



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

AMANDA CORDEIRO DE MELO SOUZA

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS VIAS METABÓLICAS DO INOSITOL E DE
OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE,
EM FEIJÃO-CAUPI SOB ESTRESSE ABIÓTICO E BIÓTICO**

Recife

2019

AMANDA CORDEIRO DE MELO SOUZA

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS VIAS METABÓLICAS DO INOSITOL E DE
OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE,
EM FEIJÃO-CAUPI SOB ESTRESSE ABIÓTICO E BIÓTICO**

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

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Profº. Dr. Ederson Akio Kido

Coorientador: Dr. Antonio Félix da Costa

Recife

2019

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Souza, Amanda Cordeiro de Melo

Análise transcriptômica das vias metabólicas do inositol e de oligossacarídeos da família rafinose, em feijão-caupi sob estresse abiótico e biótico / Amanda Cordeiro de Melo Souza - 2019.

153 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ederson Akio Kido

Coorientador: Antonio Félix da Costa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2019.

Inclui referências.

1. Feijão-caupi 2. Expressão gênica 3. Bioinformática

I. Kido, Ederson Akio (Orient.) II. Costa, Antonio Félix da (Coorient.)

III. Título

583.74

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-376

AMANDA CORDEIRO DE MELO SOUZA

**ANÁLISE TRANSCRIPTÔMICA DAS VIAS METABÓLICAS DO INOSITOL E DE
OLIGOSSACARÍDEOS DA FAMÍLIA RAFINOSE,
EM FEIJÃO-CAUPI SOB ESTRESSE ABIÓTICO E BIÓTICO**

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

Aprovada em: 01 / 08 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Ederson Akio Kido (Orientador)

Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Valdir de Queiroz Balbino (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Wilson José da Silva Júnior (Examinador Interno)

Universidade Federal de Pernambuco

Profª Drª. Flavia Figueira Aburjaile (Examinadora Interna)

Universidade Federal de Pernambuco

Drª. Mariele Porto Carneiro Leão (Examinadora Externa)

Instituto Agrônomo de Pernambuco

Aos pesquisadores e educadores brasileiros,

*com amor, **dedico.***

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me faz encontrar a paz, me faz acreditar no amor, e por me conceder sabedoria, paciência e humildade.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela possibilidade de realização do Doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelos ensinamentos compartilhados.

Agradeço à FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco) pela concessão da bolsa de estudos e pela possibilidade da realização de parceria com o IPA.

Agradeço ao IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco) que como Instituto “abraça” pesquisadores do Estado de Pernambuco e do Brasil, possibilitando infraestrutura e acesso a pesquisadores em diversas linhas de trabalho.

Agradeço profundamente ao Prof. Dr. Éderson Akio Kido, por ter me orientado durante o Doutorado, por confiar no trabalho, por me aconselhar e me guiar durante esses anos, pelo exemplo de dedicação como professor e pesquisador.

Agradeço enormemente ao Dr. Antonio Félix da Costa, por sua co-orientação desde o Mestrado, por sua amizade a qualquer momento, e por ser uma inspiração como pessoa e profissional. Gratidão por nos acompanhar nos trabalhos e experimentos em horários e dias “malucos” (feriados, finais de semana, desde a madrugada até tarde da noite), e nos aconselhar sempre que possível.

Estendo meus agradecimentos aos amigos do Laboratório de Genética Molecular, cada um com seu espaço e importância durante a minha caminhada. Manassés Daniel, Valesca Pandolfi e Neto, obrigada pelo apoio e pela ajuda sempre que necessária.

Agradeço aos amigos do departamento de Genética, pela atenção e apoio durante os dias de sufoco.

Agradeço aos amigos do IPA pelos ensinamentos, dedicação e amizade, especialmente a Emmanuelle Araújo, Luciana Gonçalves e Mariele Porto.

Agradeço aos meus pais pela educação que me ofereceram, por serem uma inspiração, exemplo de dedicação, determinação, coragem, trabalho, otimismo e humildade. Obrigada por me apoiarem em cada decisão e me ensinarem que não somos perfeitos, nem temos que fingir ser, mas o importante é fazermos o nosso melhor todos os dias.

Ao meu irmão, por ter me apoiado e motivado durante a caminhada, e me ensinar todos os que devemos acreditar em nós mesmos e no nosso poder de cocriar nossa realidade. Gratidão pela sua vida.

Ao meu noivo, por acreditar todos os dias na minha potencialidade como pesquisadora e profissional, por me fazer ser uma pessoa melhor, por me ajudar cada segundo do dia, desde uma palavra amiga, carregar o botijão de nitrogênio líquido comigo, até me levar para trabalhar aos finais de semana. Obrigada por estar nessa jornada comigo e por se dedicar para torna-la tão especial.

Aos meus familiares, em especial a minha avó, exemplo de professora e historiadora, agradeço por toda a inspiração e carinho.

Aos meus amigos que não estão presentes na rotina de trabalho, mas que de alguma forma me ajudaram a acreditar ainda mais que existem pessoas do bem, existem pessoas que se inspiram em você e existem motivos sim para acreditar que fazemos a diferença no mundo, mesmo que seja uma gota no oceano.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho.

Minha gratidão do fundo do coração.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo de busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.”

(FREIRE, P. 1996, p. 16)

RESUMO

As plantas desenvolveram, ao longo do processo evolutivo, mecanismos moleculares de ajuste fisiológico para enfrentar mudanças adversas, tais como estresses abióticos e bióticos, assim como a indução de respostas específicas às condições estressantes impostas, minimizando as perdas agrícolas. Existem moléculas com múltiplos efeitos no metabolismo vegetal, envolvidas nos mecanismos de adaptação, incluindo mudanças em nível fisiológico, e relacionados a produção de mensageiros secundários, desintoxicação, homeostase. Neste trabalho, foram identificados transcritos e proteínas das vias metabólicas em questão, por meio de análise *in silico*, utilizando a técnica HT-SuperSAGE. Para validar o método, foram identificadas e alinhadas *unitags* SuperSAGE de feijão-caupi, a partir de BLASTn, em ESTs de feijão-caupi disponíveis nos bancos de dados locais. Posteriormente, as ESTs de feijão-caupi com *tags* ancoradas, foram alinhadas, via BLASTx, com sondas de feijão comum e feijão azuki para a melhor compreensão do modelo em feijão-caupi, as quais contam com enzimas mapeadas nas vias. Os resultados obtidos identificaram em relação ao estresse salino, 77.753 *unitags* alinhando com 196.764 ESTs de feijão-caupi, e na via de inositol 385 transcritos de feijão-caupi ancorando 57 *unitags*, envolvendo 21 enzimas de feijão comum. No estresse de virose, 20.645 *unitags* SuperSAGE alinharam com 106.670 ESTs de feijão-caupi. Na via do inositol, foram identificados 171 transcritos de feijão-caupi ancorando 46 *unitags*, cujos produtos de tradução foram similares com 11 sequências sondas de proteínas de feijão azuki. Considerando o metabolismo de rafinose, foram identificados 77 diferentes ESTs de feijão-caupi ancorando 12 *unitags*, cujos produtos de tradução foram similares com 3 sequências sondas de proteínas de feijão azuki. Com base nos resultados foi possível: a) identificar transcritos com *unitags* diferencialmente expressas; b) mapear componentes previstos na via de inositol (58 %), em resposta a salinidade, e nas vias do inositol (45 %) e rafinose (60 %) em resposta a estresse biótico; c) propor nove primers eficientes para RT-qPCR, amplificando componentes das vias analisadas; d) identificar respostas individualizadas, de genótipos tolerante, sensível e resistente, nas orquestrações das vias de metabolismo. Em conjunto, os resultados contribuem para uma melhor compreensão das respostas de tolerância e resistência da planta aos estresses estudados, a partir da ação dos genes expressos por diferentes genótipos de feijão-caupi.

Palavras-chave: Feijão-caupi. Estresse. Bioinformática. Expressão gênica.

ABSTRACT

During the evolutionary process, plants developed molecular mechanisms of physiological adjustment to cope with adverse changes, such as abiotic and biotic stresses, as well as the induction of specific responses to the stressful conditions imposed, minimizing agricultural losses. There are molecules with multiple effects on plant metabolism, involved in the mechanisms of adaptation, including physiological changes, and related to secondary messenger production, detoxification, homeostasis. In this work, transcripts and proteins of the metabolic pathways in question were identified by *in silico* analysis using the HT-SuperSAGE technique. To validate the method, cowpea SuperSAGE unitags were identified and aligned from BLASTn in ESTs available from local databases. Later, the tagged cowpea ESTs were aligned via BLASTx with common bean and azuki bean probes for a better understanding of the cowpea model, which have enzymes mapped in the pathways. In relation to salt stress, 77,753 unitags aligned with 196,764 cowpea ESTs and 385 cowpea transcripts anchoring 57 unitags, involving 21 common bean enzymes, were identified. In biotic stress, 20,645 SuperSAGE unitags aligned with 106,670 cowpea ESTs. In the inositol pathway, 171 cowpea transcripts were identified anchoring 46 unitags, whose translation products were similar with 11 sequences of azuki bean protein probes. Considering the metabolism of raffinose, 77 different cowpea ESTs were identified, anchoring 12 unitags, whose translation products were similar with 3 sequences of azuki bean protein probes. Based on the results it was possible to: a) identify transcripts with differentially expressed unitags; b) map predicted components in the inositol pathway (58%) in response to salinity and inositol pathway (45%) and raffinose pathway (60%) in response to biotic stress; c) propose nine efficient primers for RT-qPCR, amplifying components of the analyzed pathways; d) identify individualized responses of tolerant, sensitive and resistant genotypes in the orchestration of metabolism pathways. Together, the results contribute to a better understanding of the tolerance and resistance responses of the plant to the studied stresses, from the action of genes expressed by different cowpea genotypes.

Keywords: Cowpea. Stress. Bioinformatics. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 – Planta de feijão-caupi	23
Figura 2 – Variação na coloração do tegumento da semente de feijão-caupi	24
Figura 3 – Estrutura da flor de feijão-caupi	25
Figura 4 – Esquema da interação planta – estresse ambiental para geração de respostas ambientais	31
Figura 5 – Sintomas do mosaico do feijão-caupi transmitido por pulgão (cabmv)	33
Figura 6 – Esquema da via metabólica de síntese de oligossacarídeos de rafinose. UDP-GLC: uridina difosfato-glicose; UDP-GAL: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; GLC6P: glicose-6-fosfato.....	37

Artigo I

Figure 1 – Inositol phosphate metabolism from the KEGG pathway database. the stereoisomers (highlighted in blue); the phosphorylated derivatives [inositol (poly)phosphates (highlighted in orange) and (poly)phosphoinositides (highlighted in red)]; the methylated derivatives (highlighted in green); the oxygenated derivatives (highlighted in green); and others (highlighted in purple)	53
Figure 2 – The galactose metabolism from the KEGG pathway database. highlighted in red are the enzymatic reactions associated with the metabolism of raffinose family oligosaccharides.....	54
Figure 3 – KEGG pathway database diagrams presenting: (a) inositol metabolism; (b) galactose metabolism, showing the raffinose family oligosaccharides (highlighted in red). green box: enzymes with transcriptional modulation data available from stress assays. red box: enzymes without transcriptional modulation data available in the literature. yellow box: enzymes not covered in this review.....	62

Artigo II

Figure 1 – Flowchart of the steps of the cowpea test under saline stress (100 mM NaCl)...	75
---	----

Figure 2 – Venn diagram with ht-supersage tags totals. (a) - up-regulated (UR) and down-regulated (DR) of cowpea roots under saline stress (100 mM NaCl) of contrasts PT (cultivar Pitiuba, under stress <i>versus</i> non-stressed control) and BR (cultivar BR-14 Mulato).....	76
Figure 3 – Quantitative distribution of unitags regulation observed in different ht-supersage contrasts libraries of cowpea under saline stress (bulk 30, 60, 90 min) in relation to the negative control, with regulations UR (up-regulated), DR (down-regulated) and not significant (n.s.; $p < 0.05$).....	77
Figure 4 – Hierarchical clustering of the inositol pathway in response to saline stress (bulk 30, 60, 90 min) in HT-SuperSAGE libraries in relation to the negative control. 1 - in relation to enzymes and various contrasts - red: up-regulated unitags; green: down-regulated unitags; black: n.s. unitags. 2: fold change of the cultivar Pitiuba; fold change of the cultivar BR-14 Mulato.....	80
Figure 5 – Mapping of gene expression in the inositol pathway, according to the in silico analysis of HT-SuperSAGE unitags in: (a) cultivar Pitiuba; (b) cultivar BR-14 Mulato	84
Figure 6 – Mapping of gene expression in the inositol pathway in the cultivar Pitiuba, according to in silico analysis of HT-SuperSAGE unitags and in rtq-pcr in: (a) HT-SuperSAGE, (b) RTq-PCR in the time of 30 minutes, (c) RTq-PCR in the time of 90 minutes	86
Figure 7 – Mapping of gene expression in the inositol pathway in the cultivar BR-14 Mulato, according to in silico analysis of HT-SuperSAGE unitags and in RTq-PCR	87

Artigo III

Figura 1 – Diagramas metabólicos do banco de dados KEGG: a - via de inositol fosfatos; b - via de galactose. * os nós laranja representam enzimas com sequências <i>seeds</i> proteicas disponíveis para o feijão azuki. * asterísticos azuis representam o metabolismo dos oligossacarídeos da família rafinose (RFOs)	99
Figura 2 – Diagrama de Venn com <i>tags</i> HT-SuperSAGE de feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV; 3T: <i>bulk</i> 30, 60, 90 min; e T4: 16h).	102
Figura 3 – Diagrama de Venn com <i>tags</i> HT-SuperSAGE de feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV; 3T: <i>bulk</i> 30, 60, 90 min; e T4: 16h), presentes na via de inositol	103

Figura 4 – Diagrama de Venn com <i>tags</i> HT-SuperSAGE de feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV; 3T: <i>bulk</i> 30, 60, 90 min; e T4: 16h), presentes no metabolismo de rafinose	105
Figura 5 – Clusterização hierárquica em resposta ao estresse de virose nas HT-SuperSAGE em relação ao controle negativo na via de inositol. 1 - em relação às enzimas, e os vários contrastes - vermelho: <i>unitags</i> UR; verde: <i>unitags</i> DR; preto: <i>unitags</i> n.s. 2 - fold change do tempo precoce (3T: <i>bulk</i> 30, 60 e 90 min); fold change do tempo tardio (T4: 16 h)	106
Figura 6 – Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) na via metabólica de inositol, conforme a análise <i>in silico</i> de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE	110
Figura 7 – Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) no metabolismo rafinose, conforme a análise <i>in silico</i> de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE.	111
Figura 8 – Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) na via metabólica de inositol, conforme a RTq-PCR e a análise <i>in silico</i> de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE.....	115
Figura 9 – Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) na via metabólica de inositol, conforme a RTq-PCR e a análise <i>in silico</i> de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE.....	116
Figura 10 – Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) no metabolismo de RFOs, conforme a RTq-PCR e a análise <i>in silico</i> de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE.....	117
Figura 11 – Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) no metabolismo de RFOs, conforme a RTq-PCR e a análise <i>in silico</i> de <i>unitags</i> HT-SuperSAGE.....	118

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Estimativa de área plantada, produtividade e produção de grãos de feijão-caupi no Brasil.....27

Tabela 2 – Períodos, metas e atividades realizadas durante a introdução de cultivares de feijão-caupi no Brasil.....29

Artigo I

Table 1 – Transgenic and knockout plant assays available in the literature related to (poly)phosphoinositides and inositol (poly)phosphates. relevant information: ec number of the enzyme coded by the studied gene, plant donor species, the genetically modified organisms (transformants), the modulation of the studied gene, the analyzed stress condition, the impact on plant tolerance and physiology (additional details, please see the legends)58

Artigo II

Table 1 – EC number (enzyme commission numbers) of the inositol pathway, KO (KEGG orthology) of the protein seed sequences of common bean, with respective annotations and ID according to the KEGG database, confirmed by the NCBI database, and short name according to the CDD (conserved domain database)78

Table 2 – Identification of ests of cowpea mapped in the ins pathway, with their respective unitags of the cultivars tolerant and sensitive under saline stress, modulation [FC (Fold Change)], regulation of their expression and quantitative analysis by libraries analyzed in tags per million (PT3T, PTC, BR3T E BRC) 81

Table 3 – Proposed candidate genes and their results based on in silico analysis of HT-SuperSAGE unitags expressed by bulks of tolerant and sensitive cultivars e its relative expression by rt-qpcr using cdnas from cowpea of roots of each cultivar after 30 and 90 minutes under salinity stress..... 85

Artigo III

Tabela 1 – Número EC (*enzyme commission numbers*) do metabolismo de inositol, KO (KEGG ORTHOLOGY) das *seeds* de feijão azuki com suas respectivas anotações, sigla da

enzima, ID de acordo com o banco de dados KEGG, confirmado pelo banco de dados NCBI, e abreviação de acordo com o CDD (*conserved domain database*) 104

Tabela 2 – Número EC (*enzyme commission numbers*) do metabolismo de rfos, ko (kegg orthology) das *seeds* de feijão azuki com suas respectivas anotações, sigla da enzima, id de acordo com o banco de dados KEGG, confirmado pelo banco de dados NCBI, e abreviação de acordo com o CDD (*conserved domain database*) 105

Tabela 3 – Identificação das ESTs de feijão-caupi mapeadas na via de inositol, com suas respectivas *unitags* sob estresse biótico (CABMV; *bulk* 30, 60, 90 min; e 16h), modulação [FC (Fold Change)], regulação da expressão das mesmas, e quantitativo dessas por bibliotecas analisadas em *tags* por milhão [ITP3T/ ITPIC (3T/IC), ITPT4 / ITPICN (T4/IC)] 108

Tabela 4 – Identificação das ESTs de feijão-caupi mapeadas no metabolismo de RFOs, com suas respectivas *unitags* sob estresse biótico (CABMV; *bulk* 30, 60, 90 min; e 16h), modulação [FC (Fold Change)], regulação da expressão das mesmas, e quantitativo dessas por bibliotecas analisadas em *tags* por milhão [ITP3T/ ITPIC (3T/IC), ITPT4 / ITPICN (T4/IC)] 109

Tabela 5 – Genes candidatos propostos e seus resultados baseados na análise *in silico* de *unitags* HT-SuperSAGE expressas do genótipo IT85F-2687 e sua expressão relativa por RT-qPCR, utilizando cDNAs de feijão-caupi de folhas após 90 minutos e 16 horas sob condições de estresse biótico 113

LISTA DE SIGLAS

ABA	Ácido abscísico
AsA	Ácido ascórbico
α -GAL	Alfa-galactosidase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BGMV	Bean golden mosaic vírus
BRENDA	Braunschweig Enzyme Database
Ca	Cálcio
CABMV	Cowpea aphid-borne mosaic vírus
CaMV	Cauliflower mosaic virus
CDD	Conserved Domain Database
cDNA	DNA complementar
CGMV	Cowpea golden mosaic vírus
Cl ⁻	Ânion cloreto
CMV	Cucumber mosaic vírus
CO ₂	Dióxido de carbono
CPRMV	Cowpea rugose mosaic vírus
CpSMV	Cowpea severe mosaic vírus
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Down-regulated
EC	Enzyme Commission Number
ESTs	Expressed Sequence Tags
FC	Fold Change
Fe	Ferro
GMO	Genetically modified organism
GS	Galactinol sintase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IMPase	Inositol monophosphatase
IMT1	Myo-inositol O-methyl transferase
Ins	Inositol
InsP5-ptase	Inositol polyphosphate 5-phosphatase
INV	Invertase
IPk2	Inositol polyphosphate multikinase
IPPK	Inositol-pentakisphosphate -kinase
ITPK1	Inositol-tetrakisphosphate 1-kinase
K	Potássio
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KO	KEGG Orthology
miRNA	MicroRNA
MIK	Inositol kinase
MINPP1	Type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase
MIOX	Myo-inositol oxygenase
MIPS	Myo-inositol-1-P-synthase
mM	Milimolar

MMSDH	Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase
Mn	Manganês
MPSS	Massively Parallel Signature Sequencing
mRNA	RNA mensageiro
MTM1	Phosphatidylinositol-phosphatase myotubularin
n.s.	Not significant
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NGS	Next Generation Sequencing
P	Fósforo
pb	Pares de base
PC-PLC	Non-specific phospholipase C
PCR	Polymerase chain reaction
PGDB	Pathway/Genome Database
PI(3,5)P2	Phosphoinositide phosphatase
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PI4K	Phosphatidylinositol 4-kinase
PIKfyve	Phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase
PIP5K	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5- kinase
PI-PLC	Phosphoinositide phospholipase C
PIS-CDP	Diacylglycerol-inositol 3-phosphatidyltransferase
PPK	Polyphosphate kinase
PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase
RFOs	Oligossacarídeos da família rafinose
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RS	Raffinose syntahse
RT-qPCR	Real time quantitative PCR
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression
SAL1	SAL1 phosphatase
Tm	Temperatura de melting
TMV	Tobacco mosaic virus
TPI	Triosephosphate isomerase
UR	Up-regulated
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	21
1.1.1	Objetivo Geral	21
1.1.2	Objetivos Específicos	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	ASPECTOS GERAIS DO FEIJÃO-CAUPI.....	22
2.1.1	Caracterização Botânica.....	22
2.1.2	Origem, introdução e dispersão do feijão-caupi	25
2.1.3	Importância socioeconômica do feijão-caupi	26
2.1.4	Melhoramento do feijão-caupi e potencial genético.....	28
2.2	ESTRESSES E FEIJÃO-CAUPI: PRINCIPAIS ATORES E IMPACTOS	30
2.2.1	As viroses no cultivo do feijão-caupi	31
2.2.2	A salinidade no cultivo do feijão-caupi	33
2.3	VIAS METABÓLICAS: INOSITOL E DERIVADOS.....	35
2.3.1	Inositol e derivados: participação em mecanismos de tolerância a estresses e disponibilidade de informações para feijão-caupi.....	37
2.4	GENÔMICA VEGETAL: CONCEITO, BREVE HISTÓRICO E PERSPECTIVAS	39
2.4.1	Métodos para análise do transcriptoma.....	41
2.5	BANCO DE FEIJÃO-CAUPI, A REDE NORDEST	47

3	ARTIGO I - An (A) Biotic Stress Perspective, Vol 2: Molecular and Genetic Perspectives: The Transcription Modulation of Inositols and Raffinose Family Oligosaccharides Pathways in Plants	49
4	ARTIGO II - Cowpea and abiotic stress: transcriptomic analysis of the metabolic pathway of Inositol.....	70
5	ARTIGO III - Análise transcriptômica das vias metabólicas do inositol e oligossacarídeos da família rafinose em feijão-caupi em resposta ao estresse biótico.....	94
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	123
	REFERÊNCIAS.....	124
	ANEXO A – Instruções Genetics and Molecular Biology - ISSN 1678-4685	146

1 INTRODUÇÃO

As plantas são capazes de perceber estímulos ambientais e se adaptar a diferentes ambientes; no entanto, o grau de tolerância e adaptabilidade a estresses abióticos, tais como, baixa disponibilidade de água, salinidade, temperaturas extremas, estresse oxidativo, hipóxia / anoxia, varia entre espécies e variedades. As culturas expostas a esses estresses respondem ativando os mecanismos de defesa. Portanto, tais fatores afetam o crescimento normal do vegetal, impossibilitando que as plantas alcancem seu potencial genético, já que em um estágio inicial de estresse não mostram sintomas visíveis, mas sua fisiologia pode sofrer mudanças significativas (CRAMER et al., 2011).

Adicionalmente, é válido ressaltar que os estresses abióticos interagem não apenas entre si, mas também com estresses bióticos. Por exemplo, uma cultura que sofreu estresse abiótico geralmente apresenta maior suscetibilidade a ataques de insetos, fungos, ácaros, viroses, e uma cultura propensa a esses ataques mostra maior sensibilidade ao estresse hídrico, uma vez que a regulação dos estômatos é alterada (MARIANI e FERRANTE, 2017).

Contudo, o custo metabólico sofrido pelas plantas frente às condições adversas resulta em impacto negativos para produção agrícola, em que as culturas devem equilibrar a alocação de recursos entre produtividade e ações de defesa (ATKINSON et al., 2012). Assim, a defesa das plantas contra os estresses abiótico e biótico deve ser integrada pela identificação de genótipos tolerante ou resistente associada a abordagens de pesquisa integrada, como a transcriptômica, metabolômica e a proteômica, a fim de reduzir as perdas de produtividade (BUCHANAN et al., 2015).

Por sua vez, o feijão-caupi [*Vigna unguiculata* L. (Walp.)] constitui a segunda maior cultura agrícola do Nordeste brasileiro. Embora nessa região existam acessos com características agronômicas requeridas pelo mercado consumidor, há uma demanda pela aquisição de novas fontes de resistência / tolerância aos principais estresses, em especial contra a salinidade (no âmbito abiótico) e o ataque por vírus, podendo citar o vírus do mosaico severo (CpSMV; *cowpea severe mosaic virus*) e o potyvírus (CABMV; *cowpea aphid-borne mosaic virus*) no âmbito biótico, que se destacam como fatores limítrofes da produtividade do feijão-caupi (FREIRE-FILHO et al., 2011; EMBRAPA, 2014).

Estudos envolvendo feijão-caupi e inositol e seus derivados, engloba abordagens de importância nutricional, já que alguns fosfoderivados do inositol atuam como antinutrientes, sendo os metabólitos quantificados por diferentes metodologias, com comparação de diferentes genótipos (KOKHAR E APENTEN, 2009). Sendo assim, dependendo do organismo analisado, vegetal ou animal (incluindo humanos), metabólitos representantes do inositol e seus derivados

exercem um papel fisiológico heterogêneo. Em vegetais, tais compostos exercem papéis importantes, auxiliando na regulação da homeostase vegetal durante períodos de estresse. Em animais (incluindo humanos), sua influência fisiológica tem repercussão diversificada, como na prevenção de doenças cardíacas, ou ainda detentor de propriedades anticarcinogênicas (VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2003; KUMAR et al., 2010b).

Para o estudo global das vias metabólicas do inositol e da rafinose, a abordagem transcriptômica, em que uma grande quantidade de transcritos (expressos em condições específicas) é amostrada, permite tal caracterização. A técnica HT-SuperSAGE é eficiente em gerar transcriptomas compreensíveis, com a vantagem de ser de arquitetura aberta (permitindo a descoberta de transcritos inéditos) e adequada às novas tecnologias de sequenciamento (*Next Generation Sequencing*), gerando milhões de *tags* de 26 pb dos transcritos amostrados, aumentando a sensibilidade da análise e a cobertura desses transcriptomas (MATSUMURA; et al., 2012).

Para o feijão-caupi, a rede NordEST dispõe de cerca de 13 milhões de *tags* SuperSAGE de tecidos de plantas de sob estresse abiótico (raízes) e biótico (folhas), geradas a partir de dois ensaios, disponíveis para o presente trabalho: o primeiro ensaio de feijão-caupi sob estresse salino (100 mM de NaCl), com mais de quatro milhões de *tags* de dois genótipos [Pitiúba (tolerante a salinidade) e BR-14Mulato (sensível)]; e o segundo ensaio de feijão-caupi infectado com o potyvírus CABMV (plantas do genótipo resistente IT85F-2687), com mais de nove milhões de *tags* (KIDO et al., 2011).

Desta forma, a importância desses compostos na fisiologia vegetal, aliada à capacidade de influenciar tanto positiva quanto negativamente o bem-estar humano, permite vislumbrar um grande potencial biotecnológico. Logo, a disponibilização de informações sobre a identificação de genes codificantes das enzimas pertencentes às suas vias metabólicas e sua orquestração transcricional sob condições estressantes em feijão-caupi agregarão dados de relevância aos mecanismos de tolerância a estresses nas leguminosas. Por conseguinte, para lidar com estresses torna-se necessário um melhor entendimento dos mecanismos de respostas das plantas em nível celular e molecular frente a tais condições adversas.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar e validar alvos moleculares de feijão-caupi relacionados com as vias de metabolismo do inositol e oligossacarídeos de rafinose, com base em *tags* HT-SuperSAGE diferencialmente expressas sob condições de estresses de salinidade (duas bibliotecas contrastantes: cultivar tolerante Pitúba – *bulk* de 30, 60, 90 minutos; cultivar sensível BR-14 Mulato – *bulk* de 30, 60, 90 minutos) e de virose (cultivar IT85F-2687, resistente ao potyvírus CABMV; tempo precoce – *bulk* de 30, 60, 90 minutos, e tempo tardio após 16 horas).

1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar as vias metabólicas do inositol e oligossacarídeos de rafinose e suas enzimas;
- b) Identificar as *unitags* SuperSAGE diferencialmente expressas envolvendo bibliotecas de raízes e folhas de plantas resistente / tolerante e sensível, após o período de exposição ao estresse;
- c) Gerar banco de dados local composto por transcritos presentes nas vias metabólicas estudadas, para cada estresse, incluindo as respectivas frequências das *unitags* nas bibliotecas, regulações (indução e repressão) e valores de modulação de expressão;
- d) Mapear transcritos associados às *unitags* diferencialmente expressas pelos *bulks* de feijão-caupi, nas comparações sob estresse em relação aos respectivos controles negativos, em diagramas das vias metabólicas em questão;
- e) Desenhar e propor, a partir dos transcritos investigados, pares de *primers* para RT-qPCR;
- f) Validar as expressões diferenciais observadas por RT-qPCR, de alvos moleculares selecionados das diferentes vias, buscando reforçar a importância dos dados obtidos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DO FEIJÃO-CAUPI

2.1.1 Caracterização botânica

A família Fabaceae, ordem Fabales, é composta por espécies conhecidas como leguminosas, abrangendo cerca de 720 gêneros e mais de 19.300 espécies, e é a terceira família de angiospermas em termos de espécies, depois de Asteraceae e Orchidaceae (LPWG, 2017). É formada de pequenos vegetais herbáceos a grandes árvores florestais, crescendo sob as mais diversas condições edafoclimáticas (SINGH et al., 2007; RAHMAN et al., 2015). Esta família compreendia as subfamílias Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae (LPWG, 2013), no entanto, sua circunscrição foi reformulada a partir de estudos filogenéticos e passou a incluir seis subfamílias, a Caesalpinioideae (incluindo Mimosoideae), Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae e Papilionoideae, sendo as quatro primeiras e a última com distribuição Pantropical, e a Duparquetioideae exclusiva da África (LPWG, 2017).

Dentre as leguminosas, o gênero *Vigna* contém espécies importantes para a agricultura, incluindo *V. reflexo-pilosa* var. *glabra*, *V. mungo* (feijão-da-china), *V. umbellata* (feijão-arroz), *V. aconitifolia*, *V. angularis* (feijão azuki) e *V. unguiculata* (feijão-caupi). O tamanho do genoma das espécies de *Vigna* é variável, podendo ser de 416 a 1,39 Mb (PARIDA et al., 1990; LAKHANPAUL e BABU, 1991). A maioria das espécies são diploides ($2n = 2x = 22$), mas a *V. reflexo-pilosa* é tetraploide ($2n = 4x = 44$) (TOMOOKA et al., 1992).

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma planta dicotiledônea que se reproduz de preferência por autogamia, a qual é facilitada pelo mecanismo da cleistogamia (autopolinização antes da abertura da flor), podendo a taxa de fecundação cruzada variar. Assim, a biologia floral dessa leguminosa demonstra que é uma espécie evoluída, já que é autopolinizada, mas mantém a capacidade de polinização cruzada (APG III, 2009). A espécie apresenta um genoma estável, sendo um dos menores genomas entre as leguminosas ($\cong 450$ -500 Mb), e é uma espécie diploide $2n=22$ cromossomos, composta por um cromossomo menor, cinco médios e cinco maiores (BENKO-ISEPPON, 2001; PIGNONE et al., 1990).

Na espécie *V. unguiculata*, a subespécie “*unguiculata*” inclui as formas cultivadas de quatro cultigrupos, sendo eles: *biflora* ou *cylindrica* (forrageira cultivada principalmente na Ásia), *textilis* (cultivado na África para produção de fibras), *sesquipedalis* (feijão de metro, comum na Ásia) e *unguiculata* (forma mais comum nas culturas que fornecem grãos). No Brasil, dois cultigrupos são cultivados, “*unguiculata*”, compreendendo a maioria das cultivares

locais e melhoradas para produção de grão seco e feijão-verde, além do “*sesquipedalis*” para produção de vagem (VIJAYKUMAR et al., 2010; DIFO et al., 2014).

Acredita-se que essa leguminosa tenha o nome popular de feijão-caupi, por ser derivado do inglês cowpea (ervilha de vaca), sendo comumente utilizada como fonte de feno para animais nos Estados Unidos, assim como em outras regiões do mundo (TIMKO et al., 2007). Além de feijão-caupi, apresenta diversos nomes populares, sendo comumente conhecida, na região do Nordeste brasileiro, como feijão macáçar ou macaça; na região Norte, é denominado de feijão-de-corda, feijão-de-praia, feijão-da-colônia ou feijão-de-estrada; já na região Sul, é conhecido como feijão-miúdo (FREIRE FILHO et al., 2000; 2011). Além dos já citados, existem outros nomes populares, a exemplo de feijão mineiro, feijão de vaca, feijão de frade, feijãozinho da índia, feijão mucunha, feijão congo, feijão fradinho e feijão catador (Figura 1) (WILK e BARBOSA, 2012; RIBEIRO et al., 2013).

Figura 1 – Planta de feijão-caupi.



Fonte: Antonio Félix da Costa (2018).

O feijão-caupi apresenta ciclo curto, baixa necessidade em água e rusticidade para se desenvolver em solos de baixa fertilidade e, é capaz de utilizar o nitrogênio fixado por rizóbios, por meio de simbiose. A estrutura da planta feijão-caupi possui variação de porte, desde ereto até prostrado e hábito de crescimento determinado a indeterminado; e resulta da interação de hábito de crescimento; comprimentos do epicótilo, hipocótilo, entrenós, ramos principal e secundários; pedúnculo; disposição dos ramos e pedúnculos, e consistência dos ramos (FREIRE FILHO et al., 2005b).

As sementes variam do formato arredondado ao reniforme, podendo apresentar halo de formato irregular que circunda o hilo, sendo capazes de permanecer viáveis ou dormentes no

solo até que a umidade esteja favorável, o que caracteriza a germinação da espécie como de alta percentagem (KIGEL et al., 2015). Quanto ao tegumento da semente, pode variar na textura (liso ou rugoso), na coloração (branco, creme, verde, amarelo-claro, vermelho, marrom e preto) (Figura 2), na uniformidade (uniforme, com estrias, manchas ou pontuações); na presença ou não de hilo e ser opaco ou brilhoso (FREIRE FILHO et al., 2005a; OKON, 2013). A cor do tegumento, o hilo e as características relacionadas a ele (membrana, anel, halo) além de fazerem parte do aspecto visual do feijão-caupi, também são características comerciais fundamentais, podendo influenciar inclusive no preço (FREIRE FILHO et al., 2011).

Figura 2 – Variação na coloração do tegumento da semente de feijão-caupi.



Fonte: Freire Filho et al. (2011).

As flores são classificadas como perfeitas (pistilo e estame na mesma flor), zigomorfas (simetria bilateral) e estão distribuídas aos pares no racemo, na extremidade do pedúnculo, região que antecede a flor ou o fruto (Figura 3). O cálice é composto por cinco sépalas (pentâmero) unidas e soldadas entre si, podendo variar de verde a roxo. A corola também é pentâmera e com pétalas livres entre si. A maior pétala é chamada de estandarte e está localizada na parte posterior da flor. As duas pétalas laterais são as asas e cobrem as pétalas inferiores. As duas pétalas inferiores são fundidas e formam a quilha, que tem de coloração branca, independentemente da cor das outras pétalas (Figura 3) (ROCHA et al., 2007).

Figura 3 – Estrutura da flor de feijão-caupi.



Fonte: Antonio Félix da Costa (2018).

2.1.2 Origem, introdução e dispersão do feijão-caupi

A evolução do feijão-caupi ocorreu em ambientes semiáridos, com alterações durante a domesticação, que incluem a mudança de perene para anual, de alógama para autógama e adaptação às condições semiáridas (RAWAL, 1975). Outras alterações ocorreram, tais como a redução no número de vagens no pedúnculo, redução na taxa de crescimento relativo na fase inicial da planta, e aumento do tamanho das vagens e sementes (LUSH e EVANS, 1981).

O centro primário de diversidade dessa espécie seria o oeste da África, especificamente a Nigéria, de acordo com alguns autores (NG e MARÉCHAL, 1985; STEELE e MEHRA, 1980). Contudo, experimentos moleculares, sugeriram que mesmo o centro de diversidade se localizando na África, o gênero *Vigna*, o qual inclui *V. unguiculata*, pode ter surgido na Ásia, onde ainda advêm algumas subespécies primitivas (SIMON et al., 2007). Assim, através de ensaios relacionados à variação morfológica, fitogeográfica, molecular e citogenética indicam o feijão-caupi como uma das espécies mais primitivas ocorrentes na África, o que pode sugerir que a evolução e dispersão possam ter ocorrido neste continente (FARIS, 1965).

A partir do Nordeste da África, por volta de 2.300 a.C., o feijão-caupi alcançou o sudoeste da Ásia, expandindo-se para o sudeste da Europa por volta de 300 a.C. Por meio de uma segunda rota, migrou do leste da África para a Índia, há mais de 2.100 anos, onde foi submetido a uma grande diversidade de ambientes e de sistema de produção, chegando posteriormente ao sudeste da Ásia (FREIRE FILHO, 1988).

O feijão-caupi foi introduzido simultaneamente por espanhóis e portugueses no continente americano ainda no século XVI, sendo introduzido no Brasil por volta da segunda

metade do século XVI pelos colonizadores portugueses, na Bahia, de onde se disseminou por todos os outros estados (ALVES et al., 2009). Em 1568, já havia a indicação da existência de muitos feijões no Brasil. Há fortes evidências de que o feijão-caupi era um deles, uma vez que desde a fundação da Bahia como capital administrativa do Brasil, o comércio com o oeste da África, de Guiné a Angola, era muito intenso (FREIRE FILHO et al., 2011). Atualmente é uma das espécies cultivadas mais importantes nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (NEVES et al., 2011).

2.1.3 Importância socioeconômica do feijão-caupi

O feijão-caupi é uma leguminosa importante nos sistemas de cultivo nas regiões mais secas e áreas marginais dos trópicos e subtropicais que ocupam a Ásia, Oceania, Oriente Médio, Europa, EUA, África, América Central e América do Sul (FATOKUN et al., 2000). A produção mundial média de feijão-caupi no período de 2012 a 2014, é 7,36 milhões de toneladas, colocando a África Ocidental como maior área mundial produtora. O principal país produtor é a Nigéria que responde por 54% do volume médio mundial, seguida de Níger com 21%, e em terceiro Burkina Faso com 8%. Os três países respondem por 83% do total mundial do feijão-caupi seco (FAO, 2017).

Por outro lado, o Brasil apresenta grande parte da produção de feijão-caupi para o mercado interno brasileiro. No Norte (muita chuva, alta umidade, solo argiloso) e Nordeste (seca, solo arenoso, salino, clima quente), o sistema de cultivo está associado à agricultura familiar, geralmente com baixo uso de tecnologias e sujeito a irregularidades pluviométricas, o que confere baixo rendimento de grãos. A região Nordeste é responsável por praticamente 80% da área cultivada, mas, na produção total, contribui com menos de 60%, devido às menores produtividades obtidas na região (SILVA et al., 2016). Já na região Centro-Oeste, predomina a agricultura empresarial (SANTOS et al., 2014).

Estima-se que, para o ano agrícola de 2018/2019, a produção brasileira de feijão-caupi foi de 841,3 mil toneladas, sendo que quase 1/3 desta é produzida no Mato Grosso para fins de exportação (CONAB, 2017). A variedade caupi, cultivada nas regiões Norte e Nordeste e no Mato Grosso, concentra-se na 2ª safra, à exceção da produção da Bahia (CONAB, 2017). A estimativa de área plantada, produtividade e produção de grãos de feijão-caupi no Brasil, safra 2017/2018, é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 - Estimativa de área plantada, produtividade e produção de grãos de feijão-caupi no Brasil.

Cultura	Área (Em 1.000 t) SAFRAS		Produtividade (Em 1.000 t) SAFRAS		Produção (Em 1.000 t) SAFRAS	
	2016/2017	mai/2018	2016/2017	mai/2018	2016/2017	mai/2018
Feijão total	3.180,3	3.197,2	1.069 1.043		3.399,5 3.334,4	
Feijão-caupi total	1.409,3 1.533,1		506 563		713 863	

Fonte: Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2017.

O feijão-caupi é uma das fontes alimentares mais antigas e, provavelmente, tem sido utilizada como uma planta de colheita desde os tempos neolíticos. Conhecido por ser uma excelente fonte de proteína, é também rico em importantes vitaminas, minerais e fibras alimentares. Todas as partes das plantas de caupi são usadas para alimentos ou forragem (VIEIRA et al., 2010). Sua comercialização é realizada como vagens verdes, sementes, farinha para acarajé, além de produtos pré-cozidos e congelados (RIBEIRO, 2002). Suas sementes são fontes de tiamina e niacina, além de fibras dietéticas, sendo consumidas na forma de grãos secos e de grãos verdes, bastante apreciados por seu gosto e cozimento fácil, utilizados em pratos típicos da região nordestina (CORREA et al., 2012).

Além de sua importância nutricional, a planta é usada como um agente multiterapêutico para o câncer, tratamento de sangue na urina, inchaços e infecções. O conteúdo de proteína da semente varia de 23 a 32% do peso das sementes ricas em lisina e triptofano, e uma quantidade substancial de minerais e vitaminas (ácido fólico e vitamina B), necessários para a prevenção de defeitos de nascimento durante a fase de gestação (NIELSEN et al., 1993; HALL et al., 2003). Como o feijão-caupi contém uma baixa quantidade de gordura e teor elevado de fibras, pode prevenir doença cardíaca, reduzindo a lipoproteína de baixa densidade (FROTA et al., 2008). O consumo de feijão-caupi aumenta a glucose no sangue mais lentamente devido à lenta digestibilidade do amido, promovendo o seu uso por diabéticos e beneficiando a saúde gastrointestinal (PHILLIPS et al., 2003).

A espécie é considerada uma planta versátil. Adapta-se bem às diversas condições edafoclimáticas devido a sua rusticidade e plasticidade, respondendo a diferentes níveis de estresse ao longo dos diversos estágios de seu desenvolvimento (SUMMERFIELD et al., 1985). Tolerância hídrica, altas temperaturas, salinidade, solos ácidos e alcalinos (DADSON et al., 2005). Por apresentar plasticidade produtiva sob as mais diversas condições ambientais, tal leguminosa pode atenuar perdas econômicas de outras culturas, em caso de períodos

desfavoráveis (DADSON et al., 2005), sendo também importante componente da agricultura de subsistência (SINGH et al., 2003). Assim, adiciona-se a tal fato a importância do melhoramento genético dessa cultura, em razão da necessidade de obtenção de novas cultivares, melhores que as pré-existentes, em termos de produtividade, associado, principalmente, à resistência a pragas e patógenos (FREIRE FILHO et al., 2011).

2.1.4 Melhoramento do feijão-caupi e potencial genético

O feijão-caupi está inserido em programas de melhoramento genético que tem focado no desenvolvimento de cultivares com arquitetura moderna de planta, principalmente de portes semiprostrado (agricultura familiar) e ereto (agricultura empresarial); resistência às principais pragas (caruncho, pulgões, mosca branca e trips) e doenças (viroses e fungos); tolerância a altas temperaturas, estresse hídrico e salinidade; altos teores de proteína e minerais, qualidade comercial do grão (cor, forma e aspecto do tegumento) e culinária do grão; maior adequação ao mercado; alta resposta à fixação biológica do nitrogênio; e alta produtividade, adaptação e estabilidade aos vários biomas brasileiros (FREIRE FILHO et al., 2011). O melhoramento genético do feijão-caupi no Brasil começou na segunda metade do século XVI com as primeiras introduções de cultivares, como pode ser exemplificada na Tabela 2.

Tabela 2 - Períodos, metas e atividades realizadas durante a introdução de cultivares de feijão-caupi no Brasil.

Período	Meta	Atividades realizadas
1925 a 1963	Primeiras introduções de germoplasma.	Sem recomendações de cultivares.
1963 a 1973	Início da integração das pesquisas com feijão-caupi entre alguns institutos de pesquisa e as universidades.	Primeiras coletas realizadas, juntamente com a caracterização e avaliação de germoplasma, sendo liberadas as primeiras cultivares pela Universidade Federal do Ceará.
1973 a 1991	Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) estruturou uma rede nacional de pesquisa de feijão-caupi sob a liderança da Embrapa Arroz e Feijão, em Goiás.	Melhoramento da espécie, utilizando-se os métodos genealógico (Pedigree), de descendência de uma única vagem (SPD) e seleção massal.
1991 até o momento	Ampliação da rede de melhoramento, incluindo os estados da região Norte, Nordeste e Centro-Oeste.	Avanços obtidos para a qualidade do grão, resistência a vírus, arquitetura da planta e precocidade, que viabilizaram o cultivo em grandes áreas dos cerrados.

Fonte: Adaptado de FREIRE FILHO et al., 2011.

Desde a introdução dessa leguminosa até 2010, foram lançadas 71 cultivares melhoradas (FREIRE FILHO et al., 2011). Embora existam os esforços dos programas de melhoramento utilizando as metodologias convencionais, há a necessidade de um impulso visando aumentar sua eficiência, como o uso de ferramentas de biotecnologia, propiciando ao feijão-caupi condições de competitividade e características que atendam às necessidades comerciais locais e internacionais (FREIRE FILHO et al., 2005b).

