

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

KATIANE FEDRIGO

**RESPOSTAS MOLECULARES DO FEIJÃO AO CRESTAMENTO
BACTERIANO COMUM**

TESE

**PATO BRANCO
2019**

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

KATIANE FEDRIGO

**RESPOSTAS MOLECULARES DO FEIJÃO AO CRESTAMENTO
BACTERIANO COMUM**

TESE

PATO BRANCO

2019

KATIANE FEDRIGO

**RESPOSTAS MOLECULARES DO FEIJÃO AO CRESTAMENTO
BACTERIANO COMUM**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia - Área de Concentração: Produção Vegetal.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Taciane Finatto

Coorientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rosângela Dallemole
Giaretta

PATO BRANCO

2019

F294r Fedrigo, Katiane.
Respostas moleculares do feijão ao cretamento bacteriano comum /
Katiane Fedrigo. -- 2019.
95 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Taciane Finatto
Coorientador: Prof. Dr. José Abramo Marchese
Coorientadora: Profa. Dra. Rosângela Dallemole Giaretta
Tese (Doutorado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa
de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco, PR, 2019.
Bibliografia: f. 79 - 95.

1. Feijão-comum. 2. Bactérias fitopatogênicas. 3. Expressão gênica. I. Finatto,
Taciane, orient. II. Marchese, José Abramo, coorient. III. Giaretta, Rosângela
Dallemole, coorient. IV. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa
de Pós-Graduação em Agronomia. V. Título.

CDD (22. ed.) 630

Ficha Catalográfica elaborada por
Suélem Belmudes Cardoso CRB9/1630
Biblioteca da UTFPR Campus Pato Branco



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Diretoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Tese nº 056

RESPOSTAS MOLECULARES DO FEIJÃO AO CRESTAMENTO BACTERIANO COMUM

por

KATIANE FEDRIGO

Tese apresentada às oito horas e trinta minutos do dia cinco de julho de dois mil e dezanove como requisito parcial para obtenção do título de DOUTORA EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Sistemas de Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos membros abaixo designados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho APROVADO.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Anelise Tessari Perboni
UTFPR/Dois Vizinhos

**Prof^a. Dr^a. Maristela dos Santos Rey
Borin**
UTFPR/Dois Vizinhos

Dr. Leomar Guilherme Woyann
GUERRA RAGT Melhoramento Genético do
Brasil LTDA

Prof^a. Dr^a. Glacy Jaqueline da Silva
UNIPAR/Umuarama

Prof^a. Dr^a Carolina Hoppen Tonial
IFPR/Palmas

Prof^a. Dr^a. Taciane Finatto
UTFPR/Pato Branco
Orientadora

Prof. Dr. Alcir José Modolo
UTFPR
Coordenador do PPGAG

“O Termo de Aprovação, devidamente assinado, encontra-se arquivado na Coordenação do PPGAG, conforme Norma aprovada pelo Colegiado do Programa.”

Dedico

À Deus, que foi minha maior força nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Clademir e Maria Goreti.

Aos meus irmãos, Karina, Luis Gustavo e João Vitor.

Ao meu noivo, Luiz Antônio Nuernberg.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, pela oportunidade do curso de doutorado, e a todos os servidores que de alguma forma contribuíram com este trabalho.

À minha orientadora, Dr^a. Taciane Finatto, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Obrigada pela sua amizade, dedicação, confiança, paciência, orientação e conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento do trabalho. Orientadora é a palavra ideal para defini-la.

Aos meus coorientadores, José Abramo Marchese e Rosângela Dallemole Giaretta, pelos ensinamentos durante o curso.

A todos os professores, por me proporcionar o conhecimento.

Às professoras Dr^a. Anelise Tessari Perboni, Dr^a. Maristela dos Santos Rey Borin, Dr^a. Glacy Jaqueline da Silva e Dr^a Carolina Hoppen Tonial e ao Dr Leomar Guilherme Woyann, por aceitar o convite e pelas contribuições para este trabalho.

À minha família que é o pilar de toda minha vida. Aos meus pais Clademir e Maria Goreti, por sempre estarem ao meu lado de coração aberto e certo e me apoiarem em todas as minhas escolhas. Aos meus irmãos, Karina, Luis Gustavo e João Vitor por todo carinho e companheirismo.

Ao meu noivo, Luiz Antônio, por ser minha inspiração, por estar sempre ao meu lado, me auxiliando nos trabalhos, nos estudos e me dando força para seguir em frente.

Aos meus avós, tios, tias, primos e primas, que sempre me incentivaram.

À minha segunda família, Clarice, Alcindo, Marta e Danilo, pelo estímulo e apoio.

Às colegas e amigas Eliane, Débora e Maisa, pela amizade, carinho, compreensão e por sempre me ajudar e auxiliar nos experimentos. Aos colegas do laboratório de Fisiologia Vegetal e Genética Molecular pela amizade.

Aos meus amigos e colegas, que compreenderam a minha distância e ausência, principalmente nas datas especiais.

Enfim, a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para que isso fosse possível!

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

(Charlie Chaplin)

RESUMO

FEDRIGO, Katiane. Respostas moleculares do feijão ao crestamento bacteriano comum. 95 f. Tese (Doutorado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco, 2019.

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais produzidas e consumidas no mundo. Entretanto, numerosas doenças afetam o cultivo desta cultura, dentre elas o crestamento bacteriano comum causada pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Sob condições de estresse, as plantas ativam cascatas de sinalização que aumentam ou suprimem a expressão dos genes-alvo, alterando as respostas fisiológicas das plantas. Este trabalho teve como objetivo analisar as respostas moleculares do feijão ao crestamento bacteriano comum. O experimento foi conduzido em delineamento de blocos ao acaso com 2 cultivares (IPR Colibri - Suscetível e IAC Milênio - Moderadamente Resistente) x 7 métodos (sementes inoculadas por imersão, sementes inoculadas por infiltração a vácuo, folhas inoculadas, folhas apenas feridas, caule inoculado, caule apenas ferido e plantas não inoculadas (controle)) com 4 repetições. As folhas das plantas foram coletadas para análise de metilação do DNA e expressão de genes de defesa por PCR semiquantitativa. A severidade da doença foi avaliada aos 7, 14, 21 e 28 dias após a semeadura. Aos 28 dias após a semeadura, as plantas foram coletadas para análise da massa fresca e seca de folhas e caules. Outro estudo *in silico* da regulação dos promotores de genes que atua na sinalização ao ataque de patógenos foi realizado. Os resultados encontrados no assunto 1 indicam que o método de infiltração a vácuo foi o mais eficiente para avaliar a gravidade da doença em ambas as cultivares de feijão. Além disso, os valores de biomassa da parte aérea foram relacionados à severidade, ou seja, em plantas com maior severidade a massa da parte aérea foi menor. No assunto 2, foi observado que a cultivar IAC Milênio apresentou maior aumento na expressão gênica em relação à cultivar IPR Colibri, para os genes analisados, principalmente para o gene *Phvul.002G092300*. Além disso, a metilação do promotor pode influenciar a expressão dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* nos genes IAC Milênio e IPR Colibri em resposta a *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. No assunto 3, verificou-se que entre os 555 genes, 491 eram expressos em nódulos e 486 nas raízes. Além disso, 50 elementos reguladores de ação *cis* (ERACs) estavam presentes na região promotora desses genes e os mais frequentes foram TATA box, CAAT box, MYB, MYC e AT-TATA box. Também foram identificados ERACs, GT1 motif, W-box e WRE3, relacionados ao estresse biótico. Portanto, os resultados fornecem dados importantes sobre a função dos genes de defesa do feijão em resposta ao crescimento bacteriano comum, representando um amplo recurso para o aprimoramento genético dessa cultura.

Palavras-chave: *Phaseolus vulgaris*. Bactérias fitopatogênicas. Expressão gênica.

ABSTRACT

FEDRIGO, Katiane. Common bean molecular responses to common bacterial blight. 95 f. Thesis (Ph.D. in Agronomy) - Graduate Program in Agronomy (Concentration Area: Crop Production), Federal University of Technology – Parana (UTFPR), Campus Pato Branco, 2019.

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is one of the most produced and consumed legumes in the world. However, numerous diseases affect the cultivation of this crop, among them, the common bacterial blight caused by the bacterium *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. Under stress conditions, the plants activate signaling cascades that increase or suppress the expression of target genes changing the physiological responses of plants. This work aimed to analyze the common bean molecular responses to common bacterial blight. The experiment was carried in a randomized block design with 2 cultivars (IPR Colibri - Susceptible and IAC Milênio - Moderately Resistant) x 7 methods (seeds inoculated by immersion, seeds inoculated by vacuum infiltration, inoculated leaves, leaves only wounds, inoculated stem, only injured stem and uninoculated plants (control)) with 4 replicates. Plant leaves were collected for DNA methylation analysis and defense gene expression by semiquantitative PCR. Disease severity was assessed at 7, 14, 21 and 28 days after sowing. At 28 days after sowing, plants were collected for analysis of fresh and dry matter mass of leaves and stems. Another study *in silico* of the regulation of the promoters of genes that acts in the signaling to attack of pathogens was realized. The results found in subject 1 indicate that the vacuum infiltration method was the most efficient to evaluate disease severity in both bean cultivars. In addition, shoot biomass values were related to severity, ie, in plants with higher severity, shoot mass was lower. In subject 2, we were observed that the cultivar IAC Milênio had greater increase in gene expression compared to cultivar IPR Colibri, for the analyzed genes, mainly for the *Phvul.002G092300* gene. In addition, the promoter methylation may influence the expression of *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* and *Phvul.005G054300* genes in the IAC Milênio and IPR Colibri in response to *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. In subject 3, we were found that among the 555 genes, 491 were expressed in nodules and 486 in roots 19. In addition, 50 *cis*-acting regulatory elements (ERACs) were present in the promoter region of these genes and the most frequent were TATA-box, CAAT-box, MYB, MYC and AT-TATA-box. ERACs, GT1-motif, W-box and WRE3, related to biotic stress were also identified. Therefore, the results provide important data on the function of bean defence genes in responses to common bacterial growth, representing a broad resource for the genetic improvement of this crop.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*. Phytopathogenic bacteria. Gene expression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira através do T3SS de bactérias. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.....	22
Figura 2 – Respostas de defesa da planta. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019. ..	23
Figura 3 - Severidade do crestamento bacteriano comum causado pela bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> entre as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio, nos diferentes métodos de inoculação. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.....	38
Figura 4 - Valores médios de estabilidade de expressão dos genes de referência nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes pelo método de imersão. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.....	50
Figura 5 - Incremento no nível de expressão dos genes alvo em relação ao gene referência UBI nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes pelo método de imersão. A – Pv001. B – Pv002. C – Pv005. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.	52
Figura 6 - Frequência de sequências promotoras com sítios de restrição das enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.	56
Figura 7 - Distribuição dos genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos nos cromossomos de feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	63
Figura 8 - Distribuição das proteínas de feijão nos compartimentos celulares. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	64
Figura 9 - Frequência da expressão dos genes em diferentes tecidos de feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	65
Figura 10 - <i>Heat map</i> dos perfis de expressão dos genes em diferentes tecidos de feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da severidade do crestamento bacteriano comum causado pela bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> entre as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio, nos diferentes métodos de inoculação. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	35
Tabela 2 - Severidade (%) do crestamento bacteriano comum causado pela bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> , entre as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio em diferentes métodos de inoculação. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	35
Tabela 3 - Análise de comparação entre médias para massa da matéria fresca de folha (MMFF), massa da matéria seca de folha (MMSF), massa da matéria fresca de caule (MMFC) e massa da matéria seca de caule (MMSC) para as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio em diferentes métodos de inoculação da bactéria <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	40
Tabela 4 - Iniciadores, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho fragmento amplificado dos genes relacionados a defesa à patógenos em feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	45
Tabela 5 - Iniciadores, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho fragmento amplificado dos genes relacionados a defesa à patógenos em feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	48
Tabela 6 - Metilação do DNA nos promotores (1Kb) dos genes <i>Phvul.002G092300</i> , <i>Phvul.003G159700</i> , <i>Phvul.004G015000</i> e <i>Phvul.005G054300</i> nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes, pelo método de imersão. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.	57
Tabela 7 - Elementos <i>cis</i> identificados a 1 Kb na região promotora dos genes em <i>Phaseolus vulgaris</i> . UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	68
Tabela 8 - Genes com a maior quantidade de elementos <i>cis</i> em seus promotores. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.	72

LISTA DE SIGLAS E ACRÔNIMOS

°C	Graus Celsius
ACT	Actina
Avr	Avirulência
B.O.D.	Biochemical Oxygen Demand
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CC	Coiled-Coil
cDNA	Complementar Deoxyribonucleic Acid
CDS	Coding Sequence
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
CV	Coeficiente de Variação
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DEPC	Diethylpirocarbonato
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ERACs	Elementos Regulatórios de Ação <i>cis</i>
ERSM	Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
ETI	Effector-Triggered Immunity
FPKM	Fragments Per Kilobase Million
FT	Fatores de transcrição
g	Grama
IAC	Instituto Agronômico de Campinas
IPR	Instituto Agronômico do Paraná
Kb	Kilobase
L	Litro
LiCl	Cloreto de Lítio
LRR	Leucine-Rich Repeat
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

MAMP	Microbe-associated molecular pattern
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MMFC	Massa da Matéria Fresca de Caule
MMFF	Massa da Matéria Fresca de Folhas
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
MMSC	Massa da Matéria Seca de Caule
MMSF	Massa da Matéria Seca de Folhas
NaCl	Cloreto de Sódio
NBS	Nucleotide-binding site
ng	Nanograma
NIL	Near-Isogenic Lines
OD	Optical Density
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Pattern
PCR	Polimerase Chain Reaction
PR	Unidade da Federação – Paraná
PRR	Pattern Recognition Receptors
PTI	Pathogen Triggered Immunity
PVP	Polyvinylpyrrolidone
RLK	Receptor like-kinase
RLP	Receptor like-protein
RNA	Ribonucleic Acid
RNAse	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
TA	Temperatura de Anelamento
TE	TRIS-EDTA
TIR	Toll-Interleukin 1 Receptor
TP	Tamanho do Produto
Tris-HCL	(Hydroxymethyl) Aminomethane Hydrochloride
TUB	Tubulina
UBI	Ubiquitina
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Importância econômica do feijão.....	18
2.2 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	19
2.3 Interação planta-patógeno	20
2.4 Expressão de genes relacionados com a patogênese e metilação do DNA	24
3. ASSUNTO 1 – Métodos de inoculação de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	30
3.1 Introdução ao assunto 1.....	30
3.2 Procedimentos metodológicos do assunto 1.....	31
3.2.1 Isolamento de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	31
3.2.2 Instalação do experimento.....	32
3.2.3 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> nas sementes.....	32
3.2.4 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> nas folhas.....	33
3.2.5 Inoculação de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> no caule	33
3.2.6 Coleta do material vegetal.....	34
3.2.7 Avaliação da severidade.....	34
3.2.8 Avaliação de massa fresca e seca da parte aérea	34
3.3 Resultados e Discussão do assunto 1	34
3.3.1 Severidade do crestamento bacteriano comum.....	34
3.3.2 Acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea.....	40
3.4 Conclusões sobre o assunto 1	42
4. ASSUNTO 2 – Expressão gênica e metilação do DNA em promotores de genes de feijão em resposta ao crestamento bacteriano comum	43
4.1 Introdução ao assunto 2.....	43
4.2 Procedimentos metodológicos do assunto 2.....	44
4.2.1 Análise dos perfis de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa	44
4.2.1.1 Desenho dos iniciadores	44
4.2.1.2 Extração do RNA total	45
4.2.1.3 Síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar)	46
4.2.1.4 RT-PCR semiquantitativa	46
4.2.1.5 Análises estatísticas	47
4.2.2 PCR para determinar o padrão de metilação do DNA usando enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM).....	47
4.2.2.1 Identificação dos Sítios de Restrição das Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação (ERSM) nas sequências de DNA	47
4.2.2.2 Desenho dos iniciadores	47
4.2.2.3 Extração do DNA total	48

4.2.2.4	PCR.....	48
4.3	Resultados e Discussão do assunto 2	49
4.3.1	Análise dos perfis de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa	49
4.3.1.1	Análise da estabilidade dos genes de referência	49
4.3.1.2	Perfil de expressão dos genes alvo.....	51
4.3.2	PCR para determinar o padrão de metilação do DNA usando enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM).....	55
4.3.2.1	Identificação dos Sítios de Restrição das Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação (ERSM) nas sequências de DNA	55
4.3.2.2	Análise dos padrões de metilação com ERSM e PCR Semiquantitativa	56
4.4	Conclusões sobre o assunto 2	59
5.	ASSUNTO 3 – Identificação por análise <i>in silico</i> de genes relacionados ao estresse biótico no genoma de <i>Phaseolus vulgaris</i>	60
5.1	Introdução ao assunto 3.....	60
5.2	Procedimentos metodológicos do assunto 3.....	61
5.3	Resultados e Discussão sobre o assunto 3	62
5.3.1	Caracterização dos genes relacionados ao estresse biótico	62
5.3.2	Análise de Elementos Regulatórios de Ação <i>Cis</i> (ERACs).....	67
5.4	Conclusões sobre o assunto 3	73
6.	CONCLUSÕES	75
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	77

1. INTRODUÇÃO

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma das leguminosas mais produzidas e consumidas em todo o mundo, ocupando um lugar importante na nutrição humana, pois é rica em proteínas, vitaminas e minerais, como cálcio, fósforo, ferro e zinco (HAILU et al., 2017). No entanto, inúmeras doenças afetam o cultivo dessa cultura, reduzindo a produtividade (LETA; LAMESSA; AYANA, 2017).

O crestamento bacteriano comum causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith) Dye, é uma das principais limitações a produção de feijão em locais de média altitude, temperaturas e umidade relativa elevadas (CORRÊA et al., 2017). Para evitar a disseminação do patógeno, a rotação de culturas e a utilização de cultivares resistentes são recomendadas como principais práticas de manejo (OSDAGHI; ZADEMOHAMAD, 2016).

O desenvolvimento de cultivares de feijão resistentes a doenças deve ser uma prioridade, pois os agricultores utilizam medidas de controle de doenças que exigem muito trabalho e na maioria das vezes não tem resultado. No entanto, para desenvolver cultivares resistentes, primeiramente é necessário compreender a base molecular da interação entre a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e a planta hospedeira, e após definir a melhor estratégia para implantação de resistência, como introduzir genes de resistência ao patógeno.

Com a evolução, as plantas desenvolveram um sistema de defesa multifacetado e sofisticado que detectam os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern*) através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), ativando a imunidade desencadeada por PAMP (PTI - *Pathogen Triggered Immunity*). Contra estratégia de defesa, os patógenos fornecem efetores que alteram a fisiologia da planta para favorecer o processo de infecção (BIGEARD; COLCOMBET; HIRT, 2015). No entanto, as plantas reconhecem os efetores dos patógenos através de receptores e ativam a imunidade desencadeada pelo efector (ETI - *Effector-Triggered Immunity*) (KOURELIS; VAN DER HOORN, 2018).

Durante a PTI e a ETI, os sinais de defesa são transmitidos a partir de receptores que ativam várias cascatas de sinalização. Essas cascatas induzem a expressão de genes responsáveis pela resistência a patógenos (DEVENDRAKUMAR; LI; ZHANG, 2018).

Em eucariotos, a transcrição é regulada por fatores de transcrição e elementos

regulatórios de ação *cis* (ERACs). O sinal do estresse chega ao núcleo através da mudança na atividade das proteínas que se ligam ao DNA, ativando os fatores de transcrição que interagem especificamente com os ERACs dos genes alterando sua expressão (FICHMAN et al., 2015). As modificações epigenéticas também são importantes na regulação do desenvolvimento de plantas (SONG et al., 2013).

A expressão e a regulação gênica estão sendo extensivamente estudadas, no entanto, os detalhes dessas redes regulatórias e como elas funcionam ainda são amplamente desconhecidos (ZHOU et al., 2013). No entanto, os avanços nos projetos de sequenciamento de genomas de plantas produzem muitos resultados de sequências nucleotídicas e assim, um grande número de dados são disponibilizados frequentemente, porém sem muitas informações, o que torna necessário associar as sequências com as informações biológicas utilizando ferramentas de análise *in silico*.

O acesso a bancos de dados online permite buscar e alinhar sequências de DNA e proteínas, auxiliando na identificação, caracterização e análise das funções biológicas. Com esses dados é possível realizar diversas pesquisas, incluindo a análise da expressão de genes defesa em resposta a patógenos em plantas e quais os mecanismos que a controlam. Portanto, o objetivo do trabalho foi analisar as respostas moleculares do feijão ao cretamento bacteriano comum.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância econômica do feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), pertencente à família Fabaceae, é cultivado em uma ampla variedade de sistemas e ambientes agrícolas. A América Latina é a principal produtora e consumidora de feijão, especialmente o Brasil (ASSEFA et al., 2019). Além de ser utilizado para a alimentação humana devido alto valor nutricional, como proteínas e carboidratos complexos, vitaminas, fibra alimentar e minerais, representa uma importante fonte de renda e emprego no campo (BLAIR, 2013; TAÏBI et al., 2016).

Os desafios enfrentados pela cultura do feijão foram fortemente influenciados pela história evolutiva em determinados ambientes, como também pelo conjunto de novos agrossistemas que é cultivado (ASSEFA et al., 2019). Inúmeras evidências indicam que o feijão foi domesticado pelo menos em dois locais – no Norte dos Andes e na Mesoamérica. Os nichos ecológicos para ambas populações selvagens são especializados e estreitos. A população mesoamericana foi adaptada a regimes de chuvas bimodais com uma época de seca, plantada em solos vulcânicos férteis, em clareiras de florestas e em local geográfico quase equatorial. Em contrapartida, a população andina cresceu em locais mais frios, tornando-a adaptada à essa condição (BITOCCHI et al. 2013; SCHMUTZ et al. 2014; ARIANI et al. 2016).

