h	Glyma.06G101500	NM_001354042.1	NP_001340971.1
Gm14-3-3i	Glyma.07G226000	XM_003528512.5	XP_003528560.2
Gm14-3-3j	Glyma.08G115800	NM_001354062.1	NP_001340991.1
Gm14-3-3k	Glyma.08G363800	NM_001249076.2	NP_001236005.2
Gm14-3-3l	Glyma.12G210400	NM_001348920.1	NP_001335849.1
Gm14-3-3m	Glyma.12G229200	XM_041006130.1	XP_040862064.1
Gm14-3-3n	Glyma.13G270600	NM_001251663.2	NP_001238592.1
Gm14-3-3o	Glyma.13G290900	XM_006591823.4	XP_006591886.1
Gm14-3-3p	Glyma.14G176900	NM_001317441.1	NP_001304370.1
Gm14-3-3q	Glyma.17G208100	NM_001250136.2	NP_001237065.1
Gm14-3-3r	Glyma.18G298300	NM_001354043.1	NP_001340972.1
Gm14-3-3s	Glyma.20G025900	NM_001248724.2	NP_001235653.1
Gm14-3-3t	Glyma.20G043700	XM_041013628.1	XP_040869562.1
Mt14-3-3a	Medtr0137s0020.1	XM_013587113.2	XP_013442567.2
Mt14-3-3b	Medtr2g076960.1	XM_003596362.4	XP_003596410.1
Mt14-3-3c	Medtr2g091225.1	XM_013609788.3	XP_013465242.1
Mt14-3-3d	Medtr2g015980.1	XM_013607097.3	XP_013462551.1
Mt14-3-3e	Medtr3g099380.1	XM_003602775.4	XP_003602823.2
Mt14-3-3f	Medtr3g014060.1	XM_003598420.2	XP_003598468.2
Mt14-3-3g	Medtr3g100620.1	XM_003602893.4	XP_003602941.1
Mt14-3-3h	Medtr5g064580.1	XM_003615112.4	XP_003615160.1
Mt14-3-3i	Medtr5g044160.1	XM_024780676.2	XP_024636444.2
Mt14-3-3j	Medtr4g083060.1	XM_003614003.4	XP_003614051.1
Mt14-3-3k	Medtr8g086270.1	XM_003629715.4	XP_003629763.2
Pv14-3-3a	Phvul.002G102500.1	XM_007157776.1	XP_007157838.1

Pv14-3-3b	Phvul.002G238300.1	XM_007159383.1	XP_007159445.1
Pv14-3-3c	Phvul.003G043200.1	XM_007153468.1	XP_007153530.1
Pv14-3-3d	Phvul.005G095500.1	XM_007149680.1	XP_007149742.1
Pv14-3-3e	Phvul.005G066600.1	XM_007149332.1	XP_007149394.1
Pv14-3-3f	Phvul.008G162500.1	XM_007140982.1	XP_007141044.1
Pv14-3-3g	Phvul.008G004300.1	XM_007139072.1	XP_007139134.1
Pv14-3-3h	Phvul.009G143400.2	XM_007137578.1	XP_007137640.1
Pv14-3-3i	Phvul.009G032500.2	XM_007136209.1	XP_007136271.1
Va14-3-3a	-	XM_017553545.1	XP_017409034.1
Va14-3-3b	-	XM_017550522.1	XP_017406011.1
Va14-3-3c	-	XM_017568111.1	XP_017423600.1
Va14-3-3d	-	XM_017566668.1	XP_017422157.1
Va14-3-3e	-	XM_017566906.1	XP_017422395.1
Va14-3-3f	-	XM_017569790.1	XP_017425279.1
Va14-3-3g	-	XM_017575113.1	XP_017430602.1
Va14-3-3h	-	XM_017581812.1	XP_017437301.1
Va14-3-3i	-	XM_017582793.1	XP_017438282.1
Vr14-3-3a	-	XM_014666556.2	XP_014522042.1
Vr14-3-3b	-	XM_014666806.2	XP_014522292.1
Vr14-3-3c	-	XM_022776698.1	XP_022632419.1
Vr14-3-3d	-	XM_014637461.2	XP_014492947.1
Vr14-3-3e	-	XM_014642399.2	XP_014497885.1
Vr14-3-3f	-	XM_014646048.2	XP_014501534.1
Vr14-3-3g	-	XM_014645640.2	XP_014501126.1
Vr14-3-3h	-	XM_014644184.2	XP_014499670.1
Vr14-3-3i	-	XM_014651547.2	XP_014507033.1
Vr14-3-3j	-	XM_014660088.1	XP_014515574.1
Vu14-3-3a	Vigun02g050200.1	XM_028055860.1	XP_027911661.1
Vu14-3-3b	Vigun03g099100.1	XM_028063511.1	XP_027919312.1
Vu14-3-3c	Vigun03g203200.1	XM_028065303.1	XP_027921104.1
Vu14-3-3d	Vigun05g004800.1.	XM_028072412.1	XP_027928213.1
Vu14-3-3e	Vigun05g208700.1.	XM_028070561.1	XP_027926362.1
Vu14-3-3f	Vigun05g185700.1	XM_028070131.1	XP_027925932.1
Vu14-3-3g	Vigun08g103200.1.	XM_028084528.1	XP_027940329.1
Vu14-3-3h	Vigun09g183900.1	XM_028048811.1	XP_027904612.1
Vu14-3-3i	Vigun09g178000.1	XM_028048059.1	XP_027903860.1