É válido ressaltar que a Embrapa Meio-Norte, por meio do programa de melhoramento genético, tem conseguido atender às demandas dos diversos setores da cadeia produtiva, visto que são disponibilizadas cultivares adequadas para o pequeno, médio e grande agricultor. No ano de 2004, foi lançado a primeira cultivar de porte semiereto no Brasil, BRS Guariba (GONÇALVES et al., 2009) um produto tipicamente nordestino, produzido sobretudo pelas regiões Norte e Nordeste, que vem sendo cultivado em áreas extensas da região Centro-Oeste. Em 2007, foi lançada a cultivar BRS Novaera (VILARINHO, 2007) para os estados das regiões Norte (Rondônia, Amazonas, Roraima, Amapá e Pará), Nordeste (Maranhão e Rio Grande do Norte) e Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul). Além das cultivares lançadas, existem outras com bom potencial produtivo e de excelente qualidade de grão, que podem ser consideradas na hora de implantar a lavoura, visando evitar o monocultivo. Entre elas estão a BRS Marataoã, BRS Paraguaçu, BRS Rouxinol, BRS Milênio, BRS Urubuquara, BR 17-Gurguéia, BR3 Tracuateua,

BRS Xiquexique, BRS Tumucumaque, BRS Potengi, BRS Cauamé e BRS Pajeú (SOUSA et al., 2016).

No que diz respeito aos programas de melhoramento genético de feijão-caupi no Nordeste brasileiro, encontra-se o IPA (Instituto Agrônômico do Estado de Pernambuco), um dos mais ativos do Brasil e desenvolvedor de diversas cultivares de elite (IPA, 1989). O melhoramento genético do feijão-caupi é feito considerando-se os interesses de agricultores familiares e empresariais e com foco no sistema formado pelo produtor, comerciante, agroindustrial, distribuidor e consumidor, e, nos últimos anos, no exportador (FREIRE FILHO et al., 2011). O resultado desse trabalho tem sido a obtenção e indicação de cultivares de feijão-caupi melhoradas para todos os tipos de produtores e regiões com potencial no Brasil, a exemplo da IPA 206 e Miranda IPA-207 (NASCIMENTO et al., 2004; COSTA et al., 2013)

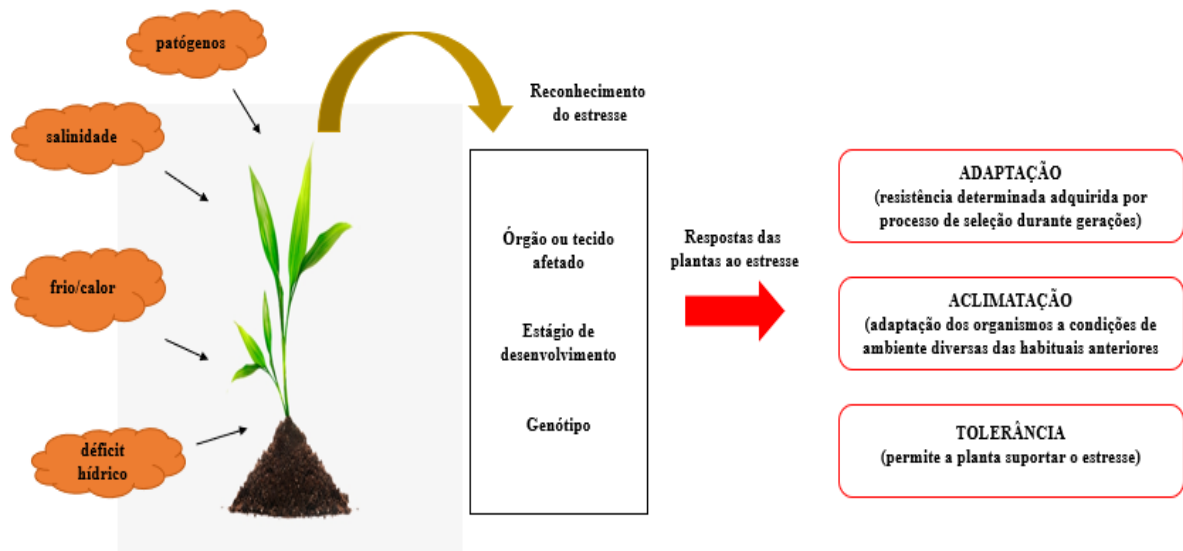
Sendo assim, o feijão-caupi, por ser um alimento básico em mais de 65 países de alto valor nutritivo, pela plasticidade, adaptação a uma ampla faixa de ambientes (SINGH, 2005), e ainda diante das perspectivas de mudanças climáticas e da necessidade de alimento em todo o mundo, é uma cultura de potencial estratégico. Portanto, trata-se de um produto de valor socioeconômico com uma excelente perspectiva no mercado brasileiro e internacional (SINGH et al., 2002; FREIRE FILHO et al., 2011). Logo, experimentos que envolvam condições estressantes (estresse biótico e abiótico) em feijão-caupi agregarão dados de relevância aos mecanismos de tolerância a estresses nessa leguminosa, e possivelmente em outras leguminosas.

2.2 ESTRESSES E FEIJÃO-CAUPI: PRINCIPAIS ATORES E IMPACTOS

Em se tratando de fisiologia vegetal, estresse é considerado uma condição ocasionada por fatores que alteram o equilíbrio (NILSEN e ORCUTT, 1996). É conhecido como os dois tipos de condições principais: o eu-estresse e o dis-estresse. O primeiro é um fator que estimula o crescimento da planta, ou seja, atribuído a condição de estresse suave e estimulante que ativa o metabolismo celular e aumenta a atividade fisiológica. Já, o segundo é qualquer condição desfavorável (intensidade ou duração) que afeta o metabolismo, desenvolvimento e crescimento vegetal (LICHTENTHALER, 2004). As plantas são normalmente expostas a diferentes adversidades ambientais, incluindo estresses bióticos (como ataque de herbívoros, insetos e patógenos) e abióticos (como seca, temperaturas extremas, salinidade, alcalinidade, estresse oxidativo). Tais fatores podem limitar severamente o crescimento vegetal, impedindo que as plantas alcancem seu potencial genético, e consequentemente a produtividade agrícola

(CRAMER et al., 2011; FREIRE FILHO et al., 2011). Assim, ao longo do processo evolutivo, as plantas desenvolveram mecanismos moleculares de ajuste fisiológico para enfrentar condições estressantes (Figura 4).

Figura 4 - Esquema da interação planta – estresse ambiental para geração de respostas ambientais.



Fonte: Adaptado de Willadino e Camara (2010).

2.2.1 As viroses no cultivo do feijão-caupi

A cultura de feijão-caupi mesmo apresentando elevada resistência natural a doenças e rusticidade, ainda sofre ataque de alguns patógenos capazes de reduzir a produtividade ou até inviabilizar sua produção (FREIRE FILHO, 2008), contribuindo para o baixo rendimento e causando grandes perdas econômicas, especialmente na região do nordeste brasileiro (FREIRE FILHO et al., 2005a). De forma geral, a cultura do feijão-caupi é suscetível a várias doenças causadas por fungos, bactérias, nematoides, vírus. Entretanto, o ataque por vírus, que incluem o *Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) (gênero *Potyvirus*, família *Potyviridae*), *Cowpea severe mosaic virus* (CPSMV) (gênero *Comovirus*, família *Secoviridae*), *Cucumber mosaic virus* (CMV) (gênero *Cucumovirus*, família *Bromoviridae*) e *Bean golden mosaic virus* (BGMV) (gênero *Begomovirus*, família *Geminiviridae*), é o fator mais limitante na produção da cultura (BESERRA JUNIOR, 2011).

No mundo todo, mais de 20 vírus foram identificados infectando naturalmente o feijão-caupi (THOTTAPPILLY e ROSSEL, 1985; MALI e THOTTAPPILLY, 1986). No Brasil, os vírus constituem um grupo importante, sendo os principais: mosaico severo do caupi (CPSMV;

Cowpea Severe Mosaic Virus), mosaico rugoso (CPRMV; *Cowpea Rugose Mosaic Virus*) , mosaico dourado (CGMV; *Cowpea Golden Mosaic Virus*), mosaico do pepino (CMV; *Cucumber Mosaic Virus*), e vírus do mosaico do feijão-caupi transmitido por pulgão (CABMV; *Cowpea Aphid-Borne Mosaic Virus*) (KITAJIMA, 1995).

A família *Potyviridae* apresenta-se como uma das maiores e mais importantes famílias de vírus que infectam plantas (FAUQUET et al., 2005). O *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV), pertencente a esta família, gênero *Potyvirus*, apresenta genoma de RNA fita simples, e mede cerca de 11 x 680 nm a 11 x 900 nm (ZERBINI e MACIEL-ZAMBOLIM, 1999). Em relação à organização do genoma dos potyvirus, a proteína capsidial apresenta uma região amino-terminal altamente variável em tamanho e sequência, uma região central conservada com 215 a 227 aminoácidos, e uma região carboxi-terminal com 18 a 20 aminoácidos. As regiões amino e carboxi-terminal estão voltadas para o exterior da partícula viral, e são responsáveis pelas propriedades antigênicas da proteína (BOCK e CONTI, 1974). O genoma é composto por uma única molécula de RNA de fita simples, e envolto por um capsídeo formado por cerca de 2.000 cópias da proteína capsidial (BERGER, 1997).

O CABMV foi isolado no Brasil, pela primeira vez, no Estado do Ceará, em 1981, sendo considerado o mais importante das espécies de vírus que infectam o feijão-caupi no Nordeste brasileiro (GHORBANI et al., 2008; LIMA, 2015). O CABMV infecta também o feijão comum, a fava, e o maracujazeiro, causando a doença conhecida como endurecimento dos frutos (PIO RIBEIRO et al., 1997).

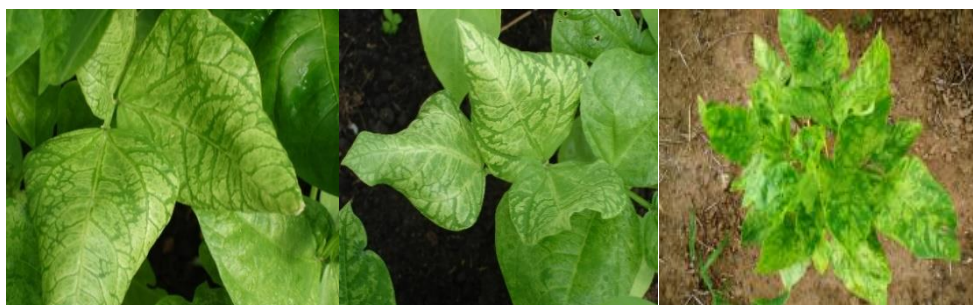
Este vírus é transmitido mecanicamente para uma série de espécies. No Brasil, o CABMV já foi relatado infectando naturalmente espécies como amendoim (*Arachis hypogaea* L.) (PIO-RIBEIRO et al., 2000), crotalária (*Crotalaria juncea* L.) (FREITAS et al., 2002) e feijão-da-praia (*Canavalia rosea* (Sw.) DC.) (KITAJIMA et al., 2008). Estudos realizados por RAHEJA e LELEJI (1974) relataram a perda completa da colheita de feijão-caupi por ataque CABMV sob condições de campo irrigado das áreas do norte da Nigéria. Uma perda de rendimento de 13 a 87% devido à infecção natural do feijão-caupi por CABMV foi relatado no Irã (KAISER e MOSSAHEBI, 1975).

O estudo do vírus do mosaico do feijão-caupi que é transmitido pelo CABMV tem se tornado cada vez mais relevante, por ser um dos mais importantes fatores limitantes da produção na cultura, tanto pela forma de disseminação, bem como pela dificuldade no controle (LIMA et al., 2005; GHORBANI et al., 2008). Pode ser transmitido eficientemente por várias espécies de

pulgão, como *Aphis cracivora* e *Myzus persicae* ou internamente pela semente (FREIRE FILHO et al., 2005a; SANTOS et al., 1999).

Os sintomas mais comuns causados pelo CABMV são mosaico intenso no limbo foliar, formado por áreas verdes normais entremeadas por áreas cloróticas, faixas verde escuras nas nervuras (Figura 5), distorção das folhas e redução mais ou menos acentuada do crescimento das plantas, dependendo da interação entre cultivar e estirpe, bem como da época de início da infecção (BOCK e CONTI, 1974; ROSSEL e THOTTAPPILLY, 1988; SHOYINKA et al., 1997).

Figura 5 - Sintomas do mosaico do feijão-caupi transmitido por pulgão (CABMV).



Fonte: Própria autora (2018).

O controle do CABMV em feijão-caupi pode ser feito através da utilização de sementes livre de vírus, eliminação de hospedeiros alternativos, controle de vetores, alteração do período e local do plantio e emprego de cultivares resistentes (PIO RIBEIRO et al., 2000). Através desses exemplos fica evidente que o potyvírus CABMV é considerado uma restrição importante na cultura do feijão-caupi em zonas agroecológicas, onde quer que seja cultivada (BASHIR et al. 2002), e assim torna-se relevante seu estudo, tanto pela forma de disseminação (pulgão), quanto pela dificuldade no controle (GHORBANI et al., 2008).

2.2.2 A salinidade no cultivo do feijão-caupi

A salinidade é um dos fatores de estresse abiótico mais importantes na limitação do crescimento e produtividade das plantas (KHAN e PANDA, 2008; MOHAMED e GOMAA, 2012). A alta concentração de sal no solo resulta em alto potencial osmótico do solo, que resulta em déficit hídrico dentro das plantas. Além disso, a maior concentração de Na^+ e Cl^- provoca desequilíbrios nutricionais e, conseqüentemente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) aumenta, resultando em estresse oxidativo (LIANG et al. 2015; LIU et al., 2015).

O excesso de ROS, é prejudicial ao metabolismo e ao crescimento normal das plantas. As ROS se acumulam nas folhas e levam à oxidação de várias moléculas celulares, incluindo lipídio, proteína e clorofila. Assim, a peroxidação de lipídios da membrana, oxidação de proteínas e danos aos ácidos nucleicos são alguns efeitos imediatos da ação do excesso dessas espécies reativas de oxigênio (WU et al., 2014). A peroxidação lipídica induzida por radicais livres também é importante na deterioração da membrana (KHAN e PANDA, 2008).

Adicionalmente, o excesso de sal afeta processos fisiológicos e bioquímicos, como a fotossíntese e estresse osmótico (PORCEL et al., 2012; HASHEM al., 2015). A fotossíntese alterada está associada ao distúrbio no metabolismo do carbono e do nitrogênio (HASHEM et al., 2014; EGAMBERDIEVA et al., 2015). O estresse osmótico resulta em desequilíbrio das relações hídricas, alterações na absorção e utilização de nutrientes essenciais além do acúmulo de íons tóxicos (ASSIS JÚNIOR et al., 2007; CALVET et al., 2013).

Em feijão-caupi, os efeitos da salinidade podem causar modificação na anatomia radicular e foliar (GARZÓN e GARCÍA, 2011), podendo ocorrer redução da massa seca e da nodulação, devido aos efeitos tóxicos e nutricionais que afetam a assimilação líquida de CO₂; reduzem a área fotossintética e a produção de fotoassimilados (LIMA et al., 2007; NEVES et al., 2009); reduzem o teor de proteína dos grãos (DANTAS et al., 2002), assim como a área foliar, devido à elevação do potencial hídrico da planta, já que o déficit hídrico na zona radicular promove a senescência e abscisão das folhas (DANTAS et al., 2003), aumento de Na⁺ e redução da extração de N, K, Ca, P, Fe, Mn, Zn e Cu, à medida que a irrigação com água salina se torna constante (NEVES et al., 2009).

Estudos investigando estresse salino em feijão-caupi (DANTAS et al., 2003; ALMEIDA et al. 2012; MAIA et al. 2012) são relatados. Em ensaio com a cultivar Epace 10 de feijão caupi, ASSIS JÚNIOR et al. (2007) verificaram que a redução na produtividade ocasionada pela salinidade deveu-se, em parte, às reduções no crescimento vegetativo e na assimilação líquida de carbono, durante as fases de floração e frutificação, associadas aos efeitos osmóticos e ao acúmulo de íons potencialmente tóxicos (Na⁺ e Cl⁻) nos tecidos foliares. LIMA et al. (2007), testando a tolerância à salinidade da cultivar Quarentinha de feijão-caupi, verificaram que a matéria seca da parte aérea da planta decresceu linearmente à medida que se aumentou a salinidade da água de irrigação, alcançando uma redução de 66,94% no maior nível salino (5,0 dS m⁻¹) em relação a testemunha (0,5 dS m⁻¹).

Assim, as plantas desenvolveram diferentes mecanismos para lidar com o dano oxidativo induzido pelo estresse. O aumento das atividades de enzimas antioxidantes é um dos principais mecanismos de defesa que ajudam as plantas a evitar danos ao estresse oxidativo. A superóxido dismutase, a catalase, a peroxidase e a glutathione redutase estão entre as várias enzimas antioxidantes intrincadas que transportam a eliminação de ROS para proteger as células (AHANGER et al., 2014; HASHEM et al., 2014). Além disso, o acúmulo de prolina livre, açúcares e aminoácidos altera a osmorregulação da planta para que o teor de água da célula possa ser mantido. A redução da concentração tóxica de íons no citoplasma por restrição do influxo de Na^+ ou seu sequestro no vacúolo também são mecanismos importantes que ajudam as plantas a manter crescimento e proteção de várias vias metabólicas (BINZEL et al., 1988; BOHNERT et al., 1999; AHANGER et al., 2014).

Deste modo, gerar informações que permitam identificar no caupi alelos que contribuam de forma positiva para tolerância a estresses abióticos e bióticos sob condições adversas, acaba se tornando uma das prioridades para aumentar a produtividade, além de que esses alelos poderiam ser usados em outras leguminosas (NELSON et al., 2004). Como a resposta a estresses abióticos geralmente é de natureza poligênica e envolve um conhecimento multidisciplinar (HONG-BO et al., 2006), essa problemática só poderá ser solucionada com a integração de metodologias associadas com diversos campos como a genômica, proteômica, metabolômica, entre outros.

2.3 VIAS METABÓLICAS: INOSITOL E DERIVADOS

As plantas desenvolveram mecanismos moleculares e fisiológicos como forma de adaptação às condições estressantes. Tais organismos contam com uma maquinaria celular, atuante em níveis estratificados que vão desde a percepção, sinalização, controle transcricional, ativação até a reorganização de vias responsivas a estresses (BARTELS e SOUER, 2004). Dentre as moléculas cujo conhecimento de sua função indica atuação em mais de um dos níveis mencionados, o inositol (Ins) tem despertado interesse, atuando como substrato na biossíntese de muitos compostos, especialmente os oligossacarídeos da família rafinose (RFOs) que se acumulam nas plantas (LOEWUS e MURTHY, 2000; MAJUMDER e BISWAS, 2006).

O inositol é distribuído em abundância em todo o sistema biológico, podendo permanecer como açúcar livre, éster de fosfato e metil-derivados, podendo ainda ser precursor de importantes metabólitos. Participa de vários processos metabólicos (produção de mensageiros secundários até síntese de antioxidantes), tais como síntese do ácido fítico, estoque e transporte de auxina nas células, produção de moléculas relacionadas ao estresse, germinação de sementes,

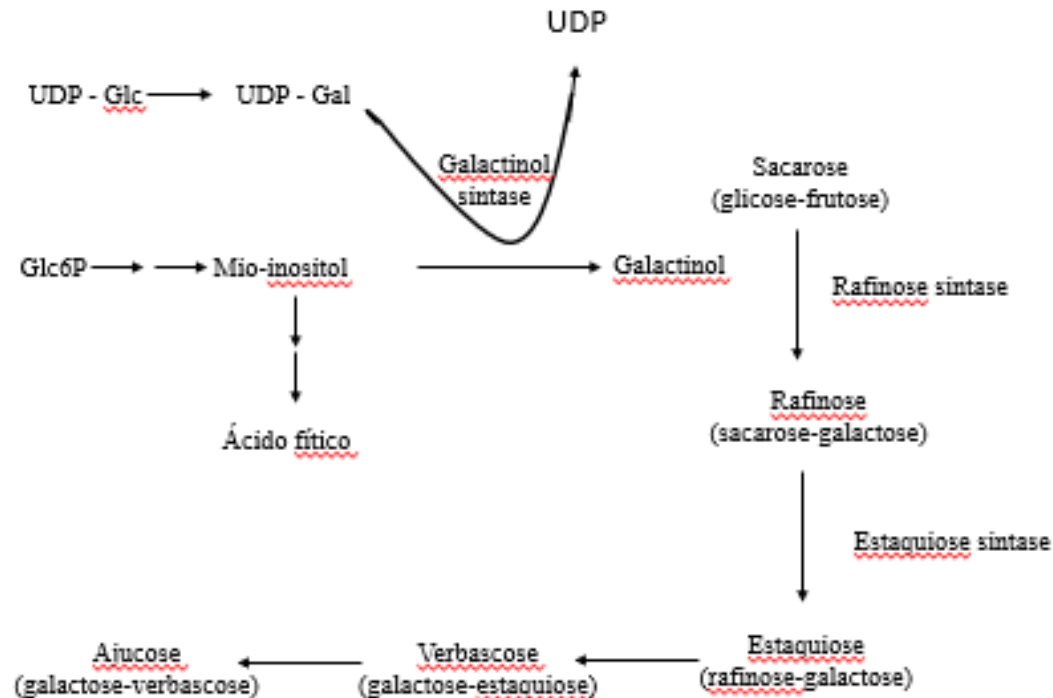
transporte de açúcar, nutrição mineral, metabolismo de carboidratos, estrutura de membranas, formação de parede celular e homeostase de hormônios. Seus derivados fosforilados (fosfoinositídeos, polifosfoinositídeos, inositol fosfatos e inositol polifosfatos e metilados) representam moléculas sinalizadoras versáteis e dinâmicas em todos os eucariotos, especialmente em vegetais (MUNNIK e VERMEER, 2010).

Os papéis essenciais do inositol em muitos processos celulares, incluem formação de membrana, biogênese da parede celular, resposta ao estresse (regulação da homeostase vegetal durante períodos de estresse) e transdução de sinal. Adicionalmente, o inositol atua na via de metabolismo dos RFOs, os quais são carboidratos (correspondem a aproximadamente 99% dos carboidratos solúveis presentes na semente de soja madura) representados por galactinol sintase, alfa-galactosidase, estaquiose, invertase e rafinose sintase, e estão presentes na via da galactose (LOEWUS e MURTHY, 2000; MAJUMDER e BISWAS, 2006).

O metabolismo de um organismo é formado por vias metabólicas, que compõem a sua rede metabólica. As vias metabólicas são uma série de reações químicas que ocorrem nas células dos organismos. Essas reações podem ser catalisadas por enzimas que muitas vezes precisam de minerais, vitaminas e outros cofatores (MICHAL e SCHOMBUG, 2012). Os produtos de algumas reações são utilizados como reagentes de outras reações, esse encadeamento forma vias, que por conseguinte, formam redes de processamento de compostos químicos em uma célula. As vias metabólicas são muitas vezes mostradas graficamente, como a representação da via da síntese dos oligossacarídeos, bem como das enzimas envolvidas, na Figura 6.

O metabolismo pode ser classificado em primário ou secundário. O metabolismo primário é o conjunto de processos metabólicos que desempenham funções essenciais ao organismo, como crescimento e divisão celular e estocagem de energia. Já o metabolismo secundário, diferentemente do primário, não é essencial às funções do organismo. Apesar dos compostos secundários fazerem parte do metabolismo normal do organismo, são frequentemente produzidos em células especializadas e tendem a ser mais complexos que os compostos primários (MICHAL e SCHOMBUG, 2012).

Figura 6 – Esquema da via metabólica de síntese de oligossacarídeos de rafinose. UDP-Glc: uridina difosfato-glicose; UDP-Gal: uridina difosfato-galactose; UDP: uridina difosfato; Glc6P: glicose-6-fosfato.



Fonte: Adaptado de SUAREZ et al. (1999).

2.3.1 Inositol e derivados: participação em mecanismos de tolerância a estresses e disponibilidade de informações para feijão-caupi

O mio-inositol (inositol) é importante para o crescimento e desenvolvimento normal da planta. O inositol participa da via de sinalização de fosfatidilinositol (PI), armazenamento e transporte de auxina, biossíntese do ácido fítico e da parede celular, e produção de moléculas relacionadas ao estresse. A modificação da biossíntese de inositol pode oferecer soluções potenciais para problemas agrícolas práticos. As ferramentas de biotecnologia, como a tecnologia de plantas transgênicas, estão disponíveis para regular a biossíntese do inositol *in vivo* (LOEWUS e MURTHY, 2000). Adicionalmente, inositol está associado ao metabolismo de RFOs, atuando na sua via biossintética (KELLER e PHARR, 1996). A enzima Galactinol sintase (GolS; EC 2.4.1.123) catalisa a porta de entrada do metabolismo desses compostos, a partir do uso de mio-inositol e UDP-galactose, produzindo galactinol, sendo que este serve

como doador de galactose para a síntese posterior de membros da RFOs (LIU et al., 1998; SPRENGER e KELLER, 2000).

Diversos artigos indicam o envolvimento de compostos das vias metabólicas do Ins e seus derivados na resposta a estresses, sendo que a totalidade desses dados está associada à transgenia de genes específicos, ou obtenção de mutantes, e análise do comportamento dos organismos obtidos perante condições pré-determinadas. Exemplo disso é visto em PERERA et al. (2008), os quais obtiveram *Arabidopsis thaliana* transformada com uma inositol polifosfato 5-fosfatase (InsP 5-ptase; EC 3.1.3.56) tipo I, de humano. Estudos relacionados ao estresse da seca revelaram que a planta transgênica exibiu aumento na tolerância ao mesmo. Em outra análise, SHEVELEVA et al. (1997) superexpressaram uma O-metiltransferase (IMT1; EC 2.1.1.140) em tabaco (*Nicotiana tabacum*) e constataram que a mesma acumulou maiores quantidades de D-ononitol (derivado metilado do inositol), além de apresentar recuperação mais rápida do que o tipo selvagem, quando expostas a condições de seca e alta salinidade (50 – 150 mM NaCl).

Há evidências da importância do Ins e derivados na resposta a outros tipos de estresses (abióticos e bióticos). ZHU et al. (2012) expressaram, em *Arabidopsis*, uma *myo*-inositol-O-metiltransferase (IMT1; EC 2.1.1.140), idêntica ao gene *Imt1* da planta halófito *Mesembryanthemum crystallinum*. Foi observado que as plantas resultantes exibiram maior crescimento quando comparadas à sua contraparte selvagem, além de maior tolerância ao frio (4 °C). SENGUPTA et al. (2008), adicionalmente, constataram um aumento na síntese de D-pinitol (derivado metilado do inositol) em um tipo selvagem de arroz (*Porteresia coarctata*), com características halofíticas, quando submetido a alta salinidade (400 mM de NaCl). Tal acentuação ocorreu tanto em nível transcricional quanto proteômico de O-metiltransferase (IMT1; EC 2.1.1.140); ele não foi observado no arroz domesticado sob a mesma situação. Adicionalmente, os autores relataram um aumento coordenado na expressão de L-*myo*-inositol 1-phosphate synthase (PcMIPS1; EC 5.5.1.4), juntamente com a expressão de IMT1, o que sugere que a acumulação de D-pinitol é um mecanismo regulado pelo estresse analisado.

No que tange a RFOs, LIU et al. (1998) observaram que a atividade de GolS (BnGolS-1) é correlacionada positivamente com tolerância a dessecação em sementes de couve (*Brassica napus*) durante o período de desenvolvimento vegetativo. Tal vegetal se tornou tolerante ao referido fator exógeno em torno de 21-24 dias após a floração, sendo que esse período foi coincidente com o acúmulo de rafinose e estaquiose (membros da RFO). Adicionalmente, foi

constatado que o acúmulo de transcritos de BnGolS-1 foi concomitante à formação dos membros RFOs acima citados.

Dados de genômica estrutural e análise global de transcriptoma relativos a Ins e RFOs não estão disponíveis para nenhum vegetal, com exceção de milho, onde ZHOU et al. (2012) executaram a identificação genômica de genes associados ao metabolismo de rafinose. Em relação a leguminosas, a soja é a única que possui dados associados ao inositol com genes pontuais analisados ou produtos quantificados associados ao referido composto. A totalidade dos relatos na literatura englobam análises nas quais tais metabólitos são quantificados por diferentes metodologias e tal parâmetro comparado entre diferentes genótipos (VALVERDE et al., 2005), sendo que tais abordagens possuem importância nutricional, devido ao fato de fosfoderivados do inositol atuarem como antinutrientes.

2.4 GENÔMICA VEGETAL: CONCEITO, BREVE HISTÓRICO E PERSPECTIVAS

Em se tratando de melhoramento vegetal, a biologia molecular, até certo momento, era utilizada para isolar e estudar um único ou poucos genes, assim como averiguar os efeitos fenotípicos interessantes para a agricultura, limitando o conhecimento acerca das bases moleculares de genes e das características fenotípicas advindas da ação dos muitos genes, como por exemplo, na resistência a doenças. Contudo, com as novas tecnologias, tem sido possível o estudo das “oomicas”, com o sequenciamento completo dos nucleotídeos de um genoma e a análise da expressão de genes em plantas submetidas a diversas condições (ARRUDA, 2004). Logo, é possível afirmar que as plantas também entraram na chamada era genômica.

A genômica pode ser considerada como a ciência que estuda o sequenciamento dos nucleotídeos, mapeamento e análise de genomas (RECH FILHO, 2004; FURLAN et al., 2007), não se tratando apenas de uma técnica que auxilia a identificar a função do gene com potencial biotecnológico, mas considerando uma abordagem integrada, com o uso de técnicas de transgenia, geração e caracterização de mutantes e o mapeamento físico e genético, por exemplo. Comumente as análises genômicas são divididas em genômica estrutural, funcional e comparativa.

A genômica estrutural se refere ao início de um processo que visa compreender a análise de um genoma e estudar organização e estrutura do mesmo, por meio da elaboração de mapas físicos, genéticos e de transcritos de alta resolução (HIETER e BOGUSKI, 1997; ONOFRE, 2012). Uma vez que a estrutura do genoma vegetal tenha sido elucidada, é importante determinar os efeitos dessa organização dos genes no desempenho celular, fisiológico e

molecular dos organismos. Por sua vez, a genômica funcional surge como o desenvolvimento e aplicações de abordagens experimentais para avaliar a função dos genes buscando compreender as mudanças no comportamento do genoma em diferentes estágios do desenvolvimento ou devido a uma resposta a diversos estímulos, a partir das informações providas pela genômica estrutural (HIETER e BOGUSKI, 1997). Assim, a genômica funcional envolve estudos de transcriptoma, proteoma e metaboloma e a biologia dos sistemas. Por conseguinte, a genômica comparativa surge como uma maneira de interligar e complementar os estudos da genômica funcional e estrutural visando elucidar as relações entre genomas, a homologia entre sequências e genes, determinando o grau de sintonia de entre espécies correlacionadas. O fundamento dessa genômica é comparar a sequência de referência final de uma espécie com o genoma de outros organismos, de maneira que seja possível identificar regiões similares e diferentes entre eles (HIETER e BOGUSKI, 1997; ONOFRE, 2012).

É válido ressaltar que durante a evolução, alguns genes permanecem em um mesmo cromossomo (sintonia) e na mesma ordem (colinearidade) em espécies diferentes (TANG et al., 2008). Regiões onde há conservação da ordem gênica em organismos distintos são comumente referidas como sintênicas. Embora as relações genômicas das leguminosas ainda não sejam bem elucidadas, estudos revelam sintonia entre os membros dessa família. CHOI et al., 2004 e MUDGE et al. (2005) descreveram macrosintonia dentro do genoma das leguminosas, demonstrando que é mais acentuada em espécies relacionadas e tende a diminuir quanto mais filogeneticamente distantes forem os organismos.

Desde a publicação do sequenciamento completo de *Arabidopsis thaliana* no ano de 2000 (AGI, 2000), muitas culturas de importância agrícola e econômica já possuem genoma montado, como *Oryza sativa* (YU et al. 2002), *Medicago truncatula* (MGSC, 2007), *Lotus japonicus* (SATO et al. 2008), *Glycine max* (SCHMUTZ et al. 2010) e *Jatropha curcas* (SATO et al. 2011). Dentro do gênero *Vigna*, as três principais espécies (*V. unguiculata*, *V. radiata* e *V. angularis*) de importância agrícola e econômica dispõem de montagens disponíveis no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). *V. radiata* apresenta três montagens, sendo uma delas em nível de *contigs* (TANGPHATSORNRUANG et al., 2009), outra em nível *scaffold* (LIU et al., 2016) e o genoma representativo (KANG et al., 2014). Já *V. angularis* apresenta duas montagens referências completas (YANG et al., 2015; KANG et al., 2015) e uma a nível de *scaffold* (LESTARI et al., 2013). Para *V. unguiculata*, há apenas uma montagem disponível no NCBI (MUÑOZ-AMATRIÁIN et al., 2017), contudo essa se encontra a nível de *scaffold*, não dispondo de genoma referência, e por isso não é muito informativa para análises genômicas, diferentemente das duas outras espécies citadas. Uma primeira versão do

sequenciamento do genoma foi divulgada em 2008 para o feijão-caupi, por um grupo de pesquisa dos Estados Unidos (*The Timko Laboratory*: http://faculty.virginia.edu/timko/cowpea_genomics.htm), em que para reduzir os custos do sequenciamento do genoma completo, foram sequenciadas as regiões ricas em genes, selecionadas a partir do padrão de metilação (TIMKO et al., 2008).

Adicionalmente há estudos de sintenia envolvendo espécies do gênero *Vigna*, em 1993, MENANCIOHAUTEA observou considerável conservação do genoma entre *V. radiata* e *V. unguiculata* estendendo-se até por cromossomos inteiros. MUÑOZ-AMATRIAÍN et al. (2017) esclareceu a relação de sintenia entre o feijão-caupi e o feijão comum. KANG et al. (2015) demonstrou sintenia entre o feijão azuki e os legumes filogeneticamente próximos, feijão comum, feijão mungo e a soja. Esse fenômeno de sintenia pode ser explorado pelos melhoristas transferindo o conhecimento gerado a partir de análises genômicas em plantas modelos, ou que são mais bem estudadas, para outras culturas de importância agrônômica relacionadas que não recebem tantos esforços e não dispõem de banco de dados (NAYLOR et al., 2004). Na ausência do genoma do feijão-caupi no banco de dados Phytozome, KIDO (2014) mapeou *in silico* *unitags* SuperSAGE de feijão-caupi em cromossomos da soja e feijão comum, respectivamente. Isso só foi possível porque as espécies são filogeneticamente relacionadas e apresentam alta conservação do seu material genômico (MUÑOZ-AMATRIAÍN et al., 2017). Assim, as informações providas pelas “oomicas” promovem aos pesquisadores uma ferramenta necessária para o melhoramento.

2.4.1 Métodos para análise do transcriptoma

O estudo do transcriptoma busca analisar o conjunto de RNAm, ou transcritos, em que a expressão se dá por um único organismo ou por um grupo de células em determinado momento, refletindo genes ativos expressamente. O seu estudo permite comparar perfis de expressão genica contrastantes assim como identificar genes ou proteínas de interesse de acordo com a resposta dos mesmos (KIDO et al., 2011; 2012). BUSCH e LOHMANN (2007) separaram essas abordagens em três grandes grupos de acordo com a metodologia, sendo elas a hibridização (*Northen blot* e *microarrays*), variantes da PCR [RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), qPCR (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)], a combinação das duas, RT-qPCR e sequenciamento [(geração de ESTs, e variáveis da SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*))]. Contudo, eventos como duplicação gênica levando a existência de famílias gênicas, sobreposição de genes, *splicing* incompleto e alternativo, contaminação do DNA genômico e polimorfismo genético podem gerar resultados confusos, impossibilitando que uma

única técnica possa medir com precisão a abundância de um determinado transcrito, sendo necessário uma mistura das abordagens para obter sucesso na descrição da expressão (MONTI, 2012).

Os estudos iniciais do transcriptoma tiveram como base a técnica *Northern blot* (ALWINE et al., 1977) que consiste na separação do RNA por tamanho utilizando uma membrana de nylon, onde o RNA imobilizado é hibridizado com uma sonda contendo o DNA complementar ao gene de interesse. Esse método determina a abundância e o tamanho dos transcritos oriundos de um gene específico, sendo uma maneira efetiva de detectar transcritos alternativos. Porém, se o total de RNA disponível para o experimento for limitado e o nível de expressão do transcrito de interesse for baixo outras técnicas mais sensíveis devem ser utilizadas, como a RT-qPCR (HE e GREEN, 2013).

Já os microarranjos (*microarray*), ou *chips* de DNA são a tecnologia mais popular para traçar perfis de expressão em larga escala, uma vez que permite detectar simultaneamente dezenas de milhares de transcritos a um custo razoável (BUSCH e LOHMANN, 2007), analisando a hibridização de alvos fluorescentes (representados por RNAm das células) a sondas de cDNAs de genes específicos (SCHENA et al., 1995). Uma estratégia amplamente utilizada é selecionar, com experimentos em *microarray*, muitos genes potencialmente interessantes e confirmar esses candidatos a partir de análises RT-qPCR (KLOK et al., 2002). A maioria dos bancos de dados para expressão gênica são com base em microarranjos (SHERLOCK et al., 2001; BARRETT et al., 2007; BRAZMA et al., 2003). Embora *V. unguiculata* não disponha de uma plataforma comercial *microarray*, já foi demonstrado que um GeneChip comercialmente disponível para soja pode ser usado com eficácia para o feijão-caupi (DAS et al., 2008; 2010).

A técnica mais conhecida para análise do perfil de expressão em pequena-média escala é a RT-qPCR (HEID et al., 1996), uma abordagem que segue o princípio geral da PCR convencional, cujo seu produto de amplificação do DNA é mensurado à medida que se acumula na reação, em tempo real, após cada ciclo de temperatura. Para tal abordagem, a amostra de RNA precisa ser transcrita reversamente a cDNA (DNA complementar) via uma enzima conhecida como transcriptase reversa, processo chamado RT-PCR. Ao término de cada ciclo sondas marcadas com fluoróforo florescem quando hibridizadas com o cDNA, e esses sinais de fluorescência obtidos são analisados em softwares computacionais para calcular tanto a expressão relativa de genes entre diferentes amostras como o número de cópias de RNAm baseado numa curva padrão, além de amplificar a expressão gênica. Assim, a transcrição

reversa seguida associada a análise de PCR em tempo real (qPCR) é um método extremamente sensível, rápido e de custo-benefício para quantificar genes transcritos em células vegetais (UDVARDI et al., 2008). Essa técnica já foi bastante utilizada dentro do gênero *Vigna*, como na validação de microRNAs conservados em tecidos radiculares de feijão-caupi sob estresse salino (PAUL; KUNDU; PAL, 2011), ou ainda na detecção da expressão de um fator de transcrição de *V. radiata* envolvido em múltiplos estresses (CHEN et al., 2016).

Por muito tempo essas foram as técnicas dominantes em termo de expressão gênica, no entanto abordagens de sequenciamento profundo tem ganhado crescente importância, especialmente por não serem limitadas a detecção de transcritos conhecidos. O mais simples método de analisar uma população de RNA é a geração de ESTs (*Expressed Sequence Tags*), tida como uma técnica de descrição da atividade transcricional em larga escala (ADAMS et al., 1991). As ESTs são obtidas a partir de bibliotecas de cDNA com representatividade de todo o conjunto de genes transcritos na célula ou tecido do organismo (MEYERS et al., 2004). A princípio, clones são selecionados aleatoriamente e somente a porção inicial e final são sequenciadas, ganhando tempo e reduzindo os custos que seriam gastos se todo o cDNA fosse sequenciado. As ESTs geradas são altamente redundantes, além de sucessivas a erros, já que foram sequenciadas apenas uma vez. Essas ESTs passam então por um “pré-processamento” onde as sequências repetidas, contaminadas e de baixa complexidade são eliminadas e as que restaram são clusterizadas, a fim de coletar ESTs de um mesmo transcrito que possam ser sobrepostas em um único grupo ou cluster para reduzir a redundância (NAGARAJ et al., 2007). Cada *conting* representa um provável gene que deve ser anotado através de análises *in silico* utilizando ferramentas computacionais, como o BLAST, que compara essas ESTs com sequências já descritas depositadas em banco de dados, através da similaridade entre elas, permitindo identificar genes expressos em determinado tecido, tipo celular ou fase do desenvolvimento, assim como inferir sua função (MALONE et al., 2006).

Adicionalmente, merece destaque a técnica RNA-Seq (sequenciamento do RNA) (MORIN et al., 2008), uma das mais atuais, a qual utiliza uma população de transcritos (total ou fracionada, como poli (A)+) que é convertida em uma biblioteca de fragmentos de cDNA com adaptadores anexados a ambas as extremidades. Esses adaptadores ligados ao cDNA são então amplificados e sequenciados para obter as *reads* (WANG et al., 2009; WOLF, 2013). A técnica é de baixo custo, altamente sensível e precisa para medir a expressão de transcritos, detectar isoformas de genes, miRNA, transcritos raros e pode ser aplicada a qualquer espécie, com ou sem genoma de referência.

A análise de ESTs, embora valiosa para descoberta de novos genes, avalia um número limitado de genes por vez. Desta forma, entre todas as técnicas utilizadas para analisar transcritos, a SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*; Análise Serial da Expressão Gênica) é a que permite uma análise rápida e detalhada de milhares de transcritos. A metodologia SAGE é baseada em três princípios, sendo eles uma curta sequência chamada *tag* que contém informações para identificar exclusivamente um transcrito, desde que a *tag* seja obtida a partir de uma posição única dentro de cada transcrito; as *tags* podem ser ligadas umas às outras para formar longas moléculas em série que são clonadas e sequenciadas; a frequência do número de vezes que uma *tag* é observada, fornece o nível de expressão do transcrito correspondente. Para obtenção das *tags*, o RNA é convertido em cDNA dupla fita através de transcrição reversa utilizando um primer dT ligado a biotina juntamente com estreptodovina, os cDNAs são então isolados pela extremidade 3' através de ligação magnética e digeridos por uma enzima de ancoramento (NlaIII) (VELCULESCU et al., 1995).

O aperfeiçoamento de uma técnica para outra, está na modificação da *tagging enzyme* (enzima para isolamento). Na SAGE é usada a enzima de restrição BsmFI, uma endonuclease do Tipo IIS, que reconhece sequências de DNA assimétricas e clivam o DNA fora do sítio de reconhecimento (PINGOUD et al., 2005), já na LongSAGE a enzima é do Tipo IIS, a MmeI. A SuperSAGE utiliza a EcoP15I, uma endonuclease Tipo III com duas subunidades diferentes que reconhecem sequências de DNA simétricas (VAN AELST et al., 2010). Essas modificações permitiram a geração de *tags* cada vez mais longas (9-15 pb, SAGE; 18–20 pb, LongSAGE; 26 pb, SuperSAGE). Isso porque quando a *tagging enzyme* reconhece seu sítio de reconhecimento no adaptador, clivando alguns pares de bases à frente, sendo o tamanho da *tag* determinado pela enzima usada.

Para os métodos SAGE, o RNA total é extraído do tecido alvo e o cDNA é sintetizado a partir do RNAm. Esse cDNA é digerido com uma enzima de ancoragem, que cliva a maior parte dos transcritos ao menos uma vez. A extremidade mais próxima da cauda poli-A do transcrito é selecionada e adaptadores que contêm o sítio de reconhecimento de uma *tagging enzyme* são ligados. Após digestão com essa última enzima, as *tags* são geradas, concatenadas e clonadas para posterior sequenciamento (MATSUMURA et al., 2003; 2008). A análise do sequenciamento é realizada com base na contagem de cada *tag* representando o nível de expressão do transcrito (JUNIOR et al., 2004). Aumentar tanto o número de *tags* sequenciadas quanto o tamanho delas deixam a abordagem SAGE mais eficiente melhorando a reprodutibilidade e também a detecção de transcritos menos abundantes, assim como promover

uma melhor anotação ou identificação de *tags* correspondentes a genes (BRÄUTIGAM e GOWIK, 2010; KIDO et al., 2012).

Desta maneira diversas variações da SAGE emergiram, como a LongSAGE (SAHA et al., 2002) que gera *tags* maiores com 21 pb utilizando uma endonuclease IIS diferente (MmeI), a RL-SAGE (Robust-LongSAGE) (GOWDA et al., 2004) que gera cerca de 4,5 milhões de *tags* a partir de poucas amostras de RNAm, a SuperSAGE (MATSUMURA et al., 2003) que é capaz de clivar o cDNA com uma endonuclease tipo III (EcoP15I) para gerar *tags* com 26pb. A SuperSAGE é uma técnica de “arquitetura aberta”, não necessitando o conhecimento prévio sobre as sequências de transcritos, além de ter a capacidade de descobrir transcritos inéditos, sendo útil para a expressão de perfis em organismos nos quais há pouca informação sobre o genoma disponível (MEYERS et al., 2004; TERAUCHI et al., 2008; MATSUMURA et al., 2008). Os 26 pb da *tag* SuperSAGE tornam a técnica mais confiável, aumentando a sensibilidade da análise e a cobertura desses transcriptomas (KIDO et al., 2011), possibilitando que ela seja anotada com mais precisão com uso dos bancos de dados públicos (MATSUMURA et al., 2005).

A SuperSAGE pode ser associada a tecnologias NGS (*Next Generation Sequencing*) (KIDO et al., 2012b ; MATSUMURA et al., 2012a, 2012b), incluindo plataformas como Roche® 454, Life Sciences (MOLINA et al., 2008; SHARBEL et al., 2009, 2010; GILARDONI et al., 2010; ITO-INABA et al., 2012), Illumina (Solexa®) *Genome Analyzer* (YAMAGUCHI et al., 2010; MATSUMURA et al., 2010, 2012b; KIDO et al., 2010, 2011, 2012c, 2012d), e Applied Biosystems® SOLiD sequencer (MATSUMURA et al., 2012b). Essa combinação de técnicas é chamada DeepSuperSAGE e permite realizar a análise de centenas de milhares de *tags* simultaneamente eliminando a etapa de formação de *ditags* (MATSUMURA et al., 2011). A variante mais recente da DeepSuperSAGE é a HT-SuperSAGE (*High-Throughput SuperSAGE*) que incorpora um sistema de indexação para analisar múltiplas amostras em uma única análise NGS (MATSUMURA et al., 2012a).