As características sazonais desta cultura resultam em três épocas de cultivo, sendo a primeira, a safra das águas, no qual a semeadura acontece entre os meses de agosto/outubro ou novembro/dezembro, com colheita entre novembro e março. Nas regiões Sul e Sudeste, esta época de cultivo é frequente. A segunda é mais praticada nas regiões Nordeste e Sudeste, cuja semeadura acontece entre janeiro e abril e a colheita entre abril e julho. Na região Centro-Oeste e Sudeste, a terceira safra ou feijão de inverno irrigado é comum, sendo que a semeadura inicia a partir do mês de maio e a colheita entre agosto e outubro (VIVAN et al., 2015).

A área plantada de feijão no Brasil na safra de 2018/2019 foi 6% menor que na anterior e a produtividade atingiu 1030 kg ha⁻¹, 4,8% acima em relação a última temporada. Na Região Sul, houve aumento na produtividade de 108 kg ha⁻¹, ou seja, 6,9% em relação à safra anterior. No Paraná, na safra de 2018/2019 a área plantada diminuiu 0,8% em comparação com a de 2017/2018, porém a produtividade aumentou

de 1472 para 1641 kg ha⁻¹ (11,5%) (CONAB, 2019).

Em função de ser cultivado em vários locais e devido as práticas agrícolas utilizadas como manejo inadequado do solo, falta de cultivares resistentes e danos ou ferimentos causados por patógenos, o feijão fica exposto a diversos patógenos fúngicos e bacterianos que afetam o crescimento, causando perdas econômicas significativas (TORRES et al., 2017).

As doenças estão entre os fatores que mais afetam a produtividade, pois podem reduzir significativamente a produção da cultura (DEMANT; MARINGONI, 2012). Dentre essas doenças destaca-se o crestamento bacteriano comum, causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

2.2 *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

O crestamento bacteriano comum é causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. A doença é a principal restrição em áreas de produção em altitude média e é favorecida por temperaturas quentes e alta umidade relativa (RODRÍGUEZ DE LUQUE; CREAMER, 2015).

A *X. axonopodis* pv. *phaseoli* é classificada como gram-negativa, baciliforme, monotríquia e aeróbia estrita, ou seja, não fixa oxigênio, pois pode inibir seu crescimento e desenvolvimento. As colônias são amarelas, de bordos definidos e convexas, porém com o progresso da infecção, as lesões tornam-se maiores e adquirem uma coloração marrom, com bordos amarelados, deixando o tecido com aspecto necrótico de queima, o chamado crestamento (MUTLU et al., 2008).

A bactéria pode penetrar na folha através dos estômatos ou ferimentos e colonizar os espaços intercelulares, destruindo a lamela média (TUGUME et al., 2019). Os primeiros sintomas na planta são manchas aquosas, com crescimento irregular, na face abaxial dos folíolos, os tecidos se tornam secos e quebradiços e são circundados por halo amarelo visível na parte adaxial. No caule das plântulas, as lesões aquosas aumentam de tamanho gradualmente e há formação de riscos vermelhos ao longo do caule, podendo rachar e o exsudato bacteriano acumula-se, ficando visível. As lesões nas vagens, são irregulares, encharcadas e circulares, podendo apresentar exsudato bacteriano de coloração amarelada para posteriormente tornarem-se avermelhadas e secarem (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

O patógeno *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode sobreviver na palhada, sobre o tegumento de sementes, em plantas hospedeiras e no solo, por um longo período de tempo (DARRASSE et al., 2018), no entanto a principal via de disseminação é a semente. Sementes infestadas interna e/ou externamente são importantes fontes de inóculos primários (LETA; LAMESSA; AYANA, 2017).

As principais medidas preventivas para o controle do cretamento bacteriano comum são o uso de sementes saudáveis, irrigação adequada, plantio em áreas não infestadas pelo patógeno e a rotação de culturas (TRINDADE, 2012), pois a eficácia do controle químico do cretamento bacteriano comum em feijoeiro é magnitudinal nas lavouras, devido à baixa eficiência destes (VIGO et al., 2009).

2.3 Interação planta-patógeno

As plantas enfrentam vários tipos de estresses, como mudanças drásticas de temperatura, umidade, radiação solar e ataque de patógenos. O estresse biótico de plantas é provocado por organismos patogênicos, incluindo agentes patogênicos celulares como fungos biotróficos e necrotróficos, bactérias e nematoides. Os patógenos causam elevadas perdas de rendimento em diferentes culturas agrícolas e têm um impacto considerável nos sistemas naturais. As consequências socioeconômicas sobre a agricultura são expressivas, com reduções na qualidade e quantidade das culturas, resultando na redução da renda dos produtores (NEJAT et al., 2017).

Com o ataque do patógeno, as plantas podem alterar a constituição de compostos moleculares em defesa e proteção, ou seja, durante o processo de evolução, desenvolveram mecanismos de resposta contra doenças que reconhecem o ataque (WANG et al., 2012).

Em condições desfavoráveis, as plantas formam barreiras antes de sofrerem ataques de agentes danosos, a fim de evitar ou reduzir danos e garantir a sobrevivência e descendência. Essas barreiras chamadas de defesas constitutivas são representadas por estruturas como ceras, cutículas, parede celular espessa, tricomas e fibras vasculares, além de substâncias químicas pré-formadas, como fenóis, alcalóides, fitotoxinas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos (ARAUJO; MENEZES, 2009).

A relação entre os mecanismos de resistência do hospedeiro e os mecanismos

de ataque do patógeno determinam o sucesso ou não da penetração do patógeno na planta e o desenvolvimento da doença (TAKKEN; REP, 2010), além das condições ambientais favoráveis, como clima quente e úmido, que favorecem a sobrevivência das bactérias (HAILU, et al., 2017).

As plantas são organismos sésseis e devido a isso desenvolveram complexos mecanismos de defesa para reconhecer, reagir e evitar danos causados por patógenos. A resposta da planta ao ataque de patógenos depende do reconhecimento no nível celular, ativando vias complexas de sinalização (ALLARDYCE et al., 2013).

Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs - *Pattern Recognition Receptors*) reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs - *Pathogen-associated molecular pattern*) para ativar a imunidade desencadeada por PAMP (PTI - *Pathogen Triggered Immunity*) (KADOTA et al., 2019).

Durante a PTI, a morte das células vegetais afetadas não ocorre com frequência. Por outro lado, os patógenos biotróficos colonizam as células e liberam efetores que atuam para reprimir a PTI e reprogramar a fisiologia e o metabolismo das células hospedeiras (KHAN et al., 2018).

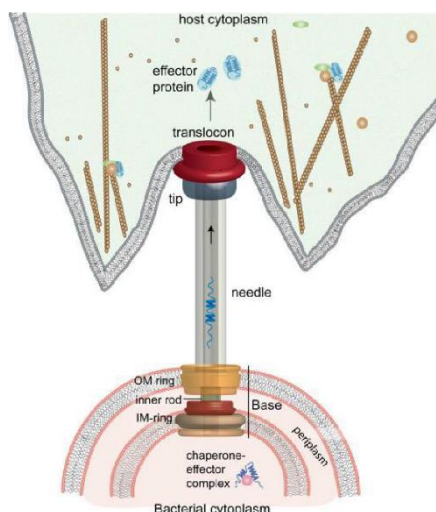
A PTI é uma barreira importante contra doenças, impedindo a infecção de microrganismos não adaptados. No entanto, os patógenos possuem a capacidade de se adaptar ao genótipo de hospedeiros específicos e assim, desenvolveram fatores de virulência conhecidos como efetores. Esses efetores são inseridos na célula hospedeiras a fim de interferir na PTI, enfraquecendo as defesas basais (DANGL; HORVATH; STASKAWICZ, 2013).

Apesar da PTI ser suficiente para evitar a infecção por alguns patógenos, outros desenvolveram mecanismos para superá-la, através da produção de moléculas efetoras que resultam em Suscetibilidade Ativada por Efetores (ETS - *Effector Triggered Susceptibility*), resultando em plantas suscetíveis a infecção pelo agente patogênico (GÖHRE; ROBATZEK, 2008). Em contrapartida, o ataque de patógenos também pode ser identificado através do reconhecimento de proteínas efetoras secretadas por patógenos. Esse reconhecimento é auxiliado por receptores intracelulares ou extracelulares que ativam a imunidade desencadeada pelo efector (ETI - *Effector Triggered Imunity*) (THULASI; LI; ZHANG, 2018).

Como parte da ETI, as plantas têm receptores intracelulares chamados de proteínas de resistência (R) que detectam a presença de proteínas efetoras

específicas conhecidas como avirulência (*Avr*) ou efetores do tipo III (DAVID; HARMON; CHEN, 2019) liberados através do Sistema de Secreção tipo III (T3SS) (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do transporte de proteínas efetoras para o citoplasma da célula hospedeira através do T3SS de bactérias. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.



As bactérias fitopatogênicas desenvolveram uma maquinaria do tipo agulha para injetar proteínas de virulência no citoplasma da célula hospedeira para iniciar a infecção. A capacidade de injetar efetores em células hospedeiras é essencial para o estabelecimento da infecção e patogênese de muitas bactérias gram-negativas. O T3SS é formado por proteínas estruturais e não estruturais. As proteínas estruturais montam o pílus em forma de agulha, com uma estrutura embutida na membrana basal, uma agulha externa e um complexo que recobre a ponta da agulha. Em contato com a célula hospedeira, o complexo de translocação para proteínas efetoras é montado. Após adentrarem o citoplasma do hospedeiro, os efetores iniciam e mantêm a infecção. FONTE: CHATTERJEE et al., 2013.

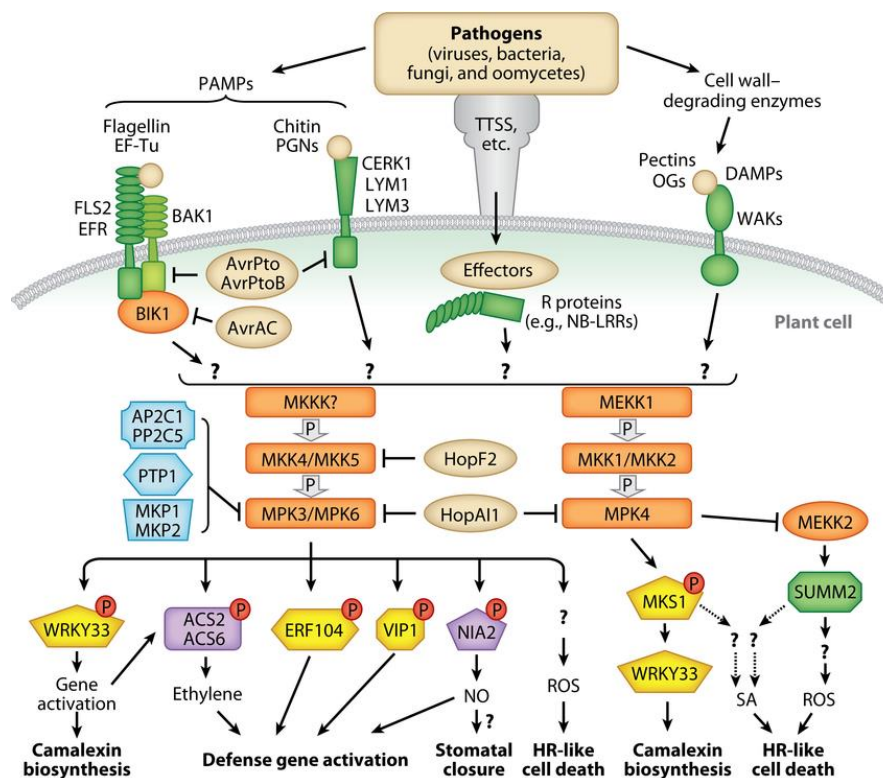
Quando uma proteína R específica se generaliza entre os genótipos do hospedeiro, induz o patógeno a acumular mutações na proteína efetiva correspondente ou perder completamente o efetor, evitando a ETI (DANGL; HORVATH; STASKAWICZ, 2013). Além disso, o patógeno pode desenvolver novos efetores que são detectados pela mesma proteína R e suprimir a ETI. Por outro lado, as plantas podem desenvolver novas proteínas R que reconhecem esses efetores e ativar as respostas de defesa (PAULUS; VAN DER HOORN, 2018).

A ETI é robusta e está associada à morte celular programada localizada, denominada resposta de hipersensibilidade (HR – *hypersensitive response*). A HR ajuda na prevenção da propagação de patógenos biotróficos no tecido saudável (GOURBAL et al., 2018).

No entanto, durante a PTI e a ETI, o reconhecimento de patógenos pelos

receptores está relacionado a diversas respostas de defesa na planta, como a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs - *Mitogen-activated protein kinases*), influxo de íons, explosão oxidativa, aumento da biossíntese de hormônios e indução de genes de defesa (PENG; VAN WERSCH; ZHANG, 2018; THULASI; LI; ZHANG, 2018) (Figura 2).

Figura 2 – Respostas de defesa da planta. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.



Pontos de interrogação indicam componentes de sinalização não identificados. Uma seta pode indicar várias etapas. MAPK: proteína quinase ativada por mitógenos. PAMP: padrão molecular associado a patógenos. MAMP: padrão molecular associado a micróbios. DAMP: padrão molecular associado a danos. NB-LRRs: proteínas de ligação a nucleotídeos com repetições ricas em leucina. NO: óxido nítrico. OGs: ácidos oligogalacturônicos. PGNs: peptidoglicanos. ERO: espécies reativas de oxigênio. SA: ácido salicílico. TTSS: sistema tipo três de secreção. WAKs: quinases associadas à parede. FONTE: MENG; ZHANG, 2013.

Na resposta de defesa da planta, os PRRs reconhecem os PAMPs/MAMPs e DAMPs e ativam a PTI. Os efetores dos patógenos suprimem a imunidade da planta, no entanto, as plantas detectam a presença desses efetores através de proteínas R e desencadeiam a ETI. A primeira sinalização desencadeada por PTI e ETI é a ativação das cascatas de MAPKs responsivas ao patógeno. As MAPKs controlam a síntese e a sinalização de hormônios de defesa, a síntese de metabólitos antimicrobianos, o fechamento estomático, a ativação de genes de defesa e a morte celular programada

(Figura 2) (MENG; ZHANG, 2013).

2.4 Expressão de genes relacionados com a patogênese e metilação do DNA

As plantas possuem um sistema de reconhecimento de patógenos que equilibra a ausência de um sistema imunológico adaptativo. Após esse reconhecimento, as células vegetais reprogramam as atividades metabólicas e ativam os mecanismos de defesa (NOMAN; AQEEL; LOU, 2019).

As plantas possuem vários componentes de defesa contra patógenos, além das barreiras estruturais e químicas básicas, há duas classes de receptores que reconhecem o sinal desencadeado pelo ataque e ativam genes de defesa. Uma classe atua na defesa basal, os PAMPs, MAMPs ou DAMPs são reconhecidos pelos PRRs, que são classificados como receptores semelhantes a quinases (RLKs) ou receptores semelhantes a proteínas (RLPs). As RLKs estão localizadas na membrana plasmática e possuem um ectodomínio de ligação, um domínio transmembrana e um domínio intracelular de quinase. As RLPs não têm domínios de sinalização intracelular (KANYUKA; RUDD, 2019).

O reconhecimento de PAMPs por receptores quinases FLS2 (*Flagellin Sensing 2*) que se liga diretamente a flagelina bacteriana e forma um complexo de sinalização foi descrito em *Arabidopsis* (FORSYTH et al., 2010).

A FLS2 interage com uma quinase associada ao brassinosteróide 1 (BAK1) e iniciam o processo de sinalização, fosforilando proteínas. O BAK1 pode perceber outros elicitores através da heterodimerização com PRRs, como o receptor semelhante a quinase *Botrytis 1* (BIK1). O BIK1 fosforilado é transfosforilado com FLS2/BAK1 para aumentar a sinalização da flagelina (LU et al., 2010). Então, as MAPKs acionam o processo MAPK total e a transcrição de genes após o reconhecimento da flg22, desencadeando a reação de resistência (SHEHZADI et al., 2017).

O BAK1 também é necessário após a identificação do elf18, peptídeo resultante do fator de alongamento bacteriano EF-Tu, pelo receptor do fator de alongamento (EFR). Portanto, FLS e EFR fazem parte da família RLK, possuindo um domínio extracelular LRR e um domínio quinase intracelular (NOMAN; AQEEL; LOU, 2019).

A outra classe está relacionada com a defesa mediada por receptores que

contém proteínas citoplasmáticas contendo sítios de ligação de nucleotídeos e domínios de repetição ricos em leucina (NBS-LRR) (ZHANG et al., 2016).

O controle geral da condução do sinal através da mudança conformacional nos genes R é função primária dos domínios NBS (INOUE et al., 2013), enquanto os domínios LRR estão relacionados com as interações proteína-proteína e funções de reconhecimento de patógenos (GUO et al., 2016). Há uma dependência entre os domínios NBS e LRR que deve evoluir um com o outro (QI; DEYOUNG; INNES, 2012).

Os genes NBS-LRR constituem a maior família de genes relacionados a resistência de doenças em plantas (JONES et al., 2016). As proteínas NBS-LRR reconhecem uma ampla variedade de patógenos, incluindo vírus, fungos, bactérias e insetos, e podem perceber a presença do agente patogênico diretamente através da ligação de proteínas efetoras do patógeno ou indiretamente pelo reconhecimento na modificação das proteínas alvo efetoras no hospedeiro, ativando a transdução de sinais de defesa que resultam em alterações bioquímicas que limitam o crescimento do patógeno e na morte celular programada pelo hospedeiro (SAGI; DEOKAR; TAR'AN, 2017).

Os genes de resistência que codificam os domínios NBS podem ser classificados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de diferentes domínios na região N terminal das angiospermas, receptores Toll/Interleucina-1 (TIR) e coiled coil (CC), dividindo assim, os genes NBS-LRR em subclasses TIR-NBS-LRR e CC-NBS-LRR (SHAO et al., 2016). Essa divisão é baseada tanto na análise filogenética quanto nas vias de sinalização. No entanto, ambos os domínios TIR e CC estão envolvidos na regulação da sinalização e especificidade a jusante (LOZANO et al., 2015).

Nas plantas, proteínas com domínios LRR possuem diferentes estruturas e funções contra a infecção por patógenos, ativando sinais e iniciando respostas de defesa (CHANDRA et al., 2016).

Os receptores de sinais acionam rápidas e convergentes redes de sinalização a jusante que são controladas por cascatas de proteínas quinases ativadas por cálcio e MAPKs. As cascatas de MAPKs fosforilam fatores de transcrição (FTs) que controlam a expressão de genes de defesa (YOODDEE et al., 2018).

A expressão gênica é controlada por diversos fatores de transcrição que evoluíram com a expressão de determinados genes em resposta a estímulos

ambientais e assim direcionam o crescimento e desenvolvimento das plantas, diferenciação celular e respostas a estresses (GUPTA; HUANG, 2014).

A regulação da expressão gênica é a etapa mais importante. O local que regula a expressão dos genes está situado a principalmente 1 Kb a montante do início da transcrição e é referido como região reguladora 5' ou região promotora do gene. A região promotora é constituída por sequências específicas de DNA e elementos regulatórios de ação *cis* (ERACs) que ativam FTs. Os FTs ativam a transcrição da região codificadora do gene (SONG et al., 2015).

A interação entre os ERACs e os FTs determina o nível temporal, espacial e de atividade de genes dentro de um conjunto de redes de expressão extremamente coordenadas (PASSRICHA et al., 2017). Os elementos transponíveis inseridos na região promotora dos genes regulam a expressão gênica, alterando o estado epigenético dos genes (ESPINAS; SAZE; SAIJO, 2016).

A epigenética é uma alteração molecular do DNA que pode ser herdada, mesmo não envolvendo alterações na sequência genômica (BANERJEE; ROYCHOUDHURY, 2017). A conformação da cromatina pode ser alterada durante um evento epigenético, podendo ficar eucromática possibilitando que a transcrição ocorra normalmente, ou heterocromática, dificultando a ação dos fatores de transcrição em uma região específica do genoma e assim permitir que os genes sejam expressos ou silenciados (COSTA; PACHECO, 2013).

A evidência de caracteres epigenéticos está associada à regulação de genes responsáveis pela especificidade dos tecidos, pelo desenvolvimento dos organismos e pela supressão de elementos transponíveis. Diferentemente do mecanismo de atuação do genoma, o epigenoma é frequentemente alterado por fatores ambientais (KUMAR, 2018).

Componentes epigenéticos, como metilação da citosina, modificações de histonas e acúmulo de pequenos RNA regulam várias características das plantas, incluindo crescimento, desenvolvimento e resposta a estresses bióticos e abióticos (HEWEZI, 2018).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético no qual um grupo metil é transferido da S-adenosil metionina para a citosina do DNA pela metiltransferase, regulando a expressão gênica sem alterar a sequência de DNA (WANG et al., 2018). A metilação ocorre nas posições 4 e 5 do anel de pirimidina da citosina formando ou

4-metil-citosina (4mC) ou 5-metil-citosina (5mC), ou ainda na posição 6 do anel de purina em 6-metil-adenina (6mA) (ALIAGA et al., 2019). Nas plantas, a metilação da citosina ocorre em locais CG, CHG e CHH, onde H representa A, T ou C (TAKAHASHI et al., 2018). O GC metilado é a forma mais abundante de citosina metilada nos genomas das plantas e é catalisado e mantido pela METHYLTRANSFERASE 1 (MET1) (BEWICK; SCHMITZ, 2017).