Tabela S2. Transcritos 14-3-3 portadores de tags identificados em feijão-caupu sob estímulo de desidratação radicular e sua regulação (p -value <0,05 e FDR < 0,01) para os acessos sensível (Santo Inácio- SI) e tolerante (Pingo de Ouro – PO) considerando plantas controle (C) e submetidas ao estímulo (T) de 0 à 150m de exposição de raízes ao ar. A quantidade de tags alinhadas a cada transcrito está disposta nas colunas PO(C); PO(T). SI(C) e SI(T). Transcritos *up-regulated* foram designados por UR e *down-regulated* por DR. Transcritos com regulação não significativa foram representados por “ns”

Transc. portador de tag	Transc. correspondente	SI (C)	SI (T)	FC	p -value	FDR	Reg	PO (C)	PO (T)	FC	p -value	FDR	Reg
XM_028055860.1	Vu14-3-3a	870	686	1,01	4,00E-01	4,00E-01	ns	79	702	1,49	2,34E-04	7,00E-04	UR
XM_028063511.1	Vu14-3-3b1	2885	1464	-1,53	2,00E-42	3,00E-41	DR	771	2454	-1,87	5,91E-47	2,00E-45	DR
XM_028063512.1	Vu14-3-3b2	2885	1464	-1,53	2,00E-42	3,00E-41	DR	771	2454	-1,87	5,91E-47	2,00E-45	DR
XM_028063513.1	Vu14-3-3b3	2885	1464	-1,53	2,00E-42	3,00E-41	DR	771	2454	-1,87	5,91E-47	2,00E-45	DR
XM_028072412.1	Vu14-3-3d1	5957	2582	-1,8	1,00E-145	7,00E-144	DR	496	4497	1,52	3,67E-21	5,00E-20	UR
XM_028072413.1	Vu14-3-3d2	5957	2582	-1,8	1,00E-145	7,00E-144	DR	496	4497	1,52	3,67E-21	5,00E-20	UR
XM_028072414.1	Vu14-3-3d3	5957	2582	-1,8	1,00E-145	7,00E-144	DR	496	4497	1,52	3,67E-21	5,00E-20	UR
XM_028070561.1	Vu14-3-3e	8109	4212	-1,5	1,00E-104	5,00E-103	DR	687	5027	1,23	1,17E-07	6,00E-07	UR
XM_028070131.1	Vu14-3-3f1	189	72	-2,04	4,00E-08	2,00E-07	DR	10	112	1,88	2,62E-02	5,00E-02	ns
XM_028070132.1	Vu14-3-3f2	189	72	-2,04	4,00E-08	2,00E-07	DR	10	112	1,88	2,62E-02	5,00E-02	ns
XM_028084528.1	Vu14-3-3fg	6470	5608	1,11	2,00E-09	9,00E-09	UR	737	9619	2,19	3,56E-117	3,00E-115	UR
XM_028048811.1	Vu14-3-3h	432	374	1,11	7,00E-02	1,00E-01	ns	156	503	-1,85	9,64E-11	7,00E-10	DR
XM_028048059.1	Vu14-3-3i1	6447	5140	1,02	1,00E-01	1,00E-01	ns	237	7416	5,25	9,32E-243	2,00E-240	UR
XM_028048060.1	Vu14-3-3i2	6447	5140	1,02	1,00E-01	1,00E-01	ns	237	7416	5,25	9,32E-243	2,00E-240	UR