As variantes da SuperSAGE têm sido amplamente usadas para estudo das respostas a estresses, bióticos e abióticos em plantas. EL KELISH et al. (2014) estudaram o pólen da planta ambrósia comum (*Ambrosia artemisiifolia*), uma erva daninha que causa alergia nos humanos, analisando os mecanismos moleculares no desenvolvimento de pólen e suas proteínas alergênicas gerando bibliotecas SuperSAGE para identificar transcritos expressos diferencialmente. KIDO et al. (2012) analisaram tecidos radiculares de cana-de-açúcar submetidos a 24 horas de estresse por déficit de água utilizando a metodologia SuperSAGE

associada ao sequenciamento de alto desempenho Solexa, permitindo a identificação de genes alvo potenciais durante a resposta ao estresse e a identificação 213 *tags* induzidas com categorização de genes. Em leguminosas, os estudos abrangem a soja [déficit hídrico radicular e inoculação com *Phakopsora pachyrhizi*] (KIDO et al., 2010)], o feijão comum (estresse por alumínio na raiz) (YANG et al., 2011), o feijão-caupi [inoculação com CPMSV, o vírus mosaico e CABMV, o potyvirus, déficit de salinidade radicular (100mM NaCl) e déficit hídrico radicular (150 minutos de exposição) (KIDO et al., 2010, 2011, 2014)], e o grão-de-bico [déficit de salinidade (25mM NaCl) e inoculação com *Mesorhizobium ciceri*] (MOLINA et al., 2011)].

Com essa expansão na disponibilidade de dados genômicos, há uma necessidade crescente de armazenar e tratar esse grande volume de informações geradas. É nesse panorama que os bancos de dados se tornam importantes desempenhando papel relevante dentro da bioinformática, possibilitando armazenar e integrar dados.

Considerando a quantidade de dados, e que tais dados podem e devem tornar-se acessíveis a todos, ocorreu a construção de bancos de dados públicos e privados, assim como redes de acesso, as quais possibilitam o fluxo contínuo de informação entre tais bases. Um banco de dados é uma coleção de dados persistentes usados pelos sistemas das organizações (ARRAES et al., 2005). Diversos bancos de dados estão disponíveis online, dentre os quais se destacam o banco de dados americano de sequências de DNA e proteínas (*Genbank*), o europeu EMBL (*European Molecular Biology Laboratory*) e o japonês DDBJ (*DNA Bank of Japan*), todos os três geridos e integrados pelo NCBI (*National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Há também bancos direcionados a espécies vegetais como o *Phytozome* (www.phytozome.net), o *Ensembl Plants* (<http://plants.ensembl.org/index.html>) e o *PlantGDB* (<http://www.plantgdb.org>), incluindo os bancos mais específicos para leguminosas, como o LegumeIP (<http://plantgrn.noble.org/LegumeIP/>) que permite comparar o genoma e transcriptoma de legumes modelos (LI et al., 2011) e o ILDIS (*International Legume Database & Information Service*; <http://www.ildis.org/>).

Dentre as ferramentas computacionais disponíveis estão as relacionadas a anotação de proteínas, predição de genes, bancos de dados biológicos e de vias metabólicas, e o modelo de banco de dados conhecido como *Pathway/Genome Database* (PGDB). O BioCyc é um agregador de PGDBs, e suas ferramentas permitem a navegação, visualização e análise de dados, incluindo browser genômico, visualização das vias metabólicas, ferramenta para análise comparativa e mapeamento com *links* entre cada componente das vias metabólicas (CASPI et al., 2012). Por sua vez, o UniProtKB (*UniProt Knowledgebase*; <http://www.uniprot.org>) é um repositório de informações acerca de proteínas, fornecendo sequências proteicas e informações

funcionais, e é composto por duas seções, o UniProtKB/Swiss-Prot (curado manualmente) e UniProtKB/- TrEMBL (gerados automaticamente e são enriquecidos com anotação automática e classificação) (MAGRANE et al., 2011). Um sistema de informações de enzimas que é bastante conhecido é o BRENDA (*Braunschweig Enzyme Database*; <http://www.brenda-enzymes.org>), em que grande parte dos dados são extraídos manualmente da literatura. Os dados abrangem função, estrutura, ocorrência, aplicação de enzimas, assim como propriedades de mutações e variações (SCHEER et al., 2011). Já o CDD (*Conserved Domain Database*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd>) é utilizado para anotação de sequências de proteínas através da identificação de domínios conservados e sítios funcionais, sendo curado manualmente e utilizando modelos tridimensionais de proteínas para refinar os modelos de domínio e fornecer informações sobre a sequência-estrutura-função (MARCHLER-BAUER et al., 2011). E por fim, um dos bancos mais utilizados para análise sistemática de função genômica, o KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*; <http://www.genome.jp/kegg>), em que a informação genômica é armazenada num banco de dados de genes, com uma coleção de genes para genomas totalmente ou parcialmente sequenciados (KANEHISA e GOTO, 2000; KARP et al., 2010).

Adicionalmente, a anotação é o procedimento pelo qual uma função biológica é atribuída à sequência de resíduos de aminoácidos (proteínas) ou nucleotídeos (genes). Quanto ao formato dos dados, o FASTA é um dos mais conhecidos, em que os dados são apresentados em formato de texto representando as sequências proteicas ou nucleotídicas. Neste sentido, o número de ESTs sequenciadas vem crescendo rapidamente para várias espécies, e em 2013 aproximadamente 74 milhões de ESTs estiveram disponíveis na plataforma *Genbank*. Essas ESTs depositadas em banco de dados públicos ou dbESTs vem sendo muito empregadas em estudos de plantas seja no mapeamento de transcritos (WU et al., 2002; CHOI et al., 2007; STEIN et al., 2007; GUJARIA et al., 2011) na identificação genes expressos em condições de estresses bióticos e abióticos (CAMPOS et al., 2007; GUO et al., 2008; BLAIR et al., 2011; YIN et al., 2011) e no desenvolvimento de marcadores funcionais com traços agronomicamente importantes (VARSHNEY et al., 2009b; ACUÑA et al., 2011; MARCONI et al., 2011).

2.5 BANCO DE FEIJÃO-CAUPI, A REDE NORDEST

No Brasil, diversos grupos de pesquisas dirigem esforços para geração de bibliotecas de ESTs resultando em projetos ESTs, como o consórcio NordEST (<http://bioinfo03.ibi.unicamp.br/vigna/>), para o feijão-caupi, estabelecido em 2005, agrupando doze laboratórios de pesquisa com o intuito de gerar dados úteis para o melhoramento do feijão-

caupi, através da análise genômica funcional e estrutural. A partir do projeto transcriptoma do feijão-caupi (*Cowpea Transcriptome Project*) cerca de 30.000 ESTs foram sequenciadas a partir de 12 bibliotecas distintas sob condições de estresse abiótico (salinidade) e biótico (mosaico severo e potyvirus) (NOGUEIRA, 2012).

Outros projetos ESTs para culturas de relevância no país, incluem o GeneSoja que foi estabelecido em 2008, liderado pela Embrapa Soja e financiado pelo CNPq (<https://bioinfo.cnpso.embrapa.br/genosoja/>), com o objetivo de integrar instituições brasileiras com o interesse comum em elucidar aspectos referentes ao genoma da soja, incluindo informações da expressão gênica e gerando dados relacionados a defesa da planta a estresses bióticos e abiótico (BENKO-ISEPPON et al., 2012); o projeto genoma brasileiro de café (CoffeaEST; <http://www2.iict.pt/?idc=15&idi=18340>) (ESTEVES VIEIRA et al., 2006); o projeto de sequências expressas de citrus (CitEST- <http://biotecnologia.centrodecitricultura.br>) (NATIVIDADE TARGON et al., 2007); e o projeto de etiquetas de sequências expressas de eucalipto (FORESTs; <https://forests.esalq.usp.br>).

Apesar da importância socioeconômica do feijão-caupi, há necessidade de novas pesquisas de sequenciamento de transcriptoma dessa espécie, advindas de vários tecidos e tratamentos, visando aumentar o conjunto básico de informações e auxiliar nas estratégias biotecnológicas e de melhoramento. Assim, estudos transcriptômicos mais eficientes ajudarão a estabelecer uma plataforma para a genômica do feijão-caupi.

3 Artigo I - capítulo de livro aceito: Arun Shanker (Editor). Springer International Publishing, Heidelberg, Germany (2016). “An (A)Biotic Stress Perspective, Vol 2: Molecular and Genetic Perspectives.”

The Transcription Modulation of Inositols and Raffinose Family Oligosaccharides Pathways in Plants

ABSTRACT

Among the multifunctional molecules that participate in processes of plant tolerance/resistance to stresses, inositol (Ins) and its derivatives (phosphorylated, methylated, oxygenated, and Raffinose Family Oligosaccharides) have attracted the attention of researchers. These compounds represent versatile and dynamic signaling molecules and osmolytes in all eukaryotes. Due to the impacts related to Ins and its derivatives in a plant cell, assays have been conducted to understand how these biomolecules affect plant physiology. Thus, overexpression or knockout of Ins-related genes has been shown as interesting strategies for generating more efficient plants capable of growing under stress conditions. In this chapter, studies using molecular tools are presented, and the impacts of their results are discussed based on the plant stress tolerance/resistance. Furthermore, an informative panel is provided with transcriptional modulation of genes related to Ins and its derivatives expressed in plants under stress. There is a gap involving about two dozen enzymes associated with the synthesis of inositol related compounds that have not been adequately studied, and they represent an area of high biotechnological potential.

Keywords: Transgeny, tolerance, resistance, biotechnology.

RESUMO

Entre as moléculas multifuncionais que participam dos processos de tolerância / resistência das plantas ao estresse, o inositol (Ins) e seus derivados (fosforilados, metilados, oxigenados e oligossacarídeos da família Raffinose) atraíram a atenção dos pesquisadores. Estes compostos representam moléculas e osmólitos de sinalização versáteis e dinâmicos em todos os eucariotos. Devido aos impactos relacionados ao Ins e seus derivados em uma célula vegetal, foram realizados ensaios para entender como essas biomoléculas afetam a fisiologia da planta. Assim, a superexpressão ou nocaute de genes relacionados ao ins tem sido demonstrada como estratégias interessantes para gerar plantas mais eficientes, capazes de crescer sob

condições de estresse. Neste trabalho, são apresentados estudos usando ferramentas moleculares e os impactos de seus resultados são discutidos com base na tolerância / resistência ao estresse da planta. Além disso, é fornecido um painel informativo com modulação transcricional de genes relacionados ao Ins e seus derivados expressos em plantas sob estresse. Existe uma lacuna envolvendo cerca de duas dúzias de enzimas associadas à síntese de compostos relacionados ao inositol que não foram adequadamente estudados e representam uma área de alto potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Transgenia, tolerância, resistência, biotecnologia

INTRODUCTION

To survive and integrate in the niche in which they germinate, plants constantly regulate their internal environment to external fluctuations encompassing soil, climate, and biological interactions. Thus, along its evolutionary processes, plants were selected through the need of molecular mechanisms for physiological adjustments to inadequate conditions for development, resulting from adverse conditions. In this way, plants have a diverse and active cellular machinery at different stratified levels, covering perception, signaling, transcriptional control of key metabolic pathways and synthesis of molecules responsive to stresses [1].

Among the molecules functioning in more than one of the afore mentioned levels, inositol (Ins; $C_6H_{12}O_6$) is a biomolecule of great interest. It is a cyclic carbohydrate (polyalcohol) that anchors in each of the six carbons forming the ring, a hydroxyl group. Along with their derivatives, Ins has multiple effects on plant metabolism. They act from the production of secondary messengers to the synthesis of osmolytes and antioxidants (more details in the reviews of [2, 3]). Phosphorylated Ins-derivatives [(poly)phosphoinositides and inositol (poly)phosphates] are versatile and dynamic signaling molecules in all eukaryotes, particularly in plants [4]. These two classes of compounds [highlighted in red and orange respectively, in Figure 1] are interdependent. While (poly)phosphoinositides are used in the synthesis of inositol (poly)phosphates through the action of phospholipases; the breaking of inositol (poly)phosphates produces inositol, which is a substrate for the synthesis of (poly)phosphoinositides. Moreover, according to Ins metabolism, shown in Figure 1, another branch realizes the synthesis of methylated derivatives (highlighted in green). These compounds act as important osmoregulators during periods of unfavorable conditions [5]. Additionally, oxygenated Ins-derivatives are observed (highlighted in yellow in Figure 1), which are involved in increasing

plant tolerance to stresses by decreasing oxidative damage [6]. Still associated with Ins is the metabolism of the Raffinose Family Oligosaccharides (RFOs) [7]. In this biosynthetic pathway, the galactinol synthase (GolS; EC 2.4.1.123) uses myo-inositol and UDP-galactose to produce galactinol, which serve as galactose donors for subsequent synthesis of RFO members ([8, 9]; highlighted in red in Figure 2). Recent reports indicate that RFOs may assist in the reactive oxygen species (ROS) cleaning process. In periods of stress, ROS accumulation favors the physiological imbalance of plants [10].

Due to the impacts related to the Ins and its derivatives in a plant cell, assays have been conducted to understand how these biomolecules affect the physiology of plants. Thus, overexpression or knockout of genes present in these pathways has been shown as interesting strategy for generating more efficient plants capable of growing under abiotic stress conditions. In this chapter, studies using molecular genetic tools will be presented, which affect the above-mentioned metabolic pathways and the studied organisms.

The use of Ins and phosphorylated Ins-derivatives in plant cells under stress

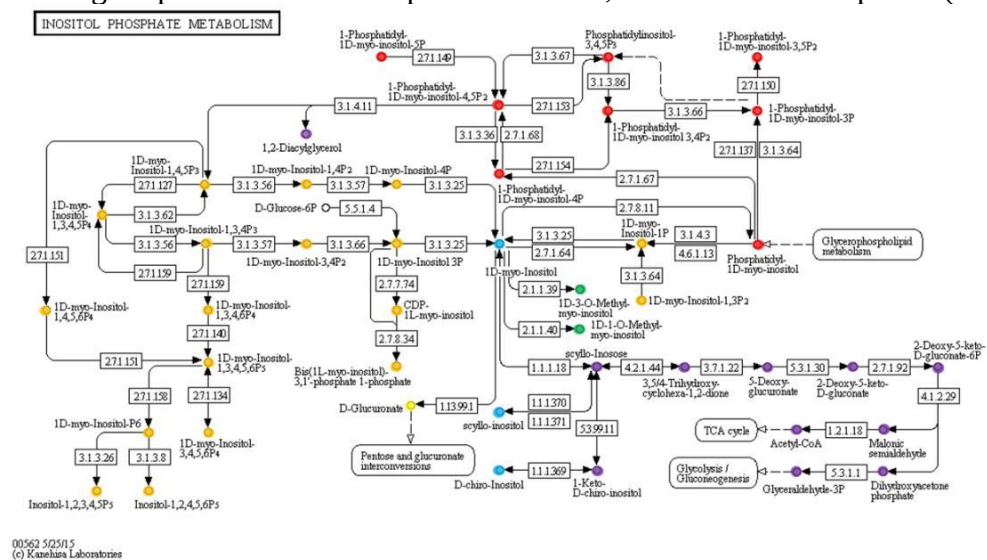
Although there are several articles addressing the involvement of Ins and its derivatives in plant stress responses, so far no report has described the overall transcriptional orchestration of these components covering the metabolic pathways related to them. Information is available only in particular assays covering few genes and their expression modulations, some individual gene knockout analyses or a specific GMO (genetically modified organism) assay. In most several stresses, promoting a biotechnological interest in these compounds.

Among the Ins-derivatives, those that are phosphorylated [(poly)phosphoinositides (highlighted in red in Figure 1) and inositol (poly)phosphates (highlighted in orange)] are the most discussed in the literature. This fact reflects the importance of these compounds in plant physiology in signaling activities. An example is a work developed by Hunt et al. [11] with transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38) expressing reduced levels of a gene encoding phospholipase C (PI-PLC; EC 3.1.4.11). This enzyme catalyzes the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate to InsP3 [inositol (1,4,5)-trisphosphate; (Figure 1)], affecting from this point on the rest of the pathway. The obtained transgenic plants showed a partial inhibition of stomatal opening due to the action of ABA (abscisic acid phytohormone). A possible role of PI-PLC enzyme and InsP3 in ABA-dependent signaling pathway was also reported, thus suggesting that a complete response to ABA phytohormone in guard cells requires PI-PLC. However, other calcium-mobilizing pathways could also help in ABA guard

cell signaling. The stomatal movement is a critical process for the plant under drought conditions by enabling better use of its water supply.

Mills et al. [12] provide more details on this ABA-mediated stomatal regulation in transgenic plants obtained by Hunt et al. [11]. A three-day assay under drought and in dark-adapted conditions, to reopen the stomata in response to light, was carried out. The results showed that transgenic plants with reduced PI-PLC as compared to control plants (with the empty vector without the transgene insert) have a greater increase in stomatal conductance. Thus, there is a strengthening of the role of inhibition due to PI-PLC in ABA-mediated stomatal opening. Further analysis indicated tobacco PI-PLC acting on the inhibition of stomatal opening by ABA, but not in promoting ABA-induced stomatal closure.

There are also reports of the involvement of Ins-derivatives in ABA-independent mechanisms during periods of drought. Perera et al. [13] obtained *A. thaliana* plants transformed with human type I gene for inositol polyphosphate 5-phosphatase (InsP5-ptase; EC 3.1.3.56; Figure 1). This enzyme hydrolysis InsP3, which is an essential element of the signal transduction pathway in general response to stresses. Looking at the impact on plant response to drought, the authors observed that transgenic plants showed increased stress tolerance after 12 days of watering suspension. After this period of stress, wild and controls plants (with the



empty vector without the transgene insert) became brown and dry, while InsP5-ptase transgenic lines remained green and turgid. Furthermore, transgenic plants under drought conditions showed reduced levels of ABA compared with wild plants in the same condition as well as no induction of several genes regulated by the phytohormone. The analyses of stomatal responses in transgenic plants observed that guard cells are less responsive to the inhibition of opening stomata promoted by ABA. Nevertheless, there is an increase in sensitivity to the closing of the

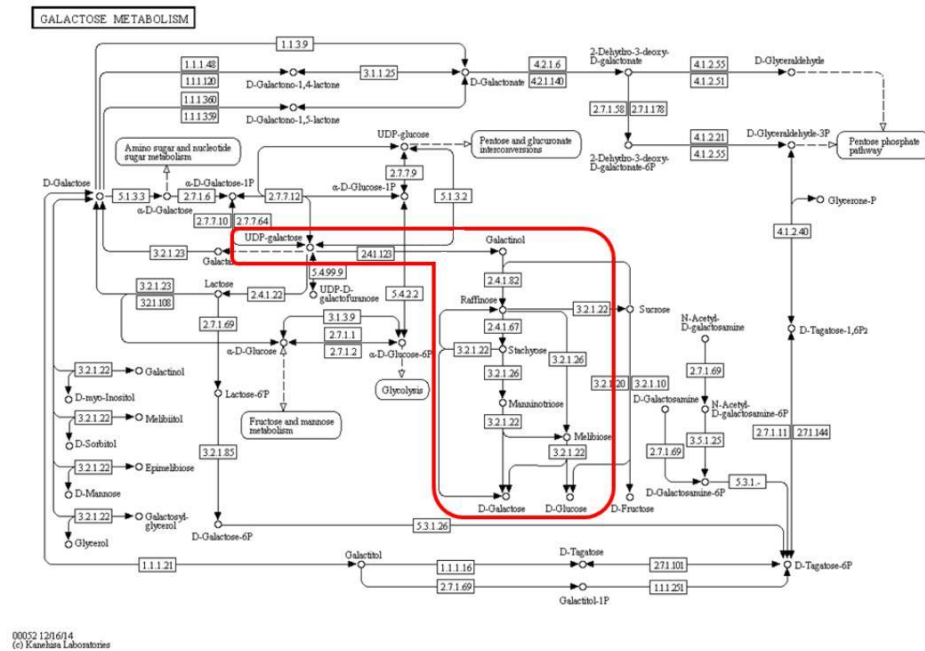
stomata, induced by the phytohormone. The transgenic plants showed irregular behavior in coordinated processes via ABA. Despite this, these plants showed a compensatory overexpression of an ABA-independent pathway involving the transcription factor (TF) DREB2A (dehydration-responsive element-binding protein 2A) and a subset of genes regulated by this TF. In this way, the drought tolerance of Ins5-ptase plants was mediated in part via DREB2A- dependent and that constitutive dampening of InsP3 signal revealed unforeseen interconnections between signaling pathways.

Figure 1. Inositol phosphate metabolism from the KEGG Pathway database. The stereoisomers (highlighted in blue); the phosphorylated derivatives [inositol (poly)phosphates (highlighted in orange) and (poly)phosphoinositides (highlighted in red)]; the methylated derivatives (highlighted in green); the oxygenated derivatives (highlighted in green); and others (highlighted in purple).

In a similar assay, Khodakovskaya et al. [14] reported physiological consequences in transgenic lines of *Solanum lycopersicum* (cv. Micro-Tom) overexpressing a human type I InsP5-ptase gene. The transgenic lines presented a content of 15–30% of InsP3 observed in the wild-type plants. This reduction led to increases in: (1) the total vegetative biomass (two- to fourfold) with an increased ratio of root: shoot dry weight; (2) lycopene levels (in fruit); and (3) the hexose concentration (on fruits and leaves). After 13 days of water stress, the leaf water potential in transgenic plants was about -0.4 MPa higher than in control plants. Drought tolerance in transgenic lines was associated with increased hexoses in the leaves. This would contribute to maintaining a greater potential for water in transgenic leaves under drought. Furthermore, increases in the number of root biomass may have contributed to this improved performance.

The involvement of InsP3 in other stress tolerance processes, beyond drought, has also been demonstrated. Alimohammadi et al. [15] obtained transgenic tomato plants (*Lycopersicon esculentum* cv. MicroTom,) overexpressing a human type I InsP5-ptase gene. These plants presented a decreased level of InsP3 and supported a continuous exposure to light longer than wild plants. Prolonged exposure to light causes oxidative stress in plant cells and can result in irreversible damage. However, the molecular mechanism involved in this tolerance process was not reported, but these transgenic lines were characterized in more detail by Alimohammadi et al. [16]. These authors observed that under stress conditions, the transgenic plants maintained high chlorophyll content and accumulated low levels of hydrogen peroxide. This fact was attributed to the induction of genes related to multiple antioxidants [LeAPX1 (*L. esculentum* ascorbate peroxidase 1), SICAT2, LeSOD (*L. esculentum* superoxide dismutase)] during continuous exposure to light. Other effects included overexpression of the LePHYB

photoreceptor (*L. esculentum* phytochrome B) and a key enzyme [LeCHS1 (*L. esculentum*



chalcone synthase)] in the biosynthesis pathway of flavonoids, which are plant nonenzymatic antioxidants. There was also an overexpression of the SIMYB12 transcription factor, leading to an increase in flavonoids in tomato plants by up-regulation of the LeCHS1 expression. A relationship was established between change in phosphoinositol signaling pathway and increase tolerance to continuous exposure to light, through the activation of ROS-scavenging enzymes, and up-regulation of molecular activators of non-enzymatic antioxidants.

Figure 2. The galactose metabolism from the KEGG Pathway database. Highlighted in red are the enzymatic reactions associated with the metabolism of Raffinose Family Oligosaccharides.

The biotechnological potential through the manipulation of compounds shown in Ins-related metabolic pathways may also be seen in the work of Ahmad et al. [17]. These authors performed a comprehensive analysis of *A. thaliana* genome, using the activation tagging technique in dedifferentiated calli, to identify salt-tolerant mutants (NaCl 150 mM). To this end, plants were modified with pRi35ADen4 binary vector. Such vector contains four copies of the 339 bp long cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S enhancer in the construct that induces the expression of adjacent genes after proper insertion. Of the 18 potential tolerant mutants (150 mM NaCl), a line (stc1; salt-tolerant callus 1) presented the gene for myo-inositol-1-P-synthase-1 [At4g39800; MIPS1; EC 5.5.1.4; Figure 1] with induced expression in callus, with or without salt. This gene expressed 45 and 15 times higher compared to wild-type under the control condition. MIPS catalyzes the first step in the biosynthesis of inositol from glucose-6-P (Figure 1). The referred induction was greater in the mutant line than in the wild type (approximately,

260 times higher), both under stress. The *mips* gene transcription in the wild type reduced dramatically under stress condition. The tolerance analysis revealed that the mutant plants regenerated from calli showed salt tolerance in germination and growth. However, the mechanism involved was not disclosed, but the authors suggested that MIPS protect the calli and the plants from salt stress as osmolytes or by providing a precursor in the regulation of signal transduction pathways.

Kusuda et al. [18] went beyond the study of transformed lines overexpressing enzymes from the Ins-related pathways. They analyzed the differences among wild type and transformants lines in regard to salt tolerance in 3.5 days in medium with concentrations up to 250 mM NaCl. They also sought for differences by mining the metabolomes (the fourth leaf tissue harvested at 0, 6, and 12 h after NaCl stress induction) of the studied plants. To this end, a rice cultivar (*Oryza sativa* cv. Kitaake) was transformed with the construction Act::RINO1. The RINO1 gene encodes an MIPS (EC 5.5.1.4, Figure 1). It has been demonstrated that the constitutive overexpression of rice MIPS when compared to a wild type, results in greater tolerance to salt stress. Furthermore, it leads to a range of metabolic changes, with increased production of various metabolites (such as inositol, raffinose, ascorbate, amino acids). These handle the protection of plants from abiotic stresses. Additionally, activation of basal metabolisms such as glycolysis, the pentose phosphate pathway, and the tricarboxylic acid cycle has been observed during induction of the Ins metabolism in those plants overexpressing MIPS.

Ins metabolism and phosphorylated Ins-derivatives are also associated with response to biotic stresses in plants. This fact shows the plurality of actions of these compounds. Murphy et al. [19] report evidence in this direction. They obtained transgenic potato [*S. tuberosum* L. (cv. Desiree)] and *A. thaliana* lines, synthesizing low levels of phytic acid (1-D-myo-inositol-P6 or InsP6, Figure 1). The transgenic potato lines were obtained by: (1) constitutive expression of an antisense sequence of the myo-inositol 3-phosphate synthase gene. This enzyme (IPS, EC 5.5.1.4, Figure 1) catalyzes the first step in the InsP6 biosynthesis; (2) plants expressing the *Escherichia coli* polyphosphate kinase (PPK, EC 2.7.4.1; Figure 1). PPK inserts inorganic phosphate into chains of phosphate residues linked by phospho-anhydride bonds, and this decreases the phosphate available to InsP6 biosynthesis. Genetically modified potatoes presenting both (1) and of (2) showed increased susceptibility to avirulent pathogen potato virus Y and the virulent pathogen tobacco mosaic virus (TMV). In relation to *A. thaliana*, the authors obtained three loss-of-function mutants [two (atips1 and atips2) involving the gene for IPS (EC 5.5.4.1, Figure 1); and one (atipk1) involving the gene encoding inositol polyphosphate kinase

(IPK1; EC 2.7.1.158, Figure 1)]. IPK1 catalyzes the final step in InsP6 and without this enzyme, very little InsP6 is done. The disruption of InsP6 biosynthesis in *A. thaliana* resulted in an increased susceptibility to viruses (tobacco mosaic virus), bacteria [*Pseudomonas syringae* pv tomato (Pst) DC3000 and Pst DC3000 AvrB], and fungus (*Botrytis cinerea*). The increased susceptibility only occurred for *atips2* and *atipk1* mutants. For *atips1* mutants showing also InsP6 depletion, the resistance to pathogens was not compromised. This suggests either that a particular pool of InsP6 regulates defense against pathogens in *A. thaliana*, or IPS1 and IPS2 are differentially regulated, and one cannot compensate for the other. It was observed with regard to the typical responses of both species that levels of salicylic acid (SA), a key molecular signal for establishing local and systemic acquired resistance, were not diminished. Therefore, SA was not responsible for increased susceptibility to pathogens analyzed. Furthermore, a relationship between the inositol phosphate metabolism and basal resistance to pathogens (fungi, bacteria, and viruses) has been established. This indicates that InsP6 is also required as an essential operation signal for regulation and defense in plants, together with several other well-known defensive signals (NO, cADPR, SA and Ca²⁺).

Recently, Meng et al. [20] found that *A. thaliana* *ips1* loss-of-function mutant (*atips1*; IPS; EC 5.5.4.1, Figure 1) exhibits spontaneous cellular death and increased resistance to oomycete *Hyaloperonospora arabidopsis* pathogen. This result, together with the above, supports the premise that a particular InsP6 pool may regulate defense pathways, since *atips1* mutants did not show increased susceptibility to the cultivar of testes pathogens (Tobacco mosaic virus; *Pseudomonas syringae* pv. tomato (Pst) DC3000 and Pst. DC3000 AvrB; and *Botrytis cinerea*). Additionally, it was observed that spraying the *atips1* mutant plants with Ins could suppress the formation of spontaneous lesions, indicating that Ins production and not AtIPS1 protein is required to prevent the lesion formation. The authors also found evidence for the role of Ins (or Ins-derivatives) in the regulation of programmed cell death.

Reports presented in Table 1 also show the broad roles of Ins and its phosphorylated derivatives in plant cells. From the wide spectrum of analyzed genes, a range of effects on plants at different levels was observed. These effects have shown associations with hormone signaling pathways, such as ABA [12], influences in photosystems [21, 22], with reactive oxygen species (ROS; [23]), with relative water content, with osmotic adjustment [24], among others (Table 1).

Methylated Ins-derivatives in plant cell and the biotechnological use to increase stress tolerance

Some plants use Ins as precursor of compatible solutes such as D-ononitol and D-pinitol, which act as osmoprotectants (small molecules that act as osmolytes and help organisms survive in extreme osmotic stress [35]). In halophyte ice plant (*Mesembryanthemum crystallinum*), which is considered highly tolerant to drought, salinity, and cold, Ins is methylated to D-ononitol and subsequently epimerized to D-pinitol [36]. The myo-inositol O-methyl transferase gene (IMT1; EC 2.1.1.40; Figure 1) is transcriptionally induced by osmotic stress, whereas neither transcriptional nor enzyme activities is detectable in ice plants under normal growth conditions [37, 38]. Despite the positive influence of these metabolites in plant physiology under abiotic stress conditions, there are less available data for these compounds compared with phosphorylated Ins-derivatives.

EC† Number	Gene origin (specie)	Transformant (specie)	Gene Modulation	Analysed Condition	Impact on Tolerance	Authors	Notes
5.5.1.4	<i>Pc</i>	<i>Os and Bj</i>	Overexp.	HS	Raise	[25]	a.
5.5.1.4	<i>Pc</i>	<i>Nt</i>	Overexp.	HS	Raise	[21]	b.
5.5.1.4	<i>As</i>	<i>At</i>	Overexp.	HS	Raise	[22]	c.
3.1.3.25	<i>Ca</i>	<i>At</i>	Overexp.	HS, P, PEG, and HT	Raise	[26]	d.
2.7.1.140; 2.7.1.151	<i>At</i>	<i>Nt</i>	Overexp.	HS and OS	Raise	[27]	e.
2.7.1.140; 2.7.1.151	<i>Th</i>	<i>Bn</i>	Overexp.	HS, D, and OS	Raise	[28]	f.
3.1.4.11	<i>Zm</i>	<i>Zm</i>	Overexp.	D	Raise	[29]	g.
2.7.1.159; 2.7.1.134	<i>Os</i>	<i>Nt</i>	Overexp.	HS	Decrease	[24]	h.
3.1.3.57	<i>At</i>	<i>At</i>	Knockout	HS, F, and D	Decrease	[30]	i.
2.7.1.137	<i>At</i>	<i>At</i>	Knockout	HS	Decrease	[31]	j.
2.7.1.67	<i>At</i>	<i>At</i>	Overexp.	HS and ABA	Raise	[23]	l.
2.7.8.11	<i>Zm</i>	<i>Zm</i>	Overexp.	D	Raise	[32]	m.
3.1.3.8	<i>At</i>	<i>At</i>	Overexp.	HS and OSM	Raise	[33]	n.
2.7.1.149	<i>At</i>	<i>At</i>	Overexp.	HS, D, and ABA	**	[34]	–

†Enzyme Commission; *According to KEGG Database Pathway; – Not observed; Overexp. (Overexpression);

Legend: HS (high salinity); P (paraquat); PEG (polyethylene glycol); HT (high temperature); OS (oxidative stress); D (drought); DH (dehydration); ABA (ABA hormone); OSM (osmotic stress); F (freezing). a. Albeit to a variable extent, overexpres- sion of this gene confers salt-tolerance to diverse evolutionary organisms (from prokaryotes to eukaryotes), including crop plants; b. Transgenic individuals presenting retention of approximately

40–80% of the photosynthetic competence under analyzed stress condition; c. Transgenic individuals retained more chlorophyll and carotenoid by protecting the photosystem II; d. Improving seed germination and seedling growth in transgenic individuals under stress conditions; e. Expression patterns of various stress responsive genes were enhanced, and the activities of antioxidative enzymes were elevated in transgenic plants; f. The transcripts of various stress-responsive genes are increased in ThIPK2 transgenic plants under salt stress condition; g. The sense transgenic plants had higher relative water content, better osmotic adjustment, increased photosynthesis rates, lower percentage of ion leakage and less lipid membrane peroxidation, higher grain yield than the wild type; h. The 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a negative regulator of osmotic stress signaling in tobacco; i. The genetic evidence indicating that phosphoinositols mediate ABA and stress signal transduction in plants, and their turnover is critical for attenuating ABA and stress signaling; j. Salt stress responses, such as increased plasma membrane endocytosis and the intracellular production of ROS, are coordinated by phospholipid-regulated signaling pathways; l. AtPI4K γ 3 is activated by DNA demethylation and regulates the ROS accumulation induced by high salt treatment or ABA treatment; m. ZmPIS regulates the plant response to drought stress through altering membrane lipid composition and increasing ABA synthesis in maize; n. AtPAP15 (3-PHYTASE) may modulate AsA levels by controlling the input of myoinositol into this branch of AsA biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. At: *A. thaliana*; Pc: *P. coarctata*; Sa: *S. alterniflora*; Ca: *C. arietinum*; Th: *T. halophila*; Zm: *Z. mays*; Os: *O. sativa*; Nt: *N. tabacum*; Bn: *B. napus*; Bj: *B. juncea*.

Table 1. Transgenic and knockout plant assays available in the literature related to (poly)phosphoinositides and inositol (poly)phosphates. Relevant information: EC number of the enzyme coded by the studied gene, plant donor species, the genetically modified organisms (transformants), the modulation of the studied gene, the analyzed stress condition, the impact on plant tolerance and physiology (additional details, please see the legends).

Sheveleva et al. [39] were one of the first to report the biotechnological potential of methylated Ins-derivatives. In their work, the authors superexpressed O-methyltransferase (IMT1; EC 2.1.1.40; Figure 1) of *Mesembryanthemum crystallinum* in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. SRL). The transgenic plant increased its tolerance to abiotic stresses [drought and high salinity (50–250 mM NaCl)] when compared to the wild control line. An accumulation of methylated inositol D-ononitol in amounts of fresh weight exceeding 35 $\mu\text{mol g}^{-1}$ in the transformed lines was observed. Besides, the photosynthetic CO₂ fixation was less inhibited in those plants during drought and salt stress. Further, transformed plants recovered faster than the wild type after rehydration. In turn, Sengupta et al. [40] observed an increase of the D-pinitol synthesis in a wild-type rice (*Porteresia coarctata*) with halophilic characteristics when subjected to high salt environment (400 mM NaCl). An increment also occurred in both transcriptional and proteomic level of IMT1, not observable in domesticated rice under the same condition. The authors also reported an increase in the expression of L-myo-inositol 1-phosphate synthase (PcMIPS1; EC 5.5.1.4; Figure 1), along with the expression of IMT1. According to the authors, this suggests that the accumulation of D-pinitol would be a mechanism regulated by salt stress.

Recently, Zhu et al. [41] used a similar strategy as the one developed by Sheveleva et al. [39] to express in *A. thaliana*, a gene coding IMT1, from *Mesembryanthemum crystallinum*. The transformed plants showed higher growth compared to the wild control line and increased tolerance to cold stress (4°C). This increment in tolerance was attributed to different factors: (1) the electrolyte leakage content in the transgenic plants was significantly lower than that of the wild-type plants after freezing stress, showing less damage to the membranes of those plants; (2) transgenic plants showed lower MDA content than wild-type plants, not only in normal conditions but also after stress; and (3) a higher proline content presented in transgenic lines than in wild type, after application of stress.

Oxygenated Ins-derivatives in plant cell and the plant strategy to tackle stress

So far, the myo-inositol oxygenase (MIOX; EC 1.13.99.1; Figure 1) is the only enzyme known by the oxidation of Ins [42]. Its importance in plants stood out from the statement in the Ins metabolism as a precursor in Ascorbic Acid (AsA) biosynthesis in Arabidopsis. In this sense, Lorence et al. [43] observed the expression of a myo-inositol oxygenase (miox4) increasing the content of AsA in leaves (approximately two- to threefold). By that, they anticipated a potential use of the gene by genetic engineering, enhancing levels of this important antioxidant in plants. Further analysis indicated that D-GlcUA (Figure 1), a derivative from MIOX reaction (EC 1.13.99.1, Figure 1), plays a negligible role for AsA biosynthesis [44]. However, MIOX can control the metabolite level of myo-inositol in plants [44].

Nevertheless, the metabolic consequences of MIOX action are still unclear. In order to contribute with information from gene regulation and catalytic activity of this enzyme, Duan et al. [6] performed a functional characterization in rice (*Oryza sativa*), observing its predominant expression in root, with induced transcription under drought stress (20% PEG6000 solution), H₂O₂, high salt (200 mM NaCl), cold (4°C) and Absciscic Acid (100 µM). Transgenic rice lines overexpressing an MIOX gene showed a higher survival rate than a wild line, when in contact with 20% PEG6000 solution. In the same way, the authors also reported for the transgenic lines, transcription levels significantly induced for genes coding enzymes associated with ROS scavenging, suggesting an MIOX activity in reducing oxidative stress.

Moreover, Alford et al. [45] reported MIOX enzymes responding to growing conditions of *A. thaliana* in low energy/nutrient environment. Their data supported the hypothesis that MIOX2 and MIOX4 enzymes would be encoded by multiple genes. Furthermore, on plants growing in low energy conditions/nutrients environments, MIOX2 enzyme would have a

significant role in providing Ins to many different tissues, whereas MIOX4 would act in supplemental form at some tissues. An analysis of promoters was presented, considering multiple lines of MIOX2p:GUS and MIOX4p:GUS seedlings growing on: (I) no nutrients (agar); (II) low nutrients (agar + 0.5× MS salts); and (III) optimal nutrients (agar + 0.5× MS salts + 3% glucose) in low light (40 μ E) during seven days. As a result, only MIOX2p:GUS was expressed abundantly in condition I, whereas in condition II, both MIOX2p:GUS and MIOX4p:GUS showed moderate expression, having been more expressed previously.

Raffinose Family Oligosaccharides (RFOs) and plant strategy to address stresses

RFOs are a class of compatible solutes coming from Ins metabolism ramifications. As mentioned before, the enzyme GolS (EC 2.4.1.123, highlighted in red in Figure 2) connects the metabolism of these compounds, producing galactinol (highlighted in red in Figure 2), which serves as galactose donor for further synthesis of RFO members [8, 9]. To date, structural genomics data and global transcriptome analysis concerning RFOs are only available for corn [46]. For this crop, the authors have performed a genomic identification of genes associated with raffinose metabolism, together with an expression analysis using data-mining from GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) and PLEXdb databases (<http://www.plexdb.org>). Additionally some transgenic lines overexpressing specific gene isoforms related to RFO pathway, under particular growth conditions, are available for some species. These studies showed a positive impact in some crops.

Taji et al. [47], for example, analyzed the expression of seven genes encoding GolS in *A. thaliana* under different stresses. From those genes, only three (AtGolS1, 2 and 3) were stress-responsive. AtGolS1 and AtGolS2 were induced by drought and high salt (250 mM NaCl), but not by low temperature (4°C). On the other hand, AtGolS3 was induced by low temperatures, but not high salinity or drought. The AtGolS2 overexpression in *A. thaliana* was associated with an increase of raffinose and galactinol and resulted in a reduction of leaf transpiration with a greater drought tolerance. In turn, Dos Santos et al. [48] analyzing three *Coffea arabica* galactinol synthase isoforms (CaGolS1, CaGolS2, CaGolS3) observed a mainly tissue-specific expression but differentiated regulation depending on the applied stress (drought, heat, and high salinity). This reinforces the observation by Taji et al. [47], indicating that different galactinol sets can be necessary for response to various stresses. The GOLs (BnGOLS-1) activity was also positively correlated with desiccation tolerance in cabbage seeds (*Brassica napus*) during the vegetative growth period [8]. The tolerance was observed around 21-24 days after flowering

cabbage, coinciding with the accumulation of raffinose and stachyose. The BnGOLS-1 transcripts accumulation was concomitant with the formation of these two RFO members [8].

In *Arabidopsis thaliana* leaves overexpressing HsfA2 (Heat-Shock Transcription Factor A2; [49]) was also found highly induced GolS1, -2, -4 and Raffinose Syntase 2 (RS2; EC 2.4.1.82, highlighted in red in Figure 2) transcriptions. The galactinol and raffinose levels in the transgenic plants were higher compared to the wild-type lines, both in the control condition. These higher levels were positively correlated with an increase in plant tolerance when exposed to the studied stresses [mevalonate (50 mM), high salt (100 mM NaCl) and low temperatures (4°C)].

Latter, Pennycooke et al. [50] studied the expression of α -galactosidase gene (EC 3.1.2.22 highlighted in red in Figure 2) from petunia (*Petunia x hybrida* "Mitchell"), monitoring acclimated plants to low temperatures (4°C) and in response to increasing temperature (25°C). Transcripts induction were observed after one hour of desacclimation occurring together with an increase in enzymatic activity and decreased raffinose content, suggesting that the rise in temperature can regulate the RFO catabolism of certain members, through gene regulation that encoding α -galactosidase.

Thus, the diversity of functions performed by compounds presenting in the Ins metabolism was shown in the described works. Also, studies of distinct isoforms showed positive correlations with plant responses to various abiotic stresses. In this way, the identification of new transcripts, as well as the understanding of its regulation (spatial and temporal) in plants under unfavorable conditions for the development may lead to the discovery of new genes with biotechnological potential.

According to the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) Pathway database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>), which provides diagrams of various metabolic processes, at least 45 enzymes are associated with the metabolic pathways described here. Of these enzymes, 21 (highlighted in green boxes in Figures 3A and 3B) have been studied in previous works addressing the transcriptional expression of their genes or effects on plants under stress. Therefore, there are at least 24 enzymes (in red boxes in Figures 3A and 3B) that have not been targets of these analyses, with significant potential for further research in biotechnology.

Ins and its derivatives in humans: Antinutrients versus disease prevention

Once Ins and its derivatives are present in vegetables and these are part of the daily diet of large populations around the world, it is essential to analyze their potential effects on consumers. The Ins and related metabolites play a heterogeneous physiological role, depending on the concerned organism, plant or animal (including human). In plants, as already mentioned, such compounds help regulate plant homeostasis during periods of stress. In animals (including humans), their influence has very diverse physiological repercussions. Initially, they were only seen as harmful agents because some representatives when present in certain plants could act as antinutritional factors, thereby reducing the bioavailability of important nutrients and the nutritional value of the food. According to Kokhar and Apenten [51], this effect is present a result of a selected adaptive mechanism due to a "chemical warfare" between higher plants and herbivorous pests.

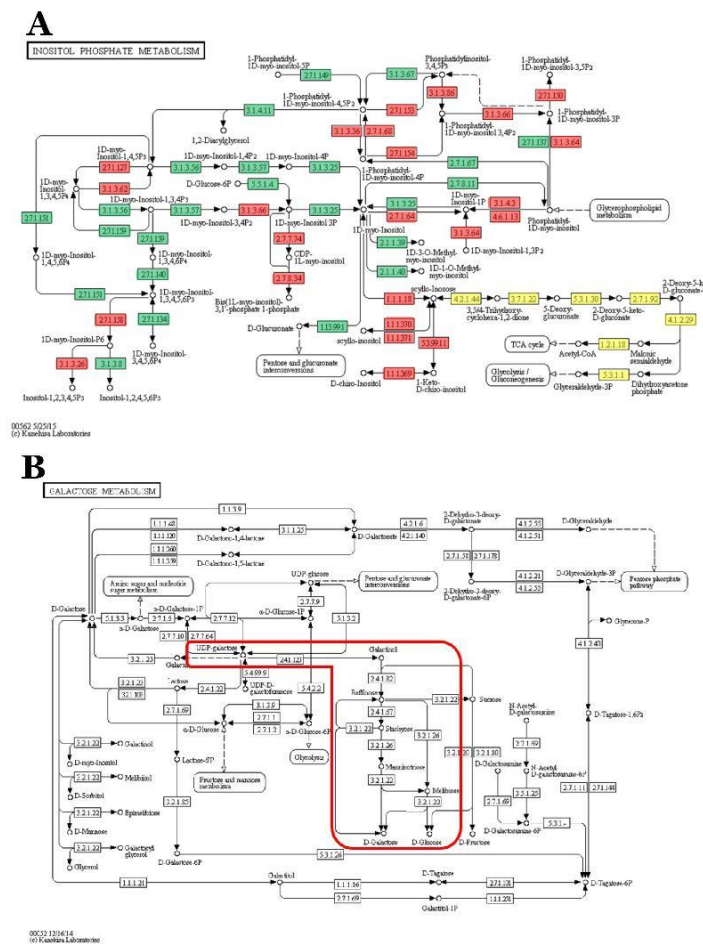


Figure 3. KEGG Pathway database diagrams presenting: (A) Inositol Metabolism; (B) Galactose Metabolism, showing the Raffinose Family Oligosaccharides (highlighted in red). Green Box: enzymes with transcriptional modulation data available from stress assays. Red Box: enzymes without transcriptional modulation data available in the literature. Yellow Box: enzymes not covered in this review.

Among the various Ins-derivatives, phytic acid (1-D-myo-inositol-P6; Figure 1) is the most studied, concerning the impacts on human and animal health. Its unique structure provides the ability to chelate cations such as iron, zinc, potassium, magnesium, and copper, forming insoluble salts denominated phytate. These salts adversely affect animal's ability to absorb and digest nutrients [52, 53]. Phytates can form complexes with proteins, changing their structures and their enzymatic activities and characteristics of solubility and proteolytic digestibility [54]. However, there are reports that show positive aspects in phytates consumption. The presence of these in the diet of patients with diabetes has positive effects in reducing the level of blood glucose due to decreased starch digestion rate and slowing of gastric evacuation [55]. There are also reports of activity against HIV replication, kidney stones prevention, reduction of cholesterol and triglycerides levels, as well as assistance in prevention of heart diseases (for review see [54]). Studies also indicate that both Ins [56] and phytic acid [56, 57] have anticancer properties. With regard to RFOs, besides the fact that they are potential antinutritional factors, there are indications that they may act as important immunostimulants in animals (including humans). Also, RFOs' involvement is suggested in universal mechanisms of oxidative balance in several taxa [58].