O padrão e o papel da metilação do DNA se diferenciam dependendo das características genômicas esperadas. A metilação em sequências repetitivas, como elementos transponíveis, ocorre nos três contextos e exerce a função de sistema imunológico genômico através da supressão da transcrição e impedindo a proliferação de elementos de DNA invasores, conservando a integridade do genoma (FULTZ; CHOUDURY; SLOTKIN, 2015).

No entanto, as citosinas presentes na região transcrita de genes codificadores de proteínas são metiladas nos locais CG e modulam a expressão gênica, correlacionando a expressão induzida e/ou constitutiva da proteína (CHEN et al., 2018).

Nas plantas, o status da metilação do DNA pode ser verificado tanto em nível genômico quanto para genes candidatos específicos (LÄMKE; BÄURLE, 2017). A distribuição genômica da metilação do DNA foi estudada em milho (LAURIA et al., 2017), soja (HOSSAIN et al., 2017), feijão (RICHARD et al., 2017) e trigo (GARDINER et al., 2015).

Em soja, a metilação do DNA foi observada por sequenciamento bissulfito e foi comparada a distribuição e o nível de metilação nos contextos CG, CHG e CHH de raízes, caules, folhas e cotilédones de sementes em desenvolvimento. No total, 2162 regiões diferencialmente metiladas foram identificadas entre os diferentes órgãos. Em cada órgão, regiões hipometiladas estavam significativamente correlacionadas com a regulação positiva da expressão de genes vizinhos (SONG et al., 2013).

Portanto, a metilação da citosina pode ser transmitida através de divisões mitóticas e meióticas. Embora não modifique a sequência de DNA e assim a informação genética, a metilação do DNA é importante para a manutenção e regulação da função e estrutura do genoma, contribuindo para a organização da cromatina em locais heterocromáticos condensados, na regulação da expressão e recombinação de genes. Além disso, pode influenciar processos biológicos, a

regulação do desenvolvimento e respostas a estresses (BRÄUTIGAM; CRONK, 2018).

2.5 Elementos Regulatórios de ação *cis* – ERACs

O estresse causado por fatores abióticos e bióticos é a principal causa de redução da produtividade das plantas. Em condições de estresse, as plantas podem alterar suas funções fisiológicas e/ou morfológicas. A nível molecular, a reprogramação transcricional temporal e espacial é a resposta imediata ao estresse. Essa reprogramação acontece através da interação dos fatores de transcrição com os elementos de regulação *cis* (ERACs) (ZOU et al., 2011).

Os ERACs são motivos regulatórios curtos, geralmente entre 5 e 20 pb, presentes em regiões promotoras de genes alvo, e controlam várias respostas ao estresse. Vários ERACs, como TATA box, GC box e CAAT box, possuem locais de ligação para fatores de transcrição (FTs), intensificadores, sequências isoladas e elementos repressores úteis para a expressão dos genes (KAUR et al., 2017).

A regulação gênica é diretamente influenciada pelos ERACs. Esses elementos estão presentes em diferentes números de cópias, além de distâncias e orientações variáveis em relação ao gene (BIŁAS et al., 2016). A regulação transcricional desempenha um papel fundamental na ativação e supressão da expressão (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

A base molecular do controle da expressão gênica é a seguinte: os FTs se ligam aos seus ERACs correspondentes, localizados nos promotores dos genes-alvo e regulam a transcrição. O controle combinatório da expressão gênica está relacionado com a associação de vários ERACS e seus TFs nos promotores pela combinação entre eles (DEB; KUNDU, 2015).

A maioria dos genes de organismos eucariontes possui um único promotor próximo ao local de início da transcrição, embora alguns genes possuem promotores alternativos que ativam a transcrição em diferentes locais do genoma, sob condições específicas. Os promotores são necessários para que ocorra a transcrição nos eucariotos através da ligação a um conjunto de reguladores transcricionais amplamente utilizados e altamente conservados (WITTKOPP; KALAY, 2012).

Nos promotores dos genes responsivos ao estresse, os ERACs são responsáveis pelas informações sobre a regulação de genes e a sinalização nas

plantas sob condições de estresse (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014).

Em condições de estresse biótico, as plantas ativam um mecanismo completo de resposta. Assim, a caracterização de ERACs responsivos ao estresse a montante das proteínas relacionadas com a defesa a patógenos é relevante. O ERAC W-box, que é o local de ligação para o fator de transcrição WRKY na resposta de defesa de genes de resistência a doenças, foi observado em *Oryza sativa*, *Glycine max*, *Populus trichocarpa*, *Medicago truncatula*, *P. vulgaris* e *Arabidopsis thaliana* (BENSON et al., 2014).

Os ERACs WUN-motif, W-box, GT1-box e TC-rich repeats associados à expressão gênica induzida por estresse biótico foram observados nas regiões promotoras dos genes NBS-LRR em uva, sugerindo que a presença desses elementos, regulam positivamente a expressão de genes de defesa NBS-LRR em situações de estresse causado por patógeno (GOYAL et al., 2019). Em pimenta, os ERACs W-box e TC-rich repeats também foram encontrados nos promotores dos genes *CaWRKY* de pimenta em resposta ao vírus do mosaico do pepino (ZHENG et al., 2019).

O elemento W-box é responsivo a elicitores patogênicos e interagem com os fatores de transcrição da família WRKY. Esse elemento regula a expressão de genes relacionados a defesa durante o estresse biótico e abiótico (KAUR et al., 2017). Genes que possuem o ERAC W-box nas regiões promotoras são alvos de WRKY (FINATTO et al., 2018).

A presença de W-box nos promotores de vários genes WRKY sugere que as propriedades desses FTs são autorreguladas, o que altera a cromatina e os mecanismos transcricionais, formando mais uma camada de complexidade à rede (ABEYSINGHE; LAM; NG, 2019). Assim, os membros da família WRKY possuem expressão aprimorada em resposta ao ataque de diversos patógenos, sinais de defesa e ferimentos (WANI; ASHRAF, 2018).

3. ASSUNTO 1 – Métodos de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

3.1 Introdução ao assunto 1

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) ocupa lugar de destaque na agricultura brasileira, apresentando grande impacto no mercado interno, pois os grãos são as principais fontes de proteínas e minerais na dieta da população, além de representar grande importância socioeconômica (CARVALHO et al., 2014). Entretanto, sua produção é limitada devido vários fatores, incluindo doenças, como o crestamento bacteriano comum, causada pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (BOERSMA et al., 2015; MIKLAS et al., 2017).

A infecção por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode ocorrer através dos estômatos, colonizando as células do mesofilo, causando clorose nas folhas, descoloração do tegumento da semente (CHATURVEDI et al., 2018) e lesões aquosas e avermelhadas no caule e nas vagens (BELETE; BASTAS, 2017). As principais fontes de inóculo são sementes contaminadas, porém no campo, a bactéria também pode se espalhar por respingos de chuvas (TUGUME et al., 2019).

O controle do crestamento bacteriano comum ocorre através de medidas preventivas, como uso de sementes livres de doenças, utilização de cultivares resistentes e rotação de culturas, pois o controle químico apresenta baixa eficiência (SULTANA et al., 2018). Devido a isso, é necessário inocular o patógeno nas sementes ou folhas das plantas a fim de verificar a intensidade e incidência das doenças bacterianas em casas de vegetação e laboratório.

Os métodos de inoculação de folhas por agulhas múltiplas e por incisão com tesoura foram utilizados para determinar a reação de resistência de diferentes genótipos de feijão ao crestamento bacteriano comum (SILVA et al., 2009). Em outras espécies vegetais, os métodos de inoculação para avaliar a interação patógeno-hospedeiro incluíram a imersão de sementes de algodão em suspensão bacteriana de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* por três horas (THEODORO et al., 2011), infiltração a vácuo para testar a virulência de *Pectobacterium carotovorum* subs. *brasiliense* em batata (VAN DER WOLF et al., 2016), corte de folhas de plantas de arroz com uma tesoura embebida em suspensão bacteriana de *Xanthomonas*

oryzae pv. *oryzae* (KIM et al., 2016).

Identificar e desenvolver métodos de inoculação para avaliação de doenças é importante para avaliar um grande número de plantas rapidamente e as interações entre plantas e patógenos sob determinadas condições (RODRIGUES et al., 2017).

Os métodos de inoculação utilizados neste estudo podem auxiliar novos projetos que tenham como objetivo estudar a interação entre o feijoeiro e a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* sob condições controladas, e também fornecer aos melhoristas de plantas um método consistente para avaliar a resistência de cultivares de feijão ao cretamento bacteriano comum antes de projetar testes de reprodução.

O objetivo do trabalho foi identificar o melhor método para inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em dois genótipos de feijão contrastantes para a resistência ao cretamento bacteriano comum.

3.2 Procedimentos metodológicos do assunto 1

3.2.1 Isolamento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*

A bactéria foi obtida a partir de material vegetal com sintomas característicos da doença. As folhas de feijão foram lavadas em água corrente com sabão neutro e secas em papel toalha. Em seguida, em câmara de fluxo laminar, com bisturi esterilizado foram cortados fragmentos de 0,5 x 0,5 cm de tecido vegetal a partir das bordas da lesão e colocados em uma placa de Petri de 9 cm de diâmetro, onde foi realizada a assepsia por meio da imersão em etanol 50% por 30 segundos. Após, os fragmentos foram colocados em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% de cloro ativo por 1 minuto e, em seguida, lavados 3 vezes em água destilada esterilizada (MARIANO; SILVEIRA, 2000).

Após esse procedimento, os fragmentos foram transferidos para uma placa de Petri esterilizada contendo uma gota de água destilada esterilizada, macerados com um pistilo e deixados em repouso por 30 minutos. A semeadura da suspensão bacteriana foi realizada com uma alça de platina em placas de Petri contendo o meio de cultura batata-sacarose-ágar (BSA). As placas foram mantidas em câmaras de crescimento a 28°C, por 24 horas, no escuro. Para obtenção de cultura pura de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, uma colônia foi repicada para outra placa de Petri contendo meio de cultura BSA e armazenada nas condições descritas anteriormente.

Para obtenção da suspensão bacteriana, as colônias puras foram transferidas para tubos de vidro contendo 30 mL de água destilada esterilizada e a concentração foi ajustada em espectrofotômetro para 10^8 UFC mL⁻¹ (OD₅₅₀ = 0,4), pré-determinada por meio de curva de calibração.

3.2.2 Instalação do experimento

O experimento foi conduzido em casa de vegetação da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco – PR. A semeadura das cultivares de feijão foi realizada em vasos de 5L contendo solo argiloso e areia na proporção 3:1 v:v, com adubação recomendada para a cultura. Em cada vaso foram semeadas 10 sementes de uma única cultivar e oito dias após a germinação foi realizado o raleio manual deixando 5 plântulas por vaso. As plantas foram mantidas sob temperatura entre 16 e 28 °C e a irrigação foi realizada manualmente.

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso em arranjo fatorial, sendo 2 cultivares (IPR Colibri – Suscetível e IAC Milênio – Moderadamente Resistente) x 7 métodos (sementes inoculadas por imersão, sementes inoculadas por infiltração a vácuo, folhas inoculadas, folhas somente feridas, caule inoculado, caule somente ferido e plantas não inoculadas (controle)), com 4 repetições.

3.2.3 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes

Antecedendo a inoculação da bactéria nas sementes, foi realizado um teste a para confirmar que a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* não estava presente. Para isso, 1000 sementes foram deixadas em 600 mL de água destilada esterilizada por 16–18 horas a 4°C em Becker. Após, os frascos foram agitados e foi realizada a diluição de 10¹ e 10², pipetando 100 µl da solução em placas de Petri contendo o meio semi-seletivo MT (0,25 g de cloreto de cálcio; 10 g de peptona; 15 g de agar; 0,5 g de tirosina; 10 g de leite em pó e 1 L de água destilada; foram adicionados após autoclavagem 10 mL de Tween 80, 80 mg/L de cefalexina, 200 mg/L de ciclohexamina e 10 mg/L de vancomicina) (GOSZCZYNSKA; SERFONTEIN, 1998) e espalhado sobre a superfície da placa com alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas no escuro a 26-28°C e avaliadas após 3 dias.

No dia da semeadura foi realizada a inoculação das sementes. No método de inoculação por imersão, as sementes foram imersas na suspensão bacteriana por 15

minutos e agitadas com um bastão de vidro. Posteriormente, as sementes foram recolhidas em peneiras. No método de infiltração a vácuo, as sementes foram imersas na suspensão bacteriana contida em um Becker de 250 mL e colocadas em dessecador conectado a uma bomba de vácuo, por 2 períodos de 2 minutos cada, proporcionando um vácuo de 640 mm Hg e liberando-se o vácuo em seguida (LEBEN; SLEESMAN, 1981).

3.2.4 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas folhas

Antecedendo a inoculação da bactéria nas folhas de feijão, as plantas foram irrigadas por aspersão por 10 minutos, a fim de proporcionar um microclima favorável para o desenvolvimento da doença. Para os métodos inoculação do patógeno nas folhas e folhas feridas, foram realizados ferimentos em dois folíolos de cada planta, pelo método de agulhas múltiplas, utilizando cinco agulhas cravadas equidistantes numa rolha de 2 cm de diâmetro.

Os folíolos da terceira folha trifoliada de cada planta de feijão em estágio vegetativo V3 foram colocados sobre uma placa de Petri contendo algodão esterilizado e umedecido com a suspensão bacteriana na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ do isolado de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, pressionando-se o conjunto de agulhas sobre a folha, baseando-se na metodologia de Andrus (1948), utilizado por Maringoni (1998) e descrito por Silva et al. (2009).

Após a inoculação do patógeno e durante o período que se sucedeu à condução do experimento foi realizado molhamento superficial das folhas de feijão por meio de irrigação por aspersão por um período de 10 minutos.

3.2.5 Inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* no caule

A inoculação do patógeno no caule das plantas de feijão foi realizada através da utilização de seringa hipodérmica com agulha com capacidade de 1 mL, contendo a suspensão bacteriana. A agulha foi inserida no caule da plântula abaixo das folhas verdadeiras de forma que a agulha saiu no outro lado, injetando lentamente 0,1 mL do inóculo de *X. axonopodis* pv. *Phaseoli* na concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ dentro da plântula, até que uma gota de cada lado do ferimento ficasse aparente (MAPA, 2009).

3.2.6 Coleta do material vegetal

O fermento e a inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* no caule e nas folhas foram realizados aos 13 dias após a semeadura do feijão. Aos 16 dias após a semeadura, folhas de duas plantas por vaso de cada tratamento foram coletadas, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas em freezer a -80°C até o momento das análises moleculares.

3.2.7 Avaliação da severidade

A severidade da doença foi avaliada aos 21, 28, 35 e 42 dias após a semeadura. A severidade da doença (%) foi estimada para todas as folhas marcadas, utilizando a escala diagramática proposta por Díaz, Bassaneze e Bergamin Filho (2001).

Os dados foram submetidos a análise de variância. Para os efeitos significativos, foi realizada comparação de médias pelo teste Scott-Knott a 1% de probabilidade para os fatores qualitativos, e para os fatores quantitativos realizou-se a análise de regressão. As análises foram processadas no programa WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

3.2.8 Avaliação de massa fresca e seca da parte aérea

Aos 42 dias após a semeadura, as plantas foram coletadas e colocadas em sacos de papel e, em seguida, levadas para laboratório. As folhas e o caule foram separados para que fossem determinados os valores da massa da matéria fresca de folhas (MMFF) e massa da matéria fresca de caule (MMFC). Após esse procedimento, as plantas foram colocadas em estufa a 40°C até atingirem massa constante. Posteriormente, estas foram pesadas e determinou-se a massa da matéria seca de folhas (MMSF) e a massa da matéria seca de caule (MMSC).

Os dados foram submetidos à análise de variância e realizada a comparação entre médias pelo teste de Scott-Knott a 1% de probabilidade de erro utilizando o programa WINSTAT (MACHADO; CONCEIÇÃO, 2003).

3.3 Resultados e Discussão do assunto 1

3.3.1 Severidade do crestamento bacteriano comum

Para a severidade do crestamento bacteriano comum observou-se que houve

diferenças significativas para cultivar, métodos e tempo, porém para blocos não teve diferença. A interação foi significativa para todos os fatores avaliados (Tabela 1).

Tabela 1 - Resumo da análise de variância da severidade do crestamento bacteriano comum causado pela bactéria *X. axonopodis pv. phaseoli* entre as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio, nos diferentes métodos de inoculação. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Fator de variação	GL	Severidade
Cultivar	1	3921,93**
Métodos	6	2373,50**
Tempo	3	6134,58**
Bloco	3	4,27 ^{ns}
Cultivar*Tempo	3	328,07**
Métodos*Tempo	18	184,60**
Cultivar*Métodos	6	268,28**
Cultivar*Métodos*Tempo	18	20,87**
Resíduo	165	2,10**
CV (%)		7,15

**Significativo a 1% de probabilidade de erro. ^{ns} = não significativo. CV = Coeficiente de variação. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Os resultados da comparação de médias da interação cultivar e métodos para análise da severidade indicaram que houve diferença significativa entre cultivares para os métodos analisados, exceto para o controle. Diferenças significativas na severidade da doença também foram observadas entre os métodos analisados em ambas as cultivares de feijão (Tabela 2).

Tabela 2 - Severidade (%) do crestamento bacteriano comum causado pela bactéria *X. axonopodis pv. phaseoli*, entre as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio em diferentes métodos de inoculação. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Métodos	Severidade (%)	
	IPR Colibri	IAC Milênio
Imersão de sementes	49,15b	32,25b
Infiltração à vácuo	51,92a	37,90a
Caule ferido	42,85c	27,13c
Caule inoculado	43,30c	31,06b
Folha ferida	39,06d	20,83d
Folha inoculada	48,20b	25,59c
Controle	1,82e	1,41e
CV (%)		7,15

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade de erro. CV = Coeficiente de variação. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

A severidade da doença foi maior nas plantas que tiveram as sementes inoculadas com a bactéria pelo método infiltração a vácuo tanto para a cultivar IPR Colibri quanto para IAC Milênio, indicando que este método foi o mais eficiente entre os métodos testados (Tabela 2). O método imersão de sementes em suspensão

bacteriana afetou significativamente a colonização da bactéria nas sementes e os sintomas apareceram nas plântulas em ambas cultivares. Entretanto, na cultivar IPR Colibri esse método não diferiu da folha inoculada e na cultivar IAC Milênio não diferiu do método caule inoculado (Tabela 2).

Para os métodos caule ferido e caule inoculado não houve diferenças significativas para a cultivar IPR Colibri. A severidade foi menor nas plantas que tiveram as folhas somente feridas para ambas cultivares. A severidade não diferiu para os métodos caule ferido e folha inoculada na cultivar IAC Milênio (Tabela 2).

A partir desses resultados foi possível inferir que a bactéria pode entrar no sistema vascular da planta e espalhar-se sistematicamente ocorrendo a transmissão da semente para a plântula em cultivares suscetíveis e resistentes. Portanto, sementes contaminadas internamente ou externamente são fontes de inóculo para a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (BELETE; BASTAS, 2017).

A transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* da semente para a plântula em algodoeiro foi verificado por Theodoro et al. (2011), utilizando o método de imersão. Estes autores observaram que esse método não foi eficaz, pois fatores físicos e biológicos, como a concentração da suspensão bacteriana (10^8 UFC.mL⁻¹) e a temperatura (19°C a 29°C), influenciaram as taxas de transmissão de patógenos da semente para a plântula, não sendo possível constatar a presença da bactéria nas plântulas. Comparando os resultados de Theodoro et al. (2011) com os obtidos neste trabalho, pode-se verificar que a quantidade de inóculo utilizada para o método de imersão de sementes foi suficiente para causar os sintomas em plântulas de feijão.

Para o método inoculação a vácuo, resultados semelhantes foram encontrados por Darrasse et al. (2018). Os autores avaliaram a eficiência da transmissão do cretamento bacteriano comum de sementes para plântulas de feijão através da condição infiltração a vácuo e verificaram que tanto cepas patogênicas quanto não patogênicas colonizaram eficientemente as plântulas, demonstrando a capacidade dessas de se translocar de sementes para plântulas.

O método de infiltração a vácuo foi utilizado para testar a virulência de *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* na batata em comparação com outras espécies de *Pectobacterium* e *Dickeya* por Van Der Wolf et al. (2016). A inoculação dos patógenos foi realizada em diferentes densidades nas sementes de batata e foi observado que a infiltração a vácuo com alta densidade de *Pectobacterium*

atrosepticum ou *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* resultou em incidências de doença significativamente maiores que *Dickeya solani*. A inoculação por infiltração a vácuo de sementes de tubérculos com alta densidade ($> 10^4$ UFC mL⁻¹) dos patógenos resultou em alta porcentagem de plantas com sintomas e alta incidência de infecção de tubérculos de progênie entre 11% e 30%.

Os resultados encontrados por Van Der Wolf et al. (2016) corroboram com os encontrados nesse trabalho e demonstra que o método de infiltração a vácuo pode ser útil para avaliar severidade e incidência de doenças em diferentes culturas e selecionar genótipos resistentes.

Para os métodos folha ferida e caule ferido, a severidade pode ser explicada devido as plantas estarem próximas umas das outras, em ambiente favorável para a disseminação do inóculo e desenvolvimento da doença, além de apresentarem ferimentos, que é a principal via de entrada do patógeno na planta. Dentro da planta, a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* se multiplica nos espaços intercelulares e entre 10 e 14 a partir da infecção inicial, a infecção secundária ocorre (BELETE; BASTAS, 2017).

No método de inoculação de folhas utilizando agulhas múltiplas resultados semelhantes foram encontrados por Patil et al. (2017). Para padronizar os métodos de patogenicidade da requeima bacteriana da romã causada por *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*, os pesquisadores utilizaram três métodos de inoculação, infiltração de agulha em folha, agulhas múltiplas e pulverização, e observaram que o método de agulhas múltiplas não foi o melhor para inocular a bactéria nas plantas.