Tabela S3. Transcritos 14-3-3 RNA-Seq identificados em feijão-caupu sob estímulo de desidratação radicular e sua regulação (p -value <0,05) para o acesso Pingo de Ouro (PO) considerando plantas controle (C) e submetidas ao estímulo (T) de 25 e 150m de exposição de raízes ao ar. Transcritos com domínio completo e confirmado foram identificados por “C”; transcritos com domínio confirmado e incompleto por “I” e aqueles com domínio não confirmado foram representados por “-” na terceira coluna. Transcritos *up-regulated* foram designados por UR e *down-regulated* por DR. Transcritos com regulação não significativa foram representados por “ns”

Transc. Correspondente	Transc. RNA-Seq	Conf. Domínio	log2FC (25m)	p-value (25m)	FDR (25m)	Reg (25m)	log2FC (150m)	p-value (150m)	FDR (150m)	Reg (150m)
Vu14-3-3a	TR111011 c0_g1_i1	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	0,16591	1	1	ns
Vu14-3-3a	TR26756 c0_g1_i1	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	-0,4226	1	1	ns
Vu14-3-3a	TR26756 c0_g2_i1	-	2,20469	0,17193	0,52969	ns	-4,0153	0,01353	0,10827	DR
Vu14-3-3 ^a	TR26756 c0_g2_i2	C	0,3969	0,10642	0,41198	ns	-0,6403	0,03392	0,20319	ns
Vu14-3-3a	TR26756 c0_g2_i3	C	2,3641	0,09518	0,38465	ns	-0,3827	0,86294	1	ns
Vu14-3-3a	TR26756 c0_g2_i4	-	0,20051	1	1	ns	-1,2833	0,34425	0,73383	ns
Vu14-3-3a	TR4578 c0_g1_i1	I	1,31328	0,17184	0,52969	ns	-1,185	0,23349	0,63478	ns
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i1	C	0,43797	0,07305	0,33074	ns	0,02504	0,91611	1	ns
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i12	C	0,73512	0,32517	0,72882	ns	1,44447	0,04216	0,23393	UR
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i13	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i2	C	0,57244	0,8385	1	ns	-5,1863	0,00703	0,06813	DR
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i4	C	-1,698	0,09846	0,39249	ns	0,71553	0,32384	0,73383	ns
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i6	C	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	ns
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i8	I	-0,1762	0,92101	1	ns	-2,3463	0,11915	0,44199	ns
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i9	I	-1,5051	0,10301	0,40352	ns	1,84538	0,09133	0,37677	ns
Vu14-3-3b1	TR164213 c0_g1_i1	I	-0,1261	1	1	ns	0,6913	0,33185	0,73383	ns

Vu14-3-3b1	TR164213 c0_g2_i1	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	0,21064	1	1	ns
Vu14-3-3b1	TR159113 c0_g1_i5	I	0,80901	0,00235	0,03187	DR	0,46438	0,07674	0,34135	ns
Vu14-3-3b2	TR159113 c0_g1_i10	I	-5,7435	0,00069	0,01259	DR	2,861	0,07829	0,34485	ns
Vu14-3-3b2	TR159113 c0_g1_i11	C	1,20412	0,06767	0,31595	ns	-1,7276	0,10086	0,40003	ns
Vu14-3-3b2	TR159113 c0_g1_i14	C	-0,3385	0,15956	0,51221	ns	1,13792	4,30E-06	0,00018	UR
Vu14-3-3b2	TR159113 c0_g1_i15	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	-2,4954	0,53092	0,84761	ns
Vu14-3-3b2	TR159113 c0_g1_i7	-	-2,0676	0,67079	0,91025	ns	2,47037	0,47216	0,84291	ns
Vu14-3-3b2	TR76890 c0_g1_i1	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	2,01005	0,63752	0,92104	ns
Vu14-3-3b3	TR117165 c0_g1_i1	-	1,56854	0,13978	0,47577	ns	1,49526	0,15892	0,51568	ns
Vu14-3-3b3	TR159113 c0_g1_i3	-	0,6676	0,01072	0,09467	ns	-0,1288	0,63386	0,92104	ns
Vu14-3-3c	TR25521 c0_g1_i1	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3c	TR26756 c0_g3_i1	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3c	TR26756 c0_g3_i2	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i5	I	-2,2746	0,01407	0,11428	DR	0,01547	1	1	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i12	C	4,52186	0,00011	0,003	UR	1,07989	0,45933	0,84291	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i7	C	7,31714	1,70E-12	5,90E-10	UR	1,80902	0,16488	0,52472	ns
Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i1	-	-0,6334	0,29411	0,68489	ns	1,41733	0,00168	0,02347	UR
Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i2	-	-0,1029	0,749	0,96099	ns	0,01878	0,95286	1	ns
Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i3	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i4	-	-3,883	0,08573	0,3628	ns	4,58046	0,01433	0,11273	UR
Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i5	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i6	C	7,32095	3,60E-08	3,50E-06	UR	-1,1622	0,3787	0,76558	ns
Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i6	-	-1,3612	0,27256	0,65843	ns	0,12311	0,92201	1	ns