CONCLUDING REMARKS AND PERSPECTIVES

Experimentally, mutants and transgenic analyses are being successfully carried out to uncover the various roles played by Ins-related compounds. It is known today that some phosphorylated derivatives of inositol are connected with a large number of signaling procedures which are regulated by both abiotic and biotic stress. Methylated and oxygenated Ins-derivatives, including RFOs, have also proven to be active agents in the process of plant acclimatization to unfavorable conditions, involved in a number of functions. However, there is a gap to be filled. About two dozen enzymes associated with the synthesis of these compounds have not been adequately studied and they represent an area of high biotechnological potential.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank CNPq (National Council of Technological and Scientific Development – process number 454112/2014-9) for financial support. JRCFN thanks to CAPES (InterSis Network – Biocomp Project) for the fellowship granted. EAK thanks to CNPq for the fellowship granted.

REFERENCES

- [1] Bartels D, Souer E. Molecular Responses of Higher Plants to Dehydration. In: Hirt H, Shinozaki K, editors. *Plant Responses to Abiotic Stress*. 1st edn. Springer; 2004. p. 9–38. DOI: 10.1007/978-3-540-39402-0_2
- [2] Loewus, FA, Murthy PPN. Myo-Inositol Metabolism in Plants. *Plant Sci*. 2000; 150: 1–19. DOI: doi:10.1016/S0168-9452(99)00150-8
- [3] Majumder AL, Biswas BB. *Biology of Inositols and Phosphoinositides: Subcellular Biochemistry*. 2nd edn. Springer; 2006. DOI: 10.1007/0-387-27600-9
- [4] Munnik T, Vermeer JEM. Osmotic Stress-Induced Phosphoinositide and Inositol Phosphate Signalling in Plants. *Plant Cell Environ*. 2010;33:655–669. DOI: 10.1111/j. 1365-3040.2009.02097.x
- [5] Flowers TJ, Colmer TD. Salinity Tolerance in Halophytes. *New Phytol*. 2008;179:945–963. doi: 10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x
- [6] Duan J, Zhang M, Zhang H, Xiong H, Liu P, Ali J, Li J, Li Z. OsMIOX, a Myo-Inositol Oxygenase Gene, Improves Drought Tolerance through Scavenging of Reactive Oxygen Species in Rice (*Oryza Sativa* L.). *Plant Sci*. 2012;196:143–151. DOI: 10.1016/j.plantsci.2012.08.003
- [7] Keller F, Pharr DM. Metabolism of Carbohydrates in Sinks and Sources: Galactosyl-Sucrose Oligosaccharides. In: Zamski E, Schaffer AA, editors. *Photoassimilate Distribution in Plants and Crops*. 1st edn. New York: Marcel Dekker; 1996. p. 115–184.
- [8] Liu JJJ, Krenz DC, Galvez AF, De Lumen BO. Galactinol Synthase (GS): Increased Enzyme Activity and Levels of mRNA due to Cold and Desiccation. *Plant Sci*. 1998;134:11–20. DOI: 10.1016/S0168-9452(98)00042-9
- [9] Sprenger N, Keller F. Allocation of Raffinose Family Oligosaccharides to Transport and Storage Pools in *Ajuga Reptans*: The Roles of Two Distinct Galactinol Synthases. *Plant J*. 2000;21:249–258. DOI: 10.1046/j.1365-313X.2000.00671.x
- [10] Elsayed A I, Rafudeen MS, Golldack D. Physiological Aspects of Raffinose Family Oligosaccharides in Plants: Protection against Abiotic Stress. *Plant Biol*. 2014;16:1–8. DOI: 10.1111/plb.12053
- [11] Hunt L, Mills LN, Pical C, Leckie CP, Aitken FL, Kopka J, Mueller-Roeber B, McAinsh MR, Hetherington AM, Gray JE. Phospholipase C Is Required for the Control of Stomatal Aperture by ABA. *Plant J*. 2003;34:47–55. DOI: 10.1046/j.1365-313X. 2003.01698.x

- [12] Mills LN, Hunt L, Leckie CP, Aitken FL, Wentworth M, McAinsh MR, Gray JE, Hetherington AM. The Effects of Manipulating Phospholipase C on Guard Cell ABA-Signalling. *J Exp Bot.* 2004;55:199–204. DOI: 10.1093/jxb/erh027
- [13] Perera IY, Hung C-Y, Moore CD, Stevenson-Paulik J, Boss WF. Transgenic Arabidopsis Plants Expressing the Type 1 Inositol 5-Phosphatase Exhibit Increased Drought Tolerance and Altered Abscissic Acid Signaling. *Plant Cell.* 2008;20:2876–2893. DOI: 10.1105/tpc.108.061374
- [14] Khodakovskaya M, Sword C, Wu Q, Perera IY, Boss WF, Brown CS, Sederoff WH. Increasing Inositol (1,4,5)-Trisphosphate Metabolism Affects Drought Tolerance, Carbohydrate Metabolism and Phosphate-Sensitive Biomass Increases in Tomato. *Plant Biotechnol J.* 2010;8:170–183. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2009.00472.x
- [15] Alimohammadi M, De Silva K, Ballu C, Ali N, Khodakovskaya MV. Reduction of Inositol (1,4,5)-Trisphosphate Affects the Overall Phosphoinositol Pathway and Leads to Modifications in Light Signalling and Secondary Metabolism in Tomato Plants. *J Exp Bot.* 2012;63:825–835. DOI: 10.1093/jxb/err306
- [16] Alimohammadi M, Lahiani MH, Khodakovskaya MV. Genetic Reduction of Inositol Triphosphate (InsP₃) Increases Tolerance of Tomato Plants to Oxidative Stress. *Plant*. 2015;242:123–135. DOI: 10.1007/s00425-015-2289-1
- [17] Ahmad A, Niwa Y, Goto S, Kobayashi K, Shimizu M, Ito S, Usui Y, Nakayama T, Kobayashi H. Genome-Wide Screening of Salt Tolerant Genes by Activation-Tagging Using Dedifferentiated Calli of Arabidopsis and Its Application to Finding Gene for Myo-Inositol-1-P-Synthase. *PLoS One.* 2015;10: e0115502. DOI: 10.1371/journal.pone.0115502
- [18] Kusuda H, Koga W, Kusano M, Oikawa A, Saito K, Hirai MY, Yoshida KT. Ectopic Expression of Myo-Inositol 3-Phosphate Synthase Induces a Wide Range of Metabolic Changes and Confers Salt Tolerance in Rice. *Plant Sci.* 2015;232:49–56. DOI: 10.1016/j.plantsci.2014.12.009
- [19] Murphy, AM, Otto, B, Brearley, Ca, Carr, JP, Hanke, D.E. A Role for Inositol Hexakisphosphate in the Maintenance of Basal Resistance to Plant Pathogens. *Plant J.* 2008;56:638–652. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03629.x
- [20] Meng PH, Raynaud C, Tcherkez G, Blanchet S, Massoud K, Domenichini S, Henry Y, Soubigou-Taconnat L, Lelarge-Trouverie C, Saindrenan P, Renou JP, Bergounioux C. Crosstalks between Myo-Inositol Metabolism, Programmed Cell Death and Basal Immunity in Arabidopsis. *PLoS One.* 2009;4. DOI: 10.1371/journal.pone.0007364

- [21] Majee M, Maitra S, Dastidar KG, Pattnaik S, Chatterjee A, Hait NC, Das KP, Majumder AL. A Novel Salt-Tolerant L-Myo-Inositol-1-Phosphate Synthase from *Porteresia Coarctata* (Roxb.) Tateoka, a Halophytic Wild Rice. Molecular Cloning, Bacterial Overexpression, Characterization, and Functional Introgression into Tobacco-Confer- ring Salt Tolerance Phenotype. *J Biol Chem*. 2004;279:28539–28552. DOI: 10.1074/ jbc.M310138200
- [22] Joshi R, Ramanarao MV, Baisakh N. Arabidopsis Plants Constitutively Overexpress- ing a Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase Gene (SaINO1) from the Halophyte Smooth Cordgrass Exhibits Enhanced Level of Tolerance to Salt Stress. *Plant Physiol Biochem*. 2013;65:61–66. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2013.01.009>
- [23] Akhter S, Uddin MN, Jeong IS, Kim DW, Liu X-M, Bahk JD. Role of Arabidopsis At-PI4K γ 3, a Type II Phosphoinositide 4-Kinase, in Abiotic Stress Responses and Floral Transition. *Plant Biotechnol J*. 2015:1–16. DOI: 10.1111/pbi.12376
- [24] Niu X, Chen Q, Wang X. OsITL1 Gene Encoding an Inositol 1,3,4-Trisphosphate 5/6-Kinase is a Negative Regulator of Osmotic Stress Signaling. *Biotechnol Lett*. 2008;30:1687–1692. DOI: 10.1007/s10529-008-9730-5
- [25] Das-Chatterjee A, Goswami L, Maitra S, Dastidar KG, Ray S, Majumder AL. Intro- gression of a Novel Salt-Tolerant L-Myo-Inositol 1-Phosphate Synthase from *Portere- sia Coarctata* (Roxb.) Tateoka (PcINO1) Confers Salt Tolerance to Evolutionary Diverse Organisms. *FEBS Lett*. 2006;580:3980–3988. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.06.033
- [26] Saxena SC, Salvi P, Kaur H, Verma P, Petla BP, Rao V, Kamble N, Majee M. Differen- tially Expressed Myo-Inositol Monophosphatase Gene (CaIMP) in Chickpea (*Cicer Arietinum* L.) Encodes a Lithium-Sensitive Phosphatase Enzyme with Broad Sub- strate Specificity and Improves Seed Germination and Seedling Growth under Abio- tic Stresses. *J Exp Bot*. 2013;64:5623–5639. DOI: 10.1093/jxb/ert336
- [27] Yang L, Tang R, Zhu J, Liu H, Mueller-Roeber B, Xia H, Zhang H. Enhancement of Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Plants Constitutively Expressing AtIpk2, an Inositol Polyphosphate 6-/3-Kinase from Arabidopsis Thaliana. *Plant Mol Biol*. 2008;66:329–343. DOI: 10.1007/s11103-007-9267-3
- [28] Zhu JQ, Zhang JT, Tang RJ, Lv QD, Wang QQ, Yang L, Zhang HX. Molecular Char- acterization of ThIPK2, an Inositol Polyphosphate Kinase Gene Homolog from *Thel- lungiella Halophila*, and its Heterologous Expression to Improve Abiotic Stress Tolerance in *Brassica Napus*. *Physiol Plant*. 2009;136: 407–425. DOI: 10.1111/j. 1399-3054.2009.01235.x

- [29] Wang C-R, Yang A-F, Yue G-D, Gao Q, Yin H-Y, Zhang J-R. Enhanced Expression of Phospholipase C 1 (ZmPLC1) Improves Drought Tolerance in Transgenic Maize. *Planta*. 2008;227:1127–1140. DOI: 10.1007/s00425-007-0686-9
- [30] Xiong L, Lee B, Ishitani M, Lee H, Zhang C, Zhu J. FIERY1 Encoding an Inositol Polyphosphate 1-Phosphatase Is a Negative Regulator of Absciscic Acid and Stress Signaling in Arabidopsis. *Gene Dev*. 2001;15:1971–1984. DOI: 10.1101/gad.891901.netic
- [31] Leshem Y, Seri L, Levine A. Induction of Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Endocytosis by Salt Stress Leads to Intracellular Production of Reactive Oxygen Species and Salt Tolerance. *Plant J*. 2007;51:185–197. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03134.x
- [32] Liu X, Zhai S, Zhao, Y, Sun B, Liu C, Yang A, Zhang J. Overexpression of the Phosphatidylinositol Synthase Gene (ZmPIS) Conferring Drought Stress Tolerance by Altering Membrane Lipid Composition and Increasing ABA Synthesis in Maize. *Plant Cell Environ*. 2013;36:1037–1055. DOI: 10.1111/pce.12040
- [33] Zhang W, Gruszewski HA, Chevone BI, Nessler CL. An Arabidopsis Purple Acid Phosphatase with Phytase Activity Increases Foliar Ascorbate. *Plant Physiol*. 2008;146:431–440. DOI: 10.1104/pp.107.109934
- [34] Mikami K, Katagiri T, Iuchi S. A Gene Encoding Phosphatidylinositol-4-Phosphate 5-Kinase is Induced by Water Stress and Absciscic Acid in Arabidopsis Thaliana. *Plant J*. 1998;15:563–568. DOI: 10.1046/j.1365-313X.1998.00227.x
- [35] Lang F. Mechanisms and significance of cell volume regulation. *J Am Coll Nutr*. 2007;26(5 Suppl):613S–623S. DOI: 10.2174/1389202911314030001
- [36] Taji T, Takahashi S, Shinozaki K. Inositols and Their Metabolites in Abiotic and Biotic Stress Responses. In: Majumder AL, Biswas, BB, editors. Spring;2006. p. 239–264. DOI: 10.1007/0-387-27600-9_10
- [37] Rammesmayer G, Pichorner H, Adams P, Jensen RG and Bohnert HJ. Characterization of IMT1, Myo-Inositol O-Methyltransferase, from Mesembryanthemum Crystallinum. *Arch Biochem Biophys*. 1995;322:183–188. DOI: doi:10.1006/abbi.1995.1450
- [38] Vernon DM, Bohnert HJ. Increased Expression of a Myo-Inositol Methyl Transferase in Mesembryanthemum Crystallinum is Part of a Stress Response Distinct from Crassulacean Acid Metabolism Induction. *Plant Physiol*. 1992;99:1695–1698. DOI: 10.1104/pp.99.4.1695
- [39] Sheveleva E, Chmara W, Bohnert HJ, Jensen RC. Increased Salt and Drought Tolerance by D-Ononitol Production in Transgenic Nicotiana Tabacum L. *Plant Physiol*. 1997;115:1211–1219. DOI: <http://dx.doi.org/10.1104/pp.115.3.1211>

- [40] Sengupta S, Patra B, Ray S, Majumder AL. Inositol Methyl Transferase from a Halophytic Wild Rice, *Porteresia Coarctata* Roxb. (Tateoka): Regulation of Pinitol Synthesis under Abiotic Stress. *Plant Cell Environ.* 2008;31:1442–1459. DOI: 10.1111/j. 1365-3040.2008.01850.x
- [41] Zhu B, Peng RH, Xiong AS, Xu J, Fu XY, Zhao W, Jin XF, Meng XR, Gao JJ, Cai R, Yao QH. Transformation with a Gene for Myo-Inositol O-Methyltransferase Enhances the Cold Tolerance of *Arabidopsis Thaliana*. *Biol Plant.* 2012;56:135–139. DOI: 10.1007/s10535-012-0029-y
- [42] Arner RJ, Prabhu KS, Thompson JT, Hildenbrandt GR, Liken AD, Reddy CC. Myo-Inositol Oxygenase: Molecular Cloning and Expression of a Unique Enzyme That Oxidizes Myo-Inositol and D-Chiro-Inositol. *Biochem J.* 2001;360:313–320. 10.1042/0264-6021:3600313
- [43] Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. Myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. *Am Soc Plant Biol.* 2004;134: 1– 338. DOI: 10.1104/pp.103.033936.sapiens
- [44] Endres S, Tenhaken R. Myoinositol Oxygenase Controls the Level of Myoinositol in *Arabidopsis*, but Does Not Increase Ascorbic Acid. *Plant Physiol.* 2009;149:1042–1049. DOI: 10.1104/pp.108.130948
- [45] Alford SR, Rangarajan P, Williams P, Gillaspay GE. Myo-Inositol Oxygenase Is Required for Responses to Low Energy Conditions in *Arabidopsis Thaliana*. *Front Plant Sci.* 2012;3:1–11. DOI: 10.3389/fpls.2012.00069
- [46] Zhou ML, Zhang Q, Zhou M, Sun ZM, Zhu XM, Shao JR, Tang YX, Wu YM. Genome-Wide Identification of Genes Involved in Raffinose Metabolism in Maize. *Glycobiology.* 2012;22:1775–1785. DOI: 10.1093/glycob/cws121
- [47] Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Important Roles of Drought and Cold-Inducible Genes for Galactinol Synthase in Stress Tolerance in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant J.* 2002;29:417–426. DOI: 10.1046/j.0960-7412.2001.01227.x
- [48] dos Santos TB, Budzinski IGF, Marur CJ, Petkowicz CLO, Pereira LFP, Vieira LGE. Expression of Three Galactinol Synthase Isoforms in *Coffea Arabica* L. and Accumulation of Raffinose and Stachyose in Response to Abiotic Stresses. *Plant Physiol Biochem.* 2011;49:441–448. DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.01.023

- [49] Nishizawa-Yokoi A, Yoshida E, Yabuta Y, Shigeoka S. Analysis of the Regulation of Target Genes by an Arabidopsis Heat Shock Transcription Factor, HsfA2. *Biosci Bio- technol Biochem.* 2009;73:890–895. DOI: 10.1271/bbb.80809
- [50] Pennycooke JC, Vepachedu R, Stushnoff C, Jones ML. Expression of an A-Galactosidase Gene in Petunia Is Upregulated during Low-Temperature Deacclimation. *JASHS.* 2004;129:491–496.
- [51] Khokhar S, Apenten, RKO. Antinutritional Factors in Food Legumes and Effects of Processing. In: Squires VR, editor. *The Role of Food, Agriculture, Forestry and Fisheries in Human Nutrition.* 1st edn. EOLSS; 2003. p. 82–116.
- [52] Raboy V, Young KA, Dorsch JA, Cook A. Genetics and Breeding of Seed Phosphorus and Phytic Acid. *J Plant Physiol.* 2001;158:489–497. DOI: 10.1078/0176-1617-00361
- [53] Raboy V. Seeds for a Better Future: “Low Phytate” Grains Help to Overcome Malnutrition and Reduce Pollution. *Trends Plant Sci.* 2001;6:458–462. DOI: 10.1016/ S1360-1385(01)02104-5
- [54] Kumar V, Sinha AK, Makkar HPS, Becker K. Dietary Roles of Phytate and Phytase in Human Nutrition: A Review. *Food Chem.* 2010;120:945–959. DOI: 10.1016/j.foodchem. 2009.11.052
- [55] Thompson LU. Potential Health Benefits and Problems Associated with Antinu- trients in Foods. *Food Res Int.* 1993;26:131–149. DOI: 10.1016/0963-9969(93)90069-U
- [56] Vuverick I, Shamsuddin AM. Cancer Inhibition by Inositol Hexaphosphate (IP6) and Inositol: From Laboratory to Clinic. *J Nutr.* 2003;133:3830–3836.
- [57] Shamsuddin AM. Anti-Cancer Function of Phytic Acid. *Int J Food Sci Technol.* 2002;37:769–782. DOI: 10.1046/j.1365-2621.2002.00620.x
- [58] Van den Ende W. Multifunctional Fructans and Raffinose Family Oligosaccharides. *Front. Plant Sci.* 2013;4:247. DOI: 10.3389/fpls.2013.00247

4 ARTIGO II - artigo a ser submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*

Cowpea and abiotic stress: transcriptomic analysis of the metabolic pathway of Inositol

Amanda Cordeiro de Melo Souza¹, Manassés Daniel da Silva², José Ribamar Costa Ferreira Neto¹, Antonio Félix da Costa², Éderson Akio Kido¹

ABSTRACT

Plants have evolved to survive in environments where adverse conditions such as abiotic stresses are often imposed. For their survival, they have developed numerous mechanisms that allow the detection of environmental changes, as well as the induction of specific responses to the imposed stressful conditions, minimizing the losses. Among the molecules that act in the response to stress, it is worth mentioning the inositol and its derivatives, with multiple effects on plant metabolism. This emphasizes the impact that the identification of related transcripts under unfavorable conditions of cowpea cultivation, since the identification of promising candidate genes for the improvement of cultivated species in relation to the main stresses still falls short of the needs. Thus, the identification of transcripts related to the plant response to stresses in the inositol metabolism pathway was performed for the cowpea culture, based on the KEGG Pathway. In the metabolic pathway, 385 ESTs of cowpea anchoring 57 unitags were represented, which were similar with 21 sequences of common bean seeds. Five candidate genes were selected for validation by RT-pPCR of the results found in the in silico analysis, being MIOX, MMSDH, IpK2, MIK, PI-PLC. The proposed genes presented similar response to the in silico result, being induced or with non-differential expression.

Keywords: *Vigna unguiculata*, EST, SuperSAGE, enzymes.

RESUMO

As plantas evoluíram para sobreviver em ambientes onde frequentemente são impostas condições adversas, como estresse abiótico. Para sua sobrevivência, eles desenvolveram inúmeros mecanismos que permitem a detecção de mudanças ambientais, bem como a indução de respostas específicas às condições estressantes impostas, minimizando as perdas. Dentre as moléculas que atuam na resposta ao estresse, vale destacar o inositol e seus derivados, com múltiplos efeitos no metabolismo das plantas. Isso enfatiza o impacto de que a identificação de transcritos relacionados em condições desfavoráveis ao cultivo do feijão caupi, uma vez que a identificação de genes candidatos promissores para o aprimoramento de espécies cultivadas em relação aos principais estresses ainda fica aquém das necessidades. Assim, a identificação de transcritos relacionados à resposta da planta ao estresse na via do metabolismo do inositol foi realizada para a cultura do feijão caupi, com base na via KEGG. Na via metabólica, foram representadas 385 ESTs de feijão-caupi ancorando 57 unitags, semelhantes em 21 seqüências de sementes de feijão. Cinco genes candidatos foram selecionados para validação por RT-pPCR dos resultados encontrados na análise *in silico*, sendo MIOX, MMSDH, IpK2, MIK, PI-PLC. Os genes propostos apresentaram resposta semelhante ao resultado *in silico*, sendo induzidos ou com expressão não diferencial.

Palavras-chave: *Vigna unguiculata* L., EST, SuperSAGE, enzimas.

INTRODUCTION

Cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] plays an important role in the traditional diet of many countries. Consumption of this legume has been associated with the fact that it is low in fat and is an excellent source of protein, fiber and phytochemicals (Freire Filho, 2011; Baptista et al, 2017). Allied to its nutritional and functional properties, this legume has some rusticity and phenotypic plasticity, or allows to cultivate in adverse climate and soil conditions, contributing to reduce the almost exclusive dependence on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.), the main bean consumed in the Brazil, but which does not grow well in the North and Northeast, or which gives cowpea a certain strategic value (Dutra et al., 2011).

Like other crops, cowpea also suffers severe losses due to unfavorable crop conditions. The main factors limiting agricultural production are due to abiotic stresses, such as soil salinity. In the presence of high salt content, plants undergo significant reduction in growth and

development due to the osmotic and ionic effects that cause toxicity in response to stress (Munns and Tester, 2008; Taiz and Zeiger, 2013). In order to restore homeostatic conditions, acclimatize to the new environment and resume growth and development, plants have developed adaptive mechanisms that minimize the damage caused by excess salt, something that can make them less sensitive to stress (Kantar et al., 2011).

Among the molecules that act in the physiological adjustment process to face adverse conditions, inositol (Ins) together with its derivatives has aroused interest since it acts from the production of secondary messengers, osmolytes, antioxidants and enzymes (Loewus and Murthy, 2000; Majumder and Biswas, 2006). Consequently, the production of these compounds counteracts environmental stresses that may unbalance plant physiology. For example, antioxidants produced in inositol metabolism will stabilize reactive oxygen species (ROS) during periods of stressful conditions (Elsayed et al., 2013). Plant stress tolerance involves changes in the whole plant: tissue, cellular, physiological and molecular levels. Combination of intrinsic changes ensures the plant ability to remain in unfavorable environmental conditions (Lata et al., 2011). Studies that involve knowledge about genetical expression of organisms, metabolic pathways and genes under certain situations such as salinity, water deficit, diseases and other abiotic and biotic stresses are fundamental (Mittler and Blumwald, 2010; Todaka et al., 2015).

Considering the global economic importance of cowpea, and the frequent problem of salinity, the “Rede NordEST” represents a group of Brazilian research institutions, aiming at advances in the study of functional and structural genomics, using different methodological approaches (Expressed Sequence Tag (EST), HT-SuperSAGE). SuperSAGE (Matsumura et al., 2003) is one of the most efficient methodologies for transcriptome analysis (Matsumura et al., 2012a) and has been reported in studies involving plant responses to biotic and abiotic stresses, identifying genes differentially expressed in plants, such as rice (Matsumura et al., 2003), sugarcane (Kido et al., 2012) and cowpea (Kido et al., 2009). Thus, this work aims to analyze the HT-SuperSAGE libraries from roots of cowpea plants (cultivars Pitiúba and BR-14 Mulato) subjected to saline stress (100mM NaCl), related to the metabolic pathway. inositol.

MATERIAL AND METHODS

Seeds of two cultivars were tested, derived from the Pernambuco Agronomic Institute (IPA): Pitiuba (salt tolerant; PT) (Dantas et al., 2005; Praxedes and Ferreira, 2009) and BR-14 Mulato (salt-sensitive; BR) (Kido et al., 2009). During the saline assay, 31-day-old seedlings were exposure to salt for different periods (NaCl added to Hoagland’s solution to a final concentration of 100 mM) (Hoagland and Arnon, 1950). The roots were collected at 0

minutes (negative control), 30 (T1), and 90 (T3) minutes after saline Hoagland's solution irrigation. Subsequently, the samples were immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . The experimental designs were factorial (cultivars x treatments) with three biological replicates (three seedlings for each replicate). Total RNA was isolated from roots using CTAB extraction technique with modification (Chang et al, 1993). Also, RNA was treated with DNase Treatment and Removal Reagentes Kit (Ambion). After treatment, was quantified through spectrophotometry NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab), and RNA was converted in cDNA using ImProm-IITM Reverse Transcription System kit (Promega) then resuspended in 20 μL as instructions from manufacturer. cDNA synthesis were incubated at 70°C for 7 minutes in buffer solution, 25°C for 5 minutes (genomic DNA removal), 42°C for 60 minutes (reverse transcription) and 70°C for 15 minutes (enzyme inactivation) in a termocycler. Samples were stored in freezer at -20°C until RT-qPCR reactions. Furthermore, genomic DNAs from accesses were utilized for amplifications in 20 μL PCR reactions (20 ng of genomic DNA, 1x PCR buffer, 1,5mM of MgCl_2 , 100mM of dNTPs, 0,15 μM of each primer and 0,5U of taq DNA polymerase). RNA integrity was verified in 1,5% agarose gel (p/v) utilizing bluegreen stain (LGC Biotechnology®).

For available HT-SuperSAGE tags (26 pb) involving saline stress developed by Rede NordEST comprised 133,694 unitags from the libraries (Kido et al., 2012). Considering the contrast between two libraries, significance tests were applied (Audic and Claverie test) with the same software. It was determined the "p" value at 5% probability level ($p \leq 0.05$) and expressed unitags were classified in: DR – down-regulated, UR - up-regulated and n.s. – not-significant. Modulation value of expressed tag (FC: Fold Change) was obtained after normalizing the library to one million tags. The HT-SuperSAGE unitags were aligned using BLASTn analysis (e-value $< e^{-10}$) against cowpea ESTs of from the following databases: i) local database (Rede NordEST – UFPE – Harvest: Cowpea Project; 273.434 ESTs), ii) Gene Index Project (32,937 ESTs), iii) NCBI (National Center of Biotechnology Information; 187,487 ESTs). Only BLASTn alignment (tag-EST) or one mismatch, but not compromising the first 4 initial bases (CATG) were considered to this study. In addition, the cowpea ESTs presenting unitags were aligned through BLASTn (e-value $< e^{-10}$) with transcripts from *Phaseolus vulgaris*. Domain annotation were confirmed through CDD (Conserved Domain Database), using the respective tool at the NCBI website. Transcripts differentially expressed were hierarchically clustered using Cluster 3.0 program for generate heatmaps (v.1.1.4r3; Eisen et al., 1998). It was used standard parameters and modulation data of related unitags based on FC values; the ratio of unitag abundance considering two libraries, the stressed and the negative

control). Associated dendograms were visualized through TreeView program (Page, 1996). Mapping ESTs presenting unitags in the Ins metabolic pathways was performed using the KEGG Mapper - Search & Color Pathway tool from the KEGG website. The diagram of Inositol Phosphate Metabolism of KEGG database presents 48 different enzymes; 24 of these enzymes composed the seed sequences of mapped transcripts from common bean genome. Numbers ECs (Enzyme Commission Numbers) have identify the enzyme.

Analysis of HT-SuperSAGE, target genes were selected for validation through RT-qPCR. In order to confirm the identities of drawn ESTs used, primers were aligned BLASTn against mRNA RefSeq, and there was a search for conserved domains in primary sequences of open reading frames (ORFs). Primers, to amplify target cDNAs that aligned in the biosynthesis pathway were designed through Primer3 program. Following parameters were used: (1) primer size – minimum 20, optimal 22 and maximum 24; (2) amplicon size – 60 to 150bp; (3) primer dissociation temperature (TM) – minimum of 57°C, optimum of 60°C and maximum 63°C; (4) melting temperature – minimum of 65°C, optimum of 82°C and maximum of 95°C; (5) GC content (%) – variation from 45 to 55% and (5) GC clamp -1. Other program parameters followed the standard setting. Bioneer Corporation (South Korea) synthetize primers that were tested in amplification of cDNAs utilizing conventional PCR (Hold 5min 95°C, followed by 35 cycles of 95°C for 15s, 58°C for 30s, and 72°C for 30s. PCR products were analyzed in 1,5% agarose gel (p/v) with bluegreen stain (LGC Biotechnology®). RT-qPCR validate the gene expression of five molecular candidates. Rt-qPCR assays followed the MIQE (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) protocol guidelines. RT-qPCR reactions were performed in a 96-well BIOER® utilizing Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG kit (Invitrogen) following manufacturer instructions. The formula $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$ was used to calculate the efficiency of each oligonucleotides pair. Two normalizing genes were used for each analysis, and the results were analyzed using Relative Expression Software Tool (REST 4.0) version 2.0.1.3 (Pfaffl et al., 2002). Calibration curves were made using cultivars tolerant and sensitive cDNA samples in serial dilutions (1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}). RT-qPCR reactions were performed in a 10 µL final volume, including: 1 µL cDNA sample (diluted five times), 5 µL of qPCR SYS Green™ 2x (USB®) HotStart-IT mastermix, 0,05 µL of ROX, 1,95 µL of ultrapure water and 1 µL of each primer (0,05 µM). A negative control (cDNA sample) and two references genes actin and UE21D were used in all RT-qPCR reactions (96-well plates) with three biological replicates and three techniques (Amorim et al., 2018). RT-qPCR reactions were performed in LineGene 9660, FQD-96A (Bioer®) using SYBR green detection system. These reactions used the following program:

initial denaturation of 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15s, 58°C for 30s and 72°C for 30s. The dissociation curves were analyzed between 65 and 95°C for 20min after 40 cycles. LineGene 9600 software (version 1.1.10) determined the quantification cycles (Cq), melting temperatures and absolute/relative quantifications. A brief outline of the methodology can be seen below (Figure 1).

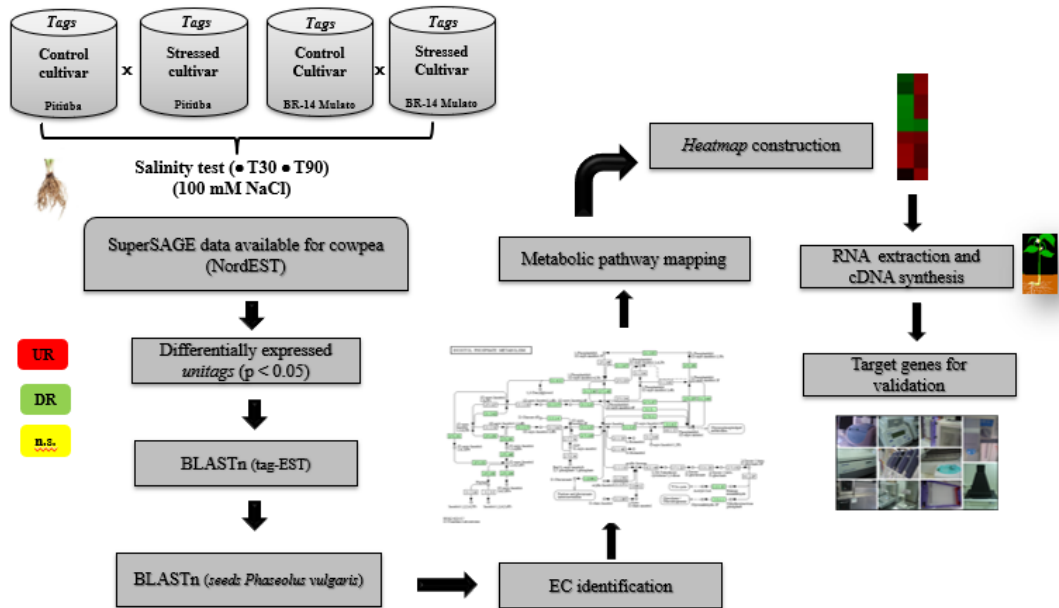


Figure 1. Flowchart of the steps of the cowpea test under saline stress (100 mM NaCl).

RESULTS

Afterwards, BLASTn ($e\text{-value} < e^{-1}$) of 133,694 tags with 493,858 ESTs of cowpea was effectuated. Acceptable alignments (tag-EST alignment was perfect or with a range of 26bp, which could not occur in the four initial bases – CATG) involved 77,753 unitags and 196,764 different ESTs of cowpea. Using Venn diagram it was possible to quantify common tags for the two main contrast, considering the differentially expressed tags in each contrast. Also, the unique tags of each contrast and the type of regulation observed in stressed and non-stressed groups were analyzed. After stress application, 5,199 and 4,102 unitags were considered UR exclusively in the tolerant and sensitive, respectively (Figure 2A). On the other hand, 3,430 unitags were UR under saline stress in both cultivars. 509 unitags were UR in the sensitive group and DR in the tolerant group, and 225 unitags were considered UR in the tolerant group and DR in the sensitive (Figure 2A). Similarly, 3,300 unitags were exclusively DR in the

sensitive and 2,163 in the tolerant group after application of the same stress (Figure 2A). In addition, 1,036 unitags were DR in both cultivars (Figure 2A).

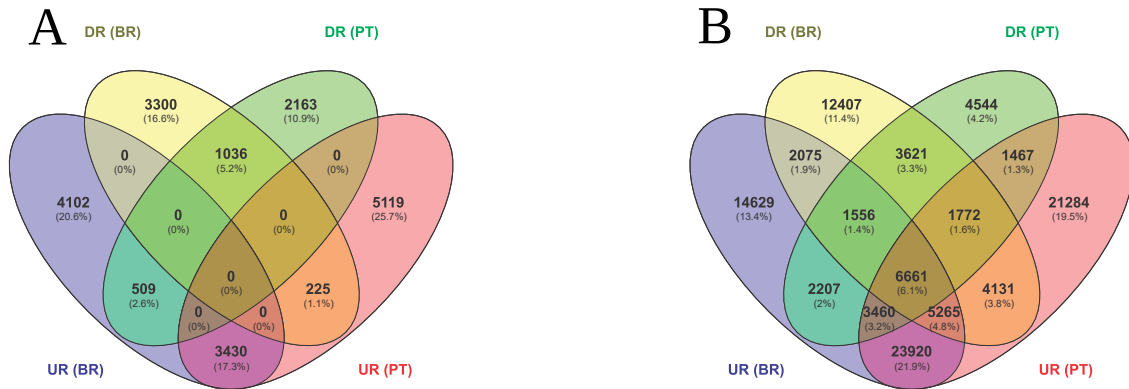


Figure 2. Venn Diagram with HT-SuperSAGE tags totals. (A) - up-regulated (UR) and down-regulated (DR) of cowpea roots under saline stress (100 mM NaCl) of contrasts PT (cultivar Pitiuba, under stress *versus* non-stressed control) and BR (cultivar BR-14 Mulato, under stress *versus* non-stressed control); (B) - ESTs of cowpea with unitags UR or DR (until a mismatch in BlastN alignments) observed in the same contrasts PT and BR.

A summary of the quantitative ESTs of cowpea containing anchored tags can be seen in Figure 2B. In this figure, a significant number ESTs was observed in the responses of two cultivars [Pitiuba (PT) e BR-14 Mulato (BR)] when these were submitted to stress (Comparing to respective negative controls). A total of 21,284 and 14,629 cowpea ESTs were available in cultivars (Figure 2B), and 23,920 ESTs were available in tags considered to be upregulated in both cultivars. They were aligned up to one error (Figure 2B).

In the metabolic pathway, it was represented 385 ESTs of cowpea anchoring 57 unitags, which were similar with 21 seeds sequences, differently of common cowpea. In the cultivar Pitiuba, 11 unitags were UR, 34 unitags n.s., and the other tags were non-determined (Figure 3A). Cultivar BR-14 Mulato had 11 unitags UR, 2 unitags DR, 34 unitags n.s., and the others non-determined (Figura 3B). They were observed in different HT-SuperSAGE libraries with root emphasis of cowpea under saline stress (30, 60, 90 minutes bulks) in relation to negative control.

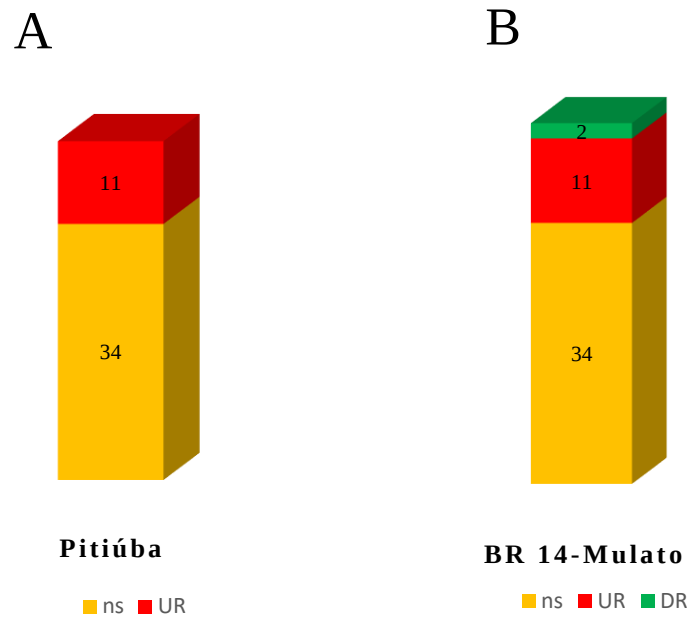


Figure 3. Quantitative distribution of unitags regulation observed in different HT-SuperSAGE contrasts libraries of cowpea under saline stress (bulk 30, 60, 90 min) in relation to the negative control, with regulations UR (up-regulated), DR (down-regulated) and not significant (n.s.; $p < 0.05$). A – cultivar Pitiuba; B – cultivar BR-14 Mulato.
Legend: red (UR / unitags), green (DR / unitags), yellow (ns / unitags).

In the mapping of metabolic pathway components, cowpea transcripts that anchored unitags. It made possible to detect EC numbers, KO identifiers (KEGG Orthology), ID and annotation (NCBI) compiled in Ins pathway (Table 1). In the Ins pathway, 21 enzymes were expressed the varieties as shown in Table 1. From these 21 enzymes, unitags and anchored ESTs were observed in order to design primers according to regulation expression in the varieties. Usually, the studied enzymes clustered around three validated expression profiles: enzymes expressed by both accesses showing similar transcriptional result, enzymes expressed by both accesses showing a different transcriptional result and enzymes with transcriptional results validated by an access (Figure 4). Of the 21 mapped components, 5 were less expressed in Pitiuba. In addition, the cowpea ESTs mapped in the inositol pathway (Table 2), the domains were identified and confirmed by the CCD database with their respective identification units of cultivars under saline stress, modulation, regulation of their expression and quantitative analysis by libraries analyzed in tags per million (PT3T, PTC, BR3T and BRC).

Table 1. EC Number (Enzyme Commission Numbers) of the inositol pathway, KO (KEGG Orthology) of the protein seed sequences of common bean, with respective annotations and ID according to the KEGG database, confirmed by the NCBI database, and short name according to the CDD (Conserved Domain Database).

EC Number	KO	Enzyme	Anotação (NCBI)	ID (NCBI)
1.13.99.1	K00469	MIOX	inositol oxygenase 2	XM_007158811.1
1.2.1.18 1.2.1.27	K00140	MMSDH	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	XM_007159105.1
2.7.1.137	K00914	PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	XM_007157375.1
2.7.1.140 2.7.1.151	K00915	IPk2	inositol polyphosphate multikinase beta	XM_007133795.1
2.7.1.150	K00921	PIKfyve	1-phosphatidylinositol-3- phosphate 5-kinase	XM_007157660.1
2.7.1.158	K10572	IPPK	inositol-pentakisphosphate 2- kinase	XM_007160666.1
2.7.1.159 2.7.1.134	K00913	ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1- kinase	XM_007158223.1
2.7.1.64	K19517	MIK	inositol 3-kinase	XM_007142148.1
2.7.1.67	K19801	PI4K	phosphatidylinositol 4-kinase beta 1	XM_007159771.1
2.7.1.68	K00889	PIP5K	phosphatidylinositol-4-phosphate 5- kinase	XM_007162036.1
2.7.8.11	K00999	PIS	CDP-diacylglycerol--inositol 3- phosphatidyltransferase 2	XM_007131657.1
3.1.3.-	K22913	PI(3,5)P2	phosphoinositide phosphatase SAC3	XM_007154478.1
3.1.3.16 3.1.3.48 3.1.3.67	K01110	PTEN	phosphatidylinositol-3,4,5- trisphosphate 3-phosphatase and dual-specificity protein phosphatase	XM_007156703.1
3.1.3.25 3.1.3.93	K10047	IMPase	inositol-phosphate phosphatase	XM_007153960.1

3.1.3.62 3.1.3.80	K03103	MINPP1	type IV inositol polyphosphate 5-phosphatase	XM_007160733.1
3.1.3.64 3.1.3.95	K18081	MTM1	phosphatidylinositol-3-phosphatase myotubularin-1	XM_007143775.1
3.1.3.7 3.1.3.57	K15422	SAL1	SAL1 phosphatase	XM_007158831.1
3.1.4.11	K05857	PI-PLC	phosphoinositide phospholipase C6	XM_007163481.1
3.1.4.3	K01114	PC-PLC	non-specific phospholipase C2	XM_007146058.1
5.3.1.1	K01803	TPI	triosephosphate isomerase	XM_007162730.1
5.5.1.4	K01858	MIPS	myo-inositol-1-phosphate synthase	XM_007163574.1

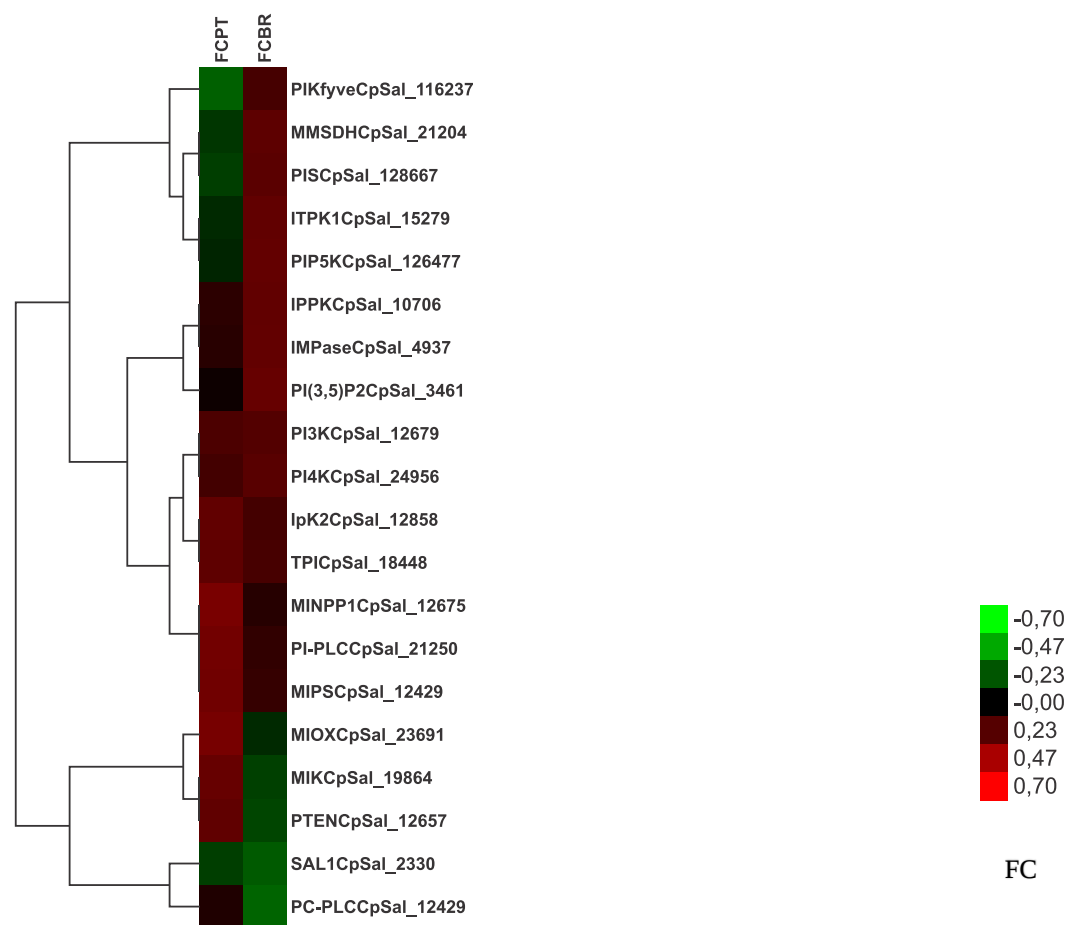


Figure 4. Hierarchical clustering of the Inositol pathway in response to saline stress (bulk 30, 60, 90 min) in HT-SuperSAGE libraries in relation to the negative control. 1 - in relation to enzymes and various contrasts - red: up-regulated unitags; green: down-regulated unitags; black: n.s. unitags. 2: Fold Change of the cultivar Pitiuba; Fold Change of the cultivar BR-14 Mulato.