Contudo, o método de inoculação de agulhas múltiplas foi utilizado para avaliar a reação de 58 linhagens de feijoeiro contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* por Ribeiro et al. (2017). Para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* seis linhagens foram resistentes, 14 moderadamente resistentes e 38 suscetíveis. Para *C. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, 11 linhas foram resistentes, 26 moderadamente resistentes e 21 suscetíveis. Os autores observaram diferenças significativas entre os níveis de resistência contra ambos os patógenos e concluíram que o método de agulhas múltiplas é eficiente para avaliar a resistência de linhagens de feijão à patógenos bacterianos.

O método de seringa hipodérmica também foi utilizado por Balaz et al. (2016). A bactéria *Xanthomonas hortorum* pv. *pelargonii* foi inoculada em caules de gerânio e em seis dias após a inoculação apareceram lesões marrons seguida pelo

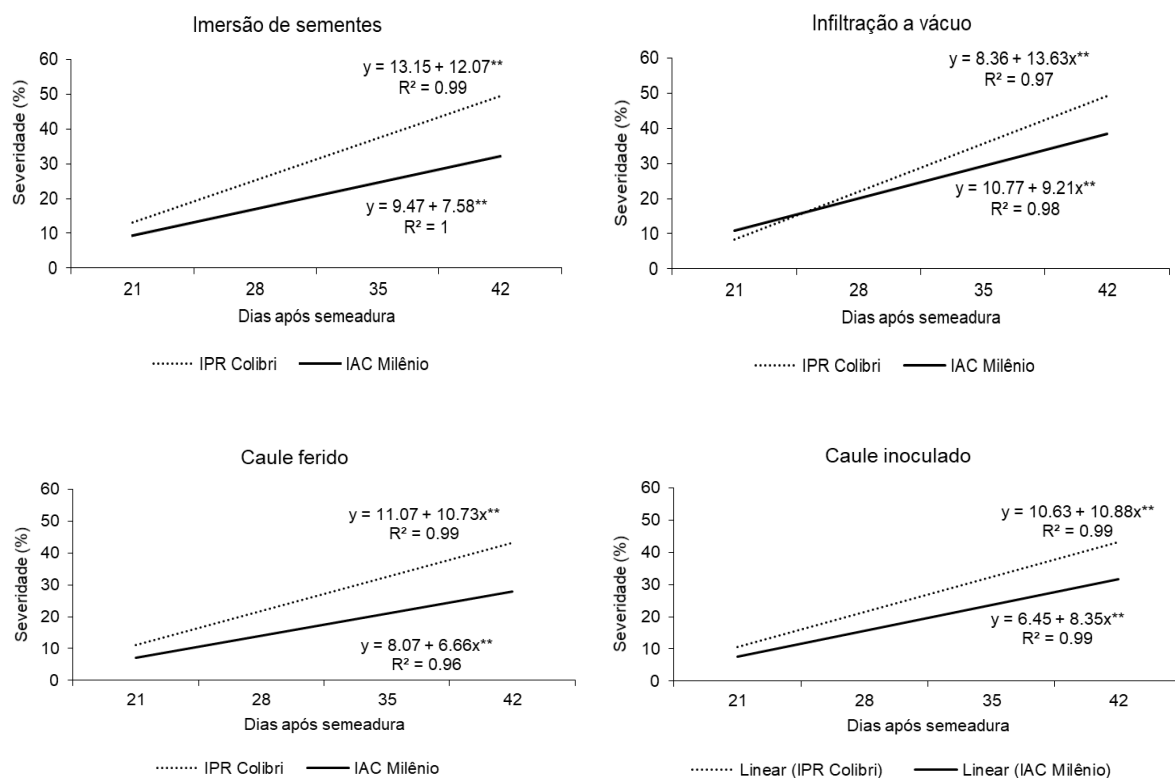
aparecimento de exsudatos e crestamento do tecido, comprovando que esse método é útil para inocular patógenos bacterianos em plantas.

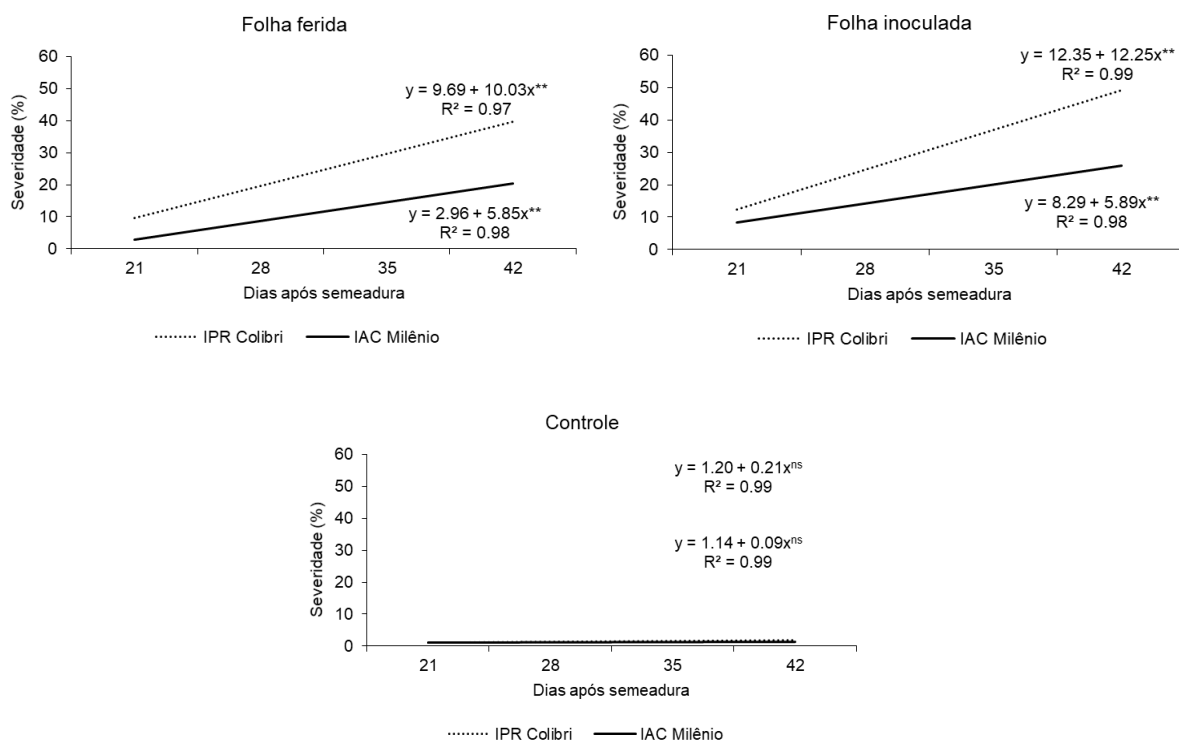
Portanto, entre os métodos utilizados para inocular a bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em cultivares de feijão, o melhor e mais eficiente foi o método infiltração à vácuo. Esse método pode ser utilizado como uma ferramenta complementar para selecionar genótipos de feijão resistentes a patógenos bacterianos.

Em relação a severidade do crestamento bacteriano comum nas cultivares IPR Colibri e IAC Milênio, nos diferentes métodos de inoculação, em diferentes dias, foi observada interação significativa e foi realizada a regressão polinomial.

A severidade da doença foi semelhante em todos os métodos de inoculação e aumentou com o passar do tempo, para as duas cultivares, porém na cultivar IPR Colibri, a severidade foi maior para todos os métodos de inoculação em comparação com a IAC Milênio (Figura 3).

Figura 3 - Severidade do crestamento bacteriano comum causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* entre as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio, nos diferentes métodos de inoculação. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.





**Significativo a 1% de probabilidade de erro. ^{ns} = não significativo. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

O impacto do crestamento bacteriano comum no rendimento, peso e descoloração de diferentes classes de feijão foi avaliado por Boersma et al. (2015), que verificaram que nas plantas inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, a severidade do crestamento bacteriano comum foi elevada na cultivar suscetível.

A severidade do crestamento bacteriano comum também foi avaliada por Hailu et al. (2017). As variedades de feijão Gofa (moderadamente resistente) e Mexican 142 (suscetível) foram inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e a severidade foi avaliada aos 48, 55, 62, 69, 76 e 83 dias após a semeadura. Na variedade suscetível, a severidade da doença foi relativamente maior do que na variedade resistente para todos os tempos analisados. Além disso, aos 83 dias após a semeadura, a severidade foi de 56% para Mexican 142 e 48% para Gofa.

Em feijão-de-corda, a severidade do crestamento bacteriano causado pela bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *vignicola* foi mais elevada nas plantas inoculadas no estágio reprodutivo R3 (76,4%) em comparação com o estágio R2 (57,8%) e ao vegetativo V3 (14,0%) (LIMA-PRIMO et al., 2019).

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho e por Hailu et al. (2017) e Lima-Primo et al. (2019), pode-se concluir que com o desenvolvimento das plantas de feijão

e quanto mais próximo da fase reprodutiva, a severidade da doença aumenta, principalmente em plantas inoculadas com o patógeno. Segundo Torres e Maringoni (1999) e Boersma et al. (2015), as plantas de feijão parecem ser mais suscetíveis a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* na fase reprodutiva do que na fase vegetativa.

3.3.2 Acúmulo de massa fresca e seca da parte aérea

Para MMFF, MMFC, MMSF e MMSC foram observadas diferenças significativas ($p < 0,01$) entre cultivares, métodos de inoculação e interação significativa entre cultivar e condição.

As MMFF, MMSF, MMFC e MMSC foram significativamente maiores na cultivar IAC Milênio em comparação com a cultivar IPR Colibri para todos os métodos de inoculação testados (Tabela 3).

Tabela 3 - Análise de comparação entre médias para massa da matéria fresca de folha (MMFF), massa da matéria seca de folha (MMSF), massa da matéria fresca de caule (MMFC) e massa da matéria seca de caule (MMSC) para as cultivares IPR Colibri e IAC Milênio em diferentes métodos de inoculação da bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Métodos	IPR Colibri				IAC Milênio			
	MMFF	MMSF	MMFC	MMSC	MMFF	MMSF	MMFC	MMSC
Imersão	4,85bB	0,95bB	2,91bB	0,65bB	6,49bA	1,11bA	4,17bA	0,75aA
Infiltração à vácuo	4,02cB	0,85cB	2,48bB	0,52cB	5,86cA	0,98cA	3,97bA	0,66bA
Caule ferido	4,80bB	0,98bB	2,83bB	0,55cB	6,35bA	1,10bA	4,17bA	0,75aA
Caule inoculado	4,03cB	0,81cB	2,69bB	0,52cB	5,52cA	0,90cA	3,61cA	0,60bA
Folha ferida	4,86bB	0,95bB	2,90bB	0,65bB	6,50bA	1,07bA	4,10bA	0,74aA
Folha inoculada	4,07cB	0,81cB	2,71bB	0,59cB	6,38bA	0,96cA	4,53aA	0,77aA
Controle	5,29aB	1,12aB	3,20aB	0,71aB	7,90aA	1,25aA	4,62aA	0,81aA
CV (%)	6,41	6,80	5,38	6,43				

Médias seguidas de letras minúsculas distintas na coluna e letras maiúsculas distintas na linha diferem entre si pelo teste de Scott-Knott, a 1% de probabilidade de erro. CV = Coeficiente de variação. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Para a cultivar IPR Colibri foi observado que a MMFF e a MMSF foram menores para os métodos infiltração a vácuo, caule inoculado e folha inoculada na cultivar IPR Colibri. A MMFC foi maior no controle, diferindo dos demais métodos, e a MMSC foi menor nos métodos infiltração a vácuo, caule ferido, caule inoculado e folha inoculada (Tabela 3).

Na cultivar IAC Milênio foi verificado que a MMFF foi menor para infiltração a vácuo e caule inoculado, e a MMSF foi menor para os métodos infiltração a vácuo,

caule inoculado e folha inoculada. A MMFC foi maior no controle, porém não diferiu do método folha inoculada. No entanto, para os demais métodos foi verificado que MMFC foi menor em plantas com caule inoculado, diferindo de todos os outros. Para a MMSC, os métodos infiltração a vácuo e caule inoculado tiveram as menores massas, 066 e 060, respectivamente. Os demais métodos não diferiram do controle (Tabela 3).

A diferença da MMFF, MMSF, MMFC e MMSC entre as cultivares ocorreu devido as diferenças de suscetibilidade das plantas ao patógeno. Folhas com halos amarelos e secas foram observadas durante as avaliações.

O crestamento bacteriano comum pode provocar a desfolhação prematura, reduzindo a área fotossintética disponível e interferir na translocação de água e nutrientes, afetando a massa da matéria fresca e seca da parte aérea (BELETE; BASTAS, 2017). Além disso, essa doença reduz a taxa fotossintética líquida da planta devido a redução da área foliar causada pelas lesões e pela redução da eficiência fotossintética dos tecidos verdes restantes da folha (DÍAZ; BASSANEZE; BERGAMIN FILHO, 2001).

A redução da massa da matéria da parte aérea pode estar relacionada com a severidade da doença, pois as menores massas foram observadas nas plantas dos métodos de inoculação com maior severidade.

Através de reações fotoquímicas, as plantas assimilam energia luminosa para gerar ATP e NADPH, que são usados no ciclo de Calvin para a produção de assimilados. Contudo, a etapa fotoquímica do fotossistema II é reduzida pela infecção de patógenos virulentos ou avirulentos. A redução nessa etapa fotoquímica ocorre não apenas nos locais de infecção, mas também nos tecidos circundantes (JIAO et al., 2016).

A infecção por bactérias virulentas ou avirulentas geralmente leva a diminuição da fotossíntese (GÖHRE et al., 2012). Além disso, os efetores bacterianos podem reprimir genes de plantas que codificam proteínas envolvidas na biossíntese de pigmentos, transporte de elétrons e ciclo Benson-Calvin durante a interação compatível (PÉREZ-BUENO et al., 2015).

Assim, a fotossíntese e outros processos associados ao metabolismo primário, como síntese ou degradação de carboidratos, aminoácidos e lipídios, geralmente são desregulados em algumas interações planta-patógeno, sugerindo que a energia economizada é desviada e utilizada para respostas de defesa (BERGER; SINHA;

ROITSCH, 2007).

Segundo Boersma et al. (2015), perdas de rendimento entre 22 e 40% foram encontradas para cultivares de feijão suscetíveis infectadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, reduzindo o retorno econômico.

Portanto, a redução na massa da matéria da parte aérea das plantas infectadas com o patógeno está relacionada com a severidade do crestamento bacteriano comum.

3.4 Conclusões sobre o assunto 1

- A severidade do crestamento bacteriano comum é mais elevada na cultivar IPR Colibri (suscetível) para todos os métodos analisados.

- A severidade da doença é maior nas plantas inoculadas pelo método infiltração a vácuo para ambas cultivares de feijão estudadas. Esse método é o mais indicado para inocular *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão. No entanto, novos trabalhos são necessários a fim de avaliar o tempo e a dificuldade para inocular o patógeno, e os custos, para cada método.

- A severidade da doença foi menor nas plantas que tiveram somente as folhas feridas tanto para a cultivar IPR Colibri quanto para IAC Milênio.

- A severidade da doença aumenta com o passar dos dias nas duas cultivares de feijão para todos os métodos de inoculação analisados.

- A MMFF, MMSF, MMFC e MMSC estão relacionadas com a severidade do crestamento bacteriano comum.

- A MMFF, MMSF, MMFC e MMSC foi menor nas plantas do método infiltração a vácuo, em que a severidade é maior, para ambas cultivares de feijão.

- A MMFF, MMSF, MMFC e MMSC são maiores na cultivar IAC Milênio.

4. ASSUNTO 2 – Expressão gênica e metilação do DNA em promotores de genes de feijão em resposta ao cretamento bacteriano comum

4.1 Introdução ao assunto 2

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é uma das leguminosas mais importantes, devido à sua extensa produção, seus valores nutricionais e seu impacto comercial (MOKRANI et al., 2019). No entanto, um dos fatores que limitam a produtividade da cultura é a ocorrência de doenças, como o cretamento bacteriano comum causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (ALLADASSI et al., 2018).

O cultivo de variedades resistentes é a principal medida eficaz e econômica para o controle de doenças em feijão, porém isso tem se mostrado um desafio para a produção dessa cultura. Entretanto, a descoberta de novos genes de resistência é importante para a criação de variedades de feijão resistentes a doenças (WU et al., 2017).

As respostas de defesa das plantas ao ataque de patógenos dependem do reconhecimento do patógeno a nível celular, ativando vias de sinalização complexas e reprogramando a transcrição gênica (NEJAT et al., 2017). Essas respostas estão relacionadas com dois mecanismos de resistência, a imunidade desencadeada por PAMP (PTI) e imunidade desencadeada por efector (ETI). O PTI é o primeiro nível de imunidade vegetal e é ativado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que reconhecem os PAMPs (ZIPFEL, 2014). Entretanto, a ETI é mediada por receptores de ligação a nucleotídeos com repetições ricas em leucina (NBS-LRR) (CUI; TSUDA; PARKER, 2015).

No genoma, os genes de defesa à patógenos formam grupos de genes que contêm sequências repetitivas e elementos transponíveis. A natureza repetitiva desse agrupamento facilita a diversificação de sequências e a rápida expansão desses genes, promovendo a recombinação desigual. Os elementos transponíveis inseridos na região promotora dos genes regulam a expressão gênica, alterando o estado epigenético dos genes (ESPINAS; SAZE; SAIJO, 2016).

Os mecanismos epigenéticos estão relacionados em diversos processos de desenvolvimento da planta, alterando a plasticidade fenotípica e influenciando nas respostas adaptativas a condições e instabilidades (GALLUSCI et al., 2017). As

modificações epigenéticas, incluindo a metilação do DNA, modificações de histonas e mudança de RNA não codificantes, influenciam a estrutura da cromatina e conseqüentemente a acessibilidade da informação genética (ZHANG; LANG; ZHU, 2018).

As modificações epigenéticas, como a metilação do DNA, desempenham papéis importantes na regulação da expressão gênica em plantas. Investigar os mecanismos que controlam a expressão diferencial dos genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos em feijão podem auxiliar o entendimento da reprogramação da expressão gênica sob estresse biótico.

Portanto, os objetivos foram analisar a expressão de genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos e verificar o padrão de metilação na sequência de DNA dos promotores desses genes nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta ao cretamento bacteriano comum.

4.2 Procedimentos metodológicos do assunto 2

4.2.1 Análise dos perfis de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa

4.2.1.1 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências codificadoras (CDS) do genoma de *P. vulgaris* v2.1 (SCHMUTZ et al., 2014) depositadas no banco de dados *Phytozome* v12.1 (<http://www.phytozome.net>) (GOODSTEIN et al. 2012). Como genes normalizadores (referência) foram utilizados ubiquitina, actina e tubulina. Os genes alvo *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* da família NBS-LRR foram utilizados para verificar a expressão gênica.

O desenho dos iniciadores foi feito no programa computacional *Primer3Plus* (UNTERGASSER et al, 2007) apresentando tamanhos de amplicons de 200 a 350 pares de bases, tamanho dos iniciadores com aproximadamente 20 pares de nucleotídeos e temperatura de anelamento próximo de 60°C (Tabela 4). Através da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) no banco de dados do *Phytozome* v12.1 (<http://www.phytozome.net>) (GOODSTEIN et al. 2012), as

sequências dos oligonucleotídeos foram alinhadas com as CDS no intuito de confirmar a posição dos iniciadores *forward* e *reverse*.

Tabela 4 - Iniciadores, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho fragmento amplificado dos genes relacionados a defesa à patógenos em feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Código do Gene		Sequência de nucleotídeos	TA (°C)	TP (pb)
<i>PvUbi</i>	<i>Forward</i>	GCCTTCATGAGGCATCAAAT	53,4	335
	<i>Reverse</i>	AGATGCCTCTGCGTGATCTT	56,3	
<i>PvAct</i>	<i>Forward</i>	TCACCATACTTGGCCACAAA	54,5	320
	<i>Reverse</i>	CAGATCTCCGGGAAAAATCA	52,2	
<i>PvTub</i>	<i>Forward</i>	AGGCCTACCATGAGCAGCTA	58,8	315
	<i>Reverse</i>	CGACAGCTGTGTTGTTGCTT	56,3	
<i>Pv001</i>	<i>Forward</i>	TTGCCTTTATTGCTGTGCTG	54,0	271
	<i>Reverse</i>	CCTTCCATGACTCCCAAGAA	54,3	
<i>Pv002</i>	<i>Forward</i>	GCCCAACAACCTAGGAGACA	56,8	260
	<i>Reverse</i>	GGTTCAGCTGCTCCACTTTC	56,3	
<i>Pv003</i>	<i>Forward</i>	TTCGTCTACTCGCTCCGTTT	56,0	281
	<i>Reverse</i>	TTGACGGAGAAAGGGATTTG	52,7	
<i>Pv004</i>	<i>Forward</i>	AAGCGCTGGAAACGTCTATG	55,4	274
	<i>Reverse</i>	TGGCCAACCTTGAGCACTACA	56,7	
<i>Pv005</i>	<i>Forward</i>	TGATGCTTTTGCCTCACTTG	53,7	249
	<i>Reverse</i>	GCAAGGAAGCTTCGATCAAC	54,3	

TA: Temperatura de Anelamento; TP: Tamanho do Produto. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

4.2.1.2 Extração do RNA total

Todo material utilizado (cadinhos, pistilos, espátulas, béqueres) foi tratado previamente com água DEPC 0.1% (0.1 ml de DEPC foram dissolvidos em 100 ml de água ultrapura em agitador magnético). A solução não foi autoclavada, pois após a autoclavagem o DEPC torna-se ineficiente. As bancadas, cubas e pipetas foram previamente limpas com papel toalha contendo RNase away™ (Invitrogen) para evitar contaminação com RNases. Todo o procedimento foi realizado utilizando luvas.