Vu14-3-3d	TR117998 c0_g1_i7	-	-1,8309	0,13395	0,46362	ns	2,47076	0,02398	0,16095	UR
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i10	C	0,39217	0,84185	1	ns	-3,6371	0,00457	0,04961	DR
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i1	I	0,79266	0,64548	0,90552	ns	0,31339	0,9002	1	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i11	C	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i2	C	0,26039	0,94287	1	ns	4,61099	0,06823	0,31651	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i4	I	-1,2166	0,05918	0,29141	ns	0,6489	0,19906	0,57492	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i8	C	-1,0047	0,06821	0,3173	ns	-0,0095	1	1	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i9	C	-0,3949	0,2308	0,62333	ns	-0,0405	0,8581	1	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g1_i3	C	-1,2722	0,00013	0,00337	DR	0,2277	0,40634	0,7989	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g2_i1	-	-2,4325	0,36727	0,7485	ns	0,58165	0,60409	0,91073	ns
Vu14-3-3d	TR159738 c0_g2_i2	-	-2,2312	0,33486	0,73218	ns	0,67327	1	1	ns
Vu14-3-3e	TR11938 c0_g1_i4	I	8,554524	7,36E-21	1,16E-17	UR	-7,40795	1,11E-17	4,93E-15	DR
Vu14-3-3e	TR11938 c0_g1_i1	-	0,572636	0,163737	0,518865	ns	-0,58677	0,119061	0,441995	ns
Vu14-3-3e	TR11938 c0_g1_i2	C	-0,13954	0,53986	0,848517	ns	-0,12964	0,576404	0,882717	ns
Vu14-3-3e	TR11938 c0_g1_i3	C	-0,22225	0,636567	0,905516	ns	0,550307	0,206135	0,585084	ns
Vu14-3-3e	TR11938 c1_g1_i1	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3f	TR108102 c0_g1_i1	I	0,11453	1	1	ns	-2,1642	0,3317	0,73383	ns
Vu14-3-3f	TR130253 c0_g1_i1	I	0,24264	1	1	ns	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3f	TR151383 c1_g2_i1	I	3,21527	0,06841	0,31786	ns	-1,5431	0,35538	0,738	ns
Vu14-3-3f	TR151383 c1_g2_i2	C	-0,5452	0,51482	0,83911	ns	0,31187	0,72847	0,94992	ns
Vu14-3-3f	TR151383 c1_g2_i3	I	0,45833	0,72903	0,94729	ns	-2,7967	0,15565	0,51154	ns
Vu14-3-3f	TR151383 c1_g2_i4	C	1,08768	0,00131	0,02058	UR	-0,5101	0,12446	0,45245	ns
Vu14-3-3f	TR46105 c0_g1_i1	-	1,98758	0,51629	0,83911	ns	0,21382	1	1	ns

Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i3	-	-0,8718	0,01106	0,09686	ns	-0,0706	0,86284	1	ns
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i6	-	1,63157	0,04549	0,24785	UR	-3,0207	0,00625	0,06246	DR
Vu14-3-3g	TR12508 c0_g1_i1	-	1,301	0,03127	0,19525	UR	-0,2346	0,65921	0,92136	ns
Vu14-3-3g	TR103527 c0_g1_i1	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i1	C	-1,4202	0,16813	0,52664	ns	2,66293	0,07979	0,34928	ns
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i2	-	0,189	0,73902	0,95412	ns	-2,4909	0,00067	0,01154	DR
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i4	C	0,06704	0,77195	0,97867	ns	0,24333	0,25335	0,64412	ns
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i5	-	0,49779	0,74121	0,95552	ns	-0,0098	1	1	ns
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i7	-	-1,7728	0,27659	0,66345	ns	2,7799	0,16466	0,52427	ns
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i8	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	4,34224	0,09191	0,37818	ns
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g3_i9	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	4,99172	0,00103	0,01609	UR
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g5_i1	C	1,98903	0,51664	0,83911	ns	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g5_i2	C	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3g	TR65856 c3_g5_i3	C	#N/D	#N/D	#N/D	-	-1,7737	0,5143	0,84291	ns
Vu14-3-3h	TR119972 c0_g1_i1	-	-0,3631	0,8453	1	ns	-0,141	1	1	ns
Vu14-3-3h	TR30311 c0_g2_i2	C	-2,4138	2,10E-07	1,60E-05	DR	-1,9321	9,70E-06	0,00036	DR
Vu14-3-3h	TR30311 c0_g1_i1	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3h	TR30311 c0_g2_i1	C	-0,0084	0,9719	1	ns	0,11386	0,61649	0,92104	ns
Vu14-3-3h	TR30311 c0_g3_i1	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3h	TR31950 c0_g1_i1	-	0,86979	0,53471	0,84371	ns	-0,3325	0,73342	0,95381	ns
Vu14-3-3i1	TR65856 c3_g4_i3	C	-0,5399	0,01915	0,14141	ns	0,51564	0,03162	0,19349	ns
Vu14-3-3i1	TR107176 c0_g1_i1	I	0,82087	0,24528	0,64556	ns	0,06546	0,92668	1	ns
Vu14-3-3i1	TR65856 c3_g2_i1	-	2,04519	2,70E-06	0,00014	UR	-1,6491	0,00017	0,00379	DR

Vu14-3-3i1	TR30727 c0_g1_i1	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Vu14-3-3i2	TR65856 c3_g4_i2	C	-1,049	0,01818	0,13647	DR	-0,8082	0,18617	0,55572	ns
Vu14-3-3i2	TR65856 c3_g4_i1	C	-1,415	0,02576	0,17228	DR	-0,0072	1	1	ns
Pv14-3-3e	TR91559 c0_g1_i1	-	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-
Pv14-3-3f	TR117911 c0_g1_i2	I	#N/D	#N/D	#N/D	-	#N/D	#N/D	#N/D	-

APÊNDICE – ARTIGO II

Tabela S1. IDs e transcritos das 14-3-3 de *Jatropha curcas*, *Manihot esculenta*, *Ricinus communis*, *Populus trichocarpa* e *Hevea brasiliensis*.

ID	Transcritos	Proteínas
Jc14-3-3a	XM_012213768.3	XP_012069158.1
Jc14-3-3b	XM_012212489.3	XP_012067879.1
Jc14-3-3c	XM_012212515.3	XP_012067905.1
Jc14-3-3d	XM_012222558.2	XP_012077948.1
Jc14-3-3e	XM_012236378.3	XP_012091768.1
Jc14-3-3f	XM_012223196.3	XP_012078586.2
Jc14-3-3g	XM_012212372.3	XP_012067762.1
Jc14-3-3h	XM_012212578.3	XP_012067968.2
Jc14-3-3i	XM_012226254.3	XP_012081644.1
Me14-3-3a	XM_021738151.2	XP_021593843.1
Me14-3-3b	XM_021770519.2	XP_021626211.1
Me14-3-3c	XM_021778825.2	XP_021634517.1
Me14-3-3d	XM_021744078.2	XP_021599770.1
Me14-3-3e	XM_021747355.2	XP_021603047.1
Me14-3-3f	XM_021748522.2	XP_021604214.1
Me14-3-3g	XM_021749470.1	XP_021605162.1
Me14-3-3h	XM_021749565.2	XP_021605257.1
Me14-3-3i	XM_021756805.2	XP_021612497.1
Me14-3-3j	XM_021763282.1	XP_021618974.1
Me14-3-3k	XM_021768878.2	XP_021624570.1
Me14-3-3l	XM_021774609.2	XP_021630301.1
Me14-3-3m	XM_021739766.2	XP_021595458.1
Me14-3-3n	XM_043953623.1	XP_043809558.1
Me14-3-3o	XM_043953064.1	XP_043808999.1
Me14-3-3p	XM_021745970.2	XP_021601662.1
Rc14-3-3a	XM_002513882.4	XP_002513928.1
Rc14-3-3b	XM_002513910.4	XP_002513956.1
Rc14-3-3c	XM_002516700.4	XP_002516746.2
Rc14-3-3d	XM_002513970.4	XP_002514016.1
Rc14-3-3e	XM_002523330.4	XP_002523376.1