Table 2. Identification of ESTs of cowpea mapped in the inositol pathway, were identified and confirmed domains by CCD database with their respective unitags of the cultivars under saline stress, modulation [FC (Fold Change)], regulation of their expression and quantitative analysis by libraries analyzed in tags per million (PT3T, PTC, BR3T e BRC).

EC	EST	Short name (CDD)	Tag	FC	Reg	PT3T	PTC	FC	Reg	BR3T	BRC
1.13.99.1	Contig14444	MIOX	CpSal_23691	4.3	UR	8.6	2.0	-1.9	n.s.	2.4	4.4
1.2.1.18 1.2.1.27	Contig7809	PLN02419 superfamily	CpSal_21204	-2.2	n.s.	2.2	4.7	4.8	UR	10.7	2.2
2.7.1.137	SI35583.4	C2_PI3K_class_III	CpSal_12769	2.3	UR	14.0	6.1	3.2	UR	17.8	5.5
2.7.1.140 2.7.1.151	SI32509.1	IPK superfamily	CpSal_12858	2.8	UR	15.1	5.8	2.5	n.s.	16.6	6.6
2.7.1.150	TC2213	PIPKc superfamily	CpSal_116237	-1.3	n.s.	0	1.3	1.2	n.s.	1.2	0
2.7.1.158	PO5770.2	Ins_P5_2-kin	CpSal_10706	1.7	n.s.	20.5	12.1	4.7	UR	15.4	3.3
2.7.1.159 2.7.1.134	PO12564.1	PLN02941	CpSal_15279	-1.2	n.s.	7.6	8.8	3.6	UR	11.8	3.3
2.7.1.64	TC12979	ribokinase_pfkB_like superfamily	CpSal_19864	2.4	UR	13.0	5.4	-1.9	n.s.	1.2	2.2
2.7.1.67	SI32567.3	PI4Kc_III_beta	CpSal_24956	2.8	n.s.	7.6	2.7	4.7	n.s.	4.7	0
2.7.1.68	SI24630.2	PLN03185 superfamily	CpSal_126477	-0,7	n.s.	0	0,7	2,4	n.s.	2,4	0
2.7.8.11	PO4687.1	PgsA	CpSal_128667	-1,3	n.s.	0	1,3	2,4	n.s.	2,4	0
3.1.3.-	SI31551.1	SH3 superfamily	CpSal_3461	1,4	n.s.	64,8	47,8	14,0	UR	61,5	4,4
3.1.3.16 3.1.3.48 3.1.3.67	PO12285.1	PTP_PTEN	CpSal_4937	2,0	UR	55,1	26,9	6,1	UR	40,2	6,6
3.1.3.25 3.1.3.93	Contig3467	PLN02553	CpSal_12657	1,2	n.s.	10,8	8,8	-1,1	n.s.	10,7	12,1

3.1.3.62 3.1.3.80	PO15446.1	EEP super family	CpSal_12675	3,2	n.s.	21,6	6,7	1,3	n.s.	8,3	6,6
3.1.3.7 3.1.3.57	SI28674.1	FIG super family	CpSal_2330	-1,3	n.s.	48,6	64,0	-2,4	DR	42,6	102,2
3.1.4.11	PO28361.1	PLN02952 superfamily	CpSal_21250	4,0	UR	10,8	2,7	2,2	n.s.	4,7	2,2
3.1.4.3	SI25471.1	Phosphoesterase	CpSal_12429	1,6	n.s.	10,8	6,7	-6,5	DR	3,6	23,1
5.3.1.1	Contig17725	TIM_phosphate_binding superfamily	CpSal_18448	11,2	UR	15,1	1,3	10,7	UR	10,7	0
5.5.1.4	Contig10395	NAD_binding_5 superfamily	CpSal_10576	21,4	UR	43,2	2,0	13,0	UR	13,0	0

According to *in silico* analysis (Figure 5A and 5B), gene expression of five molecular candidates (Table 3) was independently validated by RT-qPCR for each cultivar. All primers designed for the proposed candidates (MIOX, MMSDH, IpK2, MIK, Pi-PLC) and reference genes (actin and UE21D) amplified the cDNAs generated from the RNA samples. Also, the dissociation curves for each pair of primers showed specificity, amplifying only one product. Moreover, there wasn't amplification in model controls (NTCs) (data not available). Efficiency of amplification (E), correlation coefficient (R) and slopes for each candidate (S2 Figure), estimated from the standard curve using serial dilution (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) and a pool of root cDNA (tolerant and sensitive) of plants under or without stress ranged, respectively, from 93.04% - 107,08%, 0.92 to 1.00 and -3, 16 to -3,50. These results demonstrated favorable amplification conditions and acceptable variations to generate reliable data of relative expression among samples. According to MIQE protocol (Bustin et al., 2009), the acceptable values for efficiency are range from 90% to 110% and -3,10 to -3,58 for slope, reaching 100% of slope efficiency when achieve -3,32. Proposed candidates incorporated different metabolic processes: attenuation of different stresses (salinity, water deficit, H_2O_2 , cold and abscisic acid); root growth; oxidative decarboxylation; phytic acid synthesis; hydrolysis of phosphatidylinositol). Usually, RT-qPCR results validated the *in silico* selected unitags data showing differences between varieties (Table 3 and Figures 6A, B and C; 7A, B and C).

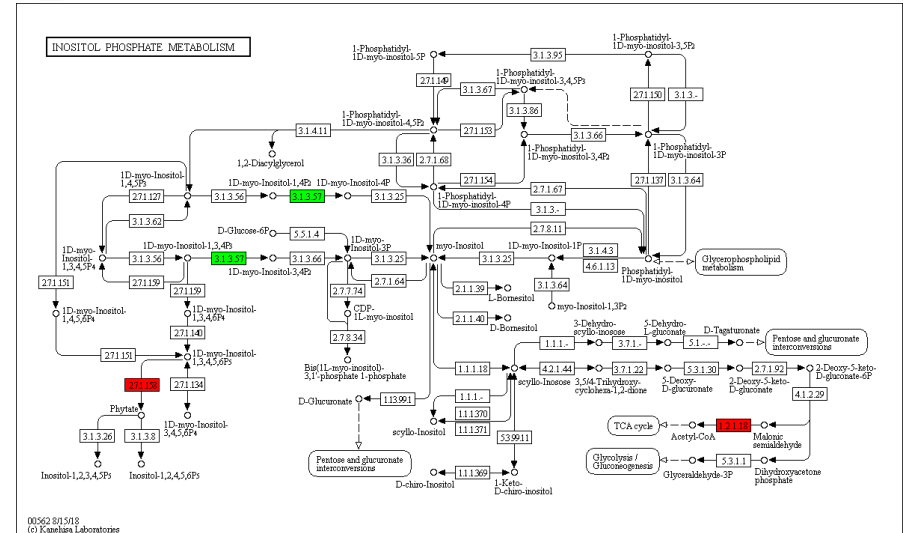
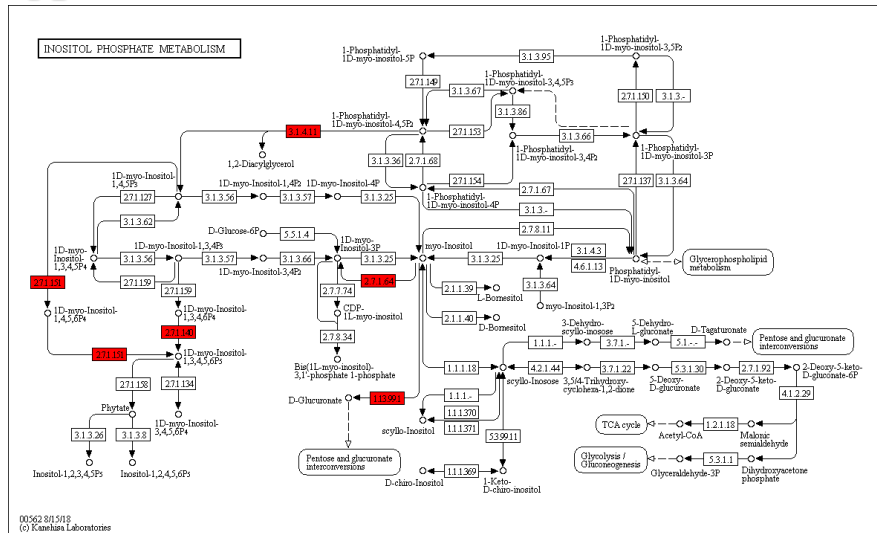


Figure 5. Mapping of gene expression in the inositol pathway, according to the in silico analysis of-HT-SuperSAGE unitags in: (A) cultivar Pitiuba; (B) cultivar BR-14 Mulato. Legend: red (UR / unitags), green (DR / unitags). UR: up-regulated; DR: down-regulated. (Enzyme Commission Numbers): Tol - 1.13.99.1: (MIOX) myo inositol oxigenase; 2.7.1.140 / 2.7.1.151: (IpK2) inositol-polyphosphate multikinase; 2.7.1.64: (MIK) myo-inositol kinase, 3.1.4.11: (PI-PLC) phosphoinositide phospholipase C. Sen - 1.2.1.18 / 1.2.1.27: (MMSDH) methylmalonate semialdehyde dehydrogenase ; 2.7.1.158: (IPPK) inositolpentakisphosphate 2-kinase; 3.1.3.7; 3.1.3.57: (SAL1) SAL1 phosphatase.

Table 3. Proposed candidate genes and their results based on in silico analysis of HT-SuperSAGE unitags expressed by bulks of cultivars and relative expression by RT-qPCR using cDNAs from cowpea of roots of each cultivar after 30 and 90 minutes under salinity stress.

Candidate Genes	Unitag	EST	Primer	HT-SuperSAGE (bulk 30, 60, 90 min)	RTq-PCR (30 and 90 minutos)
IpK2	CpSal_12858	SI32509.1	(L) GTTCTGGTGGTGTATGAGAAGG (R) AGTCAACGAGTTTGACCAAAGG	Pitiuba 2,81* / UR BR-14 Mulato 2,51* / n.s.	Tolerant 30' 0,84** / n.s. Sensitive 30' 2,30** / UR Tolerant 90' 0,54** / n.s. Sensitive 90' 0,87** / n.s.
MIK	CpSal_19864	TC12979	(L) CTTAAGCTTGACTCCACCTTGG (R) CTTTGACAGCAACAAGAGATGC	Pitiuba 2,41* / UR Sensitive -1,86* / n.s.	Tolerant 30' 0,74** / n.s. Sensitive 30' 1,40** / n.s. Tolerant 90' 0,84** / n.s. Sensitive 90' 1,56** / n.s.
MIOX	CpSal_23691	Contig14444	(L) TCTGATACCACAGACCAACTCG (R) GAAATTCTCCACTCCTTCATGC	Tolerant 4,28* / UR Sensitive -1,86* / n.s.	Tolerant 30' 0,41** / ns Sensitive 30' 2,80** / ns Tolerant 90' 0,84** / n.s. Sensitive 90' 1,56** / n.s.
MMSDH	CpSal_21204	Contig7809	(L) CCGGTGATCTCAACTTCTATGG (R) GGAAGGATTCAACTGATGGTAGC	Tolerant -2,18* / n.s. Sensitive 4,85* / UR	Tolerant 30' 7,06 ** / UR Sensitive 30' 1,50** / n.s. Tolerant 90' 0,93** / n.s. Sensitive 90' 0,30** / n.s.
PI-PLC	CpSal_21250	PO28361.1	(L) CACATATTGGGTGGATGTATGG (R) CATAACCACATCCTCCATTTGC	Tolerant 4,01* / UR Sensitive 2,15* / n.s.	Tolerant 30' 7,88 ** / UR Sensitive 30' 1,41** / ns Tolerant 90' 0,16** / n.s. Sensitive 90' 0,70** / n.s.

Legenda: Primer (L) – Left; Primer (R) – Right.

*Fold Change: frequency ratio (normalized for 1,000,000) observed in the library under stress in relation to the respective control library;

** Relative expression based on software REST (v.2.0.13) after the method $\Delta\Delta C_q$; UR – up-regulated; DR – down-regulated; n.s.: not significant a p < 0.05.

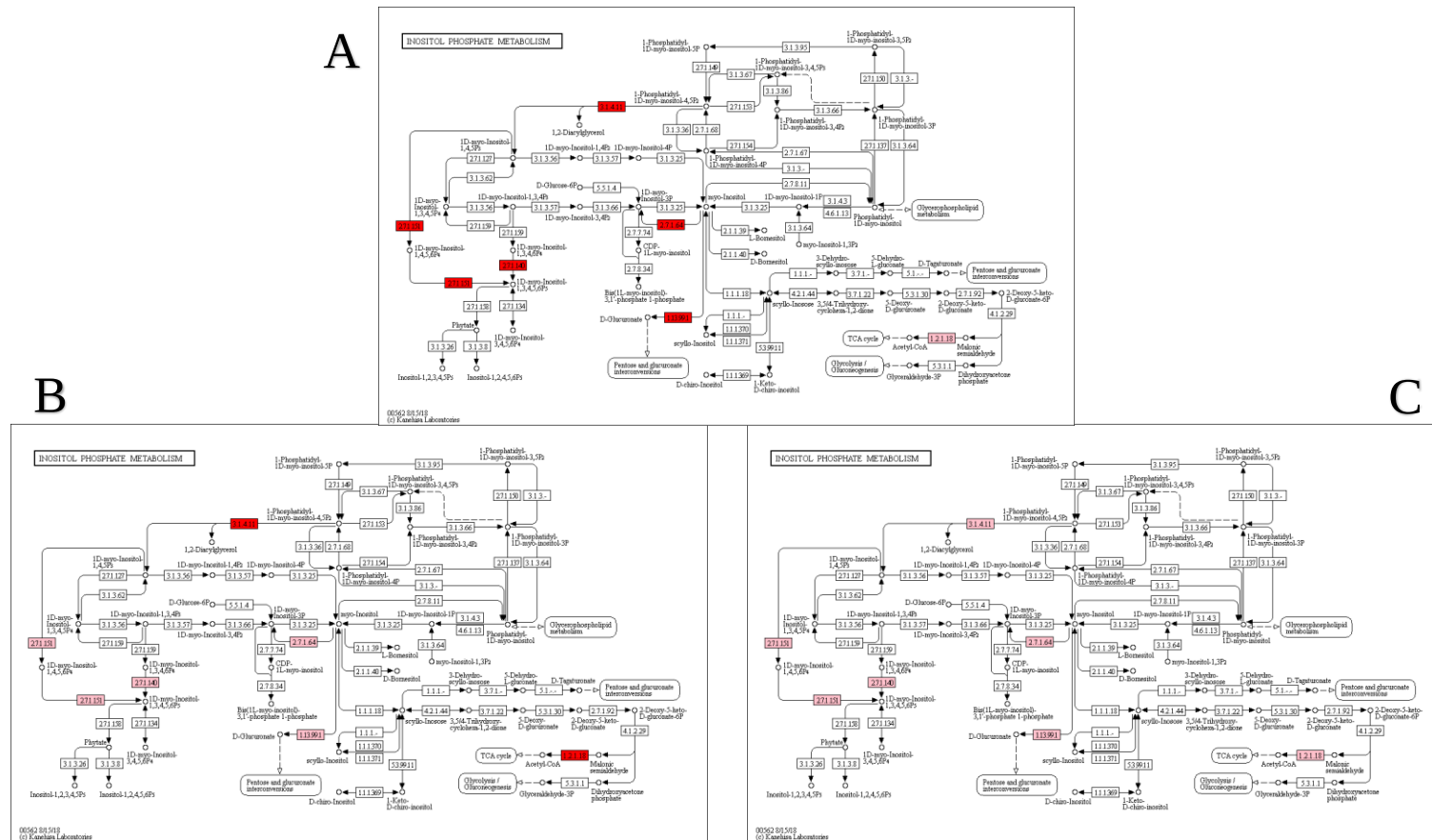


Figure 6. Mapping of gene expression in the inositol pathway in the cultivar Pitiuba, according to in silico analysis of HT-SuperSAGE units and in RTq-PCR R in: (A) HT-SuperSAGE, (B) RTq-PCR in the time of 30 minutes, (C) RTq-PCR in the time of 90 minutes. Legend: red (UR / *unitags*), green (DR / *unitags*), pink (n.s. / *unitags*). UR: up-regulated; n.s.: not significant, $p < 0.05$. (Enzyme Commission Numbers): 1.13.99.1: (MIOX) myo inositol oxygenase; 1.2.1.18 / 1.2.1.27: (MMSDH) methylmalonate semialdehyde dehydrogenase; 2.7.1.140 / 2.7.1.151: (IpK2) inositol-polyphosphate multikinase; 2.7.1.64: (MIK) myo-inositol kinase, 3.1.4.11: (PI-PLC) phosphoinositide phospholipase C.

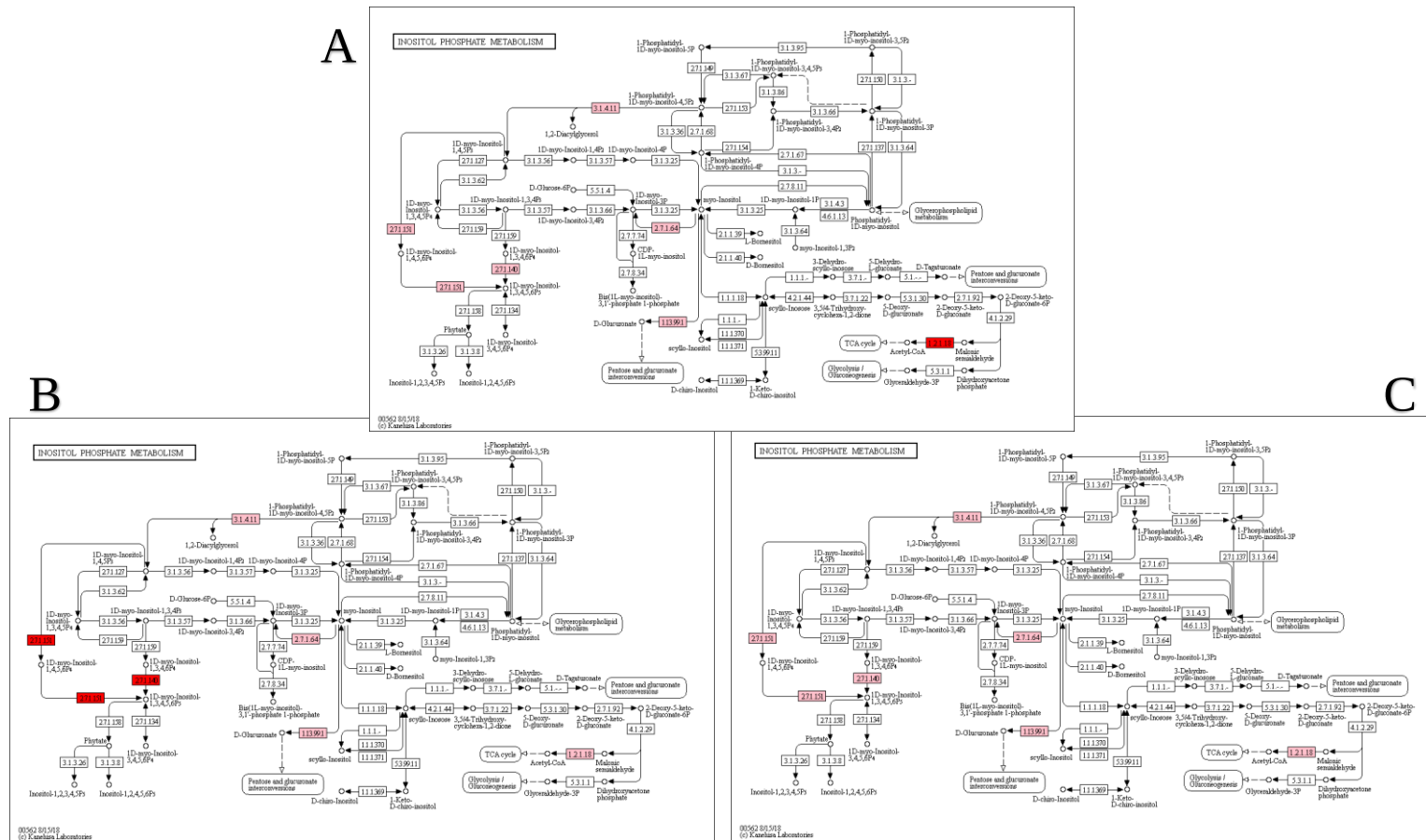


Figure 7. Mapping of gene expression in the inositol pathway in the cultivar BR-14 Mulato, according to in silico analysis of HT-SuperSAGE unitags and in RTq-PCR R in: (A) HT-SuperSAGE, (B) RTq-PCR in the time of 30 minutes, (C) RTq-PCR in the time of 90 minutes. Legend: red (UR / unitags), green (DR / unitags), pink (n.s. / unitags). UR: up-regulated; n.s.: not significant, $p < 0.05$. (Enzyme Commission Numbers): 1.13.99.1: (MIOX) myo inositol oxygenase; 1.2.1.18 / 1.2.1.27: (MMSDH) methylmalonate semialdehyde dehydrogenase; 2.7.1.140 / 2.7.1.151: (IpK2) inositol-polyphosphate multikinase; 2.7.1.64: (MIK) myo-inositol kinase, 3.1.4.11: (PI-PLC) phosphoinositide phospholipase C.

DISCUSSION

Both cultivars expressed 21 enzymes (Figure 4). In Pitiuba, the least expressed components are phosphorylated derivatives, except MMSDH which has not been studied in legumes so far. In BR-14 Mulato all are derived from myo-inositol. The myo-inositol oxygenase (MIOX, EC 1.13.99.1) can control the levels of myo-inositol metabolites in plants (Endres and Tenhaken, 2009). Also MIOX was recognized as an important enzyme due to its role in the metabolism of inositol as a precursor in the synthesis of ascorbic acid (AsA) in *Arabidopsis thaliana* (Arner et al., 2001). Myo-inositol kinase (MIK, EC 2.7.1.64) can produce IP1 from inositol. MIPS (myo-inositol-1-phosphate synthase, EC 5.5.1.4) and MIK transcription activities were detected in the rice seed aleurone layer, which is the predominant site of phytic acid biosynthesis and accumulation (Kim et al. 2008). Sengupta et al. (2008), demonstrating the accumulation of higher quantities of D-ononitol (methylated derivative of inositol) in tobacco, the plant has a faster recovery when exposed a high salinity conditions (50-150mM NaCl) and water deficit, reporting a coordinated increase in MIPS expression. Key enzymes in the synthesis of inositol and derivatives such as MIK and IMPase (inositol monophosphate synthase, EC 3.1.3.25) are increasingly understood and their functions better characterized.

Based on the results of the five proposed and validated candidates, their genetic profile allowed us to detect that the cultivar Pitiuba could detect overexpression in the first 30 minutes, validating the response in SuperSAGE. However, after 90 minutes this expression can no longer be verified, which may indicate that SuperSAGE was quite strict, or the number of replicas was not enough, or even the material at 90 'may have degraded. Already cultivar BR-14 Mulato, was able to detect overexpression in the first 30 minutes of a gene, validating the response in SuperSAGE, but when considered the cultivar Pitiúba. After 90 minutes of stress, this expression can no longer be verified (Figures 6 and 7). The genes will be discussed individually below.

I. 1D-myo-inositol tetrakisphosphate 5-kinase (IpK2, 2.7.1.140 / 2.7.1.151)

In silico data for unitag CpSal_12858 representative of IpK2 demonstrated UR of cultivar Pitiuba and non-significant expression of cultivar Br-14 Mulato (FCPT = 2,81, FCBR = 2,51) (Table 3 and 4; Figures 6A and 7A). RT-qPCR results for IpK2 revealed non-significant expression of cultivar Pitiuba and significant UR for another cultivar in initial time (respectively 0,84 and 2,30; Table 3 and 4; Figures 6B, 6C, 7B and 7C). Further, in 90 minutes both cultivars presented ns expression.

II. myo-inositol quinase (MIK, EC 2.7.1.64)

In silico analysis indicated UR expression of tolerant cultivar and non-significant of sensitive cultivar (Table 2 and 3; Figures 6A and 7A) for MIK unitag (FCPT = 2,41, FCbr = -1,86). RT-qPCR results (Tables 2 and 3; Figures 6B, 6C, 7B and 7C) demonstrated non-significant expression for cultivars in 30 and 90 minutes. Plants within MIK could convert myo-inositol in myo-inositol-monophosphatase (IMPase, EC 3.1.3.25) presenting an importante metabolic role (Loewus et al., 1982).

III. myo-inositol oxygenase (MIOX; EC 1.13.99.1)

Until now, MIOX is the only known enzyme for inositol oxidation (Arner et al., 2001). MIOX, represented for CpSal_23691 (FCPT = 4,28, FCBR= -1,86) unitag (Tables 2 and 3; Figures 6A and 7A), presented significant UR of cultivar Pitiuba and n.s. of cultivar BR-14 Mulato in the in silico assay. Furthermore, all cultivars didn't demonstrate significant differences at 30 and 90 minutes in RT-qPCR assays (Tables 2 and 3, Figures 6B, 6C, 7B and 7C). The MIOX importance in plants was associated with inositol metabolism performing as a precursor in the ascorbic acid biosynthesis in *Arabidopsis* (Lorence et al., 2004). In addition, MIOX can control myo-inositol metabolite level in plants (Endres and Tenhaken, 2009).

IV. methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase (MMSDH, EC 1.2.1.18 / 1.2.1.27)

MMSDH, represented here by unitag CpSal_21204 (FCPT = -2,18, FCBR = 4,85) (Table 2; Figures 6A and 7A), presented UR of sensitive cultivar and ns expression in cultivar Pitiuba for in silico analysis. RT-qPCR assays demonstrated UR of cultivar Pitiuba and non-significant expression for cultivar BR-14 Mulato in 30 minutes. Constitutive expression of both cultivars had a final time of 90 minutes (Tables 2 and 3; Figures 6B, 6C, 7B and 7C).

V. specific phospholipase C (PI-PLC, EC 3.1.4.11)

In silico analysis demonstrated that the unitag CpSal_21250 representative of PI-PLC UR of tolerant cultivar (FCPT = 4,01, FCBR = 2,15) (Table 2; Figures 6A and 7A). PI-PLC's expression was validated for RT-qPCR (Tables 2 and 3; Figures 6B, 6C, 7B and 7C) for the two cultivars. Cultivar Pitiuba demonstrated UR at 30 minutes and non-significant at 90 minutes (respectively 7,88 and 1,41). The cultivar BR-14 Mulato presented ns expression in both stress times. Hunt et al. (2003) observed in tobacco transgenic plants a gene encoding phospholipase C with reduced expression levels. This enzyme catalyses the hydrolysis of phosphatidylinositol 4,5-biphosphate in InsP3 [inositol (1,4,5) – triphosphate] affecting the whole pathway acting at this point.

The gene encoding PI-PLC is important since PI-PLC is identified in the literature as involved in osmoprotective mechanisms in plants under water deficit and may also indicate such involvement under salinity. Already MIK and MIOX have been DR is a disadvantage as

they are involved in controlling the level of myo-inositol metabolites in plants, which may indicate less substrate in the pathway.

CONCLUSIONS

Discovering the signaling components involved in cellular responses is important to understanding how plants deal with stress. In silico data associated with the five validated genes allowed to demonstrate important genes, but did not show distinct response in both cultivars. This is because metabolic pathways may interact with other pathways, and signals from two different metabolic pathways may be required to activate a response, or either pathway may trigger the same response. Even so, the proposed molecular candidates can be used in cowpea and other legume trials, since salt stress is a critical process for plants and related studies are required.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors of this article are thankful for the support of Pernambuco Agronomic Institute (IPA, Recife, Brazil) specially Dr. Antonio Félix da Costa and Dr. Amaro de Castro Lira Neto (Genome, IPA). This research was supported by FINEP (Funding of Studies and Projects), FACEPE (Pernambuco's Foundation for Support to Science and Technology) and CAPES (Coordination of Improvement of Higher Education Personnel)

REFERENCES

- Amorim LLB, Ferreira-Neto JRC, Bezerra-Neto JP, Pandolfi V, Araújo FT, Matos MKS et al. Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. *Plant Methods*. 2018; 14:88. doi: 10.1186/s13007-018-0354-z
- Arner RJ, Prabhu KS, Thompson JT, Hildenbrandt GR, Liken AD, Reddy CC. Myo-Inositol Oxygenase: Molecular Cloning and Expression of a Unique Enzyme That Oxidizes Myo-Inositol and D-Chiro-Inositol. *Biochem J*. 2001; 360:313–320. doi: 10.1042/0264-6021:3600313
- Baptista A, Pinho O, Pinto E, Casal S, Mota C, Ferreira IM. Characterization of protein and fat composition of seeds from common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and bambara groundnuts (*Vigna subterrânea* L. Verdc) from Mozambique. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2017. 11(2):442-45. doi: 10.1007/s11694-016-9412-2
- Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem*. 2009; 55:611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797.

- Chang S, Puryear J, Cairney J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1993; 11(2):113- 116. doi: 10.1007/BF02670468
- Dantas BF, Ribeiro LS, Aragão CA. Physiological response of cowpea seeds to salinity stress. *Revista Brasileira de Sementes*. 2005; 27(1):144-148. doi: 0.1590/S0101-31222005000100018
- Dutra AT, Silva EN, Rodrigues CR, Vieira SA, Aragão RM, Silveira JA. Temperaturas elevadas afetam a distribuição de íons em plantas de feijão Caupi pré-tratadas com NaCl. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 2011, 15 (4): 403-409. doi: 10.1590/S1415-43662011000400012.
- Eisen MP, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *PNAS*. 1998; 95(25):14863–14868. doi: 10.1073/pnas.95.25.14863
- Elsayed AI, Rafudeen MS, Golldack D. Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: protection against abiotic stress. *Plant Biology (Stuttg)*. 2013; 16:1–8. doi: 10.1111/plb.12053
- Endres S, Tenhaken R. Myoinositol Oxygenase Controls the Level of Myoinositol in *Arabidopsis*, but Does Not Increase Ascorbic Acid. *Plant Physiology*. 2009; 149:1042–1049. doi: 10.1104/pp.108.130948
- Freire Filho FR. Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios. Embrapa Meio-Norte, Teresina, Piauí, Brasil. 2011.
- Hoagland, DR, Arnon DI. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station. 1950.
- Hunt L, Mills LN, Pical C, Leckie CP, Aitken FL, Kopka J, Mueller-Roeber B, McAinsh MR, Hetherington AM, Gray JE. Phospholipase C is Required for the Control of Stomatal Aperture by ABA. *Plant J*. 2003; 34:47–55. doi: 10.1046/j.1365-313X. 2003.01698.x
- Kantar M, Lucas SJ, Budak H. Drought stress: molecular genetics and genomics approaches. *Adv. Bot. Res*. 2011, 57 (1): 445-493. doi: 10.1016/B978-0-12-387692-8.00013-8
- Kido EA, Pandolfi V, Barbosa PKA, Silva LCB, Silva AB, Montes SJH, et al. Brazilian cowpea transcriptome project: over five million expressed sequence tags to understand salinity and virus resistance. In: XII Congresso Brasileiro de Fisiologia Vegetal, Fortaleza Livro de Resumos Fortaleza CE SPH Comunicação Visual. 2009.
- Kido, EA, Ferreira Neto, JRC, Silva RLDO, Pandolfi V, Guimarães ACR, Veiga DT, et al. New Insights in the Sugarcane Transcriptome Responding to Drought Stress as Revealed by HT-SuperSAGE, *Sci. World J*. 2012; 1–14. doi:10.1100/2012/821062.
- Kim SI, Andaya CB, Goyal SS, Tai TH. The rice OsLpa1 gene encodes a novel protein involved in phytic acid metabolism. *Theor Appl Genet*. 2008. doi:10.1007/s00122-008-0818-z

- Lata C, Yadav A, Prasad M. Role of Plant Transcription Factors in Abiotic Stress Tolerance, Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives. Prof. Arun Shanker (Ed.), ISBN: 978-953-307-672-0, InTech. 2011. doi: 10.5772/23172.
- Loewus FA, Murthy PPN. *myo*-Inositol metabolism in plants: a review. *Plant Science*. 2000; 150:1-19.
- Loewus MW, Sasaki K, Leavi AL, Munsell L, Sherman WR, Loewus FA. Enantiomeric Form of *myo*-Inositol-1-Phosphate Produced by *myo*-Inositol-1-Phosphate Synthase and *myo*-Inositol Kinase in Higher Plants. *Plant Physiol*. 1982; 70: 1661-1663.
- Lorence A, Chevone BI, Mendes P, Nessler CL. Myo-Inositol Oxygenase Offers a Possible Entry Point into Plant Ascorbate Biosynthesis. *Am Soc Plant Biol*. 2004; 134: 1– 338. doi: 10.1104/pp.103.033936.sapiens
- Majumder AL, Biswas BB. *Biology of Inositols and Phosphoinositides: Subcellular Biochemistry*. 2nd edn. Springer; 2006. doi: 10.1007/0-387-27600-9
- Matsumura H, Molina C, Krüge DH, Terauchi R, Kahl G. DeepHT-SuperSAGE: High-Throughput Transcriptome Sequencing with Now- and Next-Generation Sequencing Technologies. In: Harbers M, Kahl G, editor. *Tag-Based Next Generation Sequencing*, Wiley, 2012; 1-21. doi: 10.1002/9783527644582.ch1
- Matsumura H, Reich S, Ito A, Saitoh H, Kamoun S, Winter P, et al., Gene expression analysis of plant host-pathogen interactions by HT-SuperSAGE. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2003; 15718–15723. doi:10.1073/pnas.2536670100
- Mittler R, Blumwald E. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, 61:443–462. doi: 10.1146/annurev-arplant-042809-112116
- Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance. *Ann. Rev. Plant Biol*. 2008, 59 (2): 651-681. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.032607.092911
- Page RDM. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*; 1996. 12: 357-358.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30. e36. doi:10.1093/nar/30.9e36.
- Praxedes SC, Ferreira TM, Gomes Filho E. Acúmulo de prolina e aminoácidos em cultivares de feijão-caupi com tolerância diferencial à salinidade. *Caatinga (Mossoró,Brasil)*, 2009; 22(3):211-214.

Sengupta S, Patra B, Ray S, Majumder AL. Inositol Methyl Transferase from a Halophytic Wild Rice, *Porteresia Coarctata* Roxb. (Tateoka): Regulation of Pinitol Synthesis under Abiotic Stress. *Plant Cell Environ.* 2008; 31:1442–1459. doi: 10.1111/j.1365-3040.2008.01850.x

Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K: Recent advances in the dissection of drought stress regulatory networks and strategies for development of drought-tolerant transgenic rice plants. *Frontiers in Plant Science.* 2015, 6:1–20. doi: 10.3389/fpls.2015.00084

5 ARTIGO III - artigo a ser submetido à revista *Genetics and Molecular Biology*

Análise transcriptômica das vias metabólicas de inositol e oligossacarídeos da família rafinose em feijão-caupi em resposta ao estresse biótico

Amanda Cordeiro de Melo Souza¹, Manassés Daniel da Silva², José Ribamar Costa Ferreira Neto¹, Antonio Félix da Costa², Éderson Akio Kido¹

RESUMO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma leguminosa que desempenha importante papel socioeconômico e na agricultura mundial, sendo amplamente cultivado nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, principalmente por sua rusticidade e plasticidade fenotípica em condições adversas de solo e clima (com características peculiares de resistência a estresses). Os principais fatores limitantes à produção agrícola dessa leguminosa são decorrentes de estresses bióticos, relativos às ações de agentes fitopatogênicos. Para enfrentar tais condições adversas, as plantas desenvolveram mecanismos moleculares de ajuste fisiológico, responsiva a vias de estresse. Dentre as moléculas reconhecidas com função em tal resposta, o Inositol e seus derivados, como RFOs são de interesse. Assim, por meio de análise *in silico* de tags HT-SuperSAGE e utilizando os transcritos relacionados às vias específicas de metabolismo, foi possível analisar transcriptomas de folhas feijão-caupi sob estresse biótico (3T: tempo precoce, 90 min e T4: tempo tardio, 16h), em busca dos componentes das vias metabólicas em questão, visando verificar as regulações *in silico*, mapear os transcritos nas respectivas vias, bem como identificar especificidades nas respostas fisiológicas perante cada estresse em questão. No presente estudo, foi realizado o BLASTn das tags com ESTs de feijão-caupi, e os alinhamentos aceitáveis envolveram 20.645 *unitags* e 106.670 ESTs de feijão-caupi. Posteriormente, as ESTs que ancoraram tags foram alinhadas, via BLASTx, com sequências seeds de proteínas de feijão azuki, totalizando o estudo de 14 enzimas disponíveis nas vias. Por fim, quatro genes candidatos foram propostos e testados para validação dos resultados encontrados na HT-SuperSAGE. Os dados de transcriptômica os resultados apontaram resultados de transcrição semelhante para pelo menos um dos tempos. Este estudo pretendeu decodificar as vias de metabolismo (suas enzimas e transcrições), revelando ainda candidatos pouco explorados em cultivos em condições desfavoráveis.

Palavras-chave: leguminosa, infecção por potyvírus, SuperSAGE, metabolismo.

ABSTRACT

The cowpea [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] is a legume that plays an important socioeconomic role and in the world agriculture, being widely cultivated in the North and Northeast of Brazil, mainly for its rusticity and phenotypic plasticity in adverse conditions of soil and (with peculiar characteristics of resistance to stress). The main limiting factors for the agricultural production of this legume are due to biotic stresses related to the actions of phytopathogenic agents. To address such adverse conditions, the plants developed molecular mechanisms of physiological adjustment, responsive to stress pathways. Among the molecules recognized with function in such a response, Ins and its derivatives, such as RFOs, are of interest. Thus, by means of in silico analysis of HT-SuperSAGE tags and using the transcripts related to the metabolic pathways, it was possible to analyze the transcriptomes of cowpea leaves under biotic stress (3T: early time, 90 min and T4: late time, 16h) in search of the components of the metabolic pathways in question, in order to verify the in silico regulation, to map the transcripts in the respective pathways, as well as to identify specificities in the physiological responses to each stress in question. In the present study, the BLASTn of tags with ESTs of cowpea were performed, and the acceptable alignments involved 20,645 unitags and 106,670 ESTs of cowpea. Subsequently, the ESTs that anchored tags were aligned, via BLASTx, with seeds sequences of azuki bean proteins, totalizing the study of 14 enzymes available in the pathways. Finally, four candidate genes were proposed and tested for validation of the results found in HT-SuperSAGE. The data from transcriptomic results showed similar transcript results for at least one of the times. This study aimed to decode metabolic pathways (their enzymes and transcripts), revealing still poorly exploited candidates in crops under unfavorable conditions.

Keywords: legume, potyvirus infection, SuperSAGE, metabolism.

INTRODUÇÃO

O feijão-caupi [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] é uma leguminosa cultivada mundialmente, com um número cromossômico diplóide $2n = 22$ e tamanho estimado do genoma de 620 Mb, colocando-o como um dos menores genomas dentre as leguminosas (Boukar et al., 2018). Possui um elevado teor proteico, sendo utilizado tanto como cultura de subsistência quanto para comercialização (Weng et al., 2017).

A maior parte da produção e consumo de feijão-caupi está na África Ocidental e Central. A Nigéria produz a maior quantidade de grãos de feijão-caupi, apresentando em 2014, cerca de 2,14 milhões de toneladas, seguida, respectivamente, de República do Níger e Burkina Fasso com uma média de 1,59 e 0,57 milhões de toneladas (Faostat, 2017). Apesar de sua relevância para a agricultura, há fatores limitantes à produção agrícola decorrentes dos estresses bióticos, relativos às ações de agentes fitopatogênicos. No Brasil e em outros países, as causas mais comuns dessas perdas ocorrem por viroses, como o *cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV) (Kitajima, 1995).

O CABMV pode ser transmitido por meio de sementes infectadas e na natureza de forma não persistente por afídeos, podendo ocasionar sintomas severos como mosaico intenso no limbo foliar, faixas verde-escuras nas nervuras, distorção das folhas e redução mais ou menos acentuada do crescimento das plantas (Pio-Ribeiro et al., 2005). Neste sentido, uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares relacionados ao estresse é um passo importante para a melhoria da produtividade e qualidade das leguminosas.

As plantas desenvolveram uma gama de mecanismos moleculares de adaptação fisiológica para suportar condições estressantes. Tais dependem de um maquinário celular diversificado, operando em níveis estratificados como sensoriamiento, sinalização, ativação e reorganização de vias que respondem a estresses (Bartels e Souer, 2004). Entre as moléculas conhecidas para operar em mais de um nível mencionado, o inositol tem se destacado, uma vez que tem múltiplos efeitos no metabolismo vegetal (Loewus e Murthy, 2000; Majumder e Biswas, 2006). O inositol está relacionado ao metabolismo dos oligossacarídeos da família rafinose (RFOs) atuando na via biossintética deles. A partir do mio-inositol e UDP-galactose, a enzima Galactinol Sintase (GOLS; EC 2.4.1.123) sintetiza o galactinol, que serve como um doador de galactose para a síntese subsequente de membros de RFOs (Sprenger e Keller, 2000; Liu et al., 1998). Pesquisas científicas estão disponíveis para leguminosas e outras espécies de plantas, relacionadas a análise de genes particulares ou quantificação de compostos específicos de inositol e derivados (Kumar et al., 2011).

O presente estudo teve como objetivo analisar transcriptomicamente as vias metabólicas de inositol e oligossacarídeos de rafinose, fornecendo uma análise de expressão gênica comparando tempos contrastantes (90 minutos e 16 horas) em bibliotecas HT-SuperSAGE, compostas por folhas de feijão-caupi infectado com o potyvírus CABMV, com 112.505 unitags provenientes do genótipo IT85F-2687 (resistência ao potyvírus CABMV) (Kido et al., 2011).

MATERIAL E MÉTODOS

O genótipo de feijão-caupi [*V. unguiculata* (L.) Walp.] utilizado no presente estudo foi IT85F-2687, selecionados a partir de ensaios anteriores. As sementes desses genótipos cultivadas em vasos com areia lavada regada com 200 ml de ½ força da solução de Hoagland (Hoagland e Arnon, 1950). Plântulas com 28 dias de idade foram submetidas ao desafio com o potyvírus CABMV a diferentes períodos de tempo. As folhas foram coletadas aos 0 minutos (controle) e irrigadas com solução de Hoagland, 90 minutos e 16 horas, após serem injuriadas mecanicamente com a abrasão com pó de carborundum e inoculadas com CABMV e irrigadas com solução de Hoagland. Posteriormente foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C. Os desenhos experimentais foram fatoriais (cultivares X tempo do estresse) com três repetições biológicas (Kido et al., 2011).

As tags disponíveis foram oriundas de bibliotecas HT-SuperSAGE (26 pb), desenvolvido pela rede Nordest (Kido et al., 2012). Considerando o contraste entre duas bibliotecas realizou-se testes de significância de Audic e Claverie, sendo determinado o valor *p* ao nível de 5% de probabilidade (*p-value*; $p \leq 0.05$) para se definir as tags diferencialmente expressas, as quais foram classificadas em: UR – induzida, DR – reprimida, e n.s. – não significativa. O valor da modulação da expressão da tag (FC; Fold Change) foi obtido após a normalização da biblioteca para um milhão de tags; esse valor representa quantas vezes uma determinada tag (*unitag*) foi mais ou menos expressa quando comparada com a frequência observada em outra biblioteca.

Posteriormente as tags HT-SuperSAGE foram alinhadas, a partir de análises via BLASTn ($e\text{-value} < e^{-10}$), contra sequências expressas ESTs de feijão-caupi disponíveis nos seguintes bancos de dados: i) banco de dados local [clusters e singletons de ESTs da Rede NordEST (UFPE) e Harvest: Cowpea Project], ii) Gene Index Project (<ftp://occams.dfci.harvard.edu/pub/bio/tgi/data/>); iii) NCBI (*National Center of Biotechnology Information*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Para este estudo, foram considerados somente alinhamentos BLASTn (tag-EST) perfeitos ou com somente um mismatch em 26 pb, não podendo este ocorrer nas quatro bases iniciais que caracteriza a tag (CATG), a fim de garantir a idoneidade da tag HT-SuperSAGE e sua identidade com transcritos reconhecidos.

Posteriormente, as sequências expressas ESTs de feijão-caupi com *tags* ancoradas, foram alinhadas via BLASTx (e-value < e^{-10}), com proteínas de feijão azuki [*Vigna angularis* (Wild) Ohwi & Ohashi], as quais contam com enzimas mapeadas nas vias metabólicas de INS e de RFOs, na base de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). A confirmação da anotação de domínio foi realizada por meio do CDD (*Conserved Domain Database*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>).

O mapeamento das *tags* nas vias metabólicas foi realizado a partir da base de dados KEGG. O diagrama do metabolismo de inositol disponível no KEGG apresenta 48 enzimas diferentes (Figura 1). Destas, 24 enzimas foram mapeadas no genoma de feijão azuki. O diagrama de galactose, inclui o metabolismo de oligossacarídeos da rafinose (RFOs), também apresenta 48 enzimas diferentes (Figura 1A), das quais 16 enzimas já foram isoladas do feijão azuki. Destas enzimas, cinco [galactinol sintase (GOLS, EC 2.4.1.123), alfa galactosidase (α GAL, EC 3.2.1.22), rafinose sintase (RS, EC 2.4.1.82), estaquiase sintase (STS, EC 2.4.1.67) e invertase (INV, EC 3.2.1.26)] são componentes de RFOs de feijão azuki (Figura 1B; asterísticos azuis).

Números ECs (Enzyme Commission Numbers) identificaram a enzima em questão. Tais números foram associados às proteínas por meio de análises BLASTx. Para gerar os *heatmaps*, transcritos diferencialmente expressos foram clusterizados hierarquicamente com o auxílio do programa Cluster 3.0 (v.1.1.4r3; Eisen et al., 1998), usando parâmetros padrão e dados de modulação das *tags* relacionadas (*fold change*; FC: quantas vezes uma *tag* foi mais expressa em uma biblioteca em relação a outra). Os dendrogramas associados foram gerados por meio do programa TreeView (Page, 1996).