As folhas de feijão dos tratamentos sementes inoculadas por imersão e plantas não inoculadas (controle) foram utilizadas para análise da expressão gênica. Para extração do RNA total de cada amostra, aproximadamente 100 mg de folha foram trituradas em cadinhos contendo nitrogênio líquido e posteriormente transferidas para um microtubo de 2 mL. Em seguida, foi adicionado 1mL de Quick-Zol® (TRIzol - Ludwig Biotec) em cada amostra e os microcubos foram acondicionados em caixa contendo gelo.

Após esse processo, as amostras foram homogeneizadas em vórtex e foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente (25°C). Após, foram adicionados 200 µL de clorofórmio em cada amostra, misturou-se vigorosamente em vórtex por 15

segundos e foram incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Passado o tempo, as amostras foram centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos à 4°C.

A fase aquosa foi transferida para um tubo limpo esterilizado, foram adicionados 500 µL de isopropanol em cada amostra e misturou-se por inversão. Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente (25°C) por 10 minutos e após, centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos à 4°C. No passo seguinte, o sobrenadante foi descartado, o RNA sedimentado foi lavado com 1 mL de etanol 75% e foi realizada a centrifugação a 7.500 g por 5 minutos à 4°C. Após, o sobrenadante foi descartado e o RNA foi dissolvido em 20 µL de água livre de RNase. O RNA foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

A quantificação do RNA foi realizada em espectrofotômetro. As leituras da absorbância (OD) foram feitas a 230, 260 e 280 nm. A razão 260/230 foi superior a 2 e a razão entre as absorbâncias a 260/280 estava entre 1,8 e 2,0, não havendo contaminação com proteínas. Com base na absorbância foi calculada a concentração do RNA em ng/µL para cada amostra. A verificação da integridade do RNA foi realizada em eletroforese em gel de agarose 1%, corado com Gel Red® (Biotium) e observado em transiluminador.

4.2.1.3 Síntese da primeira fita de cDNA (DNA complementar)

A primeira fita de cDNA foi sintetizada a partir de 2µg de RNA. O RNA de cada amostra foi tratado com a enzima DNase ITM (Amplification Grade Dnase I, Invitrogen) para eliminação do DNA. Após o tratamento, foi realizada PCR e eletroforese a fim de confirmar a total digestão do DNA.

Para síntese da primeira fita de cDNA, foi realizada a transcrição reversa utilizando a enzima MMLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) transcriptase reversa (Ludwig Biotecnologia Ltda) de acordo com as recomendações do fabricante utilizando o iniciador Oligo d(T)12-18TM (Invitrogen) para que a síntese da primeira fita de cDNA iniciasse a partir da cauda poli-A da molécula de RNAm (RNA mensageiro).

4.2.1.4 RT-PCR semiquantitativa

As reações de RT-PCR foram realizadas em termociclador em reações com volume final de 12,5 µL, acompanhadas de um controle de contaminação da reação ausente de material genético. Para a amplificação dos fragmentos, o termociclador foi

programado para uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 36 ciclos de 95°C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica de cada iniciador por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. No final do programa de PCR, um passo final a 72°C por 10 minutos para extensão final dos fragmentos foi incluído.

O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,8%, corado com Gel Red® (Biotium), durante 3 horas e 15 minutos a 80 volts. Após a corrida, o gel foi observado em transiluminador e fotodocumentado.

4.2.1.5 Análises estatísticas

As imagens foram armazenadas e os perfis de expressão de cada gene alvo foram avaliados pela densitometria das bandas utilizando o *software ImageJ* (RASBAND, 1997-2015).

A análise da estabilidade dos genes de referência foi realizada no software geNorm (*Gene Quantification*: <http://download.gene-quantification.info/>). No geNorm, o coeficiente de estabilidade é chamado de “valor M”, quanto menor o valor M, maior a estabilidade do gene referência (VANDESOMPELE et al., 2002).

Os valores de fluorescência para os genes alvo foram calculados com base na metodologia proposta por Cools e Ishii (2002): $[(FA/(FR+FA))*100]$, sendo FA = valor de fluorescência do gene-alvo, FR = valor de fluorescência do gene referência.

4.2.2 PCR para determinar o padrão de metilação do DNA usando enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM)

4.2.2.1 Identificação dos Sítios de Restrição das Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação (ERSM) nas sequências de DNA

Para encontrar quais eram as ERSM que clivavam a sequência da região promotora, o arquivo contendo as sequências promotoras de DNA foi analisado no *software Restriction Mapper* (<http://www.restrictionmapper.org/>). O resultado da análise contendo a denominação da enzima e a posição do sítio de restrição foram anotados.

4.2.2.2 Desenho dos iniciadores

Os iniciadores que flanqueiam a região de interesse contendo o sítio de restrição das ERSM foram desenhados no programa *Primer3Plus*

(<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) (UNTERGASSER et al, 2007) e sintetizados artificialmente (Tabela 5).

Tabela 5 - Iniciadores, sequência de nucleotídeos, temperatura de anelamento e tamanho fragmento amplificado dos genes relacionados a defesa à patógenos em feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Código do Gene		Sequência de nucleotídeos	TA (°C)	TP (pb)
<i>Pv001</i>	<i>Forward</i>	CAGCGTTCCATCAAATCACA	53,5	314
	<i>Reverse</i>	TTTCATGCGTGGTTCAAAA	51,3	
<i>Pv002</i>	<i>Forward</i>	GGAGCACATTTTGTGGCTTT	54,3	462
	<i>Reverse</i>	CGGGCAAAGCAAGATTTTAG	52,3	
<i>Pv003</i>	<i>Forward</i>	CAAGGAGGCAAAACAAGAGG	54,0	387
	<i>Reverse</i>	ATGGTTGATCACCGTCCATT	54,3	
<i>Pv004</i>	<i>Forward</i>	TTGTGAAGCCCATAAACTCCT	54,1	295
	<i>Reverse</i>	TTGCCGTTATTTTCTCACCA	52,3	
<i>Pv005</i>	<i>Forward</i>	GTGGAGGTGAACCGTGACTT	57,2	414
	<i>Reverse</i>	TCAACACATGAAGCACAGCA	55,1	

TA: Temperatura de Anelamento; TP: Tamanho do Produto. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

4.2.2.3 Extração do DNA total

A extração do DNA das folhas de feijão inoculadas pelo método de imersão de sementes em suspensão bacteriana foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987), com modificações. Com auxílio de almofariz e pistilo, as folhas foram maceradas em nitrogênio líquido até obter um pó bem fino. Ao tubo contendo folha macerada foram adicionados 600 µl de tampão de extração (20 mM de EDTA, 50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 1,1 M de NaCl, 1% de CTAB, 2% de PVP40, 0,5% de Tween 20, 0,4 M de LiCl, 2% de β-mercaptoetanol). Os tubos foram levados ao banho-maria a 60°C por 25 min. O DNA foi separado da solução por precipitação com clorofórmio álcoolisoamílico (24:1) e centrifugação. Em seguida foram realizadas sucessivas lavagens com etanol para obtenção de um DNA limpo. Depois de seco, o DNA foi ressuspendido em tampão TE tratado com RNase. O DNA obtido foi armazenado a -80°C até o momento do uso.

Após a extração, a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose a 1%, corado com Gel Red® (Biotium), durante 1 hora a 80 volts, e a quantidade foi aferida em espectrofotômetro.

4.2.2.4 PCR

O DNA foi clivado com a ERSM *HpyCH4IV* (Ludwig Biotec) conforme recomendações do fabricante. Após a digestão, foi realizada a PCR para verificar o

anelamento dos iniciadores e amplificação dos fragmentos. O termociclador foi programado para uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 36 ciclos de 95°C por 1 minuto, temperatura de anelamento específica de cada iniciador por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. No final do programa de PCR, um passo final a 72°C por 10 minutos para extensão final dos fragmentos foi incluído. Na ausência de metilação, o DNA foi clivado e não foi amplificado por PCR. Já na presença de metilação, o DNA permaneceu intacto e foi amplificado pelos iniciadores.

Os produtos de amplificação foram resolvidos em gel de agarose a 1,8%, corado com Gel Red® (Biotium), durante 3 horas e 15 minutos a 80 volts. Os fragmentos amplificados foram observados em transiluminador e fotodocumentado. Para determinação do tamanho dos fragmentos amplificados foi utilizado o marcador de peso molecular DNA Ladder 100 pb.

4.3 Resultados e Discussão do assunto 2

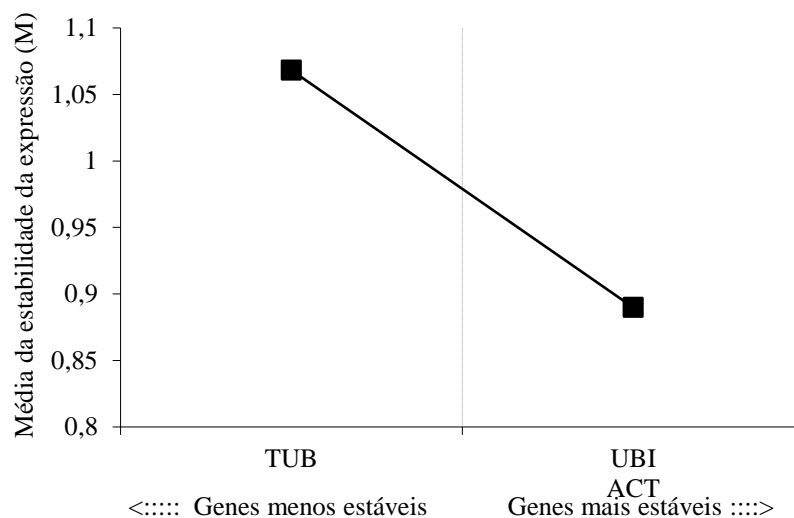
4.3.1 Análise dos perfis de expressão gênica por reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR) semiquantitativa

4.3.1.1 Análise da estabilidade dos genes de referência

Na análise dos genes de referência utilizando o programa geNorm, todos os três genes candidatos apresentaram valores de M inferiores a 1,5. O geNorm calcula a estabilidade dos genes de referência através do valor de corte para a adequação (M) e o número de genes necessários para a normalização nas diferentes condições pela variação da média em pares. A exclusão do gene com o maior valor M permite a classificação dos genes testados de acordo com as suas estabilidades de expressão (VANDESOMPELE et al., 2002).

A validação de genes de referência é necessária para a precisão dos níveis de transcritos de genes alvo. O gene mais estável nessas amostras foi o da ubiquitina (UBI) (M=1,006), seguido da actina (ACT) (M=1,041). O gene da tubulina (TUB) apresentou maior valor (M=1,157) e foi considerado menos estável, segundo a classificação do geNorm (Figura 4).

Figura 4- Valores médios de estabilidade de expressão dos genes de referência nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes pelo método de imersão. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.



Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Para análise da expressão gênica, os genes de referência podem ser utilizados na normalização de variações experimentais. A normalização da expressão do gene alvo usando genes de referência é importante para obter resultados confiáveis (LIU et al., 2016).

Os genes de referência TUB e ACT, codificadores de proteínas responsáveis pelo metabolismo básico das células e pela manutenção das estruturas, são comumente utilizados em estudos de expressão gênica. A expressão desses genes nos tecidos e células não deve ser alterada, independentemente do estresse causado, porém, a estabilidade desses genes pode variar consideravelmente, demonstrando que é necessário identificar o gene mais adequado para cada modelo experimental (WAN et al., 2017).

A identificação e a validação de genes de referência para estudos de expressão gênica utilizando RT-PCR semiquantitativa também foram avaliadas em *Rosa hybrida* por Meng et al (2013). Os perfis de expressão de 15 genes de referência candidatos das famílias ACT, TUB e UBI em pétalas de rosas nos tratamentos desidratação, etileno, ABA, GA3 e pétalas feridas foram avaliados. Os autores concluíram que o gene referência RhUBI1 era o mais estável sob diferentes condições de pós-colheita, e o RhACT4 para tratamentos com GA3 / ABA, ferimentos e estames.

A estabilidade dos genes de referência pode ser alterada com a penetração de

patógenos nas células das plantas. Vírus, bactérias e fungos podem induzir alterações metabólicas, modificando a reprogramação da expressão gênica em diferentes órgãos da planta e também a expressão dos genes de referência (FIGUEIREDO et al., 2013; MONTEIRO et al., 2013).

Como neste trabalho, os genes UBI, ACT e TUB também foram utilizados como genes de referência em diversos trabalhos relacionados ao estresse de plantas causado por patógenos (PETRICCIONE et al., 2015; EBADZAD; CRAVADOR, 2014; CAMPA; FERREIRA, 2017). Portanto, a avaliação de genes de referência durante estresse biótico é necessária para estudos de expressão gênica.

4.3.1.2 Perfil de expressão dos genes alvo

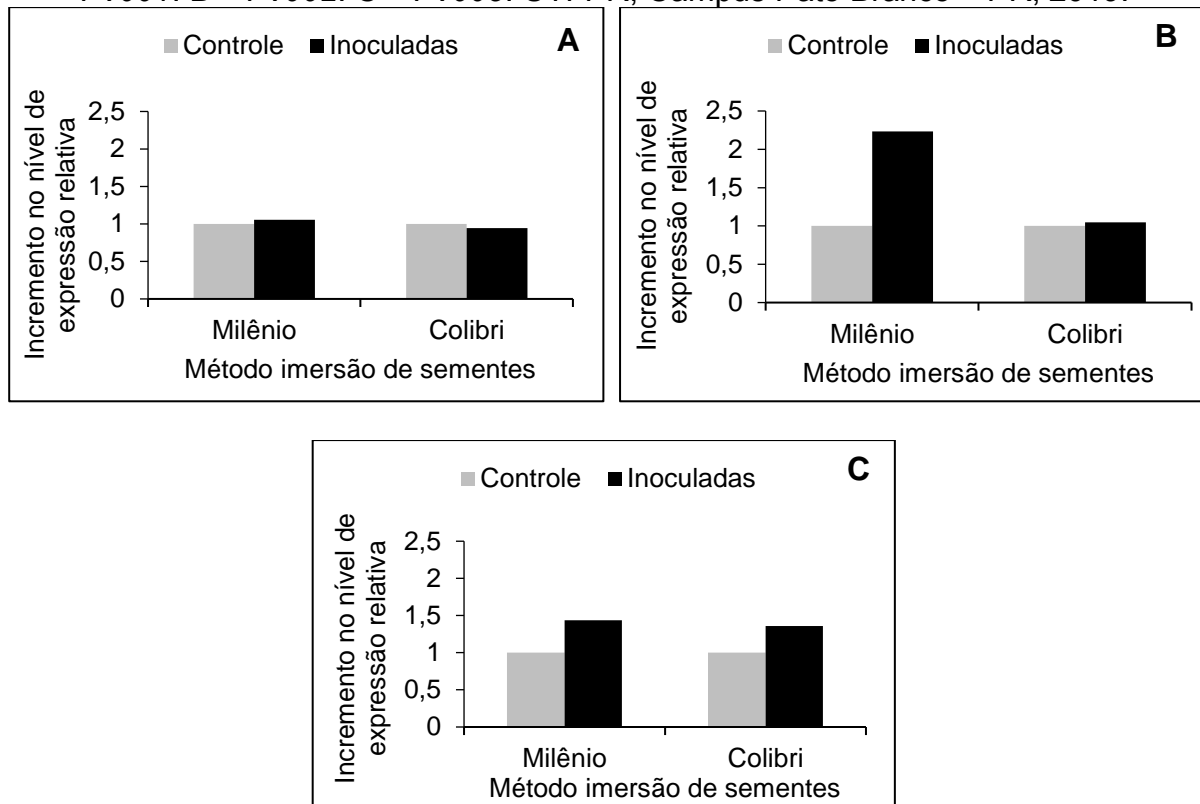
Em relação a análise genética entre as cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta a inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes pelo método de inoculação por imersão foi possível observar que entre os 5 iniciadores analisados 3 apresentaram bom perfil de amplificação. O gene referência UBI foi utilizado para avaliar o perfil de amplificação e o incremento de expressão dos genes alvo, por ser o mais estável.

O incremento no nível de expressão dos genes alvo *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300* e *Phvul.005G054300* em relação ao gene referência UBI para as duas cultivares de feijão pode ser observado na Figura 5.

Os resultados da RT-PCR indicaram que a expressão dos genes *Phvul.002G092300* e *Phvul.005G054300* foi induzida pela infecção por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes em ambas as cultivares de feijão, porém não houve incremento no nível de expressão do gene *Phvul.001G014400* para a cultivar suscetível.

A expressão dos genes *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300* e *Phvul.005G054300* apresentaram incremento de 1,05, 2,23 e 1,43 vezes, respectivamente, em relação ao controle na cultivar IAC Milênio, considerada moderadamente resistente. Na cultivar IPR Colibri, o incremento na expressão foi de 1,04 e 1,35 para os genes *Phvul.002G092300* e *Phvul.005G054300*, respectivamente (Figura 5).

Figura 5- Incremento no nível de expressão dos genes alvo em relação ao gene referência UBI nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes pelo método de imersão. A – Pv001. B – Pv002. C – Pv005. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.



Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Resultados semelhantes foram observados por Chen et al. (2017) e Wu et al. (2017), que estudaram a expressão de genes de defesa em resposta a patógenos em cultivares de feijão resistentes e suscetíveis. As análises de expressão dos genes *Phvul.001G243500*, *Phvul.001G243600*, *Phvul.001G243700* e *Phvul.001G243800* nas cultivares de feijão Hongyundou (resistente) e Jingdou (suscetível), sob condição controle e tratamento inoculado com *Colletotrichum lindemuthianum*, revelaram que todos os quatro genes foram expressos em níveis significativamente mais elevados no genótipo resistente do que no genótipo suscetível (CHEN et al., 2017).

A expressão de genes de defesa de feijão em respostas ao crescimento bacteriano comum em linhagens resistentes e suscetíveis foram estudados por qRT-PCR. Entre os 178 genes NBS, 171 genes foram analisados. A expressão de 141 genes foi significativamente alterada em pelo menos um ponto de tempo comparado a 0 h. Entre esses genes, a expressão de 40 genes foi alterada apenas no genótipo resistente (HR45), 49 genes apenas no genótipo suscetível (Bilucidou) e 52 em

ambos os genótipos inoculados. Dos 52 genes em comum, 10 genes apresentaram o mesmo padrão de expressão nos dois genótipos de 0 a 48 h após a inoculação, 11 tiveram regulação negativa apenas no genótipo resistente, mas regulação positiva ou não foram expressos na cultivar sensível após infecção por patógeno, e 8 genes foram mais expressos no genótipo resistente do que no genótipo suscetível após a inoculação (WU et al., 2017).

Em outras espécies de plantas também foi observado que a expressão de genes de defesa em resposta a patógenos foi maior na cultivar resistente. A expressão de genes específicos R, NPR1 e PR foi investigado para determinar o seu papel na resistência de *Musa balbisiana* a *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* por PCR semiquantitativa. Os níveis de expressão do gene *MbNBS*, relacionado a resistência a doenças aumentou significativamente no genótipo resistente, entretanto, no genótipo suscetível, a expressão deste gene aumentou gradualmente, mas permaneceu significativamente menor que os níveis basais (SSEKIWOKO et al., 2015).

Em grão-de-bico, o padrão de expressão dos genes NBS-LRR foi estudado em dois genótipos resistentes (CDC Corinne e CDC Luna) e um suscetível (ICCV 96029) em diferentes momentos após a infecção por *Ascochyta*. Vinte e sete genes NBS-LRR mostraram expressão diferencial em resposta à infecção pelo fungo em pelo menos um genótipo em um único momento. Entre estes, os genes LOC101509145, LOC101498915 estavam expressos exclusivamente na cultivar CDC Corinne (SAGI; DEOKAR; TAR'NA, 2017).

Em *Brassica napus*, a análise transcriptômica comparativa revelou que entre 57 genes RLKs, 19 estavam expressos exclusivamente na cultivar resistente, em resposta a *Sclerotinia sclerotiorum* (WU et al., 2016). Em café, um aumento significativamente maior na expressão de um gene RLK (7,5 vezes), relacionado com o reconhecimento e sinalização durante a resposta de resistência a *Colletotrichum kahawae*, foi observado na cultivar resistente (DINIZ et al., 2019).

Diversos estudos demonstraram que os genes NBS-LRR e RLK podem estar envolvidos no reconhecimento da presença de patógenos pelas plantas e conferir resistência. A função de pelo menos 350 genes NBS-LRR foi estudada em arroz e os resultados indicaram que esses genes desempenharam um papel crucial na resistência à brusone (FUKUOKA et al., 2014). A expressão de um gene cultivado de

amendoim CC-NBS-LRR foi aumentada após a infecção por *Aspergillus flavus*, sugerindo seu papel na resistência a doenças (LI et al., 2013). A superexpressão do gene *RXam1* da mandioca, que codifica um RLK, conferiu resistência a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (TATIS et al., 2018).

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstraram que os genes de defesa relacionados com estresse biótico, como NBS-LRRs e RLKs, são mais expressivos na cultivar resistente, sugerindo que esses genes podem aumentar sua expressão durante o ataque de patógenos.

O estudo de genes relacionados com a resposta de defesa das plantas a patógenos também foi realizado em arroz inoculado com o fungo *Magnaporthe oryzae*, no qual 116 genes candidatos foram classificados em oito grupos principais, no entanto, entre esses, 34 genes NBS-LRR e 17 RLKs foram encontrados (KANG et al., 2016). Os resultados encontrados por Kang et al. (2016) corroboram com os encontrados nesse estudo, indicando que genes com diferentes funções biológicas foram associados à resistência a diferentes patógenos em plantas.