Rc14-3-3f	XM_002512047.4	XP_002512093.1
Rc14-3-3g	XM_048376593.1	XP_048232550.1
Pt14-3-3a	XM_006370099.2	XP_006370161.1
Pt14-3-3b	XM_024595741.1	XP_024451509.1
Pt14-3-3c	XM_002301035.3	XP_002301071.1
Pt14-4-3d	XM_002302296.2	XP_002302332.1
Pt14-3-3e	XM_024594565.1	XP_024450333.1
Pt14-3-3f	XM_006384148.2	XP_006384210.2
Pt14-3-3g	XM_002306537.3	XP_002306573.1
Pt14-3-3h	XM_002306509.3	XP_002306545.1
Pt14-3-3i	XM_024602382.1	XP_024458150.1
P14-3-3j	XM_002311299.3	XP_002311335.1
Pt14-3-3k	XM_002316055.3	XP_002316091.1
Pt14-3-3l	XM_002316827.3	XP_002316863.1
Pt14-3-3m	XM_006373384.2	XP_006373446.1
Pt14-3-3n	XM_024593261.1	XP_024449029.1
Hb14-3-3a	XM_021779451.1	XP_021635143.1
Hb14-3-3b	XM_021782797.1	XP_021638489.1
Hb14-3-3c	XM_021783125.1	XP_021638817.1
Hb14-3-3d	XM_021784058.1	XP_021639750.1
Hb14-3-3e	XM_021786509.1	XP_021642201.1
Hb14-3-3f	XM_021786705.1	XP_021642397.1
Hb14-3-3g	XM_021788186.1	XP_021643878.1
Hb14-3-3h	XM_021789222.1	XP_021644914.1
Hb14-3-3i	XM_021790090.1	XP_021645782.1
Hb14-3-3j	XM_021793896.1	XP_021649588.1
Hb14-3-3k	XM_021801863.1	XP_021657555.1
Hb14-3-3l	XM_021804045.1	XP_021659737.1
Hb14-3-3m	XM_021805556.1	XP_021661248.1
Hb14-3-3n	XM_021810171.1	XP_021665863.1
Hb14-3-3o	XM_021821982.1	XP_021677674.1
Hb14-3-3p	XM_021825000.1	XP_021680692.1
Hb14-3-3q	XM_021828506.1	XP_021684198.1
Hb14-3-3r	XM_021832388.1	XP_021688080.1
Hb14-3-3s	XM_021833109.1	XP_021688801.1
Hb14-3-3t	XM_021834946.1	XP_021690638.1

Tabela S2. Transcritos 14-3-3 RNA-Seq identificados em pinhão-mansó sob estímulo de salinidade NaCl (150Mm) e sua regulação (*p-value* <0,05) para o acesso 171 considerando plantas controle (C) e submetidas ao estímulo (T) de 3 horas de exposição ao NaCl Transcritos *up-regulated* foram designados por UR e *down-regulated* por DR. Transcritos com regulação não significativa foram representados por “ns”

ID	test_id	gene_id	Locus	log2FC	Reg
Jc14-3-3a	TCONS_00001920	XLOC_001559	XM_012213768.3:0-1198	0,736467	ns
Jc14-3-3b	TCONS_00001371	XLOC_001123	XM_012212489.3:5-1398	0,771777	ns
Jc14-3-3c	TCONS_00001383	XLOC_001135	XM_012212515.3:2-1334	0,443161	ns
Jc14-3-3d	TCONS_00005584	XLOC_004490	XM_012222558.2:0-1433	1,39561	UR
Jc14-3-3e	TCONS_00011442	XLOC_009234	XM_012236378.3:11-1241	0,779817	ns
Jc14-3-3f	TCONS_00005834	XLOC_004702	XM_012223196.3:81-1316	1,02212	UR
Jc14-3-3g	TCONS_00001320	XLOC_001080	XM_012212372.3:108-1432	-0,269726	ns
Jc14-3-3h	TCONS_00001417	XLOC_001166	XM_012212578.3:0-1096	1,85743	UR