A

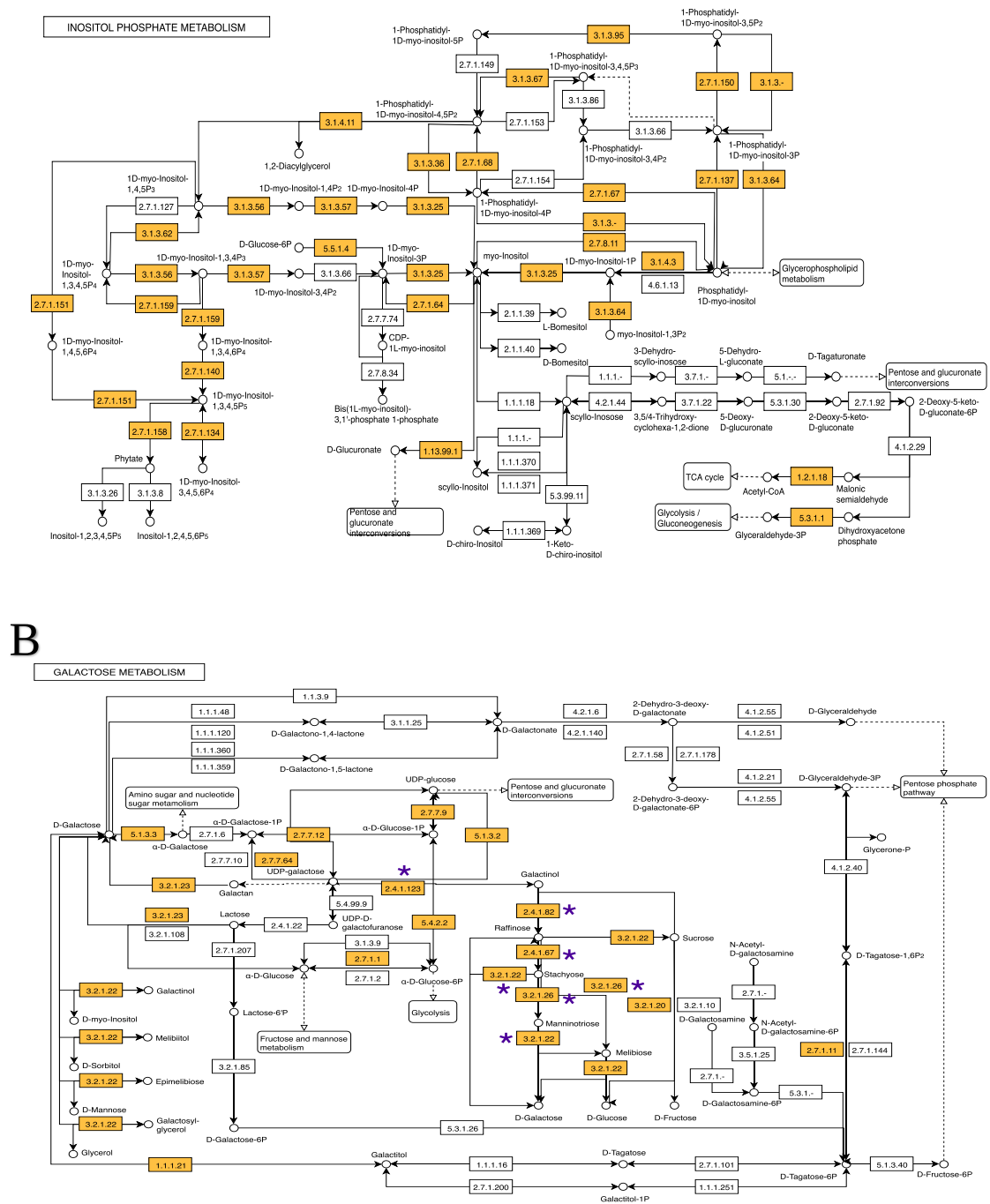


Figura 1. Diagramas metabólicos do banco de dados KEGG. A - Via de inositol fosfatos; B - Via de galactose. * Os nós laranja representam enzimas com sequências *seeds* proteicas disponíveis para o feijão azuki. * Asterísticos azuis representam o metabolismo dos oligossacarídeos da família rafinose (RFOs).

O RNA total foi isolado das folhas, a partir de extração com CTAB modificado (Chang et al., 1993), sendo posteriormente tratado com o kit ‘DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion)’, quantificado via espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Peqlab), e o RNA convertido em cDNA usando o kit ‘ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega)’, e ressuspensos em volume de 20 µL, conforme instruções dos fabricantes. A síntese de cDNA foi incubada a 70 °C por 7 min em tampão, 25 °C por 5 minutos (para remoção de DNA genômico contaminante), 42 °C por 60 min (transcrição reversa) e 70 °C por 15 min (inativação da enzima), em um termociclador. As amostras foram armazenadas em freezer a -20 °C até as reações de RT-qPCR. Posteriormente, os DNAs genômicos dos acessos foram utilizados para amplificações via PCR em reações de 20 µL [20 ng de DNA genômico, 1x PCR buffer, 1,5 mM de MgCl₂, 100 µM de dNTPs, 0,15 µM de cada *primer* e 0,5 U de Taq DNA polimerase]. As integridades de RNA foram verificadas em gel de agarose 1,5% (p/v), sendo visualizados após coloração com corante de carregamento bluegreen (LGC Biotechnology®).

Conforme a análise *in silico* das *tags* SuperSAGE, genes-alvo foram selecionados para validação via RTq-PCR. Os *primers*, para amplificar cDNAs alvos que alinharam na via, foram desenhados através do programa Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), com os seguintes parâmetros: (1) tamanho do *primer* – mínimo 20, ótimo 22 e máximo 24; (2) tamanho do amplicom – com 60 a 150 pb; (3) temperatura de dissociação (T_M) do primer – mínima de 57°C, ótima de 60°C e máxima de 63°C; (3) temperatura de *melting* do produto – mínima de 65°C, ótima de 82°C e máxima de 95°C; (4) conteúdo GC (%) – com variação de 45 a 55 % e (5) GC clamp – 1. Os demais parâmetros seguiram o padrão do programa. Os inputs utilizados no programa foram as sequências de ESTs de feijão-caupi que alinharam com *tags* (*plus / plus*), com no máximo um erro (*mismatch*) no alinhamento de 26 pb.

Após esta etapa, os *primers* foram submetidos ao programa OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) para a verificação de possíveis formações de grampos. Para analisar a formação dos grampos nos iniciadores foi verificada a T_m de cada uma das estruturas. Se a T_m do grampo for superior à T_m das condições de reação, esse iniciador foi considerado problemático. Os primers foram sintetizados pela Bioneer Corporation (Coréia do Sul) e testados em amplificações de cDNAs utilizando PCR convencional, nas condições de 5 min a 95 °C, seguido por 35 ciclos de 95 °C por 15 s, 58 °C por 30 s, e 72 durante 30 s. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% (p / v) corado com corante bluegreen (LGC Biotechnology®).

O RT-qPCR validou a expressão gênica de seis candidatos moleculares. Os ensaios RT-qPCR seguiram as diretrizes do protocolo MIQE (The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments), com o objetivo de aumentar a confiabilidade dos resultados. A técnica RT-qPCR foi usada para validar a expressão observada pela SuperSAGE. As reações de RT-qPCR foram realizadas em termociclador BIOER® de 96 poços, utilizando-se o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen), conforme instruções do fabricante. A fórmula $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$ foi utilizada para calcular a eficiência de cada par de oligonucleotídeos. Foram utilizados dois genes normalizadores para cada análise, sendo os resultados analisados via programa Relative Expression Software Tool (REST) versão 2.0.13 (Pfaffl et al., 2002).

O RT-qPCR promoveu curvas de dissociação (*melting curve*) para confirmar a especificidade de amplificação dos candidatos propostos. Além disso, as curvas de calibração foram feitas utilizando amostras de cDNAs das cultivares tolerantes e sensíveis e diluições seriadas (1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ e 10⁻⁴). Estas curvas tinham o objetivo de calcular a eficiência de amplificação ($E = 10^{-1 / \text{inclinação da curva padrão}}$) de cada candidato. As reações de RT-qPCR foram realizadas em um volume final de 10 µL, incluindo: 1 µL da amostra de cDNA (diluída cinco vezes), 5 µL da Mistura Master qPCR SYS Green™ 2x (USB®) HotStart-IT, 0,05 µL de ROX, 1,95 µL de água ultrapura e 1 µL de cada primer (0,05 µM). Em todas as reações de RT-qPCR (em placas de 96 poços), realizadas com três repetições biológicas e três técnicas, utilizou-se um controle negativo (amostra de cDNA) e dois genes de referência, β-tubulina e F-BOX (Amorim et al., 2018). As reações de RT-qPCR foram realizadas em LineGene 9660, modelo FQD-96A (Bioer®), usando o sistema de detecção SYBR Green. Essas reações utilizaram a seguinte programação: desnaturação inicial de 95 ° C por 2 min, seguida por 40 ciclos de 95 ° C por 15 s, 58 ° C por 30 s e 72 ° C por 30 s. As curvas de dissociação foram analisadas entre 65 e 95 ° C por 20 min após 40 ciclos. O software LineGene 9600 (versão 1.1.10) determinou os ciclos de quantificação (Cq), temperaturas de fusão e quantificações absolutas e relativas. Os dados relativos à expressão relativa foram calculados pelo método $\Delta\Delta Cq$ e avaliados pelo software REST (Relative Expression Software Tool, versão 2.0.13).

RESULTADOS

Do universo de 112.505 *unitags* HT-SuperSAGE no ensaio desafiado com o potyvírus CABMV, foi realizado o BLASTn dessas *tags* com ESTs de feijão-caupi, e os alinhamentos

aceitáveis envolveram 20.645 *unitags* e 106.670 ESTs de feijão-caupi, com no máximo um erro em 26 pb. Através do diagrama de Venn (Figuras 2A e 2B), foi possível quantificar as *unitags* induzidas (UR), reprimidas (DR) e não significativas (n.s., $p < 0.05$) presentes nos tempos precoce (3T: bulk 30, 60, 90 min) e tardio (T4: 16h), como aquelas exclusivas de cada um.

Nesse panorama, foram identificadas exclusivamente 198 e 1.747 *unitags* induzidas (Figura 2A) nos tempos precoce e tardio, respectivamente. Ao passo que, 123 *unitags* induzidas foram comuns em ambos os tempos. Enquanto, 502 *unitags* foram induzidas no tempo precoce e reprimidas no tempo tardio. Subsequentemente, 4.633 e 1.751 *unitags* foram identificadas como reprimidas nos tempos precoce e tardio, respectivamente. Também foram detectadas 290 *unitags* reprimidas nos tempos precoce e tardio, e 508 *unitags* reprimidas no tempo precoce e induzidas no tempo tardio. Por fim, foram observadas também 6.603 *unitags* não significativas em ambos os tempos (Figura 2B). Posteriormente, as ESTs que ancoraram *tags* foram alinhadas, via BLASTx, com 24 e 5 sequências *seeds* de proteínas presentes no metabolismo de INS e RFOs, ambas da base de dados KEGG, a fim de mapear o maior número de componentes das duas vias, visando uma melhor compreensão do modelo em feijão-caupi.

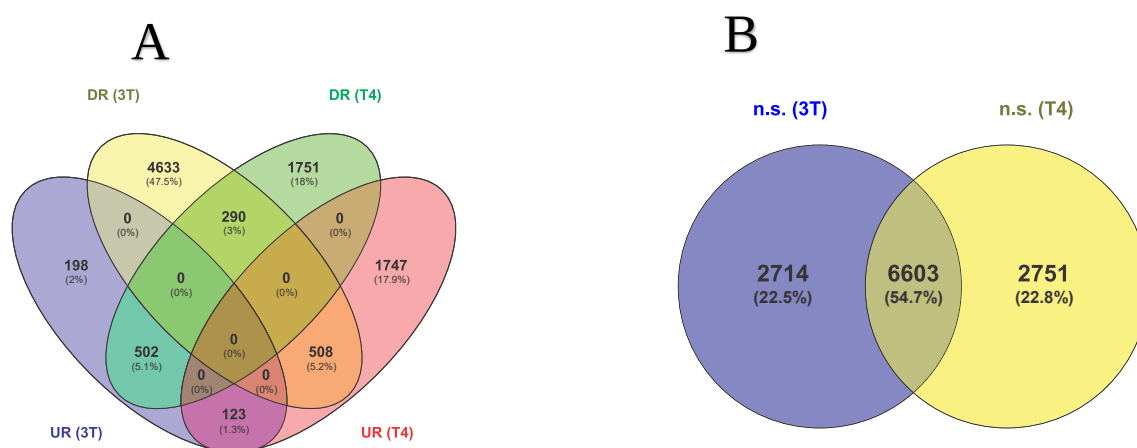


Figura 2. Diagrama de Venn com *tags* HT-SuperSAGE de feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV; 3T: *bulk* 30, 60, 90 min; e T4: 16h). A- *unitags* induzidas (UR); *unitags* reprimidas (DR); B - *unitags* não significativas (n.s.; $p < 0,05$).

No metabolismo de inositol foram identificados 171 diferentes ESTs de feijão-caupi ancorando 46 *unitags*, cujos produtos de tradução foram similares com 11 sequências *seeds* de proteínas de feijão azuki. Para a resposta do estresse no tardio (T4), as expressões apresentaram 5 *unitags* consideradas induzidas, 2 *unitags* reprimidas, e 5 *unitags* não significativa (Figuras 3A e 3B). Em relação à resposta ao estresse no tempo precoce (3T), 12 *unitags* foram consideradas reprimidas e 3 *unitags* foram não significativas (Figuras 3A e 3B). Para tal via, as

proteínas similares foram curadas, sendo confirmados os domínios pela base de dados CDD, o que possibilitou detectar os número EC (*Enzyme Commission Numbers*), KO (*KEGG Orthology*) das *seeds* de feijão azuki com suas respectivas anotações, nome da enzima, ID de acordo com o banco de dados KEGG, confirmado pelo banco de dados NCBI, e abreviação de acordo com o CDD (*Conserved Domain Database*) (Tabela 1).

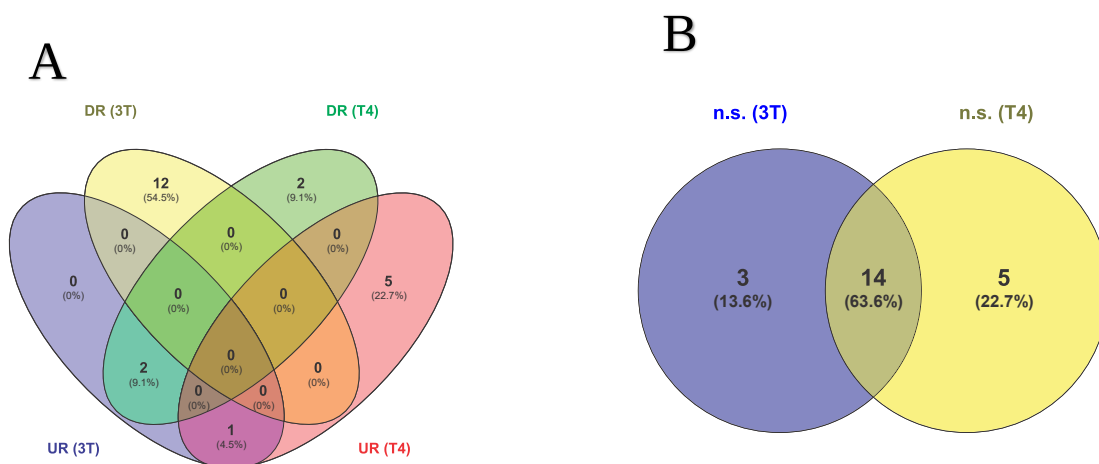


Figura 3. Diagrama de Venn com *tags* HT-SuperSAGE de feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV; 3T: *bulk* 30, 60, 90 min; e T4: 16h), presentes na via de inositol. A- *unitags* induzidas (UR); *unitags* reprimidas (DR); B - *unitags* não significativas (n.s.; $p < 0,05$).

Tabela 1. Número EC (*Enzyme Commission Numbers*) do metabolismo de inositol, KO (*KEGG Orthology*) das *seeds* de feijão azuki com suas respectivas anotações, sigla da enzima, ID de acordo com o banco de dados KEGG, confirmado pelo banco de dados NCBI, e abreviação de acordo com o CDD (*Conserved Domain Database*).

Número EC	KO	Enzima	Anotação (NCBI)	ID (NCBI)	Abreviação (CDD)
1.2.1.18 1.2.1.27	K0014 0	MMSD H	methyilmalonate-semialdehyde dehydrogenase	XP_01740717 6	PLN02419 superfamily
2.7.1.150	K0092 1	PIKfyve	1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase	XP_01743654 0	PIPKc superfamily
2.7.1.159 2.7.1.134	K0091 3	ITPK1	inositol-tetrakisphosphate 1-kinase	XP_01741269 3	PLN02941
2.7.1.68	K0088 9	PIP5K	phosphatidylinositol-4-phosphate 5- kinase	XP_01741187 5	PLN03185 superfamily
3.1.3.16 3.1.3.48 3.1.3.67	K0111 0	PTEN	phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase and protein-tyrosine-phosphatase PTEN2A	XP_01740952 5	PTP_PTEN
3.1.3.36	K2027 9	PI(4,5)P 2	phosphoinositide 5-phosphatase	XP_01744283 0	EEP super family
3.1.3.64 3.1.3.95	K1808 1	MTM1	phosphatidylinositol-3-phosphatase myotubularin-1	XP_01741489 0	Myotub-related
3.1.4.11	K0585 7	PI-PLC	phosphoinositide phospholipase C6	XP_01741593 9	PLN02952 superfamily
3.1.4.3	K0111 4	PC-PLC	non-specific phospholipase C6	XP_01742282 5	Phosphoesterase
5.3.1.1	K0180 3	TPI	triosephosphate isomerase	XP_01741006 6	TIM_phosphate_bindin g superfamily
5.5.1.4	K0185 8	MIPS	myo-inositol-1-phosphate synthase	XP_01741849 7	NAD_binding_5 superfamily

Considerando o metabolismo de RFOs, foram identificados 77 diferentes ESTs de feijão-caupi ancorando 12 *unitags*, cujos produtos de tradução foram similares com 3 sequências *seeds* de proteínas de feijão azuki. Na resposta ao estresse no tempo tardio, as expressões identificadas foram consideradas 2 *unitags* induzidas, 1 *unitag* reprimida e 2 *unitags* não significativas (Figuras 4A e 4B). Em relação à resposta ao estresse no tempo precoce, foram consideradas 3 *unitags* reprimidas, e 2 *unitags* não significativas (Figuras 4A e 4B). Assim como para INS, foi possível detectar no metabolismo de RFOs, os número EC (*Enzyme Commission Numbers*), KO (*KEGG Orthology*) das *seeds* de feijão azuki com suas respectivas anotações, nome da enzima, ID de acordo com o banco de dados KEGG, confirmado pelo banco de dados NCBI, e abreviação de acordo com o CDD (*Conserved Domain Database*) (Tabela 2).

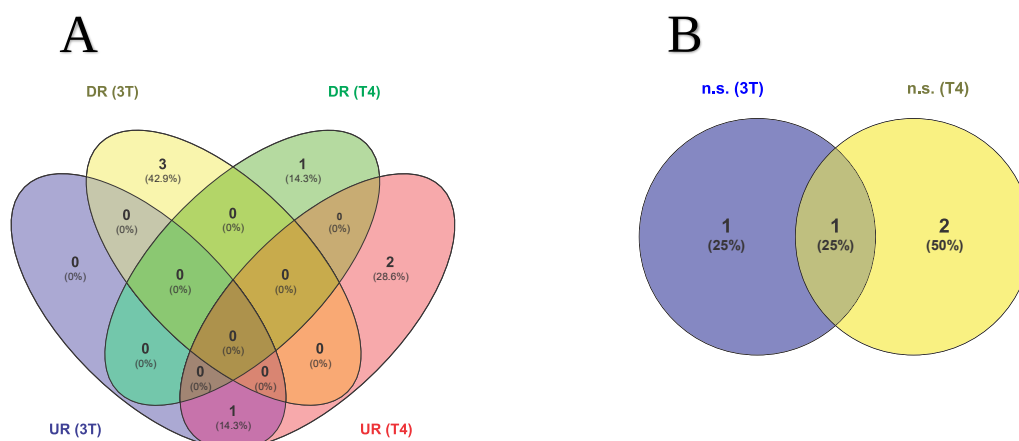


Figura 4. Diagrama de Venn com *tags* HT-SuperSAGE de feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV; 3T: *bulk* 30, 60, 90 min; e T4: 16h), presentes no metabolismo de rafinose. A- *unitags* induzidas (UR); *unitags* reprimidas (DR); B - *unitags* não significativas (n.s.; $p < 0,05$).

Tabela 2. Número EC (*Enzyme Commission Numbers*) do metabolismo de rafinose, KO (KEGG Orthology) das *seeds* de feijão azuki com suas respectivas anotações, sigla da enzima, ID de acordo com o banco de dados KEGG, confirmado pelo banco de dados NCBI, e abreviação de acordo com o CDD (*Conserved Domain Database*).

Número EC	KO	Enzima	Anotação (NCBI)	ID (NCBI)	Short name (CDD)
2.4.1.82	K06617	RS	galactinol-sucrose galactosyltransferase	XP_017411686	GH_D super family
3.2.1.22	K07407	α GAL	alpha-galactosidase	XP_017408541	PLN02692 super family
3.2.1.26	K01193	INV	beta-fructofuranosidase	XP_017406596	Glyco_32

Considerando o modelo experimental aplicado ao ensaio HT-SuperSAGE, envolveram-se 11 enzimas relacionadas ao metabolismo de inositol e RFOs que apontaram resultados de transcrição semelhantes para ambos os tempos precoce ou tardio ou tempos mostrando resultados transcricionais distintos, incluindo a expressão não detectada em algum dos tempos (Figura 5).

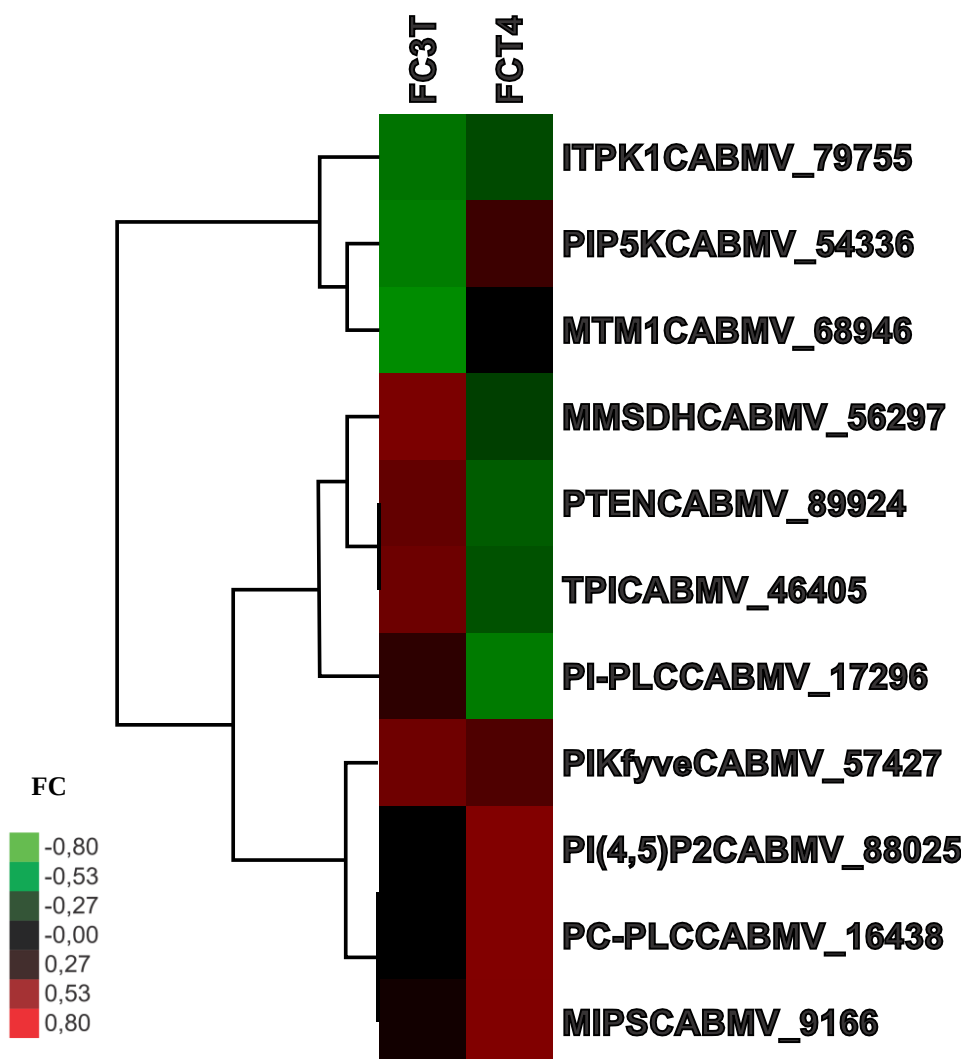


Figura 5. Clusterização hierárquica em resposta ao estresse de virose nas bibliotecas HT-SuperSAGE em relação ao controle negativo na via de inositol. 1 - em relação às enzimas, e os vários contrastes - vermelho: *unitags* UR; verde: *unitags* DR; preto: *unitags* n.s. 2 - Fold Change do tempo precoce (3T: *bulk* 30, 60 e 90 min); Fold Change do tempo tardio (T4: 16 h).

Os dados HT-SuperSAGE não possibilitaram mapear todos os componentes das vias de Ins e RFOs. Assim, componentes como o MIOX (EC 1.13.99.1) e GS (EC 2.4.1.123) não puderam ser mapeadas com as *unitags* disponíveis (Tabelas 3 e 4). Conforme observado, MMSDH e TPI estariam sendo induzidos no tempo inicial do estresse, e apresentou *unitags* reprimidas no tempo tardio (FC de -1,6 e -1,3, respectivamente). A *unitag* referente à proteína myo-inositol-1-phosphate synthase (MIPS; EC 5.5.1.4), foi não significativa no tempo precoce e induzida no tempo tardio. A ativação do metabolismo basal como a glicólise, a via das pentoses fosfato e o ciclo do ácido tricarboxílico já foram observados durante a indução do metabolismo de inositol nas plantas superexpressando MIPS. Os demais componentes não apresentaram expressões diferenciais significativas, ou não apresentaram expressão em pelo um dos tempos (Figuras 6A, 6B, 7A e 7B).

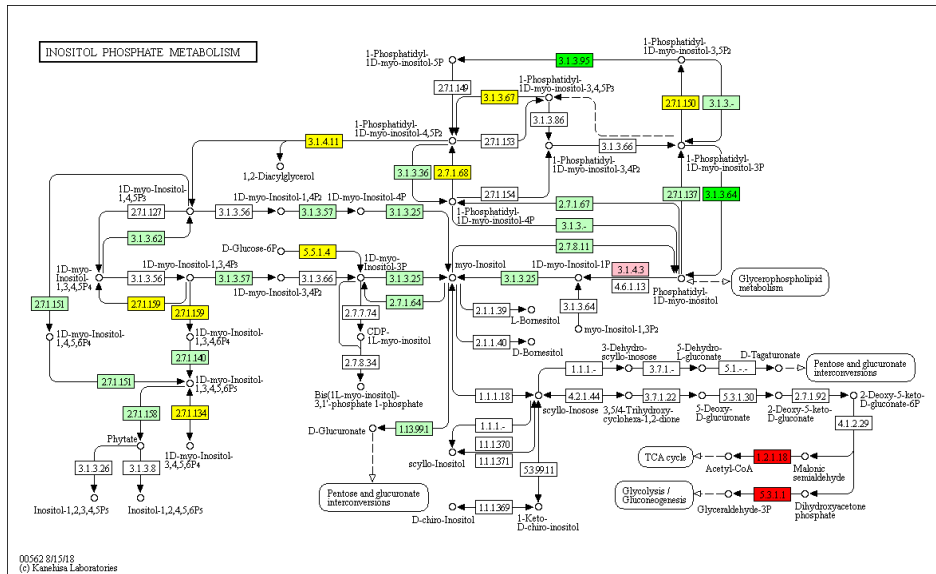
Tabela 3. Identificação das ESTs de feijão-caupi mapeadas na via de inositol, com suas respectivas *unitags* sob estresse biótico (CABMV; *bulk* 30, 60, 90 min; e 16h), modulação [FC (Fold Change)], regulação da expressão das mesmas, e quantitativo dessas por bibliotecas analisadas em *tags* por milhão [ITP3T/ ITPIC (3T/ic), ITPT4 / ITPICn (T4/ic)].

EC Number	Trancrypt	Unitag	FC	Reg	ITPIC	ITP3T	FC	Reg	ITPIC	ITPT4
1.2.1.18	TC5286	CABMV_56297	-2,9	DR	72,2	24,3	-1,6	DR	72,2	45,2
2.7.1.150	SI15736.1	CABMV_57427	-1,3	n.s.	15,5	11,6	1,0	n.s.	15,5	15,6
2.7.1.159 2.7.1.134	PO12564.1	CABMV_79755	1,3	n.s.	0,9	1,2	-0,9	n.s.	0,9	0,0
2.7.1.68	FF541006	CABMV_54336	2,7	UR	0,9	2,3	1,4	n.s.	0,9	1,2
3.1.3.16	SI33500.9	CABMV_89924	0,4	n.s.	0,0	0,4	-0,4	n.s.	0,4	0,0
3.1.3.36	PO14652.4	CABMV_88025	-	-	-	-	0,8	n.s.	0,0	0,8
3.1.3.64	PO16163.1	CABMV_68946	-2,3	DR	2,3	0,0	-	-	-	-
3.1.4.3	SI28617.1	CABMV_16438	-	-	-	-	2,4	UR	0,0	2,4
3.1.4.11	SI37058.1	CABMV_17296	-2,2	n.s.	2,6	1,1	-6,4	n.s.	2,6	0,4
5.3.1.1	gi 190518166 gb FG902117.1 FG902117	CABMV_46405	-1,6	DR	175,3	104,3	-1,3	DR	175,3	135,8
5.5.1.4	TC4316	CABMV_9166	-1,7	n.s.	3,9	2,3	12,7	UR	3,9	49,7

Tabela 4. Identificação das ESTs de feijão-caupi mapeadas no metabolismo de RFOs, com suas respectivas *unitags* sob estresse biótico (CABMV; *bulk* 30, 60, 90 min; e 16h), modulação [FC (Fold Change)], regulação da expressão das mesmas, e quantitativo dessas por bibliotecas analisadas em *tags* por milhão [ITP3T/ ITPIC (3T/ic), ITPT4 / ITPICn (T4/ic)].

EC Number	Trascript	Unitag	FC	Reg	ITPIC	ITP3T	FC	Reg	ITPIC	ITPT4
2.4.1.82	TC2744	CABMV_50331	0,0	-	-	-	2,0	UR	0,0	2,0
3.2.1.22	TC3033	CABMV_86839	- 0,4	n.s.	0,4	0,0	- 1,0	n.s.	0,4	0,4
3.2.1.26	SI28495.1	CABMV_58454	0,0	-	-	-	1,2	n.s.	0,0	1,2

A



B

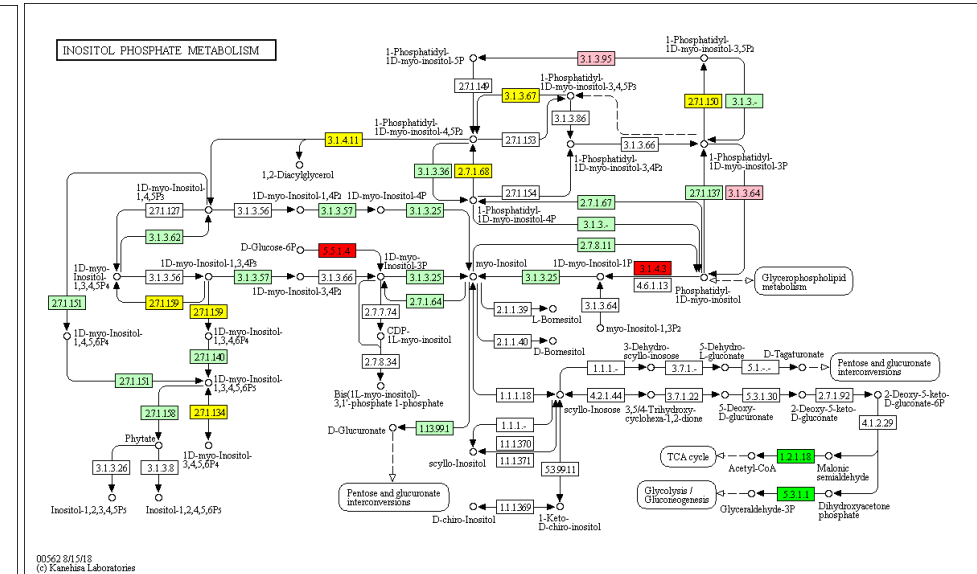
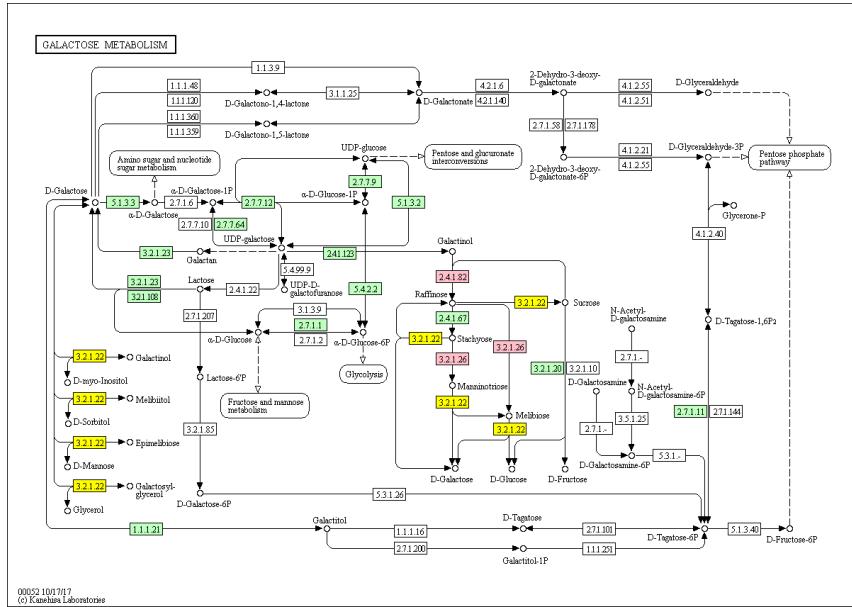


Figura 6. Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) na via metabólica de inositol, conforme a análise *in silico* de *unitags* HT-SuperSAGE. A – tempo precoce (3T: *bulk* 30, 60, 90 min); B – tempo tardio (T4: 16h).

Legenda: vermelho: *unitags* up-reguated (UR); verde: *unitags* down-regulated (DR); amarelo: *unitags* não significativas (n.s.; $p < 0,05$); rosa: *unitags* não detectadas (-).

A



B

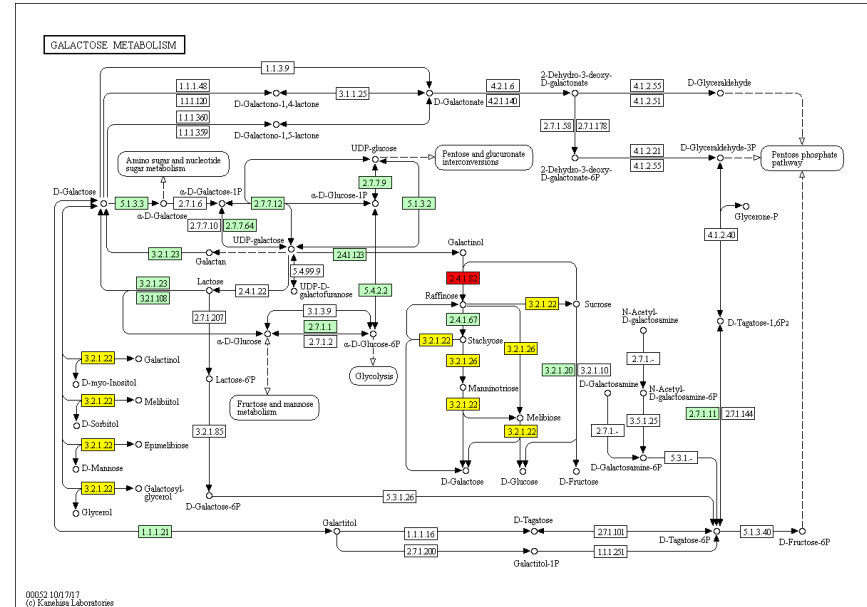


Figura 7. Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) no metabolismo de rafinose, conforme a análise *in silico* de *unitags* HT-SuperSAGE. A – tempo precoce (3T: *bulk* 30, 60, 90 min); B – tempo tardio (T4: 16h).

Legenda: vermelho: *unitags* up-reguated (UR); verde: *unitags* down-regulated (DR); amarelo: *unitags* não significativas (n.s.; $p < 0,05$); rosa: *unitags* não detectadas (-).

Conforme a análise *in silico* realizada, as expressões gênicas de três candidatos moleculares na via de inositol e um candidato molecular de rafinose (Tabela 5) foram validadas independentemente por RT-qPCR nos tempos precoce (3T: 90 minutos) e tardio (T4: 16 horas). Os *primers* projetados para os candidatos propostos (PIKfyve, PC-PLC, MIPS, RS) e os genes de referência (β -tubulina e F-BOX) amplificaram os cDNAs gerados a partir das amostras de RNA. Além disso, as curvas de dissociação (*melting curve*) para cada par de *primers* mostraram especificidade, amplificando apenas um produto. Eficiências de amplificação (E), coeficientes de correlação (R) e declives, para cada candidato, estimados a partir da curva padrão usando diluição serial (100, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4}) e um pool de cDNAs de folhas (resistente ao CABMV) de plantas sob ou sem estresse (controle), variou, respectivamente, de 91,03 a 102,66 %, 0,87 a 0,98 e -3,31 a -3,53. Estes resultados apresentaram condições favoráveis de amplificação e variações aceitáveis para gerar dados confiáveis de expressão relativa entre amostras.

Tabela 5. Genes candidatos propostos e seus resultados baseados na análise *in silico* de *unitags* HT-SuperSAGE expressas do genótipo IT85F-2687 e sua expressão relativa por RT-qPCR, utilizando cDNAs de feijão-caupi de folhas após 90 minutos e 16 horas sob condições de estresse biótico.

Genes Candidatos	Unitag	EST	Primer	HT-SuperSAGE (3T: <i>bulk</i> 30, 60, 90 minutos; T4: 16 horas)	RTq-PCR (3T: 90 minutos; T4: 16 horas)
PIKfyve	CABMV_57427	SI15736.1	(L) CAGCTCCATCAAATCCTAAACC (R) TCACTTTGAGGTTTGTCTGAGG	3T -1,34* / n.s. T4 1,00* / n.s.	3T 0,06** / DR T4 0,36** / n.s.
NPC ou PC-PLC	CABMV_17296	SI28617.1	(L) TGGATCCTGATAAAGTGAGACG (R) TTGATGAGTCAATGCGAGTACC	3T -2,23* / n.s. T4 -6,48* / n.s.	3T 0,28** / DR T4 0,23** / DR
MIPS	CABMV_9166	TC4316	(L) TTCAGCCTTGAAGTGGATACG (R) GATATTCATGGGTGGAAAGAGC	3T -1,67* / n.s. T4 12,75* / UR	3T 1,39** / n.s. T4 0,07** / DR
RS	CABMV_50331	TC2744	(L) ACAGTTCATGCTGATTGAGAGC (R) GGAAGAAAGACGGTGTAGATGG	3T 0,00* / - T4 2,00* / UR	3T 1,82** / n.s. T4 0,19** / n.s.

Legenda: Primer (L) – Left; Primer (R) – Right.

*Fold Change: razão de frequências (normalizada para 1.000.000) observada na biblioteca sob estresse em relação à respectiva biblioteca controle;

** Expressão relativa baseada no software REST (v.2.0.13) após o método $\Delta\Delta C_q$; UR - induzido; DR - reprimido; n.s.: não significativo ($p < 0,05$).

A seguir, são apresentados os resultados de RT-qPCR (Figuras 8A, 9A) e comparados aos dados *in silico* (Figuras 8B, 9B) das *unitags* selecionadas para as vias metabólicas, mostrando ou não diferenças entre os tempos.

I. 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase (PIKfyve, EC 2.7.1.150)

A *unitag* CABMV_57427 apresentando FC3T = -1,34 e FCT4 = 1,00 nos dados *in silico*, representante de PIKfyve, apresentou expressão reprimida no tempo precoce e não significativa no tempo tardio (FC3T= 0,06; FCT4 = 0,36) na RT-qPCR (Tabela 5; Figuras 8A, 8B, 9A e 9B). Poucos relatos estão disponíveis mostrando genes que codificam PIKfyve e sua expressão sob condições estressantes em culturas. A validação por RT-qPCR confirmou a expressão não significativa no tempo tardio.

II. fosfolipase C2 não específica ou fosfolipase C específica de fosfatidilcolina (NPC ou PC-PLC, EC 3.1.4.3)

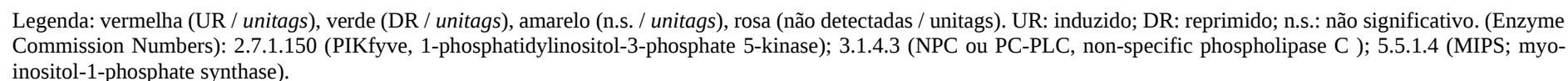
As análises *in silico* para PC-PLC mostraram *unitag* não significativa (FC3T= -2,23; FCT4 = -6,48) em ambos os tempos (Tabela 5; Figuras 8A, 8B, 9A e 9B). Por sua vez, dados de RT-qPCR demonstram, certa repressão pelo genótipo (FC3T= 0,28 FCT4 = e 0,23).

III. mio-inositol 1-phosphate synthase (MIPS, EC 5.5.1.4)

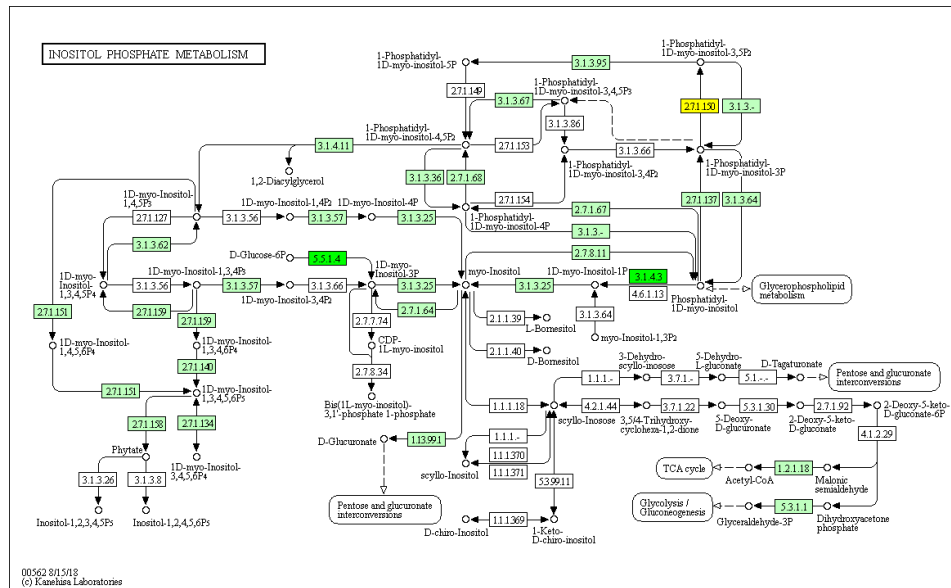
Para MIPS foi constatada *unitag* CABMV_9166 apresentando expressão não significativa no tempo precoce (Tabela 5; Figuras 8A, 8B, 9A e 9B), tanto na análise *in silico* quanto na validação, e respostas divergentes para o tempo tardio, sendo induzida na HT-SuperSAGE e reprimida na RT-qPCR.

IV. rafinose sintase (RS, EC 2.4.1.82)

Para a transcrição associada à RS, foi detectada a *unitag* CABMV_50331 que não apresentou expressão no tempo precoce (Tabela 5; Figuras 10A, 10B, 11A e 11B), mas se mostrou induzida no tempo tardio na análise *in silico*, enquanto a validação por RT-qPCR apresentou expressão não significativa em ambos os tempos, podendo indicar uma resposta à infecção pelo potyvírus.



A



B

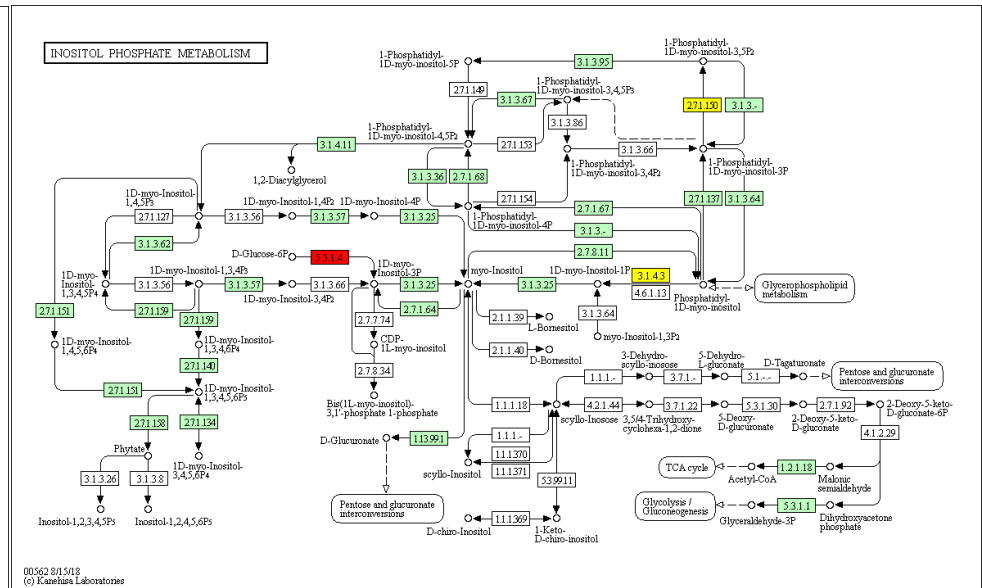
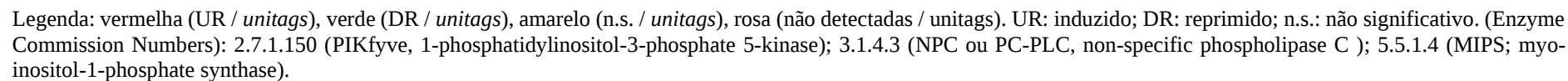


Figura 9. Mapeamento de expressões gênicas do feijão-caupi sob estresse biótico (CABMV) na via metabólica de inositol, conforme a RTq-PCR e a análise *in silico* de *unitags* HT-SuperSAGE. A - RTq-PCR (tempo tardio; T4: 16h); B - HT-SuperSAGE (tempo tardio; T4: 16h).