Portanto, embora as proteínas PRRs e NLRs estejam localizadas em compartimentos celulares distintos e sejam diferentes estruturalmente, compartilham a mesma sinalização a jusante, como Ca^{2+} , espécies reativas de oxigênio, sinalização de fito-hormônios e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), bem como a reprogramação transcricional (PENG; VAN WERSCH; ZHANG, 2018).

Na maioria das respostas adaptativas das plantas, o controle da expressão gênica possui uma fina regulação e uma resposta cinética rápida com reversibilidade controlada, permitindo que a célula altere sua capacidade transcricional na presença do estresse e volte ao seu estado inicial quando o estresse for removido, de forma muito rápida. Em células eucarióticas, a mudança de expressão gênica, alterações no metabolismo e no ciclo celular, homeostase de proteínas do citoesqueleto, tráfego de organização vesicular e modificação de atividades enzimáticas são componentes essenciais em respostas ao estresse (DE NADAL; AMMERER; POSAS, 2011).

O posicionamento e o espaçamento dos nucleossomos e suas modificações pós-tradução, juntamente com a metilação do DNA, afetam a acessibilidade dos elementos reguladores (LÄMKE; BÄURLE, 2017) e a expressão gênica (HOLOCH; MOAZED, 2015). As plantas são estreitamente dependentes de mudanças na expressão gênica para responder a estímulos ambientais, e a regulação da expressão

baseada na cromatina é crucial para essas respostas.

A comparação da desmetilase tripla do mutante *ros1-dml2-dml3* e do tipo selvagem de *Arabidopsis thaliana* revelou que a hipermetilação do DNA no mutante ocorre nas regiões que flanqueiam os corpos gênicos, incluindo regiões promotoras a montante do gene. Nas plantas *ros1-dml2-dml3*, mais de 200 genes estavam reprimidos em resposta ao estresse biótico. Coerente com isso, o mutante *ros1-dml2-dml3* exibiu maior suscetibilidade ao patógeno fúngico *Fusarium oxysporum* (LE et al., 2014), confirmando que as plantas regulam dinamicamente a metilação do DNA para regular a expressão de genes de defesa.

4.3.2 PCR para determinar o padrão de metilação do DNA usando enzimas de restrição sensíveis a metilação (ERSM)

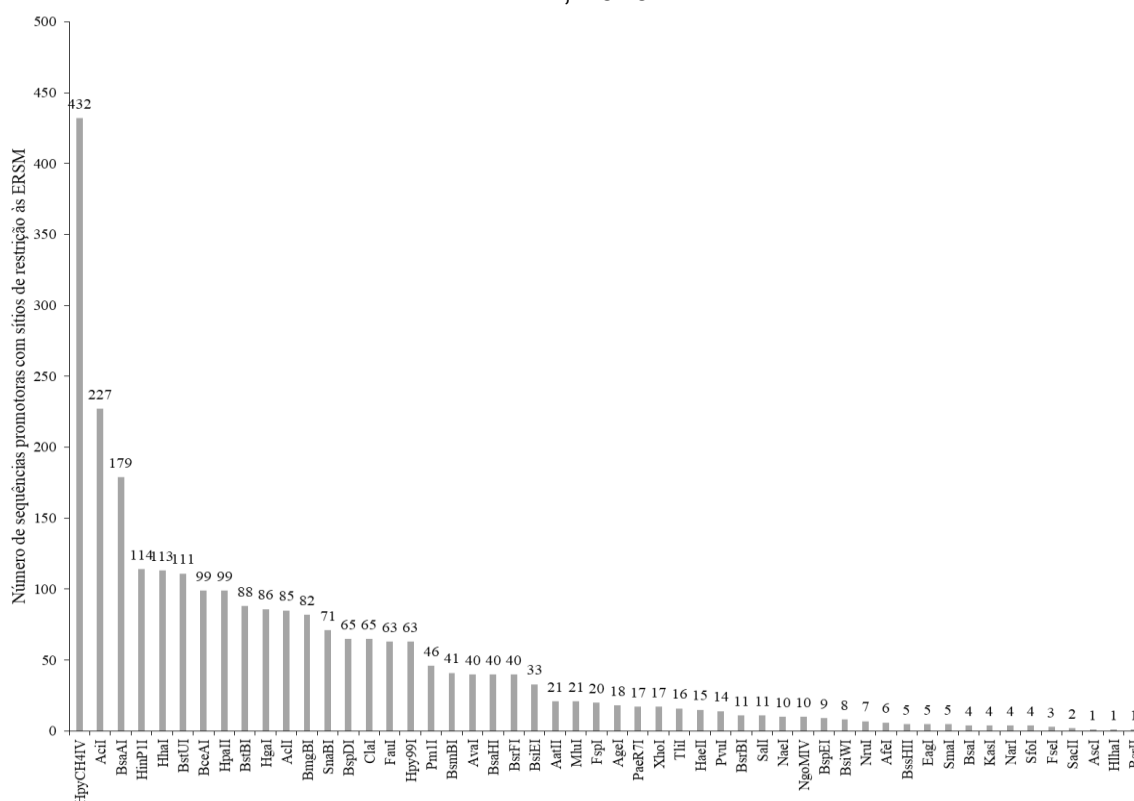
4.3.2.1 Identificação dos Sítios de Restrição das Enzimas de Restrição Sensíveis à Metilação (ERSM) nas sequências de DNA

No total, 52 enzimas de restrição sensíveis a metilação foram identificadas nos promotores dos genes de feijão estudados e todas reconheceram pelo menos 1 sítio de restrição. A enzima com maior número de promotores com sítios de restrição é a *HpyCH4IV* (432 sítios), seguida da *Acil* e *BsaAI* com 227 e 179 sítios cada, conforme observado na Figura 6.

As ERSM, clivam o DNA quando o local não está metilado e a amplificação por PCR não ocorre. Porém, se o local CpG estiver metilado, as enzimas não conseguem cortar a fita e o fragmento é amplificado via PCR. A seleção das ERSM depende das sequências de reconhecimento que estão no promotor do gene e da frequência da enzima (ROACH; HASHIMOTO, 2007).

A enzima *HpyCH4IV* reconhece os locais CG no genoma de plantas e os clivam, quando não metilados (FINKE; ROZHON; PECINKA, 2018). Essa enzima foi utilizada para identificar a metilação da citosina no promotor do gene *RCY1* da classe NB-LRR em *Arabidopsis* (SATO et al., 2017). Schumacher et al. (2006) utilizaram as enzimas *HpaII*, *Hin6I*, *Acil* e *HpyCH4IV* em análises combinadas de ERSM e microarranjos.

Figura 6- Frequência de sequências promotoras com sítios de restrição das enzimas de restrição sensíveis à metilação (ERSM) estudadas. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.



Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

A ERSM *HpyCH4IV* foi utilizada nesse trabalho para análise da metilação do DNA nos promotores dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300*.

4.3.2.2 Análise dos padrões de metilação com ERSM e PCR Semiquantitativa

As amostras de DNA atenderam os parâmetros de integridade verificados em gel de agarose e também a quantidade verificada em espectrofotômetro, sendo possível proceder a digestão do DNA com a enzima *HpyCH4IV* e a realização da PCR semiquantitativa.

Antecedendo as análises da metilação, os iniciadores foram testados nas amostras sem digestão com a enzima e foi verificado que o iniciador *Phvul.001G014400* não apresentou boa integridade, sendo excluído das análises. Além disso, o iniciador *Phvul.004G015000* amplificou o fragmento de DNA somente nas amostras da cultivar IAC Milênio.

A metilação foi observada em todos os *loci* dos promotores dos genes analisados para as duas cultivares estudadas, exceto o *locus Phvul.004G015000* que estava ausente na cultivar IPR Colibri (Tabela 6). Além disso, foi observado que a metilação nos promotores influenciou a expressão dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* nas cultivares de feijão estudadas.

Tabela 6 - Metilação do DNA nos promotores (1Kb) dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes, pelo método de imersão. UTFPR, Câmpus Pato Branco – PR, 2019.

<i>Locus</i>	Cultivar	Metilação no promotor
<i>Phvul.002G092300</i>	IAC Milênio	+
	IPR Colibri	+
<i>Phvul.003G159700</i>	IAC Milênio	+
	IPR Colibri	+
<i>Phvul.004G015000</i>	IAC Milênio	+
	IPR Colibri	0
<i>Phvul.005G054300</i>	IAC Milênio	+
	IPR Colibri	+

+ = presença de metilação. 0 = não amplificado. Fonte: FEDRIGO, K.; 2019.

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que controla a expressão gênica por meio da modificação química do DNA. Em *Arabidopsis*, os DRM2 (DOMÍNIOS REARRANJADOS METHYLTRANSFERASE2) estimulam a metilação *de novo* em todos os contextos de sequências. Após estabelecida, a metilação do DNA em sequências simétricas de CG e CHG é mantida pela DNA METHYLTRANSFERASE1 (MET1) e CHROMOMETHYLASE3 (CMT3), respectivamente (WENDTE et al., 2019).

A metilação do DNA em feijão utilizando MeDIP-Seq (Sequenciamento de Imunoprecipitação de DNA Metilado) e sequenciamento de bissulfito de sódio foi verificado por Crampton et al. (2016). No estudo, a metilação no contexto CG foi maior que em CHG e CHH, nas regiões promotoras e gênicas. Além disso, os níveis de metilação CG foram maiores nos genes do que nos promotores, entretanto, para CHG e CHH, níveis mais altos foram encontrados nos promotores em comparação aos genes. Esses resultados comprovam que há metilação nos promotores dos genes, como os observados em nosso trabalho.

A metilação do DNA associada a genes em plantas pode ocorrer no promotor

ou dentro do corpo do gene transcrito. A metilação na região promotora dos genes, seja qual for o contexto da citosina, está associada ao silenciamento transcricional do gene correspondente (RICHARD et al., 2017) e é resultado da disseminação da metilação em transposons e sequências repetitivas (TANG et al., 2016).

Em milho, genes relacionados com a síntese e o metabolismo do amido, como a enzima de desramificação do amido do tipo isoamilase ISO3, enzima de ramificação do amido IIa, amido sintase IIIb-1, amido fosforilase e domínio de ligação do amido contendo genes da família, estavam metilados principalmente na região promotora do embrião, comprovando que a metilação do DNA estava relacionada com o silenciamento gênico (WANG et al., 2015).

No entanto, a metilação do DNA pode estar associada à diminuição da expressão gênica. Em *Arabidopsis thaliana*, o gene de RESISTÊNCIA AO CMV (Y) (*RCY1*), que codifica uma proteína da classe CC-NB-LRR, confere resposta de hipersensibilidade a uma cepa do vírus do mosaico do pepino [CMV (Y)]. O ecotipo *Col-0* de *Arabidopsis* que superexpressa *RCY1* (Col: pRCY1-HA # 13) exibe resistência ao CMV (Y). A fim de identificar os fatores regulatórios envolvidos na expressão de *RCY1* e a resistência, os mutantes independentes do supressor de resistência mediada por *RCY1* ao CMV (Y) (*src*) foram mutagenizados. Nos mutantes *scr*, o vírus disseminou-se, porém não formou lesões locais necróticas nas folhas inoculadas, indicando que a mutação pode estar associada a hipermetilação do promotor *RCY1*, diminuindo a expressão gênica (SATO et al., 2017).

Os resultados obtidos por Sato et al. (2017) corroboram com os encontrados nesse trabalho, indicando que a metilação nos promotores dos genes diminuem a expressão gênica, incluindo genes de resposta a defesa de plantas a patógenos. Segundo Colicchio et al. (2015), embora a metilação gênica possa alterar a expressão dos genes, ela não pode realizar a repressão completa ou a expressão extremamente alta de alguns genes.

A identificação da metilação do DNA na região promotora dos genes de feijão em resposta ao crescimento bacteriano comum fornece novas informações sobre os mecanismos reguladores epigenéticos que controlam a expressão dos genes de resistência em resposta a patógenos nessa cultura importante.

4.4 Conclusões sobre o assunto 2

- A análise de estabilidade da expressão de genes de referência demonstrou que o gene ubiquitina é o mais estável em plantas de feijão inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes.

- Entre os genes alvos testados, *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300* e *Phvul.005G054300* apresentam bom perfil de amplificação para as cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta ao cretamento bacteriano comum.

- A cultivar IAC Milênio, moderadamente resistente ao cretamento bacteriano comum, apresenta maior incremento na expressão gênica, em relação a cultivar IPR Colibri, suscetível, principalmente para o gene *Phvul.002G092300*.

- A enzima mais frequente, ou seja, com maior número de sítios de restrição nos promotores dos genes da via de sinalização para o estresse biótico é a *HpyCH4IV* com 432 sítios, seguida da *Acil* e *BsaAI* com 227 e 179 sítios cada.

- A enzima *HpyCH4IV* detectou metilação nos promotores dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* via sementes.

5. ASSUNTO 3 – Identificação por análise *in silico* de genes relacionados ao estresse biótico no genoma de *Phaseolus vulgaris*

5.1 Introdução ao assunto 3

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris*) é o legume mais importante para o consumo mundial e é cultivado em uma ampla variedade de sistemas e ambientes agrícolas (ASSEFA et al., 2019). Devido a isso, diversos patógenos fúngicos e bacterianos comprometem o crescimento do feijoeiro, causando perdas econômicas significativas (TORRES et al., 2017). O crestamento bacteriano comum, causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, é uma das principais doenças transmitidas por sementes que causam perdas de rendimento e qualidade (ERDINC et al., 2018).

As plantas detectam o ataque de patógenos através de um sistema imunológico inato que controla as moléculas associadas ao patógeno dentro ou fora da célula vegetal (SHEHZADI et al., 2017). Os PRRs reconhecem os sinais dos padrões moleculares associados a patógenos na região extracelular e ativam uma cascata de sinalização (GUST et al., 2017).

O reconhecimento dos sinais intracelulares é facilitado por receptores citoplasmáticos, principalmente receptores de repetição ricos em leucina ligados a nucleotídeos (VAN DER BURGH; JOOSTEN, 2019), que ativam genes a jusante para induzir a resposta (KUSHALAPPA; YOGENDRA; KARRE, 2016).

A expressão de genes relacionados à defesa a jusante é essencial para a formação de respostas imunes das plantas. A interação entre plantas e patógenos induz a reprogramação transcricional extensiva de genes responsivos à defesa de plantas, demonstrando que os fatores de transcrição são fundamentais na resistência a doenças de plantas (PENG et al., 2016).

Além disso, é importante destacar que a regulação ocorre em cada estágio da expressão gênica e o estudo detalhado de uma determinada sequência regulatória é vital, pois estas apresentam várias atividades, desde a ativação até o silenciamento ou isolamento gênico (BIŁAS et al., 2016). Portanto a caracterização de elementos de regulação de ação *cis* (ERACs) a montante dos genes relacionados a estresses bióticos é relevante.

Os ERACs são motivos curtos específicos de sequências de DNA localizados

na região promotora do gene e servem como locais de ligação para reguladores específicos (PASSRICHA et al., 2017). Os ERACs nos promotores de genes responsivos a estresse fornecem informações sobre a regulação gênica e sinalização das plantas sob determinadas condições (HERNANDEZ-GARCIA; FINER, 2014). Nos promotores, é possível identificar os ERACs funcionais que determinam o tempo e a localização da atividade transcricional, a fim de compreender as alterações moleculares dos genes induzidos pelo estresse (PANDEY et al., 2015).

O conhecimento sobre os ERACs na região promotora dos genes é importante para compreender os sistemas que regulam a expressão gênica (CASTRILLO et al., 2011), pois esses elementos auxiliam na compreensão de genomas que representam uma lacuna em determinadas regiões (HAEUSSLER; JOLY, 2010). Contudo, o conhecimento sobre os ERACs diretamente envolvidos na regulação da transcrição gênica em resposta a um estímulo poderia ser utilizado para identificar genes de interesse (ZHANG et al., 2005).

Para identificar os ERACs e os genes relacionados com a resposta de defesa da planta à patógenos, métodos computacionais têm sido utilizados, pois muitos transcritos são expressos apenas em determinadas condições em células específicas ou são pouco expressos, tornando improvável a identificação por técnicas *in vitro* (SRIVASTAVA et al. 2014; SOUSA CARDOSO et al., 2016). Assim, o objetivo deste estudo foi identificar, por análise *in silico*, a regulação de genes relacionados com a resposta inicial de sinalização para estresses bióticos no genoma do feijoeiro.

5.2 Procedimentos metodológicos do assunto 3

No banco de dados *Phytozome* v12.1 (<http://www.phytozome.net>) (GOODSTEIN et al. 2012) foi escolhido o genoma de *P. vulgaris* v2.1 e realizada uma busca de genes relacionados à sinalização da resposta de defesa da planta à infecção por patógenos. O *locus*, o local, a descrição, a expressão nos diferentes tecidos e as sequências dos transcritos foram anotados para cada gene encontrado.

O compartimento celular de cada proteína foi determinado utilizando o ProtComp v. 9.0 (<http://www.softberry.com/berry.phtml>). Os fragmentos por quilo base por milhão de fragmentos mapeados (FPKM) nos diferentes tecidos foram baixados do site do *Phytozome* e transformados para um mapa de calor com agrupamento

hierárquico usando o software MeV (<http://www.tm4.org/mev.html>).

As sequências promotoras com 1,0 Kb a montante dos genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos foram identificadas no genoma de *P. vulgaris* v2.1 utilizando a base de dados *Phytozome* v12.1 (<http://www.phytozome.net>), pois nesse tamanho de sequência a probabilidade de encontrar resultados para os padrões de ocorrência de elementos *cis* é maior. Para cada gene, o promotor e a sequência gênica foram anotados, a fim de confirmar que se está trabalhando com o promotor correto.

Os ERACs da sequência promotora dos genes de *P. vulgaris* foram analisados usando o banco de dados Elemento Regulador da Ação *Cis* (PlantCARE) (LESCOT et al., 2002). Foram considerados os elementos encontrados para espécies da família Fabaceae e *Arabidopsis thaliana*.

5.3 Resultados e Discussão sobre o assunto 3

5.3.1 Caracterização dos genes relacionados ao estresse biótico

Um total de 555 genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos foram identificados no genoma do feijão. Os genes estavam distribuídos em todos os 11 cromossomos (Chr1-Chr11), entretanto, *Phvul.L003200*, *Phvul.L003500*, *Phvul.L006300*, *Phvul.L006800*, *Phvul.L009800*, *Phvul.L007300* e *Phvul.L007000* permaneceram em *scaffolds* não mapeados.

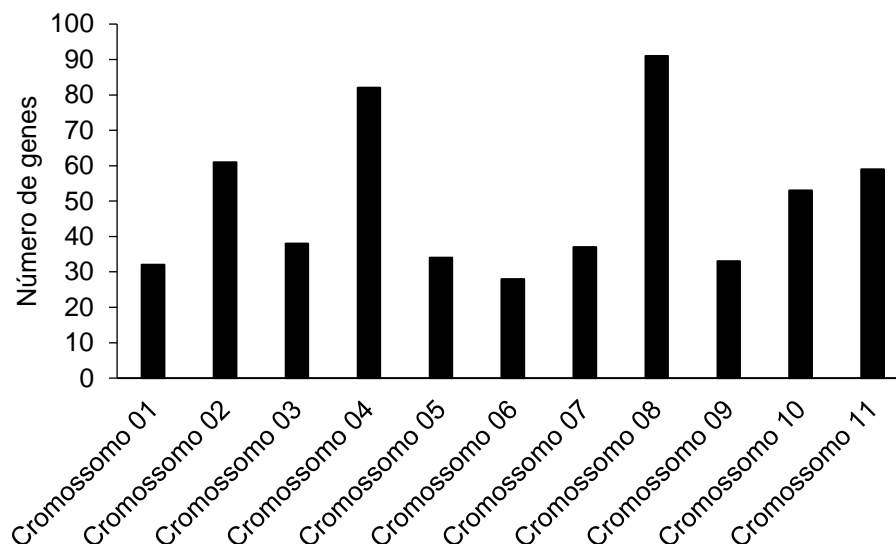
Entre os 555 genes, 61 genes foram localizados no cromossomo 02, 82 no cromossomo 04 e 91 no cromossomo 08. O menor número de genes foi observado no cromossomo 06, 28 genes (Figura 7).

A localização cromossômica de genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógeno também foi avaliada por Wei et al. (2015). Os autores verificaram que os 234 genes LRR-RLK encontrados estavam distribuídos nos 12 cromossomos de tomate.

Em feijão, a distribuição dos genes de defesa nos cromossomos foi verificada por Richard et al. (2017), que identificaram 377 genes NBS-LRR, incluindo 364 localizados nos 11 cromossomos e 13 em *scaffolds* não ancorados. Em grão-de-bico, 109 genes NBS-LRR relacionados a ferrugem por *Ascochyta* estavam distribuídos em todos os 8 cromossomos e 28 permaneceram em *scaffolds* não mapeados (SAGI et

al., 2017).

Figura 7 - Distribuição dos genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos nos cromossomos de feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.



Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

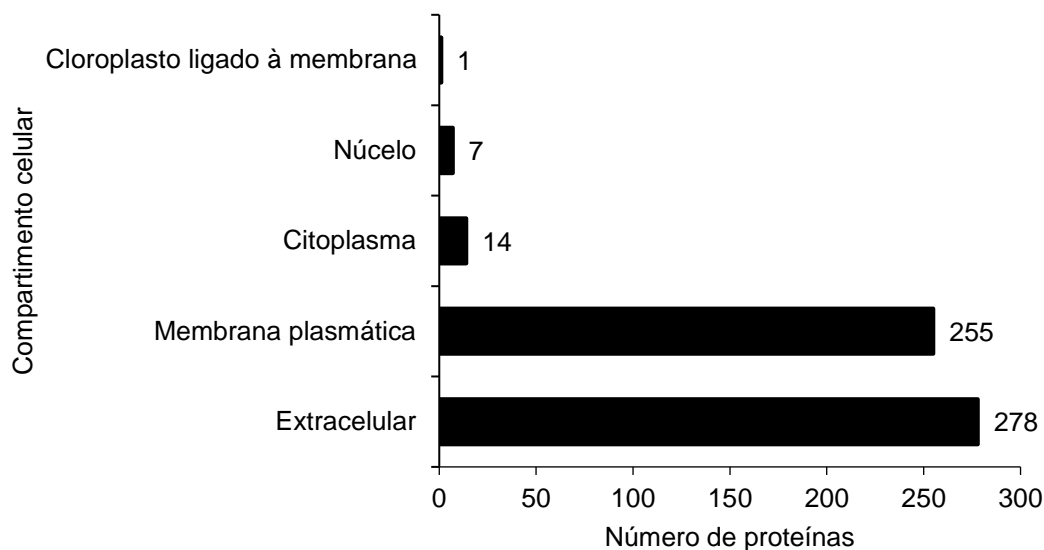
Os genes de defesa em plantas como NBS-LRRs e LRR-RLKs estão relacionados com a ativação de várias respostas de resistência da planta, incluindo a morte celular programada e a produção de proteínas antimicrobianas (HOU et al., 2013).

Em relação as sequências genômicas, CDS e sequências de proteína dos 555 genes relacionados ao estresse biótico foi observado que o comprimento das sequências genômicas desses genes variou de 573 a 30.072 pb, da CDS de 480 a 8.064 pb e das sequências de proteínas de 159 (*Phvul.002G052500*) a 2.687 pb (*Phvul.008G070800*).

A partir dos resultados obtidos sobre a localização do compartimento celular foi possível verificar que 278 proteínas estavam localizadas na região extracelular, 255 na membrana plasmática, 14 no citoplasma, 7 no núcleo e a *Phvul.003G077100* estava localizada no cloroplasto ligado a membrana (Figura 8).

Os genes utilizados na análise da expressão gênica estavam localizados na região extracelular (*Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300* e *Phvul.004G015000*) e na membrana plasmática (*Phvul.003G159700* e *Phvul.005G054300*).

Figura 8 - Distribuição das proteínas de feijão nos compartimentos celulares. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.



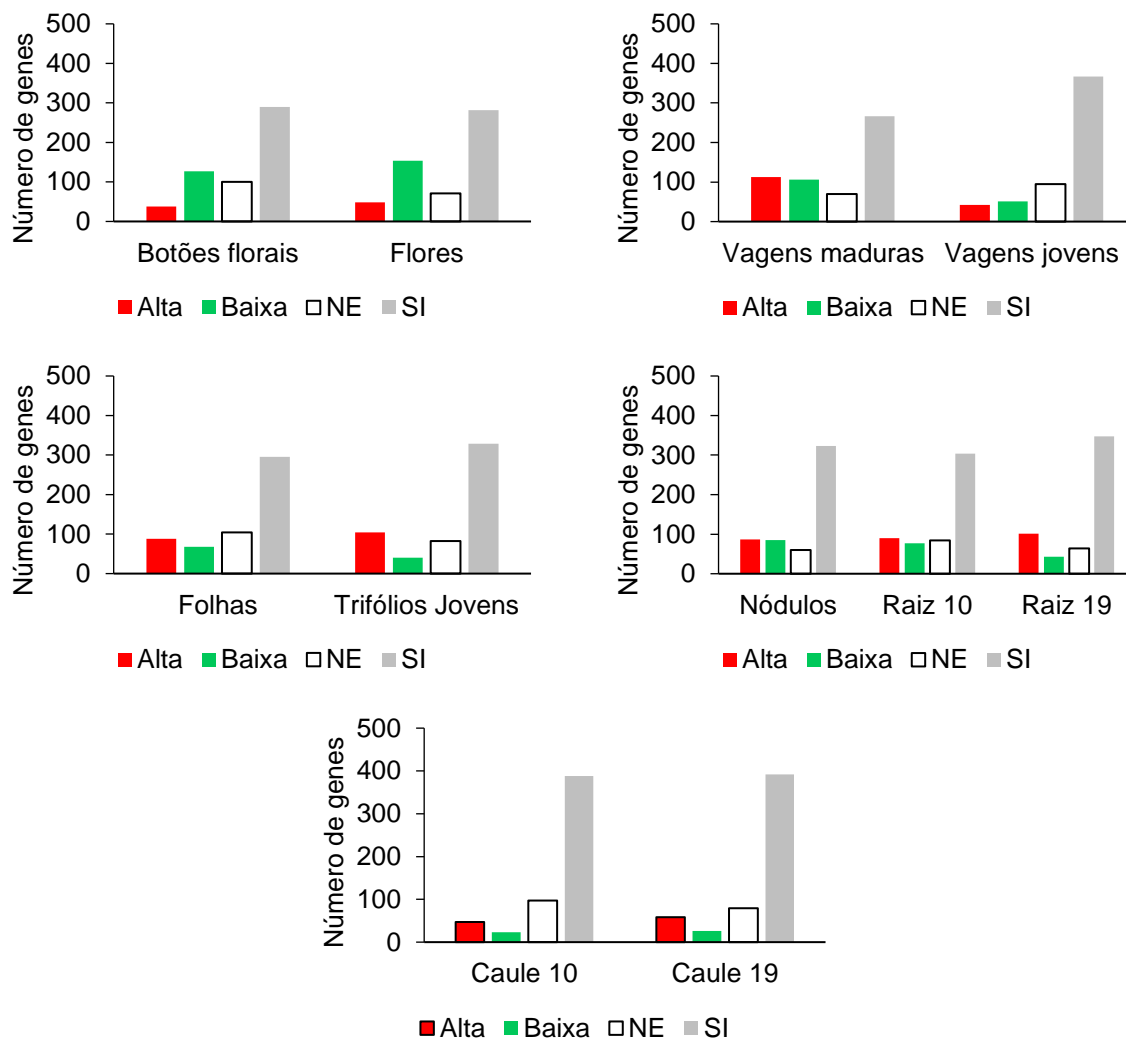
Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Na superfície celular e na membrana plasmática estão as proteínas LRR-RLKs e LRR-RLPs, que são uma família importante de proteínas transmembrana que atuam como reguladores do desenvolvimento e da imunidade das plantas. O domínio extracelular LRR dessas proteínas contribui para o reconhecimento de ligantes e associações de co-receptores que iniciam a transdução de sinal (JAMIESON; SHAN; HE, 2018). Portanto, a localização das proteínas observada nesse trabalho indica que a maioria pertence ao grupo de proteínas transmembrana LRR-RLK e LRR-RLP.

A frequência da expressão dos 555 genes foi avaliada em diferentes tecidos de feijão. Em todos os tecidos foi possível verificar que a maioria dos genes não possuíam informação sobre a expressão. Os botões florais, as flores e as vagens jovens foram os que tiveram menor número de genes com alta expressão, porém nas vagens maduras, nos trifólios jovens, nos nódulos e nas raízes 10 cm e 19 cm abaixo do solo (raiz 10 e raiz 19, respectivamente), o número de genes com alta expressão foi maior do que nos demais tecidos.

Nas vagens jovens, folhas, caules 10 cm e 19 cm acima do solo (caule 10 e caule 19, respectivamente) foi observado que um número elevado de genes não estava expresso. Entre os tecidos avaliados, os que apresentaram maior número de genes com alta expressão e maior número de genes com baixa expressão foram vagens maduras e flores, respectivamente (Figura 9).

Figura 9 - Frequência da expressão dos genes em diferentes tecidos de feijão. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.



NE = Não Expresso; SI = Sem Informação. Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Os genes utilizados para análise da expressão gênica nas folhas de plantas inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes pelo método de imersão estavam expressos nas folhas (*Phvul.001G014400*), raiz 10 (*Phvul.001G014400* e *Phvul.002G092300*), raiz 19 (*Phvul.002G092300*), caules 10 e 19 (*Phvul.002G092300* e *Phvul.005G054300*) e trifólios jovens (*Phvul.003G159700*). O gene *Phvul.004G015000* não estava em expresso nos tecidos de feijão.

Os valores de expressão FPKM foram usados para construir o mapa de calor do perfil de expressão dos genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos em diferentes tecidos de feijão (Figura 10). A expressão filogenética específica da família dos genes variou de 0,001 a 749,71 FPKM.

expressos (447 genes, 80,54%). Dois grupos distintos filogeneticamente foram formados, um constituído pelos tecidos: flores, caule 10 e trifólios jovens e o outro por botões florais, folhas, raiz 10, raiz 19, vagens maduras e vagens jovens. Os tecidos caule 19 e nódulos não se agruparam, indicando que há genes que são expressos somente nesses tecidos.

A expressão dos genes de defesa em resposta a patógenos nos tecidos de feijão também foi estudada por Wu et al. (2017), que identificaram 175 genes NBS-LRR. Entre esses, 161 genes *PvNBS* estavam expressos nos caules, 160 nas raízes e 142 nos botões florais. Além disso, os genes *Phvul.007G254200*, *Phvul.010G055100*, *Phvul.010G025100* e *Phvul.011G193800* foram expressos especificamente nas raízes, vagens jovens, flores e botões de flores, respectivamente.

Em feijão, os perfis de expressão dos genes *Dof*, que também estão relacionados ao estresse biótico, foram analisados. A maioria desses genes estavam expressos nos diferentes tecidos (vagens jovens, caule 10, caule 19, botões florais, flores, raiz 10, nódulos, raiz 19, brotos maduros verdes, folhas e trifólios jovens), porém a expressão dos genes *PvDof10*, *PvDof30*, *PvDof36*, *PvDof12* e *PvDof27* foram relativamente mais altos nos tecidos vagens jovens e caule, sugerindo que eles podem desempenhar papéis importantes na resposta de defesa a patógenos nesses tecidos no feijão (ITO et al., 2017).

Os resultados encontrados nesse trabalho comparados com os encontrados por Wu et al. (2017) e Ito et al. (2017), indicam que a expressão de diferentes genes em diferentes tecidos de feijão contribui para o mecanismo de defesa das plantas contra patógenos.

5.3.2 Análise de Elementos Regulatórios de Ação *Cis* (ERACs)

Sequências com 1 Kb a montante do códon de início foram isoladas e usadas para identificar ERACs putativos que podem contribuir para a regulação fina da expressão gênica no nível transcricional. Os ERACs foram analisados como importantes interruptores moleculares envolvidos na regulação transcricional da expressão gênica induzida por estresse (YUN et al., 2012).

Nesse trabalho foram identificados 50 ERACs associados à estresse abiótico e biótico, hormônios, expressão específica de tecidos, responsividade à luz, conservação de DNA e ligação de proteínas. É importante destacar que a tabela 7

representa, unicamente, o número de regiões promotoras em que estes elementos foram encontrados, não se referindo à frequência total dos mesmos. A frequência total leva em consideração o número de vezes que cada elemento *cis* é presente em cada promotor.

Tabela 7 - Elementos *cis* identificados a 1 Kb na região promotora dos genes em *Phaseolus vulgaris*. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Elemento	Anotação	Número de promotores (frequência %)
TATA-box	Elemento promotor principal em torno de -30 do início da transcrição	552 (99,46)
CAAT-box	Elemento comum de ação <i>cis</i> nas regiões promotora e potenciadora	550 (99,10)
MYB	Elemento envolvido na indutibilidade pela seca	469 (84,50)
MYC	Elemento envolvido na indutibilidade pela seca	438 (78,92)
AT~TATA-box	Elemento promotor principal em torno de -30 do início da transcrição	421 (75,86)
TATA	Elemento promotor principal em torno de -30 do início da transcrição	277 (49,91)
ABRE	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade do ácido abscísico	248 (44,68)
MYB-like sequence	Elemento envolvido na indutibilidade pela seca	242 (43,60)
TCT-motif	Parte de um elemento responsivo à luz	223 (40,18)
G-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade à luz	205 (36,94)
as-1	Elemento regulador de ação <i>cis</i> envolvido na expressão específica da raiz	195 (35,14)
STRE	Elemento responsivo ao estresse abiótico	191 (34,41)
GT1-motif	Elemento responsivo a luz	182 (32,79)
W-box	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade de defesa a patógenos	156 (28,11)
MBS	Sítio de ligação MYB envolvido na indutibilidade pela seca	150 (27,03)
TCA	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade do ácido salicílico	120 (21,62)
AE-box	Parte de um módulo responsivo à luz	115 (20,72)
WRE3	Elemento responsivo ao estresse biótico	106 (19,10)
CAT-box	Elemento regulador de ação <i>cis</i> relacionado à expressão do meristema	95 (17,12)
GATA-motif	Parte de um elemento responsivo à luz	93 (16,76)
GA-motif	Parte de um elemento responsivo à luz	75 (13,51)
AT-rich element	Sítio de ligação da proteína de ligação ao DNA rica em AT (ATBP-1)	65 (11,71)
MYB recognition site	Elemento envolvido na indutibilidade pela seca	55 (9,91)
ATCT-motif	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na resposta à luz	50 (9,01)
Unnamed__1	Sítio de ligação da proteína 60K	48 (8,65)
AT-rich sequence	Elemento para ativação máxima mediada por elicitores (2 cópias)	43 (7,75)
HD-Zip 1	Elemento envolvido na diferenciação de células em paliçada do mesófilo	38 (6,85)
S box	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade de defesa a patógenos	30 (5,41)

		(continuação)
Elemento	Anotação	Número de promotores (frequência %)
LAMP-element	Parte de um elemento responsivo à luz	27 (4,86)
Gap-box	Parte de um elemento responsivo à luz	22 (3,96)
AP-1	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade do cádmio	21 (3,78)
Box III	Sítio de ligação de proteína	16 (2,88)
DRE core	Elemento envolvido na indutibilidade pela seca	16 (2,88)
AC-I		12 (2,16)
HD-Zip 3	Sítio de ligação de proteína	11 (1,98)
3-AF3 binding site	Parte de uma matriz de módulos de DNA conservada (CMA3)	10 (1,80)
AT~ABRE	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade do ácido abscísico	8 (1,44)
I-box	Parte de um elemento responsivo à luz	8 (1,44)
TGA-box	Parte de um elemento responsivo a auxina	7 (1,26)
ACTCATCCT sequence	Elemento envolvido na indutibilidade pela seca	6 (1,08)
Unnamed_1	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na expressão de regulação negativa do fitocromo	6 (1,08)
CAG-motif	Parte de um elemento responsivo à luz	5 (0,90)
AuxRE	Parte de um elemento responsivo a auxina	3 (0,54)
sbp-CMA1c	Parte de um elemento responsivo à luz	3 (0,54)
Pc-CMA2a	Parte de um elemento responsivo à luz	2 (0,36)
Unnamed_5	Sítio de ligação do fator SEF1	2 (0,36)
ACA-motif	Parte do gapA in (gapA-CMA1) envolvido na resposta a luz	1 (0,18)
ATC-motif	Parte de um módulo de DNA conservado envolvido na resposta à luz	1 (0,18)
Box II	Parte de um elemento responsivo à luz	1 (0,18)
JERE	Elemento de ação <i>cis</i> envolvido na responsividade do ácido jasmônico	1 (0,18)

Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Os elementos mais frequentes identificados nos promotores dos genes de feijão foram TATA-box (99,46%), CAAT-box (99,10%), MYB (84,50%), MYC (78,92%) e AT~TATA-box (75,86%) (Tabela 7). Além disso, elevado número de elementos responsivos à luz foi detectado nas regiões promotoras dos genes, como ACA-motif, AE-box, Box II, Gap-box e sbp-CMA1c. Os elementos envolvidos com os hormônios vegetais também foram identificados, como o ERAC envolvido na responsividade do ácido abscísico (ABRE, TCA e AT~ABRE), elementos responsivos a auxina (AuxRE e TGA-box) e ao ácido jasmônico (JERE).

Os elementos MBS, MYB, MYC, DRE core e ACTCATCCT sequence relacionados ao estresse hídrico, foram detectados (Tabela 7). Os elementos associados a expressão específica de tecidos como as-1 e CAT-box também foram identificados. Além disso, S box e W-box, que estão envolvidos na expressão gênica de defesa induzida por patógenos ou elicitores fúngicos (SHI et al., 2013) e WRE3 relacionado ao estresse biótico (YUE et al., 2019) foram detectados. O elemento W-

box também foi identificado nos promotores dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700* e *Phvul.005G054300* que foram utilizados na análise da expressão gênica de sementes inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Wu et al. (2017) analisando os genes NBS-LRR relacionados a antracnose e ao crestamento bacteriano comum em feijão. Os autores verificaram um grande número de elementos responsivos à luz, tais como Box 4, Box I, G-box e GAG-motif. Os elementos CE1, ABRE, CE3, TATC-box, P box, CGTCA-motif e SARE envolvidos nos hormônios vegetais também foram identificados. Além disso, GT1 e Box-W1, que estão relacionados na expressão gênica de defesa induzida por patógenos foram detectados.

A análise de ERACs de regiões promotoras dos genes de defesa a patógenos também foram estudados em outras espécies de plantas. Em grão-de-bico, quatro ERACs relacionados a condições de estresse e ataque de patógenos foram encontrados nos promotores de genes de resistência NBS-LRR. Os quatro elementos considerados foram o WBOX, DRE, CBF e GCC box (SHARMA; RAWAT; SURESH, 2017). Em arroz, 882 genes continham na região promotora os ERACs AS-1, G-box, GCC-box e H-box que foram induzidos por patógenos (KONG et al., 2018). Em soja, elementos relacionados ao estresse biótico estavam presentes nos promotores de 76 genes *GmCRKs*. O elemento de repetição rico em TC envolvido na resposta de defesa estava em 50 regiões promotoras de genes *GmCRKs* (DELGADO-CERRONE et al., 2018).

Os elementos TATA-box, CAAT-box e AT~TATA-box são elementos essenciais para o início da transcrição. A caracterização genômica da família de genes responsivos a auxina em soja e feijão foi estudada por Le et al. (2016). Os autores também observaram que os ERACs TATA-box e CAAT-box foram encontrados na maioria dos promotores dos genes tanto de soja quanto de feijão. Em algodão, a função do gene *GhPRE1* responsável pelo alongamento das fibras foi avaliada por Zhao et al. (2018), que verificaram que a deleção de PRE1-TATA no promotor pode ser o responsável pelo silenciamento pré-específico em algodão alotetraploide. Esse estudo fornece evidências de que a variação na região do elemento TATA-box influencia a expressão do PRE1 em algodão.

Entre os ERACs relacionados ao estresse biótico estão W-box, S-box e WRE3, que foram encontrados em 182, 156 e 106 promotores dos genes, respectivamente

(Tabela 7). Isso confirma o fato de que esses genes podem desempenhar funções importantes relacionadas ao estresse causado por patógenos. Os elementos ELI-box3, E box, WUN motif, S box, EIRE, W-box, Box-W1, TCA element, TC-rich repeats e CGTCA-motif relacionados ao estresse biótico em trigo foram encontrados em 3, 6, 12, 19, 21, 63, 64, 81, 99 e 109 promotores do gene *TaHSP20*, respectivamente (MUTHUSAMY et al., 2017).

O elemento W-box também foi identificado em *Glycine max* (YANG et al., 2017), *Brassica juncea* (Ali et al., 2017), *Malus hupehensis* (WANG et al., 2017), *Arabidopsis thaliana* (KAUR et al., 2017) em resposta ao estresse biótico.

Na cultura do algodoeiro, a análise das sequências promotoras dos genes LRR-RLK (*Leucine-rich repeat receptor-like kinases*), utilizando o banco de dados PlantCARE, foi realizada para identificar os principais ERACs. Os elementos relacionados a fito-hormônios, ao ciclo celular e ao estresse de defesa estavam presentes nas regiões promotoras dos genes LRR-RLK de *Gossypium*. ERACs relacionados à resposta ao estresse, ferimento e resposta a patógenos (S box, W-box, WRE3, WUN-motif) foram encontrados em regiões promotoras de cerca de 80% dos genes de LRR-RLK de *Gossypium* (SUN et al., 2018).

O elemento W-box pertence a uma importante classe de elementos de ação *cis* em promotores de vários genes de plantas responsivos a estresse causado por patógenos (GAO et al., 2014). Esse elemento geralmente este vinculado aos fatores de transcrição WRKY (CHI et al., 2013). Em arroz, o gene *OsWRKY53* medeia a capacidade de resposta da eliciadora de quitina interagindo com três elementos W-box em tandem (CHUJO et al., 2009). O elevado número de W-box encontrado nos genes *Asc-Glu* de arroz indica que esse elemento é responsivo a ferimentos e pode participar na regulação da expressão dos genes de resposta ao estresse relacionado a patógeno (PANDEY et al., 2015).

A importância dos elementos W-box foi elucidada através de estudos do transcriptoma de *Arabidopsis* durante a resistência sistêmica adquirida. Além disso, foi demonstrado que os elementos W-box e W box-like quando agrupados ou não, contribuíam às respostas patogênicas (HIROYUKI; TERAUCHI, 2008).

Nas plantas, há um mecanismo regulador complexo que é ativado em resposta ao estresse biótico. Portanto, é importante caracterizar os ERACs associados à expressão gênica, pois fornecem informações das regiões promotoras dos genes

responsivos ao estresse (GOYAL et al., 2019).

Em relação a quantidade de elementos *cis* encontrados nos promotores dos genes, a Tabela 8 mostra a lista de genes com maior quantidade de elementos *cis* em seus promotores. No trabalho foi possível verificar que os elementos *cis* variaram de 2, nos genes *Phvul.004G142600* e *Phvul.011G192500*, a 18, no gene *Phvul.001G115100*. Quanto maior a quantidade de elementos *cis*, maior a capacidade de tolerar o estresse. Sugere-se que para a indução da expressão de genes com regulação complexa é necessária maior interação de elementos *cis*.