Legenda: vermelha (UR / *unitags*), verde (DR / *unitags*), amarelo (n.s. / *unitags*), rosa (não detectadas / *unitags*). UR: induzido; DR: reprimido; n.s.: não significativo. (Enzyme Commission Numbers): 2.7.1.150 (PIKfyve, 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase); 3.1.4.3 (NPC ou PC-PLC, non-specific phospholipase C); 5.5.1.4 (MIPS; myo-inositol-1-phosphate synthase).



Legenda: vermelha (UR / *unitags*), verde (DR / *unitags*), amarelo (n.s. / *unitags*), rosa (não detectadas / *unitags*). UR: induzido; DR: reprimido; n.s.: não significativo. (Enzyme Commission Numbers): 2.7.1.150 (PIKfyve, 1-phosphatidylinositol-3-phosphate 5-kinase); 3.1.4.3 (NPC ou PC-PLC, non-specific phospholipase C); 5.5.1.4 (MIPS; myo-inositol-1-phosphate synthase).

DISCUSSÃO

Considerando o modelo experimental aplicado ao ensaio HT-SuperSAGE, envolveram-se 11 enzimas relacionadas ao metabolismo de inositol e RFOs que apontaram resultados de transcrição semelhantes para ambos os tempos precoce ou tardio ou tempos mostrando resultados transcricionais distintos, incluindo a expressão não detectada em algum dos tempos (Figura 5). O *heatmap* referente a inositol, revelou que a maioria dos genes diferencialmente expressos em folhas são induzidos ou não diferenciais no tempo de estresse precoce (3T: *bulk* 30, 60, 90 min) quando comparado com o controle. Tal fato reforça a ideia de que as plantas precisam regular os níveis de expressão no início da percepção de estresse, visando a expressão mais rápida de genes de proteção que são responsivos ao estresse de sinalização.

Em plantas, a via metabólica de síntese dos RFOs já está bem estabelecida. A síntese destes oligossacarídeos depende da ação sequencial de uma série de galactosiltransferases e galactosilhidrolases. No primeiro passo, UDP-galactose e mio-inositol formam galactinol mais UDP, pela atividade da enzima galactinol sintase (GolS, EC 2.4.1.123). No segundo passo, a enzima rafinose sintase (RFS, EC 2.4.1.82) transfere um resíduo de galactose do galactinol para a sacarose formando rafinose e mio-inositol. No terceiro passo, a enzima estaquiose sintase (STS, EC 2.4.1.67) transfere outro resíduo de galactose do galactinol para a rafinose, por meio de uma ligação α -(1-6), liberando os produtos estaquiose e mio-inositol (Suarez et al., 1999).

A galactinol sintase (GS, 2.4.1.123) é a enzima que catalisa a porta de entrada do metabolismo desses compostos, a partir de mio-inositol e UDP-galactose, produzindo galactinol, sendo que este serve como doador de galactose para a síntese posterior dos membros da rafinose. Também envolve galactosídeos (glicosídeos- metabólitos secundários das plantas). A reação inicial da RFO é catalisada pela GS, que requer manganês para sua atividade, produzindo galactinol a partir de UDP-galactose e mio-inositol. Em seguida à reação inicial, sintases específicas catalisam a síntese de cada componente da série, pela transferência do galactinol para sacarose (glicose-frutose), rafinose (sacarose-galactose), estaquiose (rafinose-galactose) e verbascose, produzindo os 1-6 galactosídeos tri, tetra, penta e hexassacarídeos de rafinose (Fujimoto et al., 2003).

Em relação às análises realizadas, na via de inositol, no tempo precoce, a resposta foi validada para virose. Contudo, após 16 horas a resposta detectada em MIPS e PC-PLC foi diferente da SuperSAGE. Os genes e as correspondentes enzimas MIPS já foram isolados em mais de 70 organismos diferentes. Estudos realizados com as sequências do gene e da proteína MIPS, encontradas em diferentes organismos, revelaram que seus domínios catalíticos funcionais se encontram bastante conservados. Esta constatação indica que o gene praticamente

não sofreu grandes mutações ao longo da evolução das espécies, e consequentemente, sua funcionalidade tornou-se indispensável para o metabolismo de diversos organismos.

Na via da galactose, a rafinose sintase (RS) foi não significativa. em ambos os tempos, sendo na SuperSAGE detectada a expressão apenas no tempo tardio. A RS catalisa a síntese de rafinose a partir de sacarose e galactinol (Lehle e Tanner, 1973). Os RFOs atuam como osmoprotetores, em condições de deficiência hídrica, principalmente por serem capazes de manter a integridade das membranas retendo, assim, água durante a dessecação. Adicionalmente, possuem ação antioxidante, impedindo o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (*reactive oxygen species* - ROS) durante o déficit hídrico.

CONCLUSÕES

Considerando a análise *in silico* HT-SuperSAGE, a abordagem nem sempre produziu resultados idênticos quando comparadas a validação por RT-qPCR, mas algumas evidências complementam uma à outra. Assim, a partir das expressões analisadas, envolvendo 14 enzimas (onze relacionadas ao metabolismo de inositol, e três ao metabolismo de RFOs), os resultados apontaram resultados de transcrição semelhante para pelo menos um dos tempos. Este estudo pretendeu decodificar as vias de metabolismo (suas enzimas e transcrições), revelando ainda candidatos pouco explorados em cultivos em condições desfavoráveis. Além disso, este trabalho fornecerá mais informações sobre os mecanismos moleculares de adaptação de plantas a estresses bióticos. É válido ressaltar que a investigação das respostas moleculares contra estresses, normalmente aborda a sobreposição de padrões de transcrição, sendo os padrões de expressão gênica comparados. Os genes-chave dessas vias podem ser alvos para estudos de resistência ao estresse em leguminosas. Tais fatos indicam que se torna necessário uma melhor compreensão sobre a atuação dessas enzimas nas vias em questão, para que forneça novas abordagens sobre os mecanismos moleculares da planta ao estresse.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA, Recife, Pernambuco, Brasil), ao Dr. Antonio Félix da Costa (Melhoramento de feijão, IPA), ao Dr. Amaro de Castro Lira Neto (Genoma, IPA) pelo apoio técnico. Este trabalho contou com o apoio da FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e FACEPE (Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

REFERÊNCIAS

- Amorim LLB, Ferreira-Neto JRC, Bezerra-Neto JP, Pandolfi V, Araújo FT, Matos MKS et al. Cowpea and abiotic stresses: identification of reference genes for transcriptional profiling by qPCR. *Plant Methods*. 2018; 14:88. doi: 10.1186/s13007-018-0354-z.
- Bartels D, Souer E. Molecular Responses of Higher Plants to Dehydration. In: Hirt H, Shinozaki K, editor. *Plant Responses to Abiotic Stress*. Springer; 2004. doi: 10.1007/978-3-540-39402-0_2
- Boukar O, Belko N, Charmathi S, Togola A, Batieno J, Owusu E, Haruna M, Diallo S, Umar ML, Olujafo O and Fatokun C. Cowpea (*Vigna unguiculata*): Genetics, genomics and breeding. *Plant Breeding*. 2018; 1–10. 0.1111/pbr.12589
- Bustin S, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem*. 2009; 55:611–622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Chang S, Puryear J, Cairney J. A Simple and Efficient Method for Isolating RNA from Pine Trees. *Plant Molecular Biology Reporter*. 1993; 11(2):113- 116. doi: 10.1007/BF02670468
- FAOSTAT, Statistical data base. Rome: Food and Agricultural Organizations of the United Nations. 2017.
- Fujimoto Z, Kaneko S, Momma M, Kobayashi H, Mizun H. Crystal structure of rice α -galactosidase complexed with Dgalactose. *The Journal of Biological Chemistry*, 2003; 278 (22): 20313-20318. doi: 10.1074/jbc.M302292200
- Hoagland, DR, Arnon DI. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: California Agricultural Experimental Station. 1950.
- Kido EA, Barbora PK, Neto JR, Pandolfi V, Houllou-Kido LM, Crovella S, Molina C, Kahl G, Benko-Iseppon AM. Identification of plant protein kinases in response to abiotic and biotic stress using SuperSAGE. *Curr. Protein Pept. Scie*. 2011;12(7):643-56.
- Kitajima, EW. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986 - 1993). *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v. suplemento, 1995;p. 1-92.
- Kumar V, Sharma R, Trivedi PC, Vyas GK, Khandelwal V. Traditional and novel references towards systematic normalization of qRT-PCR data in plants. *Aust J Crop Sci*. 2011;5:1455–1468.doi:10.1007/s11033-. 010-0648-3
- Lehle L, Tanner W (1973) The function of myo-inositol in the biosynthesis of raffinose. Purification and characterization of galactinol:sucrose 6-galactosyltransferase from *Vicia faba* seeds. *Eur J Biochem*. 1973; 38(1):103-10. doi: 10.1111/j.1432-1033.1973.tb03039.x

- Liu J-JJ, Krenz DC, Galvez AF and de Lumen BO. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. *Plant Sci.* 1998;134:11–20. doi: 10.1016/S0168-9452(98)00042-9
- Loewus FA, Murthy PPN. *myo*-Inositol metabolism in plants: a review. *Plant Science.* 2000; 150:1-19.
- Majumder AL, Biswas BB. *Biology of Inositols and Phosphoinositides: Subcellular Biochemistry.* 2nd edn. Springer; 2006. doi: 10.1007/0-387-27600-9
- Meng PH, Raynaud C, Tcherkez G, Blanchet S, Massoud K et al. Crosstalks between myo-inositol metabolism, programmed cell death and basal immunity in *Arabidopsis*. *PLoS One*, 2009; 4:e7364. doi: 10.1371/journal.pone.0007364
- Page RDM. TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences*; 1996. 12: 357-358.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30. e36. doi:10.1093/nar/30.9e36
- Pio-Ribeiro, G. Doenças do caupi (*Vigna unguiculata*). In: KIMATI, H. e. Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. cap.24, p.215-222.
- Sprenger N and Keller F. Allocation of raffinose family oligosaccharides 7 to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: The roles of two distinct galactinol synthases. *Plant J.* 2000;21:249–258. doi: 10.1046/j.1365-313X.2000.00671.x
- Suarez FL, Springfield J, Furne JK, Lohrmann TT, Kerr OS, Levitt MD. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal Clinical Nutrition**, 1999; 69 (1): 135-139.
- Weng Y, Shi A, Ravelombola WS, Yang W, Qin J, Motes D, Moseley DO, Pengyin Chen P. A Rapid Method for Measuring Seed Protein Content in Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp). *American Journal of Plant Sciences.* 2017;8(10).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo representa a expressão *in silico* e validação de genes das vias metabólicas inositol de inositol e rafinose, associadas com respostas a estresses abiótico (estresse salino nas cultivares tolerante e sensível de feijão-caupi, nos tempos de 30 e 90 minutos) e biótico (resistência ao potyvírus CABMV, nos tempos de 90 minutos e 16 horas) do genótipo resistente ao CABMV, após 90 minutos e 16 horas, tendo por base a análise *in silico* de *unitags* HT-SuperSAGE, com validação dos resultados por RT-qPCR.

Assim, com base nos objetivos propostos e na metodologia foi possível identificar nas duas vias estudadas, transcritos de feijão-caupi com *unitags* diferencialmente expressas, em resposta ao estresse aplicado, assim como, mapear os componentes previstos nas vias, propor nove *primers* eficientes para RT-qPCR, amplificação dos nove componentes das vias analisadas e identificar respostas individualizadas, de genótipos tolerante / resistente e sensível, nas orquestrações das duas vias metabólicas.

Assim, a via de inositol foi confirmada nos genótipos tolerante e sensível, de forma parcial, já que alguns candidatos aparentemente não expressaram de modo diferencial, após aplicação do estresse. Para o estresse biótico, estudos mais aprofundados devem ser realizados a fim de caracterizar melhor as vias. Para melhor caracterizar esses genótipos nas vias propostas, se faz necessário trabalho similar envolvendo genes efetivos na tolerância ao estresse em questão, para que, em conjunto com os candidatos aqui propostos, estes possam ser eficientes na seleção de genótipos superiores e úteis em programas de melhoramento de feijão-caupi.

REFERÊNCIAS

- ACUÑA, C.; VILLALBA, P.; GARCÍA, M.; HOPP, E.; MARCUCCI, S. Functional markers development and genetic diversity analysis in *Eucalyptus globulus* with emphasis in wood quality candidate genes. **BMC Proceedings**, v.5, n.7, p.154, 2011.
- AGI - The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v.408, p.796-815, 2000.
- AHANGER, M. A.; HASHEM, A.; ABD-ALLAH, E. F.; AHMAD, P. Arbuscular mycorrhiza in crop improvement under environmental stress, In: Ahmad, P., Rasool, S. **Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance**. San Diego: Elsevier, 2014. p.69-95.
- ALMEIDA, W. S.; FERNANDES, F. R. B.; BERTINI, C. H. C. B.; PINHEIRO, M.; TEÓFILO, E. M. Emergência e vigor de plântulas de genótipos de feijão-caupi sob estresse salino. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.10, p.1047-1054, 2012.
- ALVES J. M. A.; ARAÚJO, N. P.; UCHÔA, S. C. P.; ALBUQUERQUE, J. A. A.; SILVA, A. J.; RODRIGUES, G. S.; SILVA, D. C. O. Avaliação agroeconômica da produção de cultivares de feijão-caupi em consórcio com cultivares de mandioca em Roraima. **Revista Agroambiente On-line**, v.3, n.1, p.15-30, 2009.
- ALWINE, J. C.; KEMP, D. J.; STARK, G. R. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.74, n.12, p.5350-5354, 1977.
- APG III An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.16, n.2, p.105-121, 2009.
- ARRAES, F. B.; BENOLIEL, B.; BURTET, R. T.; COSTA, P. L.; GALDINO, A. S.; LIMA, L. H.; MARINHO-SILVA, C.; OLIVEIRA-PEREIRA, L.; PFRIMER, P.; PROCÓPIO-SILVA, L.; REIS, V. C.; FELIPE, M. S. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Genetics and molecular research**, v.4, n.2, p.290-308, 2005.
- ARRUDA, P. Gênômica vegetal. In: **Gênômica**. São Paulo: Editora Atheneu, São Paulo, 2004. p.93-104.
- ASSIS JUNIOR J. O.; LACERDA, C. F.; SILVA, F. B.; SILVA, F. L. B.; BEZERRA, M. A.; GHEYI, H. R. Produtividade do feijão-caupi e acúmulo de sais no solo em função da fração de lixiviação e da salinidade da água de irrigação. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola**, v.27, n.3, p.702-713, 2007.

- BARRETT, T.; TROUP, D. B.; WILHITE, S. E.; LEDOUX, P.; RUDNEV, D.; EVANGELISTA, C.; KIM, I. F.; SOBOLEVA, A.; TOMASHEVSKY, M.; EDGAR, R. NCBI GEO: Mining tens of millions of expression profiles - Database and tools update. **Nucleic Acids Research**, v.35, n.1, p.760–765, 2007.
- BARTELS, D; SOUER, E. Molecular Responses of Higher Plants to Dehydration. In: Hirt H., Shinozaki K. **Plant Responses to Abiotic Stress 1th edition**. Berlin: Springer, 2004. p.9–38.
- BASHIR, M.; AHMAD, Z.; GHAFUOH, A. Cowpea aphid-borne mosaic potyvirus: a review. **International Journal of Pest Management**, v.48, n.2, p.155-168, 2002.
- BENKO-ISEPPON A. M. **Estudos moleculares e citogenéticos no caupi e em espécies relacionadas: Avanços e perspectivas**. Embrapa Documentos, v.56, p.327-332, 2001.
- BENKO-ISEPPON, A. M.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V. GENOSOJA - The Brazilian Soybean Genome Consortium: High throughput omics and beyond. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, n.1, p.1–4, 2012.
- BERGUER, P. H.; WYATT, S.D.; SHIEL, P. J.; SILBERNAGEL, M. J.; DRUFFEL, K; MINK, G. I. Phylogenetic analysis of the *Potyviridae* with emphasis on legume-infecting potyviruses. **Achives of Virology**, v.142, 1997.
- BESERRA JUNIOR, J. E. A.; ANDRADE, E. C.; CAMARÇO, R. F. R. A.; NASCIMENTO, A. K. Q.; LIMA, J. A. A. Sequence variability in the coat protein gene of *Cowpea severe mosaic virus* isolates from northeastern Brazil. **Tropical Plant Pathology**, v.36, p.121-124, 2011.
- BINZEL, M. L.; HESS, F. D.; BRESSAN, R. A.; HASEGAWA, P. M. Intracellular compartmentation of ions in salt adapted tobacco cells. **Plant Physiology**, v.86, n.2, p.607-614, 1998.
- BLAIR, M. W.; FERNANDEZ, A. C.; ISHITANI, M.; MORETA, D.; SEKI, M.; AYLING, S.; SHINOZAKI, K. Construction and EST sequencing of full-length, drought stress cDNA libraries for common beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, v.11, n.1, p.171, 2011.
- BOCK, K. R.; CONTI, M. Cowpea aphid-borne mosaic virus. **Description of Plant Viruses**, n.34, 1974.
- BOHNERT, H. J.; SU, H.; SHEN, B. Molecular mechanisms of salinity tolerance. In: Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. **Molecular responses to cold, drought, heat and salt stress in higher plants**. Arizona: University of Arizona, 1999. p.29-60.
- BRÄUTIGAM, A.; GOWIK, U. What can next generation sequencing do for you? Next generation sequencing as a valuable tool in plant research. **Plant Biology**, v.12, n.6, p.831–41, 2010.

- BRAZMA, A.; PARKINSON, H.; SARKANS, U.; SHOJATALAB, M.; VILO, J.; ABEYGUNAWARDENA, N.; HOLLOWAY, E.; KAPUSHESKY, M.; KEMMEREN, P.; LARA, G. G.; OEZCIMEN, A.; ROCCA-SERRA, P.; SANSONE, S. A. ArrayExpress - A public repository for microarray gene expression data at the EBI. **Nucleic Acids Research**, v.31, n.1, p.68–71, 2003.
- BUSCH, W.; LOHMANN, J. U. Profiling a plant: expression analysis in Arabidopsis. **Current Opinion in Plant Biology**, v.10, n.2, p.136–141, 2007.
- CALVET, A. S. F.; PINTO, C. M.; LIMA, R. E. M.; MAIA-JOCA, R. P. M.; BEZERRA, M. A. Crescimento e acumulação de solutos em feijão-caupi irrigado com águas de salinidade crescente em diferentes fases de desenvolvimento. **Irriga**, v.18, n.1, p.148-159, 2013.
- CAMPOS, M. A.; ROSA, D. D.; TEIXEIRA, J. E. C.; TARGON, M. L. P. N.; SOUZA, A. A.; PAIVA, L. V.; STACH-MACHADO, D. R.; MACHADO, M. A. PR gene families of citrus: Their organ specific-biotic and abiotic inducible expression profiles based on ESTs approach. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.917–930, 2007.
- CASPI, R.; ALTMAN, T.; DREHER, K.; FULCHER, C. A.; SUBHRAVETI, P.; KESELER, I. M.; KOTHARI, A.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; MUELLER, L. A.; ONG, Q.; PALEY, S.; PUJAR, A.; SHEARER, A. G.; TRAVERS, M.; WEERASINGHE, D.; ZHANG, P.; KARP, P. D. The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. **Nucleic acids research**, 2012.
- CHEN, H.; LIU, L.; WANG, L.; WANG, S.; CHENG, X. VrDREB2A, a DREB-binding transcription factor from *Vigna radiata*, increased drought and high-salt tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Plant Research**, v.129, n.2, p.263–273, 2016.
- CHOI, H. K.; MUN, J. H.; KIM, D. J.; ZHU, H.; BAEK, J. M.; MUDGE, J.; ROE, B.; ELIS, N.; DOYLE, J.; KISS, G. B.; YOUNG, N. D.; COOK, D. R. Estimating genome conservation between crop and model legume species. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.101, n.43, p.15289–15294, 2004.
- CHOI, I. Y.; HYTEN, D.L.; MATUKUMALLI, L. K.; SONG, Q.; CHAKY, J. M.; QUIGLEY, C. V.; CHASE, K.; LARK, K. G.; REITER, R. S.; YOON, M. S.; HWANG, E. Y.; YI, S. I.; YOUNG, N. D.; SHOEMAKER, R. C.; VAN TASSELL, C. P.; SPECHT, J. E.; CREGAN, P. B. A soybean transcript map: Gene distribution, haplotype and single-nucleotide polymorphism analysis. **Genetics**, v.176, n.1, p.685–696, 2007.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos: safra 201/17, décimo levantamento**. Brasília: DF, v.4, n.10, 2017. 170p.

- CORREA, A. M.; CECCON, G.; CORREA, C. M. A.; DELBEN, D. S. Estimativas de parâmetros genéticos e correlações entre caracteres fenológicos e morofagronômicos em feijão-caupi. **Revista Ceres**, v.59, n.1, p.88-94, 2012.
- COSTA, A. F.; SOUZA, M. C. M.; CANUTO, V. T. B.; COITINHO, R. L. B. C.; TAVARES, J. A.; FONSECA, M. A. C. Miranda IPA 207, Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Nordeste Brasileiro. **Pesquisa agropecuária pernambucana**, v.18, n.1, p.39-43, 2013.
- CRAMER, G. R.; URANO, K.; DELROT, S.; PEZZOTTI, M.; SHINOZAKI, K. Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. **BMC Plant Biology**, v.11, n.1, p.163, 2011.
- DADSON, R. F.; HASHEM, F.; JAVAID, I.; JOSHI, J.; ALLEN, A. L.; DEVINE, T. E. Effect of water stress on the yield of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) genotypes in the Delmarva region of the United States. **Journal of Agronomy and Crop Science**, v.191, n.3, p.210-217, 2005.
- DANTAS, J. P.; MARINHO, F. J. L.; FERREIRA, M. M. M.; AMORIM, S.N.; ANDRADE, S. I. O.; SALES, A. L. Avaliação de genótipos de caupi sob salinidade. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.6, n.3, p.425-430, 2002.
- DANTAS, J. P.; FERREIRA, M. M. M.; MARINHO, F. J. L.; NUNES, M. S. A., QUEIROZ, M. F.; SANTOS, P. T. A. Efeito do estresse salino sobre a germinação e produção de sementes de caupi. **Agropecuária Técnica**, v.24, n.2, p.119-130, 2003.
- DAS, S.; BHAT, P. R.; SUDHAKAR, C.; EHLERS, J. D.; WANAMAKER, S.; ROBERTS, P. A.; CUI, X.; CLOSE, T. J. Detection and validation of single feature polymorphisms in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) using a soybean genome array. **BMC Genomics**, v.9, p.1–12, 2008.
- DAS, S.; EHLERS, J. D.; CLOSE, T. J.; ROBERTS, P. A. Transcriptional profiling of root-knot nematode induced feeding sites in cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) using a soybean genome array. **BMC Genomics**, v.11, n.1, 2010.
- DIFO, H. V.; ELEWECHI, O.; DANLADI, A. A.; UCHE, S. N.; GODWIN, C. N.; Chemical changes during open and controlled fermentation of cowpea (*Vigna unguiculata*) flour. **International Journal Food Nutrinional and Safety**, v.5, n.1, p.1-10, 2014.
- EGAMBERDIEVA, D.; SHURIGIN, V.; GOPALAKRISHNAN, S.; SHARMA, R. Microbial strategy for the improvement of legume production under hostile environment. In: Azooz, M. M.; Ahmad, P. **Legumes under Environmental Stress: Yield, Improvement and Adaptations**. United States: Wiley and Sons, 2015. p.133-142.

- EL KELISH, A.; ZHAO, F.; HELLER W.; DURNER, J.; WINKLER, J. B.; BEHRENDT, H.; TRAUDL-HOFFMANN, C.; HORRES, R.; PFEIFER, M.; FRANK, U.; ERNST, D. Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen allergenicity: superSAGE transcriptomic analysis upon elevated CO₂ and drought stress. **BMC Plant Biology**, v.14, p.176, 2014.
- FAOSTAT, F. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. FAO. **Crops: cowpeas, dry (2017)**. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>. Acesso em: 10 Jun. 2017.
- FARIS, D. C. The origin and evolution of the cultivated forms of *Vigna sinensis*. **Canadian Journal of Genetics Cytology**, v.7, n.3, p.433-52, 1965.
- FATOKUN, C. A.; TARAWALI, S. A.; SINGH, B.; KORMAWA, P. M. **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Nigeria: Ibadan, 2000. 396p.
- FAUQUET, C. M.; MAYO, M. A.; MANILOFF, J.; DESSELBERGER, U.; BALL, L. A. (Eds.) **Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. 1259p.
- FREIRE FILHO, F. R. **Origem, evolução e domesticação do caupi**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 1988. 21p.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; SANTOS, A. A. Cultivares de caupi para a região Meio-Norte do Brasil. In: Cardoso, M. J. **A cultura do feijão caupi no Meio-Norte do Brasil**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2000. 264p.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2005a. 519p.
- FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Melhoramento genético**. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: avanços tecnológicos**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, v.1, p. 27-92, 2005b.
- FREIRE FILHO, F. R.; CRAVO, M. S.; VILARINHO, A. A.; CAVALCANTE, E. S.; FERNANDES, J. B.; SAGRILO, E.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. de M.; SOUZA, F. de F.; LOPES, A. de M.; GONÇALVES, J. R. P.; CARVALHO, H. W. L.; RAPOSO, J. A. A.; SAMPAIO, L. S. **BRS Novaera: cultivar de feijão-caupi de porte semi-ereto**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. 4p.
- FREIRE FILHO, F. R.; RIBEIRO, V. Q.; ROCHA, M. M.; SILVA, K. J. D.; NOGUEIRA, M. S. R.; RODRIGUES, E. V. **Feijão-caupi no Brasil: produção, melhoramento genético, avanços e desafios**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2011. 84p.

- FROTA, K. M. G.; SOARES, R. A. M.; AREAS, J. A. G. Composição química do feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp), cultivar BRS-Milênio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, n.2, 2008.
- FURLAN, L.R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.331-341, 2007.
- GARZÓN, P.; GARCÍA, M. Efecto del estrés por NaCl sobre La anatomia radical y foliar em dos genótipos de frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Bioagro**, v.23, n.3, p.153-160, 2011.
- GHORBANI, S. G. M.; SHAHRAEIN, N.; ELAGINIA, S. A. Serodiagnose of cowpea (*Vigna unguiculata*) viruses in Guilan province. **Iranian Journal of Virology**, v.1, n.1, p.28-31, 2008.
- GILARDONI, P. A.; SCHUCK, S.; JÜNGLING, R.; ROTTER, B.; BALDWIN, I. T.; BONAVENTURE, G. SuperSAGE analysis of the *Nicotiana attenuata* transcriptome after fatty acid-amino acid elicitation (FAC): Identification of early mediators of insect responses. **BMC Plant Biology**, v.10, 2010.
- GONÇALVES, J. R. P.; FONTES, J. R. A.; DIAS, M. C.; ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R. **BRS Guariba – Nova Cultivar de Feijão-Caupi para o Estado do Amazonas**. Comunicado Técnico, 76, Manaus: Amazonas, 2009.
- GOWDA, M.; JANTASURIYARAT, C.; DEAN, R.; WANG, G.-L. Robust-LongSAGE (RL-SAGE) for both gene discovery and transcriptome analysis. **Plant Physiol**, v.134, n.3, p.90–897, 2004.
- GUJARIA, N.; KUMAR, A.; DAUTHAL, P.; DUBEY, A.; HIREMATH, P.; BHANU, P. A.; FARMER, A.; BHIDE, M.; SHAH, T.; GAUR, P. M.; UPADHYAYA, H. D.; BHATIA, S.; COOK, D. R.; MAY, G. D.; VARSHNEY, R. K. Development and use of genic molecular markers (GMMs) for construction of a transcript map of chickpea (*Cicer arietinum* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.122, n.8, p.1577–1589, 2011.
- GUO, B.; CHEN, X.; DANG, P.; SCULLY, B. T.; LIANG, X.; HOLBROOK, C. C.; YU, J.; CULBREATH, A. K. Peanut gene expression profiling in developing seeds at different reproduction stages during *Aspergillus parasiticus* infection. **BMC Developmental Biology**, v.8, p.1–16, 2008.
- HALL, A. E., N.; CISSE, N.; McWATTERS, K. H. Development of 588 cowpea cultivars and germplasm by the Bean/Cowpea CRSP. **Field Crops Research**, v.82, n.589, p.103-134, 2003.
- HASHEM A. H.; ALLAH, E. F. A.; ALQARAWI, A. A.; EL-DIDAMONY, G.; ALWHIBI, M.; EGAMBERDIEVA, D.; AHMAD, P. Alleviation of adverse impact of salinity on faba bean

- (*Vicia faba* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. **Pakistan Journal of Botany**, v.6, n.6, p.2003-2013, 2014.
- HASHEM A.; ALLAH, E. F.; ALQARAWI, A. A.; ALWHIBI, M.; ALENAZI, M. M.; EGAMBERDIEZA, D.; AHMAD, D. Arbuscular mycorrhizal fungi mitigates NaCl induced adverse effects on *Solanum lycopersicum* L. **Pakistan Journal of Botany**, v.47, n.1, p.327-340, 2015.
- HE, S. L.; GREEN, R. Northern Blotting. **Laboratory Methods In Enzymology: RNA**, p.75-87, 2013.
- HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, M. P. Real Time Quantitative PCR. **Genome Methods**, v.6, p.986-994, 1996.
- HIETER, P.; BOGUSKI, M. Functional genomics: It's all how you read it. **Science**, v.278, p.601-602, 1997.
- HONG-BO, S.; XIAO-YAN, C.; LI-YE, C.; XI-NING, Z.; GANG, W.; YONG-BING, Y.; CHANG-XING, Z.; ZAN-MIN, H. Investigation on the relationship of proline with wheat anti-drought under soil water deficits. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.53, n.1, p.113-119, 2006.
- IPA (Recife, PE). **Caupi-IPA-206**: nova cultivar de feijão macassar (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) tipo moita para Pernambuco. Recife, 1989.
- ITO-INABA, Y.; HIDA, Y.; MATSUMURA, H.; MASUKO, H.; YAZU, F.; TERAUCHI, R.; WATANABE, M.; INABA, T. The gene expression landscape of thermogenic skunk cabbage suggests critical roles for mitochondrial and vacuolar metabolic pathways in the regulation of thermogenesis. **Plant, Cell and Environment**, v.35, n.3, p.554-566, 2012.
- JUNIOR, T. C.; BENEDITO, V. A.; FIGUEIRA, A. V. D. O. Análise Serial da Expressão Gênica. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v.33, n.2001, p.88-100, 2004.
- KAISER, W. J.; MOSSAHEBI, G. H. Studies with cowpea aphid-borne mosaic virus and its effect on cowpea in Iran. Food and Agriculture Organization. **Plant Protection Bulletin**, v.23, n.2, p.33-39, 1975.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v.28, n.1, p.27-30, 2000.
- KANG, Y. J.; KIM, S. K.; KIM, M. Y.; LESTARI, P.; KIM, K. H.; HA, B. K.; JUN, T. H.; HWANG, W. J.; LEE, T.; SHOM, S.; YOON, M. Y.; JANG, T. H.; HWANG, W. J.; LEE, T.; LEE, J.; SHIM, S.; YOON, M. Y.; JANG, Y. E.; HAN, K. S.; TAEPRAYOON, P.; YOON, N.; SOMTA, P.; TANYA, P.; KIM, K. S.; GAWAG, J. G.; MOON, J. K.; LEE, Y. H.; PARK, B. S.; BOMBARELY, A.; DOYLE, J. J.; JACJSON, S. A.; SCHAFLEITNER, R.; SRINIVES, P.;

- VARSHNEY, R. K.; LEE, S. H. Genome sequence of mungbean and insights into evolution within *Vigna* species. **Nature Communications**, v.5, p.1–9, 2014.
- KANG, Y. J.; SATYAWAN, D.; SHIM, S.; LEE, T.; LEE, J.; HWANG, W. J.; KIM, S. K.; LESTARI, P.; LAOSATIT, K.; KIM, K. H.; HA, T. J.; CHITIKINEKI, A.; KIM, M. Y.; KO, J-M.; GWAG, J-G.; MOON, J-K.; LEE, Y-H.; PARK, B-S.; VARSHNEY, R. K.; LEE, S-H. Draft genome sequence of adzuki bean, *Vigna angularis*. **Scientific Reports**, v.5, p.1–8, 2015.
- KARP, P. D.; PALEY, S. M.; KRUMMENACKER, M.; LATENDRESSE, M.; DALE, J. M.; LEE, T. J.; KAIPA, P.; GILHAM, F.; SPAULDING, A.; POPESCU, L.; ALTMAN, T.; PAULSEN, I.; KESELER, I. M.; CAPSI, R. Pathway Tools version 13.0: integrated software for pathway/- genome informatics and systems biology. **Briefings in Bioinformatics**, v.11, n.1, p.40–79, 2010.
- KELLER, F.; PHARR, D. M. Metabolism of Carbohydrates in Sinks and Sources: Galactosyl-Sucrose Oligosaccharides. In: Zamski E., Schaffer A. A. **Photoassimilate Distribution in Plants and Crops 1th edition**. New York: Marcel Dekker, 1996. p.115–184.
- KHAN, M. H.; PANDA, S. K. Alterations in root lipid peroxidation and antioxidative responses in two rice cultivars under NaCl-salinity stress. **Acta Physiology Plant**, v.30, p.81-89, 2008.
- KIDO, E.A.; BARBOSA, P. K.; NETO, J. R.; PANDOLFI, V.; HOULLOU-KIDO, L. M.; CROVELLA, S.; MOLINA, C.; KAHL, G.; BENKO-ISEPPON, A. M. Identification of plant protein kinases in response to abiotic and biotic stresses using SuperSAGE. **Current Protein and Peptide Science**, v.12, n.7, p.643–656, 2011.
- KIDO, É. A.; FERREIRA NETO, J. R. C.; SILVA, R. L. DE O.; PANDOLFI, V.; GUIMARÃES, A. C. R.; VEIGA, D. T.; CHABREGAS, S. M.; CROVELLA, S.; BENKO-ISEPPON, A. M. New Insights in the Sugarcane Transcriptome Responding to Drought Stress as Revealed by Supersage. **The Scientific World Journal**, v.2012, p.1–14, 2012a.
- KIDO, E. A.; NETO, J. R. C. F.; SILVA, R. L. O.; ANDRADE, P. P.; BENKO-ISEPPON, A. M. SuperSAGE Technology in Plants. In: KIDO, E.A. et al. **Gene Discovery and Protection: New trends and market restrictions on stress tolerant transgenic sugarcane**. New York: Nova Science Publishers, 2012b. p.13-15.
- KIDO, E. A.; NETO, J. R. F.; KIDO, B. A. S.; PANDOLFI, V.; BENKO-ISEPPON, A. M. DeepSuperSAGE in a Friendly Bioinformatic Approach: Identifying Molecular Targets Responding to Abiotic Stress in Plants. In: SHARMA, Pradeep; RUAN, Gaur. **Molecular Approaches in Plant Abiotic Stress**. Flórida: Crc Press, 2014.p.90-108.
- KIDO, E. A.; PANDOLFI, V.; HOULLOU-KIDO, L. M.; ANDRADE, P. P.; MARCELINO, F. C.; NEPOMUCENO, A. L.; ABDELNOOR, R. V.; BURNQUIST, W. L.; BENKO-

- ISEPPON, A. M. Plant Antimicrobial Peptides: An Overview of SuperSAGE Transcriptional Profile and a Functional Review. **Current Protein & Peptide Science**, v.11, n.3, p.220–230, 2010.
- KIDO, E. A.; FERREIRA NETO, J. R.; SILVA, R. L. O.; PANDOLFI, V.; GUIMARÃES, A. C.; VEIGA, D. T.; CHABREGAS, S. M.; CROVELLA, S.; BENKO-ISEPPON, A. M. New insights in the sugarcane transcriptome responding to drought stress as revealed by Supersage. **The Scientific World Journal** 2012d.
- KIDO, E. A.; FERREIRA NETO, J. R. C.; SILVA, R. L. O.; ANDRADE, P. P.; BLADANI, J. I.; BENKO-ISEPPON, A. M. **Tolerance against Abiotic Stresses in Sugarcane: Can Gene Discovery and Biotechnology Improve the Yield?** In: Gonçalves, J.F. and Correia, K. Sugarcane: Production, Cultivation and Uses. Nova Publishers Eds., 2012c. 12p.
- KIGEL, J.; ROSENTAL, L.; FAIT, A. Seed Phisiology and Germination of Grain Legume. In: De Ron A. (eds) Grain Legume. **Handbook of Plant Breeding**. New York: Springer, 2015. p.327-363.
- KITAJIMA, E. W. Lista de publicações sobre viroses e enfermidades correlatas de plantas no Brasil (1986 - 1993). **Fitopatologia Brasileira**, v.1, p.1-92, 1995.
- KITAJIMA, E. W.; ALCÂNTARA, B. K.; MADUREIRA, P. M.; ALFENAS-ZERBINI, P.; REZENDE, J. A. M.; ZERBINI, F. M. A mosaic of beach bean (*Canavalia rosea*) caused by an isolate of *Cowpea aphid-borne virus* (CABMV) in Brazil. **Archives of Virology**, v.153, p.743-747, 2008.
- KLOK, E. J.; WILSON, I. W.; WILSON, D.; CHAPMAN, S. C.; EWING, R. M.; SOMERVILLE, S. C.; PEACOCK, W. J.; DOLFERUS, R.; DENNIS, E. S. Expression profile analysis of the low-oxygen response in *Arabidopsis* root cultures. **The Plant Cell**, v.14, n.10, p.2481–2494, 2002.
- LAKHANPAUL, S.; BABU, C. In **Symposium on Grain Legumes**, New Delhi, India, 1991. p.47–57.
- LESTARI, P.; KANG, Y. J.; HAN, K. S.; LEE, Y. H.; GWAG, J. G.; MOON, J. K.; LEE, S. H.. Genome-wide single nucleotide polymorphism discovery and validation in adzuki bean. **Molecular Breeding**, v.33, n.2, p.497–501, 2014.
- LI, J.; DAI, X.; LIU, T.; ZHAO, P. X. LegumeIP: an integrative database for comparative genomics and transcriptomics of model legumes. **Nucleic Acids Research**, 2011.
- LIANG X.; WANG, H.; HU, Y.; MAO, L.; SUN, L.; DONG, L.; NAN, W.; BI, Y. Silicon does not mitigate cell death in cultured tobacco BY-2 cells subjected to salinity without ethylene emission. **Plant Cell Reports**, v.34, n.2, p.331–343, 2015.

- LICHTENTHALER, H. K. **El estrés y la medida del estrés en plantas**. In: Reigosa, M. J.; Pedrol, N.; Sánchez, A. (eds). *La Ecofisiología Vegetal – Una ciencia de síntesis*. Madrid. Thomson, 2004. p.59-111.
- LIMA, C. J.; OLIVEIRA, F. A.; MEDEIROS, J. F.; OLIVEIRA, M. K. T.; ALMEIDA JÚNIOR, A. B. Resposta do feijão caupi à salinidade da água de irrigação. **Revista Verde de Agroecologia**, v.2, n.2, p.79-86, 2007.
- LIMA, R. C. A.; LIMA, J. A. A.; SOUZA, M. T.; PIO-RIBEIRO, G.; ANDRADE, G. P. Etiologia, sintomatologia, distribuição geográfica e estratégias de controle de viroses em culturais tropicais. In: LIMA, J. A. A. **Virologia essencial & viroses em culturas tropicais**. 1. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2015. p.303-527.
- LIU, J.; KRENZ, D. C.; GALVEZ, A. F.; LUMEN, B. O. Galactinol synthase (GS): increased enzyme activity and levels of mRNA due to cold and desiccation. **Plant Science**, v.134, n.1, p.11–20, 1998.
- LIU, P.; YIN, L.; WANG, S.; ZHANG, M.; DENG, X.; ZHANG, S.; TANAKA, K. Enhanced root hydraulic conductance by aquaporin regulation accounts for silicon alleviated salt-induced osmotic stress in *Sorghum bicolor* L. **Environmental and Experimental Botany**, v.111, p.42–51, 2015.
- LIU, M. SEN; KUO, T. C. Y.; KO, C. Y.; WU, D. C.; LI, K. Y.; LIN, W. J.; LIN, C. P.; WANG, Y. W.; SCHAFLEITNER, R.; LO, H. F.; CHEN, C. Y.; CHEN, L. F. Genomic and transcriptomic comparison of nucleotide variations for insights into bruchid resistance of mungbean (*Vigna radiata* [L.] R. Wilczek). **BMC Plant Biology**, v.16, n.1, p.1–16, 2016.
- LOEWUS, F. A.; MURTHY, P. P. N. Myo-Inositol metabolism in plants. **Plant Science**, v.150, n.1, p.1–19, 2000.
- LPWG - The Legume Phylogeny Working Group. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v.66, n.1, p.44-77, 2017.
- LPWG, Legume Phylogeny Working Group. Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. **Taxon**, v.62, n.2, p.217–248, 2013a.
- LUSH, W. M.; EVANS, L. T. The domestication and improvement of cowpeas (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). **Euphytica**, v.30, n.3, p.579-587, 1981.
- MAGRANE, M.; Uniprot Consortium. UniProt Knowledgebase: a hub of integrated protein data. **Database: the journal of biological databases and curation**, 2011.

- MAIA, J. M.; SILVA, S. L. F.; VOIGT, E. L.; MACÊDO, C. E. C.; PONTE, L. F. A.; SILVEIRA, J. A. G. Atividade de enzimas antioxidantes e inibição do crescimento radicular de feijão caupi sob diferentes níveis de salinidade. **Acta Botanica Brasilica**, v.26, n.2, p.342-349, 2012.
- MAJUMDER, A. L.; BISWAS, B. B. **Biology of Inositols and Phosphoinositides: Subcellular Biochemistry 2th edition**. Springer, 2006. 340p.
- MALI, V. R.; THOTTAPPILLY, G. Virus diseases of cowpea in the tropics. **Tropical Plant Pathology**, v.3, p.361–403, 1986.
- MALONE, G.; ZIMMER, P. D.; MENEGHELLO, G. E.; BINNECK, E.; PESKE, S. T. PROSPECÇÃO DE GENES EM BIBLIOTECAS DE cDNA. **Revista Brasileira Agrociência**, v.12, n.1, p.7–13, 2006.
- MARCHLER-BAUER, A.; LU, S.; ANDERSON, J. B.; CHITSAZ, F.; DERBYSHIRE, M. K.; DEWEESE-SCOTT, C.; FONG, J. H.; GEER, L. Y.; GEER, R. C.; GONZALES, N. R.; GWADZ, M.; HURWITZ, D. I.; JACKSON, J. D.; KE, Z.; LANCZYCKI, C. ; LU, F.; MARCHLER, G. H.; MULLOKANDROY, M.; OMELCHENKO, M. V.; ROBERTSON, C. L.; SONG, J. S.; THANKI, N.; YAMASHITA, R. A.; ZHANG, D.; ZHANG, N.; ZHENG, C.; BRYANT, S. H. CDD: a Conserved Domain Database for the functional annotation of proteins. **Nucleic acids research**, 2011.
- MARCONI, T. G.; COSTA, E. A.; MIRANDA, H. R.; MANCINI, M. C.; CARDOSO-SILVA, C. B.; OLIVEIRA, K. M.; PINTO, L. R.; MOLLINARI, M.; GARCIA, A. A.; SOUZA, A. P. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane. **BMC Research Notes**, v.4, n.1, p.264, 2011.
- MATSUMURA H.; YOSHIDA, K.; LUO, S.; KRUGER, D. H.; KAHL, G.; SCHROTH, G. P.; TERAUCHI, R. **High-Throughput SuperSAGE**. In: Park D. (eds) PCR Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), v.687, p.135-146, 2011.
- MATSUMURA, H.; URASAKI, N.; YOSHIDA, K.; KRUGER, D. H.; KAHL, G.; TERAUCHI, R. **SuperSAGE: Powerful Serial Analysis of Gene Expression**. Methods In Molecular Biology, v.883, p.1-17, 2012b.
- MATSUMURA, H.; REICH, S.; ITO, A.; SAITOH, H.; KAMOUN, S.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRUGER, D. H.; TERAUCHI, R. Gene expression. analysis of plant host-pathogen interactions by SuperSAGE. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.100, n.26, p.15718–15723, 2003.
- MATSUMURA H.; ITO, A.; SAITOH, H.; WINTER, P.; KAHL, G.; REUTER, M.; KRÜGER, D. H.; TERAUCHI, R. SuperSAGE. **Cellular Microbiology**, v.7, n.1, p.11–18, 2005.

- MATSUMURA H.; KRÜGER, D. H.; KAHL, G.; TERAUCHI, R. SuperSAGE: A modern platform for genome-wide quantitative transcript profiling. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v.9, n.5, p.368–374, 2008.
- MATSUMURA, H.; YOSHIDA, K.; LUO, S.; KIMURA, E.; FUJIBE, T.; ALBERTYN, Z.; BARRERO, R. A.; KRÜGER, D. H.; KAHL, G.; SCHROTH, G. P.; TERAUCHI, R. High-throughput SuperSAGE for digital gene expression analysis of multiple samples using next generation sequencing. **PLoS One**, 2010.
- MATSUMURA, H.; MOLINA, C.; KRÜGE, D.H.; TERAUCHI, R.; KAHL, G. DeepSuperSAGE: High-Throughput Transcriptome Sequencing with Now- and Next-Generation Sequencing Technologies. In: HARBERS, M.; KAHL, G. (eds) **Tag-Based Next Generation Sequencing**. Wiley, 2012a. p.1-21.
- MENANCIOHAUTEA, D.; FATOKUN, C. A.; KUMAR, L.; DANESH, D.; YOUNG, N. D. Comparative Genome Analysis of Mungbean (*Vigna-Radiata* L-Wilczek) and Cowpea (*V- Unguiculata* L Walpers) Using Rflp Mapping Data. **Theoretical and Applied Genetics**, v.86, n.7, p.797–810, 1993.
- MEYERS, B. C.; GALBRAITH, D. W.; NELSON, T.; AGRAWAL, V. Methods for transcriptional profiling in plants. Be Fruitful and Replicate. **Plant Physiology**, v.135, n.2, p.637–652, 2004.
- MICHAL, G.; SCHOMBUG, D. **Biochemical Pathways**. Jhon Wiley Sons Inc., Hoboken: New Jersey, 2012.
- MOHAMED, H. I.; GOMAA, E. Z. Effect of plant growth promoting *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas fluorescens* on growth and pigment composition of radish plants (*Raphanus sativus*) under NaCl stress. **Photosynthetica**, v.50, n.2, p.263-272, 2012.
- MOLINA, C.; ROTTER, B.; HORRES, R.; UDUPA, S. M.; BESSER, B.; BELLARMINO, L.; BAUM, M.; MATSUMURA, H.; TERAUCHI, R.; KAHL, G.; WINTER, P. SuperSAGE: the drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. **BMC Genomics**, v.9, p.553, 2008.
- MOLINA, C.; ZAMAN-ALLAH, M.; KHAN, F.; FATNASSI, N.; HORRES, R.; ROTTER, B.; STEINHAUER, D.; AMENC, L.; DREVON, J. J.; WINTER, P.; KAHL, G. The salt-responsive transcriptome of chickpea roots and nodules via deepSuperSAGE. **BMC Plant Biology**, v.11, 2011.
- MONTI, M. Gene expression profiling: methods and protocols. **European Journal Of Histochemistry**, v.56, n.3, p.12-133, 2012.
- MORIN, R.; BAINBRIDGE, M.; FEJES, A.; HIRST, M.; KRZYWINSKI, M.; PUGH, T.; MCDONALD, H.; VARHOL, R.; JONES, S.; MARRA, M. Profiling the HeLa S3

transcriptome using randomly primed cDNA and massively parallel short-read sequencing. **Biotechniques**, v.45, p.81-94, 2008.

MUDGE, J.; CANNON, S. B.; KALO, P.; OLDROYD, G. E.; ROE, B. A.; TOWN, C. D.; YOUNG, N. D. Highly syntenic regions in the genomes of soybean, *Medicago truncatula*, and *Arabidopsis thaliana*. **BMC Plant Biology**, v.5, 2005.

MUNNIK, T.; VERMEER, J. E. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. **Plant, Cell and Environment**, v.33, n.4, p.655-669, 2010.

MUÑOZ-AMATRIÁIN, M.; MIREBRAHIM, H.; XU, P.; WANAMAKER, S. I.; LUO, M.; ALHAKAMI, H.; ALPERT, M.; ATOKPLE, I.; BATIENO, B. J.; BOUKAR, O.; BOZDAG, S.; CISSE, N.; DRABO, I.; EHLERS, J. D.; FARMER, A.; FATOKUN, C.; GU, Y. Q.; GUO, Y. N.; HUYNH, B. L.; JACKSON, S. A.; KUSI, F.; LAWLEY, C. T.; LUCAS, M. R.; MA, Y.; TIMKO, M. P.; WU, J.; YOU, F.; BARKLEY, N. A.; ROBERTS, P. A.; LONARDI, S.; CLOSE, T. J. Genome resources for climate-resilient cowpea, an essential crop for food security. **Plant Journal**, v.89, n.5, p.1042–1054, 2017.

NAGARAJ, S. H.; GASSER, R. B.; RANGANATHAN, S. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. **Briefings in Bioinformatics**, v.8, n.1, p.6–21, 2007.

NASCIMENTO, J. T.; PEDROSA, M. B.; SOBRINHO, J. T. Efeito da variação de níveis de água disponível no solo sobre o crescimento e produção de feijão caupi, vagens e grãos verdes. **Horticultura brasileira**, v.22, n.2, 2004.

NATIVIDADE TARGON, M. L. P.; TAKITA, M. A.; DO AMARAL, A. M.; et al. CitEST libraries. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.3, p.1019–1023, 2007.

NAYLOR, R. L.; FALCON, W. P.; GOODMAN, R. M.; et al. Biotechnology in the developing world: A case for increased investments in orphan crops. **Food Policy**, v.29, n.1, p.15–44, 2004.

NELSON, R. J.; NAYLOR, R. L.; JAHN, M. M. The role of genomics in improvement of “orphan” crops. **Crop Science**, v.44, n.6, p.1901-1904, 2004.

NEVES, A. L. R.; LACERDA, C. F.; GUIMARÃES, F. V. A.; HERNANDEZ, F. F. F.; SILVA, F. B.; PRISCO, J. T.; GHEJI, H. R. Acumulação de biomassa e extração de nutrientes por plantas de feijão-de-corda irrigadas com água salina em diferentes estágios de desenvolvimentos. **Ciência Rural**, v.39, n.3, 2009.

NEVES, A. C.; CAMARA, J. A.; CARDOSO, M. J.; SILVA, P. H. S.; ATHAYDE, C. **Cultivo do Feijão-caupi em Sistema Agrícola Familiar (2011)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/meio-norte/busca-de-publicacoes/-/publicacao/905184/cultivo-do-feijao-caupi-em-sistema-agricola-familiar>>. Acesso em: 11 Jul 2019.

- NG, N. Q.; MARÉCHAL, R. **Cowpea taxonomy, origin germ plasm**. In: Singh, S. R.; Rachie, K. O. Cowpea research, production and utilization. Chichester: John Wiley, p.11-21, 1985.
- NIELSEN, S. S.; BRANDT, W. E.; SINGH, B. B. Genetic variability for nutritional composition and cooking time of improved cowpea lines. **Crop Science**, v.33, n.3, p.469-472, 1993.
- NILSEN, E. T.; ORCUTT, D. M. **The Physiology of Plants under Stress – Abiotic factors**. John Wiley and Sons, Inc: New York, 1996.
- NOGUEIRA, A. C. W. **Caracterização Bioinformática de Genes Relacionados à Interação Patógeno-hospedeiro em Angiospermas**. 2012. 217p. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- OKON, J. E. Effect of Water stress on some growth aspects of two cultivars of cowpea, *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Fabaceae. **Bulletin of Environment, Pharmacology and Life Sciences**, v.2, n.5, p.69-74, 2013.
- ONOFRE, A. V. C. **Desenvolvimento de marcadores de DNA para mapeamento genético e caracterização da diversidade em feijão-caupi**. 2012. 142p. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.
- PARIDA, A., RAINA, S.; NARAYAN, R. Quantitative DNA variation between and within chromosome complements of *Vigna* species (Fabaceae). **Genetica**, v.82, p.125–133, 1990.
- PAUL, S.; KUNDU, A.; PAL, A. Identification and validation of conserved microRNAs along with their differential expression in roots of *Vigna unguiculata* grown under salt stress. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.105, n.2, p.233–242, 2011.
- PERERA, I.Y.; HUNG, C. Y.; MOORE, C. D.; STEVENSON-PAULIK, J.; BOSS, W. F. Transgenic Arabidopsis Plants Expressing the Type 1 Inositol 5-Phosphatase Exhibit Increased Drought Tolerance and Altered Abscissic Acid Signaling. **Plant Cell**, v.20, n.10, p.2876–2893, 2008.
- PHILLIPS, R. D.; MCWATTERS, K. H.; CHINNAN, M. S.; HUNG, Y.; BEUCHAT, L. R.; SEFADEDEH, S.; SAKYI-DAWSON, E.; NGODDY, P.; NNANYELUGO, D.; SAALIA, F. K. Utilization of cowpeas for human food. **Field Crops Research**, v.82, n.2, p.193–213, 2003.
- PIGNONE, D.; CIFARELLI, S.; PERRINO, P. Chromosome identification in *Vigna unguiculata* (L.) Walp. In: **Cowpea genetic resources**. NG, N. Q.; MONTI, K. M. (Ed.) IITA Ibadan: Nigéria, 1990. p.144-150.
- PINGOUD, A. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.685–707, 2005.

- PIO RIBEIRO, G.; BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C. **Doenças do caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.** In: Kimari, H., Amorim, L., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A.; Rezende, J. A. M. (Eds.) Manual de Fitopatologia, v. 2: Doenças das Plantas Cultivadas. Ed. Ceres Ltda.: São Paulo, 1997. p.233-244.
- PIO RIBEIRO, G.; PAPPU, S. S.; PAPPU, H. R.; ANDRADE, G. P.; REDDY, D. V. R. Occurrence of Cowpea aphid-borne mosaic virus in Peanut in Brazil. **Plant Disease**, v.84, p.760-766, 2000.
- PORCEL, R.; AROCA, R.; RUIZ-LOZANO, J. M. Salinity stress alleviation using arbuscular mycorrhizal fungi. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v.32, n.1, p.181-200, 2012.
- RAHMAN, A. H. M.; PARVIN, M. I. A. Taxonomic Studies on the family Fabaceae (Weeds) at Rajshahi University Campus. **Plant**, v.3, n.3, p.20-25, 2015.
- RAWAL, K. M. Natural hybridization among wild, weedy and cultivated *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Euphytica**, v.24, n.3, p.699-707, 1975.
- RENCH FILHO, E. L. **A Agropecuária Molecular**. In: Mir L (Org.). Genômica. 1 edição Editora Atheneu: São Paulo, 2004. p.705-720.
- RIBEIRO, V. Q. **Cultivo do feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp)**. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2002. 108p.
- RIBEIRO, G. S.; FERREIRA, A. F.; LYRA NEVES, C. M.; MERCÊS SOUSA, F. S.; OLIVEIRA, C.; ALVES, E. M.; SILVA SODRÉ, G.; CARVALHO, C. A. L. Aspects of the floral biology and pollen properties of *Vigna unguiculata* L. Walp (Fabaceae). **African Journal of Plant Science**, v.7, n.5, p.149-154, 2013.
- ROCHA, M. M.; FREIRE FILHO, F. R.; SILVA, K. J. D.; RIBEIRO, V. Q. **Feijão-caupi: Biologia floral**. Embrapa Meio-norte: Teresina, 2007.
- ROSSEL, H.W.; THOTTAPPILLY, G. Control of virus diseases in Africa's major food crops through breeding for resistance. In: Williams A. O.; Mbiele A. L.; Nkouka N. **Virus Diseases of Plants in Africa**. Organization of African Unity/Scientific, Technical and Research Commission: Lagos, p.169-187, 1988.
- SAHA, S.; SPARKS, A. B.; RAGO, C.; AKMAEV, V.; WANG, C. J.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W.; VELCULESCU, V. E. Using the transcriptome to annotate the genome. **Nature Biotechnology**, v.20, n.5, p.58–512, 2002.
- SATO, S.; HIRAKAWA, H.; ISOBE, S.; FUKAI, E.; WATANABE, A.; KATO, M.; KAWASHIMA, K.; MINAMI, C.; MURAKI, A.; NAKAZAKI, N.; TAKAHASHI, C.; NAKAYAMA, S.; KISHIDA, Y.; KOHARA, M.; YAMADA, M.; TSURUOKA, H.;

- SASAMOTO, S.; TABATA, S.; AIZU, T.; TOYODA, A.; SHIN-I, T.; MINAKUSHI, Y.; KOHARA, Y.; FUJIYAMA, A.; TSUCHIMOTO, S.; KAJIYAMA, S.; MAKIGANO, E.; OHMIDO, N.; SHIBAGAKI, N.; CARTAGENA, J. A.; WADA, N.; KOHINATA, T.; ATEFEH, A.; YUASA, S.; MATSUNAGA, S.; FUKUI, K. Sequence analysis of the genome of an oil-bearing tree, *Jatropha curcas* L. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v.18, n.1, p.65–76, 2011.
- SATO, S.; NAKAMURA, Y.; KANEKO, T.; ASAMIZU, E.; KATO, T.; NAKAO, M.; SASAMOTO, S.; WATANABE, A.; ONO, A.; KAWASHIMA, K.; FUJISHIRO, T.; KATOH, M.; KOHARA, M.; KISHIDA, Y.; MINAMI, C.; NAKAYAMA, S.; NAKASAKI, N.; SHIMIZU, Y.; SHINPO, S.; TAKAHASHI, C.; WADA, T.; YAMADA, M.; OHMIDO, N.; HAYASHI, M.; FUKUI, K.; BABA, T.; NAKAMICHI, T.; MORI, H.; TABATA, S. Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. **DNA Research**, v.15, n.4, p.227–239, 2008.
- SCHEER, M.; GROTE, A.; CHANG, A.; SCHOMBURG, I.; MUNARETTO, C.; ROTHER, M.; SOHNGEN, C.; STELZER, M.; THIELE, J.; SCHOMBURG, D. BRENDA, the enzyme information system in 2011. **Nucleic acids research**, v.39, p.D670–676, 2011.
- SANTOS, F. M. L.; LIMA, J. A. A.; BARRETO, P. D. Infecções simples e múltiplas de vírus em caupi no Ceará. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.24, n.4, p.518-522, 1999.
- SANTOS, J. A. S.; TEODORO, P. E.; CORREA, A. M.; SOARES, C. M. G.; RIBEIRO, L. P.; ABREU, H. K. A. Desempenho agrônômico e divergência genética entre genótipos de feijão-caupi cultivados no ecótono Cerrado/Pantanal. **Bragantia**, v.73, p.377-382, 2014.
- SCHENA, M.; SHALOM, D.; DAVIS, R. W.; BROWN, P. O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. **Science**, v.270, p.467-70, 1995.
- SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; SCHMUTZ, J.; CANNON, S. B.; SCHLUETER, J.; MA, J.; MITROS, T.; NELSON, W.; HYTEN, D. L.; SONG, Q.; THELEN, J. J.; CHENG, J.; XU, D.; HELLSTEN, U.; MAY, G. D.; YU, Y.; SAKURAI, T.; UMEZAWA, T.; BHATTACHARYA, M. K.; SANDHU, D.; VALLIYODAN, B.; LINDQUIST, E.; PETO, M.; GRANT, D.; SHU, S.; GOODSTEIN, D.; BARRY, K.; FUTRELL-GRIGGS, M.; ABERNATHY, B.; DU, J.; TIAN, Z.; ZHU, L.; GILL, N.; JOSHI, T.; LIBAULT, M.; SETHURAMAN, A.; ZHANG, X. C.; SHINOZAKI, K.; NGUYEN, H. T.; WING, R. A.; CREGAN, P.; SPECHT, J.; GRIMWOOD, J.; ROKHSAR, D.; STACEY, G.; SHOEMAKER, R. C.; JACKSON, S. A. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. **Nature**, v.463, n.7278, p.178–183, 2010.

- SENGUPTA, S.; PATRA, B.; RAY, S.; MAJUMDER, A. L. Inositol methyl transferase from a halophytic wild rice, *Porteresia coarctata* Roxb. (Tateoka): regulation of pinitol synthesis under abiotic stress. **Plant, Cell & Environment**, v.31, n.10, p.1442–1459, 2008.
- SHARBEL, T. F.; VOIGT, M. L.; CORRAL, J. M.; GALLA, G.; KUMLEHN, J.; KLUKAS, C.; SCHREIBER, F.; VOGEL, H.; ROTTER, B. Apomictic and Sexual Ovules of *Boechera* Display Heterochronic Global Gene Expression Patterns. **The Plant Cell**, v.22, n.3, p.655–671, 2010.
- SHARBEL, T. F.; VOIGT, M. L.; CORRAL, J. M.; THIEL, T.; VARSHNEY, A.; KUMLEHN, J. VOGEL, H.; ROTTER, B. Molecular signatures of apomictic and sexual ovules in the *Boechera holboellii* complex. **Plant Journal**, v.58, n.5, p.870–882, 2009.
- SHEVELEVA, E.; CHMARA, W.; BOHNERT, H. J.; JENSEN, R. C. Increased Salt and Drought Tolerance by D-Ononitol Production in Transgenic *Nicotiana Tabacum* L. **Plant Physiology**, v.115, p.1211–1219, 1997.
- SHERLOCK, G.; HERNANDEZ-BOUSSARD, T.; KASARSKIS, A.; BLINKLEY, G.; MATESE, J. C. et al. The Stanford Microarray Database. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.29, p.152-155, 2001.
- SHOYINKA, A. S.; THOTTAPPILLY, G.; ADEBAYO, G. G.; ANNO-NYAKO, F. O. Survey on cowpea virus incidence and distribution in Nigeria. **International Journal of Pest Management**, v.43, p.127–132, 1997.
- SILVA, K. J. D.; ROCHA, M. M.; MENEZES JUNIOR, J. A. **Socioeconomia**. In: BASTOS, E. A. A cultura do feijão-caupi no Brasil. Teresina: Embrapa Meio-norte, 2016. p. 6-12.
- SIMON, M. V.; BENKO-ISEPPON, A. M.; RESENDE, L. V.; WINTER, P.; KAHL, G. Genetic diversity and phylogenetic relationships in *Vigna savi* germplasm revealed by DNA amplification fingerprinting (DAF). **Genome**, v.50, n.6, p.538-547, 2007.
- SINGH, B.B.; EHLERS, J.D.; SHARMA, B.; FREIRE FILHO, F.R.; Recent progress in cowpea breeding. In: FATOCUN, C.A.; TARAWALI, S.A.; SINGH, B.B.; KORMAWA, P.M.; TAMÓ, M.(ed.). **Challenges and opportunities for enhancing sustainable cowpea production**. Ibadan: IITA, 2002. p.22-40.
- SINGH B. B.; AJEIGBE, H. A.; TARAWALI, S. A.; FERNANDEZ-RIVERA, S.; ABUBAKAR, M. Improving the production and utilization of cowpea as food and fodder. **Field Crops Research**, v.84, p.169–177, 2003.
- SINGH, B. B. *Vigna unguiculata* L. Walp. In: Singh, R. J. e Jahuar P. P. **Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement 1th edition**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 116-151.

- SINGH, R. J.; CHUNG, G. H.; NELSON, R. L. Landmark research in legumes. **Genome**, v.50, n.6, p.525-537, 2007.
- SOUSA, M.; SILVA, P. R. R.; FRANÇA, S. M.; SILVA, J. D. C.; SOUSA, F. M. Seleção de genótipos de feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) para resistência a *Callosobruchus maculatus*. **Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences**, v.59, n.2, p.190-195, 2016.
- SOUZA, V. A. B.; SANTOS, C. A. F. **Biotecnologia**. In: FREIRE FILHO, F. R.; LIMA, J. A. A.; RIBEIRO, V. Q. (Eds.) Feijão-caupi: Avanços Tecnológicos. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológicas, cap. 2, 2005. p. 95-156.
- SPRENGER, N.; KELLER, F. Allocation of raffinose family oligosaccharides to transport and storage pools in *Ajuga reptans*: The roles of two distinct galactinol synthases. **Plant Journal**, v.21, n.3, p.249–258, 2000.
- STEELE, W. M.; MEHRA, K. L. **Structure, evolution and adaptation to farming systems and environment in *Vigna***. In: SUMMERFIELD, R. J.; BUNTING, A. H., eds. *Advances in Legume Science*. England: Royal Botanic Gardens, 1980. p.459-68.
- STEIN, N.; PRASAD, M.; SCHOLZ, U.; THIEL, T.; ZHANG, H.; WOLF, M.; KOTA, R.; VARSHNEY, R. K.; PEROVIC, D.; GROSSE, I.; GRANER, A. A 1,000-loci transcript map of the barley genome: New anchoring points for integrative grass genomics. **Theoretical and Applied Genetics**, v.114, n.5, p.823–839, 2007.
- SUAREZ, F. L.; SPRINGFIELD, J.; FURNE, J. K.; LOHRMANN, T. T.; KERR, P. S.; LEVITT, M. D. Gas production in humans ingesting a soybean flour derived from beans naturally low in oligosaccharides. **American Journal Clinical Nutrition**, v.69, n.1, p.135-139, 1999.
- SUMMERFIELD, R. J.; SINGH, S. R.; RACHIE, K. O. **The physiology of cowpeas**. In: SINGH S. K.; RACHIE K. O. *Cowpea: Research, Production and Utilization*. London: John Wiley and Sons, 1985. p.65–101.
- TANG, H.; BOWERS, J. E.; WANG, X.; MING, R.; ALAM, M.; PATERSON, A. H. Synteny and collinearity in plant genomes. **Science**, v.320, n.5875, p.486–488, 2008.
- TANGPHATSORNRUANG, S.; SOMTA, P.; UTHAIPAISANWONG, P.; CHANPRASERT, J.; SANGSRAKRU, D.; SEEHALAK, W.; SOMMANAS, W.; TRAGOONRUNG, S.; SRINIVES, P. Characterization of microsatellites and gene contents from genome shotgun sequences of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **BMC Plant Biology**, v.9, n.1, p.137–149, 2009.

- TERAUCHI, R.; MATSUMARA, H.; KRÜGER, D. H.; KAHL, G. **SuperSAGE: The most advanced transcriptoma technology for functional genomics**. In: KAHL, G.; MEKSEM, K. The handbook of plant functional genomics 1th edition, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, cap. 3, 2008. p.37-54.
- THOTTAPPILLY, G.; ROSSEL, H. W. **World-wide occurrence and distribution of virus diseases**. In: SINGH S. R.; RACHIE R. O. Cowpea Research, Production and Utilization. Chichester: Wiley, 1985. p.155-171.
- TIMKO, M. P.; EHLERS, J. D.; ROBERTS, P. A. Cowpea: pulses, sugar and tuber crops. **Genome Mapping and Molecular Breeding in Plants**, v.3, p.49-67, 2007.
- TIMKO, M. P.; RUSHTON, P. J.; LAUDEMAN, T. W.; BOKOWIEC, M. T.; CHIPUMURO, E.; CHEUNG, F.; TOWN, C. D.; CHEN, X. Sequencing and analysis of the gene-rich space of cowpea. **BMC Genomics**, v.9, n.62, p.1–20, 2008.
- TOMOOKA, N.; LAIRUNGREANG, C.; NAKEERAKS, P.; EGAWA, Y.; THAVARASOOK, C. Center of genetic diversity and dissemination pathways in mung bean deduced from seed protein electrophoresis. **Theoretical and Applied Genetics**, v.83, n.3, p.289-293, 1992.
- UDVARDI, M. K.; CZECHOWSKI, T.; SCHEIBLE, W. R. Eleven Golden Rules of Quantitative RT-PCR. **the Plant Cell Online**, v.20, n.7, p.1736–1737, 2008.
- VALVERDE, S.; FRIAS, J.; DOBLADO, R.; JIMENO, M. L.; VIDA-VALVERDE, C. Inositol Phosphate Profiling of Fermented Cowpeas by 1H NMR Spectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n.12, p.4714–4721, 2005.
- VAN AELST, K.; TÓTH, J.; RAMANATHAN, S. P.; SCHWARZ, F. W.; SEIDEL, R.; SZCZELKUN, M. D. Type III restriction enzymes cleave DNA by long-range interaction between sites in both head-to-head and tail-to-tail inverted repeat. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.107, n.20, p.9123–8, 2010.
- VARSHNEY, R. K.; HIREMATH, P. J.; LEKHA, P.; KASHIWAGI, J.; BALAI, J.; DEOKAR, A. A.; VADEZ, V.; XIAO, Y.; SRIVIVASAN, R.; GAUR, P. M.; SIDDIQUE, K. H.; TOWN, C. D.; HOISINGTON, D. A. A comprehensive resource of drought- and salinity-responsive ESTs for gene discovery and marker development in chickpea (*Cicer arietinum* L.). **BMC Genomics**, v.10, 2009b.
- VELCULESCU, V. E.; ZHANG, L.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. Serial analysis of gene expression. **Science**, v.270, p.484-487, 1995.
- VIEIRA, L. G. E; ANDRADE, A. C.; COLOMBO, C. A.; MORAES, A. H. A.; METHA, A.; OLIVEIRA, A. C.; LABATE, C. A.; MARINO, C. L.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.;

MONTE, D. C.; GIGLIOTI, E.; KIMURA, E. T.; ROMANO, E.; KURAMAE, E. E.; LEMOS, E. G. M.; ALMEIDA, E. R. P.; JORGE, E. C.; ALBUQUERQUE, E. V. S.; SILVA, F. R.; VINECKY, F.; SAWAZAKI, H. E.; DORRY, H. F. A.; CARRER, H.; ABREU, I. N.; BATISTA, J. A. N.; TEIXEIRA, J. B.; KITAJIMA, J. P.; XAVIER, K. G.; LIMA, L. M.; CAMARGO, L. E. A.; PEREIRA, L. F. P.; COUTINHO, L. L.; LEMOS, M. V. F.; ROMANDO, M. R.; MACHADO, M. A.; COSTA, M. M. C.; SÁ, M. F. G.; GOLDMAN, M. H. S.; FERRO, M. I. T.; TINOCO, M. L. P.; OLIVEIRA, M. C.; SLUYS, M-A. V.; SHIMIZU, M. M.; MALUF, M. P.; EIRA, M. T. S.; GUERREIRO FILHO, O; ARRUDA, P.; MAZZAFERA, P.; MARIANI, P. D. S. C.; OLIVEIRA, R. L. B. C.; HARAKAVA, R.; BALBAO, S. F.; TSAI, S. M.; MAURO, S. .M. Z.; SANTOS, S. N.; SIQUEIRA, W. J.; COSTA, G. G. L.; FORMIGHIERI, E. F.; CARAZZOLLE, M. F.; PEREIRA, G. A. G. Brazilian coffee genome project: An EST-based genomic resource. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, n.1, p.95–108, 2006.

VIEIRA, C. L.; FREITAS, A. D.; SILVA, A. F.; SAMPAIO, E. V.; ARAÚJO, M. S. Inoculação de variedades locais de feijão macassar com estirpes selecionadas de rizóbio. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.11, p.1170-1175, 2010.

VIJAYKUMAR, A.; SAINI, A.; JAWALI, N. Phylogenetic analysis of subgenus *Vigna* species using nuclear ribosomal RNA ITS: evidence of hybridization among *Vigna unguiculata* subspecies. **Journal Heredity**, v.101, n 2, p.177–188, 2010.

VILARINHO, A. A. **BRS Novaera – nova cultivar de feijão-caupi para a Região Norte do Brasil** (2007). Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2007_4/NovaEra/index.htm>. Acesso em: 16 Fev 2017.

VUCENIK I.; SHAMSUDDIN A. M. Cancer inhibition by inositol hexaphosphate (IP6) and inositol: from laboratory to clinic. **The Journal of Nutrition**, v.133, p.3778S-3784S, 2003.

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

WILK, R.; BARBOSA, L. **Rice and beans: a unique dish in a hundred places**. London: Berg, 2012. 282p.

WILLADINO, L.; CAMARA, T. R. Tolerância das plantas à salinidade: aspectos fisiológicos e bioquímicos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.6, n.11, p. 1-23, 2010.

WOLF, J. B. W. Principles of transcriptome analysis and gene expression. quantification: an RNA-seq tutorial. **Molecular Ecology Resources**, v.13, n.4, p.559–572, 2013.

WU, J.; MAEHARA, T.; SHIMOKAWA, T.; YAMAMOTO, S.; HARADA, C.; TAKAZAKI, Y.; ONO, N.; MUJAI, Y.; KOIKE, K.; YAZAKI, J.; FUJII, F.; SHOMURA, A.; ANDO, T.;

- KONO, I.; WAKI, K.; YAMAMOTO, K.; YANO, M.; MATSUMOTO, T.; SASAKI, T. A comprehensive rice transcript map containing 6591 expressed sequence tag sites. **The Plant cell**, v.14, n.3, p.525–535, 2002.
- WU, Q. S.; ZOU, Y. N.; ABD_ALLAH, E. F. **Mycorrhizal Association and ROS in Plants**. In: AHMAD, P. Oxidative Damage to Plants. China: Yangtze University, 2014. p. 453- 475.
- YAMAGUCHI, H.; FUKUOKA, H.; ARAO, T.; OHYAMA, A.; NUNOME, T.; MIYATAKE, K.; NEGORO, S. Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of a low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. **Journal of Experimental Botany**, v.61, n.2, p.423–437, 2010.
- YANG, K.; TIAN, Z.; CHEN, C.; LUO, L.; ZHAO, B.; WANG, Z.; YU, L.; LI, Y.; SUN, Y.; LI, W.; CHEN, Y.; LI, Y.; ZHANG, Y.; AI, D.; ZHAO, J.; SHANG, C.; MA, Y.; WU, B.; WANG, M.; GAO, L.; SUN, D.; ZHANG, P.; GUO, F.; WANG, W.; LI, Y.; WANG, J.; VARSHNEY, R. K.; WANG, J.; LING, H. Q.; WAN, P. Genome sequencing of adzuki bean (*Vigna angularis*) provides insight into high starch and low fat accumulation and domestication. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.43, p.13213–13218, 2015.
- YANG, Z. B.; ETICHA, D.; ROTTER, B.; RAO, I. M.; HORST, W. J. Physiological and molecular analysis of polyethylene glycol-induced reduction of aluminium accumulation in the root tips of common bean (*Phaseolus vulgaris*). **New Phytologist**, v.192, n.1, p.99–113, 2011.
- YIN, F.; PAJAK, A.; CHAPMAN, R.; SHARPE, A.; HUANG, S.; MARSOLAIS, F. Analysis of common bean expressed sequence tags identifies sulfur metabolic pathways active in seed and sulfur-rich proteins highly expressed in the absence of phaseolin and major lectins. **BMC Genomics**, v.12, 2011.
- YU, J.; HU, S.; WANG, J.; WONG, G. K.; LI, S.; LIU, B.; DENG, Y.; DAI, L.; ZHOU, Y.; ZHANG, X.; CAO, M.; LIU, J.; SUN, J.; TANG, J.; CHEN, Y.; HUANG, X.; LI, W.; LI, J.; LIU, Z.; LI, L.; LIU, J.; QI, Q.; LIU, J.; LI, L.; LI, T.; WANG, X.; LU, H.; WU, T.; ZHU, M.; NI, P.; HAN, H.; DONG, W.; REN, X.; FENG, X.; CUI, P.; LI, X.; WANG, H.; XU, X.; ZHAI, W.; XU, Z.; ZHANG, J.; HE, S.; ZHANG, J.; XU, J.; ZHANG, K.; ZHENG, X.; DONG, J.; ZENG, W.; TAO, L.; YE, J.; TAN, J.; REN, X.; CHEN, X.; HE, J.; LIU, D.; TIAN, W.; TIAN, C.; XIA, H.; BAO, Q.; LI, G.; GAO, H.; CAO, T.; WANG, J.; ZHAO, W.; LI, P.; CHEN, W.; WANG, X.; ZHANG, Y.; HU, J.; WANG, J.; LIU, S.; YANG, J.; ZHANG, G.; XIONG, Y.; LI, Z.; MAO, L.; ZHOU, C.; ZHU, Z.; CHEN, R.; HAO, B.; ZHENG, W.; CHEN, S.; GUO, W.; LI, G.; LIU, S.; TAO, M.; WANG, J.; ZHU, L.; YUAN, L.; YANG, H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. indica). **Science**, v.296, n.5565, p.79–92, 2002.

ZERBINI, F. M.; MACIEL-ZAMBOLIM, E. A família *Potyviridae* Parte I. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.7, p.1-66, 1999.

ZHOU, M.; ZHANG, Q.; ZHOU, M.; SUN, Z. M.; ZHU, X. M.; SHAO, J. R.; TANG, Y. X.; WU, Y. M. Genome-wide identification of genes involved in raffinose metabolism in maize. **Glycobiology**, v.22, p.1775–1785, 2012.

ZHU, B.; PENG, A.; XIONG, J.; XU, X.; FU, W.; ZHAO, X.; JIN, X.; MENG, J.; YAO, Q. Transformation with a Gene for Myo-Inositol O-Methyltransferase Enhances the Cold Tolerance of *Arabidopsis thaliana*. **Biology Plant**, v.56, n.1, p.135–139, 2012.

ANEXO A – Instruções Genetics and Molecular Biology - ISSN 1678-4685

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Scope and policy *Genetics and Molecular Biology* (formerly named *Revista Brasileira de Genética/Brazilian Journal of Genetics* - ISSN 0100-8455) is published by the Sociedade Brasileira de Genética (Brazilian Society of Genetics).

The journal considers contributions that present the results of original research in genetics, molecular biology, evolution and related scientific disciplines. Manuscripts presenting methods and applications only, without an analysis of genetic data, will not be considered. It is a fundamental condition that submitted manuscripts have not been published or are not under consideration for publication elsewhere. With the acceptance of a manuscript for publication, the publishers acquire full and exclusive copyright for all languages and countries. Manuscripts considered in conformity with the scope of the journal, as evaluated by the Editor, are reviewed by an Associate Editors and two or more external reviewers. Acceptance by the Editor is based on the quality of the work as substantial contribution to the field and on the overall presentation of the manuscript. The official abbreviation for *Genetics and Molecular Biology* is **Genet. Mol. Biol.**

Open-Access policy *Genetics and Molecular Biology* articles are made available in full content at SciELO (Scientific Library Online) hosted at <http://www.scielo.br/gmb>. Back issues dating until 1998 are available through this site. GMB articles published since 2009 are also indexed at PubMed Central and available in full text version at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/journals/1440/>. Back issues of earlier titles (*Brazilian Journal of Genetics* and *Revista Brasileira de Genética*) are hosted at GMB's own site: <http://www.gmb.org.br>

Membership to the Brazilian Society of Genetics entitles subscription to *Genetics and Molecular Biology*. For nonmembers and institutions, the annual subscriptions rates (four issues/year) are informed at the journal's website <http://www.gmb.org.br>.

Submission of papers

1. Manuscripts have to be submitted through our online submission platform:

<https://mc04.manuscriptcentral.com/gmb-scielo>

A cover letter addressed to the Editor-in-Chief is required.

2. For submission the following instructions must be observed:

- a) The manuscript must be submitted by the Corresponding Author, identified as such in the title page of the manuscript. This is the person who will also check the page proofs, and arranges for any payment that may incur during the editorial process.
- b) Entering the following metadata is required: (i) the manuscript title, (ii) a short running title (max. 35 characters), (iii) the Abstract, and (iv) up to five keywords. All these items must be exactly the same as those figuring in the first two pages of the manuscript file.
- c) Statements are required informing that the data have not been published and are not under consideration elsewhere, and that all authors have approved the submission of the manuscript. Furthermore, possible conflicts of interest (e.g. due to funding, consultancies) must also be disclosed. For statements on ethical issues in research see below (3.1.m).
- d) The names of all co-authors, including institutional affiliations and e-mail addresses must be entered, as contact information for the Editorial Office.
- e) In the referee suggestions field, up to five reviewer names can be entered by the author(s); valid e-mail contact addresses for these are required, in case they are selected by the editor. These suggestions can be made separately as preferred and opposed reviewer(s).
- f) Files must be uploaded separately and identified according to file types, respecting the following sequence: main text document (title page as page 1), tables, figures and, if applicable, supplementary material. The main text file must include the title page, Abstract, References and, if applicable, figure legends, which must be typed on a separate page following the References and Internet Resources sections. Each table, figure and element containing supplementary material must be saved and uploaded in a separate file. Formats for text and tables are Word or RTF in Windows platform. Figures should be in TIFF or JPEG formats (see detailed instructions in 3.1.i).
- g) Manuscripts including photos or any other identifiable data of human subjects must be accompanied by a copy of the signed consent by the individual or his/her guardian.

Failure to adhere to these guidelines can delay the handling of your contribution and manuscripts may be returned before being reviewed. Special attention should be given to the structuring of the manuscript and correct language usage. These are important factors in the smooth running of the editorial and peer-review process, and can result in faster publication.

3. Categories of Contribution 3.1. Research Articles

Manuscripts must be written in English in double-spaced, 12-point type throughout; marked with consecutive line and page numbers, beginning with the title page.

The following elements must start on a new page and be ordered as they are listed below:

a) **The Title Page** must contain: a concise and informative title; the authors' names (first name at full length); the authors' institutional affiliation, including department, institution, city, state or province, and country; different affiliations must be indicated with superscript Arabic numbers; a short running title of up to 35 characters (including spaces); up to five key words; the corresponding author's name, full postal, and email address.

b) **The Abstract** must be a single paragraph that does not exceed 200 words and summarizes the main results and conclusions of the study. It should not contain references.

c) **The text** must be as succinct as possible. *Text citations*: articles should be referred to by authors' surnames and date of publication; citations with two authors must include both names separated by "and"; in citations with three or more authors, name the first author and use *et al.* List two or more references in the same citation in chronological order, separated by semi-colons. When two or more works in a citation were published in the same year, list them alphabetically by the first author surname. For two or more works by the same author(s) in a citation, list them chronologically, with the years separated by commas. (Example: Freire-Maia *et al.*, 1966a, 1966b, 2000). Only articles that are published or in press should be cited. In the case of personal communications or unpublished results, all contributors must be listed by initials and last name (*et al.* should not be used). *Numbers*: In the text, numbers nine or less must be written out except as part of a date, a fraction or decimal, a percentage, or a unit of measurement. Use Arabic numerals for numbers larger than nine. Do not start a sentence with an Arabic numeral. *Binomial Names*: Latin names of genera, species and infraspecific taxa must be printed in italics; we also recommend to present names of orders or families in the Title and/or when first mentioned in the text. URLs for programs, data or other sources should be listed in the Internet Resources Section, immediately following the References Section, not in the text. The text includes the following elements:

Introduction - Description of the background that led to the study.

Material (or Subjects) and Methods - Details relevant to the conduct of the study. Statistical methods should be explained at the end of this section.

Results - Undue repetition in text and tables should be avoided. Statistical analyses should be presented as complete as possible, i.e. not only *P*-values should be shown, but also all other test variables required for full appreciation of the results. Comments on relevance of results are appropriate but broader discussion should be part of the Discussion section.

Discussion - The findings of the study should be placed in context of relevant published data. Ideas presented in other publications should not be discussed solely to make an exhaustive presentation.

Some manuscripts may require different formats appropriate to their content.

- d) **The Acknowledgments** must be a single paragraph that immediately follows the discussion and includes references to grant support.
- e) **Conflict of Interest:** Any possible conflict of interest must be disclosed here. If there is none, please state: The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.
- f) **The References Section:** Only articles that are published or in press should be included in this section. Works submitted for publication but not yet accepted, personal communications and unpublished data must be cited within the text. “Personal communication” refers to information obtained from individuals other than the authors of the manuscript being submitted; “unpublished data” refers to data produced by at least one of the authors of the manuscript under consideration. Works of restricted circulation (e.g., theses not available in public databases, congress abstracts not published in regular journals or public databases) should not be listed in this section.

References must be ordered alphabetically by the first author surname; references with the same first author should be ordered as follows: first, as single author in chronological order; next, with only one more co-author in alphabetical order by the second author; and finally followed by references with more than two co-authors, in chronological order, independent of the second author surnames. In references with more than 10 authors only the first ten should be listed, followed by et al. Use standard abbreviations for journal titles as suggested by NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/journals/>) or Thomson Reuters Web of Science.

Sample journal article citation:

Breuer ME and Pavan C (1955) Behaviour of polytene chromosomes of *Rhynchosciara angelae* at different stages of larval development. *Chromosoma* 7:371-386.

Yonenaga-Yassuda Y, Rodrigues MT and Pellegrino KCM (2005) Chromosomal banding patterns in the eyelid-less microteiid lizard radiation: The X1X1X2X2:X1X2Y sex chromosome system in *Calyptommatus* and the karyotypes of *Psilophthalmus* and *Tretioscincus* (Squamata, Gymnophthalmidae). *Genet Mol Biol* 28:700-709.

Sample book citation:

Dobzhansky T (1951) *Genetics and Origin of Species*. 3rd edition. Columbia University Press, New York, 364 p.

Sample chapter-in-book citation:

Crawford DC and Howard-Peebles PN (2005) Fragile X: From cytogenetics to molecular genetics. In: Gersen SL and Keagle MB (eds) *The Principles of Clinical Cytogenetics*. 2nd edition. Humana Press, New Jersey, pp 495-513.

Sample electronic article citation:

Gotzek D, Ross KG (2009) Current status of a model System: The gene Gp-9 and its association with social organization in fire ants. *PLoS One* 4:e7713.

g) **Internet Resources Section:** this section should contain a list of URLs referring to data presented in the text, as well as software programs and other Internet resources used during data processing. Date of consultation must be stated.

Sample Internet resource citation:

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM> (September 4, 2009)

LEM Software, http://dir.niehs.nih.gov/dirbb/weinbergfiles/hybrid_design.htm (September 4, 2009)

h) **Tables: Formats for tables are Word or RTF in Windows platform. They** must be prepared with the table tool (do not use space bar or tabulator) and must be numbered consecutively in Arabic numerals). A concise title should be provided above the table. Each column should have a title in the box head. Footnotes typed directly below the table should be indicated in lowercase superscript letters. Tables that are to appear in the printed version must be saved in Word format and not as figures, so that they can later be fitted during typesetting. Each table must be saved and uploaded as a separate file.

i) **Figures: Formats for figures are TIFF or JPEG. They** must be numbered consecutively using Arabic numerals. Figures in Word, PowerPoint or Excel format cannot be published. Only sequence data can be presented in Word format. Journal quality reproduction will require resolution yielding 300 dpi for grayscale and color figures. These resolutions refer to the output size of the file, that being the size in which it will appear printed in the journal; if it is anticipated that images will be enlarged or reduced, the resolutions should be adjusted accordingly. Figures composed of several elements should be sent as a single panel, obeying the print size definitions of the journal (single or two columns width). Scanned figures should not be submitted. Color illustrations are accepted and will be reproduced free of charge in the electronic and printed versions. Figure legends must be included at the end of the main text file and should be typed on a new page. When uploading, identify each illustration by the first author name and the number of the respective figure. Each figure/panel must be saved and uploaded as a separate file.

j) **Nomenclature:** Taxonomic names should be in accordance with current international standards. For rules concerning gene names and gene symbols, please see separate Instruction form.

k) **Sequences** may appear in text or in figure. DNA, RNA and protein sequences equal to or greater than 50 units must be entered into public databases and accession numbers must be provided upon acceptance of the article. Failure to do so will inadvertently delay publication.

l) **Data access:** reference should be made to availability of detailed data and materials used for reported studies.

m) **Ethical issues:** Reports of experiments on live vertebrates must include a statement in the text that the institutional review board approved the work and the protocol number must be provided. For experiments involving human subjects, a statement must be provided that informed consent was obtained from all subjects. If photos or any other identifiable data are included, a copy of the signed consent must be uploaded during manuscript submission.

n) **Supplementary Material:** Data that the authors consider of importance for completeness of a study, but which are too extensive to be included in the print version, can be submitted as Supplementary Material. At publication, this material will be made available together with the electronic version. In case a manuscript contains such material, it should be appropriately identified within the text file. Supplementary material in tables should be identified as Table S1, Table S2, etc., in case of figures they should be named accordingly, Figure S1, Figure S2. In addition, a list of this material should be presented at the end of the manuscript text file, containing the following statement:

3.2 Short Communications

Short Communications present brief observations that do not warrant full-length articles. They should not be considered preliminary communications. They should be 15 or fewer typed pages in double spaced 12-point type, including literature cited, include an Abstract no longer than five percent of the paper's length, but no further subdivision, with introduction, material and methods, results and discussion in a single section and without headers. Up to four items (tables and/or figures) may be submitted. The title page and reference section format is that of a full-length Research Article. For Supplementary Material see instructions in item 3.1.n

3.3 Genome Insight

Genome Insight is for focused papers, usually of approximately 1500 words (up to four tables or figures), that publish new genome data as they become submitted to GenBank. This section is the premier forum to deliver that information directly to the genome community in a rapid and efficient publication of the genome. Data must be related to a complete (or nearly

complete) and fully annotated genome for prokaryote or viruses, but a draft may be accepted for an eukaryote genome. While the focus of Genome Insight is necessarily involved in novel sequences, the manuscript must contain specifically novel biological, evolutive, biotechnological and/or metabolic insights revealed by data. The work may provide comparative analyses of previously published genomes that contain a substantial and novel insight of broadest biological and genetic significance.

Submitted manuscript must contain an abstract, which should be a brief report on the organism as well as its relevance and the main insight revealed by the genome. The text (approximately 1500 words- excluding abstract, references and acknowledgements) should not contain subdivisions, but must contain the rationale for the selection of such organism as well as organism information (including taxonomy, natural habitat, phylogenetic position, eventual pathogenicity, symbiotic, biotechnological use, etc), methodology (genome sequencing and assembly; reference number at GenBank), genome relevance (which should indicate the main insights revealed by the data analysis and main conclusions. Acknowledgements and References (up to 20 references) headings should be included. Figure Legends should be provided at the end of the manuscript.

3.4 Letters to the Editor

Relate or respond to recent published items in the journal. Discussions of political, social and ethical issues of interest to geneticists are also welcome in this form.

3.5 Review Articles

Review Articles are welcome. The Editor must be contacted prior to submission. Please, provide an Abstract and a list of your recent publications in the area.

3.6 Book Reviews

Publishers are invited to submit books on Genetics, Evolution and related disciplines, for review in the journal. Aspiring reviewers may propose writing a review.

3.7 History, Story and Memories

These are accounts on historical aspects of Genetics relating to Brazil.

4. Articles accepted for publication

Once an article is accepted, the Editorial Office will send it to copy editor for language and technical corrections. If major corrections were proposed, the manuscript with the highlighted corrections will be returned to the corresponding author for approval. The final version approved by the authors must be free of any text/correction markings when returned to the Editorial Office.

After typesetting, page proofs will be sent to the corresponding author. Changes made to page proofs, apart from typesetting errors, will be charged to the authors. Notes added in proof require Editorial approval.

Together with the proofs, a form of consent to publish and transfer of copyright is sent to the corresponding author, who will have sign this form, also on behalf of any co-authors, and send it by e-mail to the Editorial Office.

5. Availability of articles and deposition in databases

Article copies are provided as PDF-files. Authors may deposit these in their personal or institutional homepage, as well as in public databases.

6. Publication charge

There is a publication charge for manuscripts once they are accepted. For price information, exemptions and waiver policies, please consult the journal homepage <http://www.gmb.org.br>.