Tabela 8 - Genes com a maior quantidade de elementos *cis* em seus promotores. UTFPR, Câmpus Pato Branco, 2019.

Genes	Número de elementos <i>cis</i>
<i>Phvul.001G115100</i>	18
<i>Phvul.010G025400</i>	17
<i>Phvul.002G112100</i>	16
<i>Phvul.002G125100</i>	16
<i>Phvul.009G234500</i>	16
<i>Phvul.002G239400</i>	15
<i>Phvul.003G129400</i>	15
<i>Phvul.006G003400</i>	15
<i>Phvul.008G207200</i>	15
<i>Phvul.010G026400</i>	15
<i>Phvul.011G115300</i>	15
<i>Phvul.011G166100</i>	15
<i>Phvul.011G197900</i>	15
<i>Phvul.001G134300</i>	14
<i>Phvul.002G060200</i>	14
<i>Phvul.002G079200</i>	14
<i>Phvul.002G152100</i>	14
<i>Phvul.003G072400</i>	14
<i>Phvul.003G193100</i>	14
<i>Phvul.003G202100</i>	14
<i>Phvul.004G096400</i>	14
<i>Phvul.004G099400</i>	14
<i>Phvul.004G103700</i>	14
<i>Phvul.004G115700</i>	14

Fonte: FEDRIGO, K., 2019.

Nos promotores dos genes *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* foram identificados 8, 11, 13, 9 e 14 ERACs, respectivamente. A expressão desses genes foi avaliada em

plantas inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

A quantidade total, assim como a maior quantidade de alguns de elementos *cis*, e a maior presença de alguns elementos específicos nos genes mostram a complexidade do controle genético desses genes. Os genes que apresentaram o maior número de diferentes elementos *cis* em sua região promotora não foram os mesmos que revelaram as maiores frequências totais, como é o caso do *Phvul.007G054100*, *Phvul.006G041200*, *Phvul.010G064300* e *Phvul.001G134300*. Alguns elementos *cis* apresentaram grandes quantidades de repetições, como o elemento TATA-box que apresentou 66 cópias na região promotora do gene *Phvul.007G054100* de feijão.

Nos genes *Phvul.004G142600* e *Phvul.011G192500* foram identificados somente dois ERACs. A presença de poucos elemento *cis*, relacionado ao estresse, no promotor do gene, não é suficiente para determinar a capacidade de resposta desse gene a partir de um estímulo associado, ou seja, são necessários dados experimentais para confirmar e estabelecer a relação entre um elemento *cis* e a responsividade do gene (WANG et al., 2015).

Cada gene contém elementos de ação *cis* únicos na região reguladora que controla diversos processos biológicos e respostas ao estresse. Devido a isso, é necessário realizar buscas e caracterizar esses elementos a fim de identificar e interpretar a regulação transcricional dos genes (GAO et al., 2014).

Portanto, o número de elementos *cis* por gene e a ocorrência total dos diferentes elementos, indicam que há elevada quantidade e diversidade de elementos *cis* presentes nas regiões promotoras dos genes.

5.4 Conclusões sobre o assunto 3

- Os genes relacionados à resposta de sinalização para defesa da planta à infecção por patógenos estão distribuídos em todos os 11 cromossomos (Chr1-Chr11) do feijoeiro.

- A maioria das proteínas relacionadas à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos estão distribuídas na região extracelular e na membrana plasmática.

- A maior frequência de genes com alta e baixa expressão é encontrada nos

tecidos vagens maduras e flores, respetivamente.

- Os genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos são mais numerosos nos nódulos (491 genes), seguidos pelas raízes 19 (486 genes). As folhas possuem o menor número de genes expressos (447 genes).

- Em relação aos perfis de expressão dos genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos, dois grupos distintos filogeneticamente são formados, um constituído pelos tecidos: flores, caule 10 e trifólios jovens e o outro por botões florais, folhas, raiz 10, raiz 19, vagens maduras e vagens jovens. Os tecidos caule 19 e nódulos não estão agrupados, indicando que há genes que são expressos somente nesses tecidos.

- Os elementos regulatórios e ação *cis* mais frequentes nas regiões promotoras dos genes de sinalização para estresse de feijão são TATA-box (99,46%), CAAT-box (99,10%), MYB (84,50%), MYC (78,92%) e AT~TATA-box (75,86%). Os ERACs relacionados ao estresse biótico são GT1-motif, W-box e WRE3 encontrados em 182, 156 e 106 promotores dos genes, respetivamente. O elemento W-box está presente nos promotores dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700* e *Phvul.005G054300*, utilizados na análise da expressão gênica de sementes inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

- Nos promotores dos genes *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* estão identificados 8, 11, 13, 9 e 14 ERACs, respetivamente.

6. CONCLUSÕES

- A severidade da doença é maior nas plantas inoculadas pelo método infiltração a vácuo para ambas cultivares de feijão estudadas. Esse método é o mais indicado para inocular *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão. No entanto, novos trabalhos são necessários a fim de avaliar o tempo e a dificuldade para inocular o patógeno, e os custos, para cada método.

- A severidade da doença aumenta com o passar dos dias nas duas cultivares de feijão para todos os métodos de inoculação analisados.

- A MMFF, MMSF, MMFC e MMSC estão relacionadas com a severidade do cretamento bacteriano comum.

- A MMFF, MMSF, MMFC e MMSC foi menor nas plantas do método infiltração a vácuo, em que a severidade é maior, para ambas cultivares de feijão.

- A análise de estabilidade da expressão de genes de referência demonstrou que o gene ubiquitina é o mais estável em plantas de feijão inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes.

- A cultivar IAC Milênio, moderadamente resistente ao cretamento bacteriano comum, apresenta maior incremento na expressão gênica, em relação a cultivar IPR Colibri, suscetível, principalmente para o gene *Phvul.002G092300*.

- A enzima com maior número de promotores com sítios de restrição é a *HpyCH4IV* com 432 sítios, seguida da *Acil* e *BsaAI* com 227 e 179 sítios cada.

- A metilação nos promotores influencia a expressão dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* nas sementes.

- A maioria das proteínas relacionadas à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos estão distribuídas na região extracelular e na membrana plasmática.

- Os genes relacionados à resposta de defesa da planta à infecção por patógenos são mais numerosos nos nódulos (491 genes), seguidos pelas raízes (486 genes). As folhas possuem o menor número de genes expressos (447 genes).

- Os elementos *cis* mais frequentes nas regiões promotoras dos genes NBS-LRR de feijão são TATA-box (99,46%), CAAT-box (99,10%), MYB (84,50%), MYC (78,92%) e AT~TATA-box (75,86%).

- O elemento W-box, relacionado ao estresse biótico, está presente nos promotores dos genes *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700* e *Phvul.005G054300*, utilizados na análise da expressão gênica de sementes inoculadas com *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

- Nos promotores dos genes *Phvul.001G014400*, *Phvul.002G092300*, *Phvul.003G159700*, *Phvul.004G015000* e *Phvul.005G054300* estão identificados 8, 11, 13, 9 e 14 ERACs, respectivamente.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os programas de melhoramento dependem de procedimentos confiáveis e reprodutíveis para avaliar e identificar resistência a doenças bacterianas como o crestamento bacteriano comum em genótipos de feijão. Portanto, as inoculações artificiais são importantes para selecionar genótipos resistentes e avaliar rapidamente um grande número de plantas. Além disso, o uso de cepas agressivas em inoculações é uma parte importante da estratégia de avaliação da resistência a doenças bacterianas em geral e pode ser especialmente importante para *X. axonopodis* pv. *phaseoli*.

Considerando a expressão de genes de referência nas cultivares de feijão IAC Milênio e IPR Colibri em resposta à inoculação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes pelo método de imersão, o gene de referência ubiquitina é o mais estável. Entretanto, a expressão de genes de referência pode variar consideravelmente de um tecido para outro e de uma espécie para outra, demonstrando que a escolha dos genes de referência exige uma abordagem complexa para cada modelo experimental, assim como sua validação.

As plantas ativam genes de defesa em resposta ao ataque de diversos patógenos, incluindo bactérias. A identificação desses genes permite que novas cultivares resistentes a patógenos, principalmente a *X. axonopodis* pv. *phaseoli* causador do crestamento bacteriano comum, sejam desenvolvidas. Dessa forma, se reduziria o uso de controle químico que além de agredir o ambiente, é ineficiente na maioria das vezes.

A metilação do DNA desempenha um papel importante na regulação da expressão gênica ao longo do desenvolvimento e das respostas ao ambiente nas plantas. As marcas epigenéticas podem contribuir com as técnicas de melhoramento vegetal através da seleção de estados epigenéticos e a regulação da expressão de genes relacionados a resistência de doenças em feijão.

As análises *in silico* e a utilização de ferramentas online disponíveis trazem informações importantes sobre o genoma de diversas espécies de plantas, incluindo *Phaseolus vulgaris*. Além disso, são úteis para a comunidade científica, pois grande quantidade de dados é gerada a cada dia e estes necessitam ser classificados e organizados para que novas interferências sobre as funções biológicas possam ser

realizadas.

As análises realizadas nesse trabalho apresentam resultados importantes para estudos posteriores que se referem ao estresse causado pela bactéria *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e descobertas de mecanismos moleculares de resistência a essa bactéria. A partir dos resultados encontrados, é possível realizar experimentos com transformação genética utilizando genes alvo e elementos *cis* preditos como importantes e frequentes, a fim de conferir características de resistência às plantas de feijão em resposta ao cretamento bacteriano comum.

REFERÊNCIAS

- ABEYSINGHE, J.K.; LAM, K.M.; NG, D.W.K. Differential regulation and interaction of homoeologous WRKY 18 and WRKY 40 in *Arabidopsis* allotetraploids and biotic stress responses. **The Plant Journal**, v.97, p.352-367, 2019.
- ALI, S.; MIR, Z.A.; TYAGI, A.; BHAT, J.A.; CHANDRASHEKAR, N.; PAPOLU, P.K.; RAWAT, S.; GROVER, A. Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. **Acta physiologiae plantarum**, v.39, p.268, 2017.
- ALIAGA, B.; BULLA, I.; MOUAHID, G.; DUVAL, D.; GRUNAU, C. Universality of the DNA methylation codes in Eucaryotes. **Scientific Reports**, v.9, p.173, 2019.
- ALLADASSI, B.M.E.; NKALUBO, S.T.; MUKANKUSI, C.; KAYAGA, H.N.; GIBSON, P.; EDEMA, R.; URREA, C.A.; KELLY, J.D.; RUBAIHAYO, P.R. Identification of common bean genotypes with dual leaf and pod resistance to common bacterial blight disease in Uganda. **African Crop Science Journal**, v.26, p.63-77, 2018.
- ALLARDYCE, J.A.; ROOKES, J.E.; HUSSAIN, H.I.; CAHILL, D.M. Transcriptional profiling of *Zea mays* roots reveals roles for jasmonic acid and terpenoids in resistance against *Phytophthora cinnamomi*. **Functional Integrative Genomics**, v.13, p.217–228, 2013.
- ANDRUS, C.F. A method of testing beans for resistance to bacterial blights. **Phytopathology**, v.38, p.757- 759, 1948.
- ARAUJO, F.F. de; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores bióticos (*Bacillus subtilis*) e abióticos (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v.35, n.3, p. 169-172, 2009.
- ARIANI, A.; TERAN, Y.; BERNY, J.C.; GEPTS, P. Genome-wide identification of SNPs and copy number variation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using genotyping-by-sequencing (GBS). **Molecular Breeding**, v.36, p.87, 2016.
- ASSEFA, T.; MAHAMA, A.A.; BROWN, A.V.; CANNON, E.K.S.; RUBYOGO, J.C.; RAO, I.M.; BLAIR, M.W.; CANNON, S.B. A review of breeding objectives, genomic resources, and marker-assisted methods in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Molecular Breeding**, v. 39, n. 2, p. 20, 2019.
- BALAZ, J.; IVANOVIE, Z.; DAVIDOVIE, A.; ILIEIE, R.; JANSE, J.; POPOVIE, T. Characterization of *Xanthomonas hortorum* pv. *Pelargonii* isolated from Geranium in Serbia. **Plant Disease**, v.100, p.164-170, 2016.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. Epigenetic regulation during salinity and drought stress in plants: histone modifications and DNA methylation. **Plant Gene**, v.11, p.199-204, 2017.
- BELETE, T.; BASTAS, K.K. Common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv.

phaseoli) of beans with special focus on Ethiopian condition. **Journal of Plant Pathology and Microbiology**, v.8, 2017.

BENSON, B. V.; NEPAL, M.P.; DAVISON, L.G.; DUWADI, P.B.; MOORE, B.G. *In silico* analysis of cis-regulatory elements of disease resistance genes across six plant species. In: **Proceedings of the South Dakota Academy of Science**, v.93, 2014.

BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, v.58, p.4019–4026, 2007.

BEWICK, A.J.; SCHMITZ, R.J. Gene body DNA methylation in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 36, p. 103-110, 2017.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças do feijoeiro. In: Kimati, H.; Amorin, L.; Bergamin Filho, A.; Camargo, L.E.A.; Rezende, J.A.M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4^a ed. São Paulo: Editora Ceres, p. 376- 399, 2005.

BIGEARD, J.; COLCOMBET, J.; HIRT, H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). **Molecular plant**, v. 8, p. 521-539, 2015.

BIŁAS, R.; SZAFRAN, K.; HNATUSZKO-KONKA, K.; KONONOWICZ, A.K. *Cis*-regulatory elements used to control gene expression in plants. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)**, v.127, p.269-287, 2016.

BITOCCHI, E.; BELLUCCI, E.; GIARDINI, A.; RAU, D.; RODRIGUEZ, M.; BIAGETTI, E.; SANTILOCCHI, R.; SPAGNOLETTI, P.Z.; GIOIA, T.; LOGOZZO, G.; ATTENE, G.; NANNI, L.; PAPA, R. Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean in Mesoamerican and the Andes. **New Phytologist**, v.197, p.300-331, 2013.

BLAIR, M.W. Mineral biofortification strategies for food staples: the example of common bean. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p.8287-8292, 2013.

BOERSMA, J.G.; HOU, A.; GILLARD, C.L.; MCRAE, K.B.; CONNER, R.L. Impact of common bacterial blight on the yield, seed weight and seed discoloration of different market classes of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.). **Canadian Journal of Plant Science**, v.95, p.703-710, 2015.

BRÄUTIGAM, K.; CRONK, Q. DNA methylation and the evolution of developmental complexity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 9, 2018.

CAMPA, A.; FERREIRA, J.J. Gene coding for an elongation factor is involved in resistance against powdery mildew in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v.130, p.849-860, 2017.

CARVALHO, J.J.; SAAD, J.C.C.; BASTOS, A.V.S.; NAVES, S.S.; SOARES, F.A.L.; VIDAL, V.M. Teor e acúmulo de nutrientes em grãos de feijão comum em semeadura direta, sob déficit hídrico. **Irriga**, Botucatu, Edição Especial 1, p.104-117, 2014.

CASTRILLO, G.; TURCK F.; LEVEUGLE M.; LECHARNY A.; CARBONERO P.; COUPLAND G.; PAZ-ARES J.; OÑATE-SÁNCHEZ L.; Speeding *cis-trans* regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of *Arabidopsis* transcription factors. **Plos one**, v.6, 2011.

CHANDRA, S.; SINGH, D.; PATHAK, J.; KUMARI, S.; KUMAR, M.; PODDAR, R.; BALYAN, H.S.; GUPTA, P.K.; PRABHU, K.V.; MUKHOPADHYAY, K. De novo assembled wheat transcriptomes delineate differentially expressed host genes in response to leaf rust infection. **PLoS One**, v.11, e0148453, 2016.

CHATTERJEE, S.; CHAUDHURY, S.; MCSHAN, A.C., KAUR, K.; DE GUZMAN, R.N. Structure and biophysics of type III secretion in bacteria. **Biochemistry**, v.52, n.15, p.2508–2517, 2013.

CHATURVEDI, S.; AGRAWAL, K.; KULSHRESTHA, S.; NARAYAN, A. Occurrence and characterization of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* associated with seeds of mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek) grown in Rajasthan state, India. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.7, p.534-538, 2018.

CHEN, M.; WU, J.; WANG, L.; MANTRI, N.; ZHANG, X.; ZHU, Z.; WANG, S. Mapping and genetic structure analysis of the anthracnose resistance locus co-1hy in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v.12, p.e0169954, 2017.

CHEN, X.; SCHÖNBERGER, B.; MENZ, J.; LUDEWIG, U. Plasticity of DNA methylation and gene expression under zinc deficiency in *Arabidopsis* roots. **Plant and Cell Physiology**, v.59, p.1790-1802, 2018.

CHI, Y.; YANG, Y.; ZHOU, Y.; ZHOU, J.; FAN, B.; YU, J.Q.; CHEN, Z. Protein–protein interactions in the regulation of WRKY transcription factors. **Molecular Plant**, v.6, p.287-300, 2013.

CHUJO, T.; SUGIOKA, N.; MASUDA, Y.; SHIBUYA, N.; TAKEMURA, T.; OKADA, K.; NOJIRI, H.; YAMANE, H. Promoter analysis of the elicitor-induced WRKY gene OsWRKY53, which is involved in defense responses in rice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.73, p.1901-1904, 2009.

COLICCHIO, J.M.; MIURA, F.; KELLY, J.K.; ITO, T.; HILEMAN, L.C. DNA methylation and gene expression in *Mimulus guttatus*. **BMC genomics**, v.16, p.507, 2015.

COLLS, H.J.; ISHII, H. Pre-treatment of cucumber plants with acibenzolar-S-methyl systemically primes a phenylalanine ammonia lyase gene (*PAL1*) for enhanced expression upon attack with a pathogenic fungus. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.61, n.5, p.273-280, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. v.6, 2019.

CORRÊA, B.O.; SOARES, V.N.; SANGIOGO, M.; DE OLIVEIRA, J.E.R.E.; MOURA, A.E.B. Interaction between bacterial biocontrol-agents and strains of *Xanthomonas*

axonopodis pv. *phaseoli* effects on biocontrol efficacy of common blight in beans. **African Journal of Microbiology Research**, v.11, p.1294-1302, 2017.

CRAMPTON, M.; SRIPATHI, V.R.; HOSSAIN, K.; KALAVACHARLA, V. Analyses of methylomes derived from Meso-American common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using MeDIP-seq and whole genome sodium bisulfite-sequencing. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.447, 2016.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, 2007. 648p.

CUI, H.; TSUDA, K.; PARKER, J.E. Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. **Annual Review of Plant Biology**, v.66, p.487–511, 2015.

DANGL, J.L.; HORVATH, D.M.; STASKAWICZ, B.J. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. **Science**, v.341, p.746–51, 2013.

DARRASSE, A.; BARRET, M.; CESBRON, S.; COMPANT, S.; JACQUES, M.A. Niches and routes of transmission of *Xanthomonas citri* pv. *fuscans* to bean seeds. **Plant and Soil**, v.422, p.115-128, 2018.

DAVID, L.; HARMON, A.C.; CHEN, S. Plant immune responses-from guard cells and local responses to systemic defense against bacterial pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v. 14, p. e1588667, 2019.

DE NADAL, E.; AMMERER, G.; POSAS, F. Controlling gene expression in response to stress. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, p. 833, 2011.

DEB, A.; KUNDU, S. Deciphering *cis*-regulatory element mediated combinatorial regulation in rice under blast infected condition. **PloS One**, v.10, e0137295, 2015.

DELGADO-CERRONE, L.; ALVAREZ, A.; MENA, E.; DE LEON, I.P.; MONTESANO, M. Genome-wide analysis of the soybean CRK-family and transcriptional regulation by biotic stress signals triggering plant immunity. **PloS one**, v.13, e0207438, 2018.

DEMANT, L.A.R.; MARINGONI, A.C. Controle da mancha angular do feijoeiro com uso de fungicidas e seu efeito na produção das plantas. **IDESIA**, v.30, p.93-100, 2012.

DEVENDRAKUMAR, K.T.; LI, X.; ZHANG, Y. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP-and effector-triggered immunity. **Cellular and molecular life sciences**, v.75, p.2981-2989, 2018.

DINIZ, I.; AZINHEIRA, H.; FIGUEIREDO, A.; GICHURU, E.; OLIVEIRA, H.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; SILVA, M.C. Fungal penetration associated with recognition, signaling and defence-related genes and peroxidase activity during the resistance response of coffee to *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.105, p.119-127, 2019.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh

leaf tissue. **Phytochemical Bulletin**, v.19, p.11-15, 1987.

EBADZAD, G.; CRAVADOR, A. Quantitative RT-PCR analysis of differentially expressed genes in *Quercus suber* in response to *Phytophthora cinnamomi* infection. **SpringerPlus**, v.3, p. 613, 2014.

ERDINC, C.; EKINCIALP, A.; AKKÖPRÜ, A.; YILDIZ, M.; ŞENSOY, S. Evolution of common beans collected from lake van basin for their resistance to the common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*). **Applied Ecology and Environmental Research**, v.16, p.5181-5191, 2018.

ESPINAS, N.A.; SAZE, H.; SAIJO, Y. Epigenetic control of defense signaling and priming in plants. **Frontiers in Plant Science**, v.7, p.1201, 2016.

FICHMAN, Y.; GERDES, S.Y.; KOVÁCS, H.; SZABADOS, L.; ZILBERSTEIN, A.; CSONKA, L.N. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. **Biological Reviews**, v.90, p.1065–1099, 2015.

FIGUEIREDO, A.; LOUREIRO, A.; BATISTA, D.; MONTEIRO, F.; VÁRZEA, V.; PAIS, M.S.; GICHURU, E.K.; SILVA, M.C. Validation of reference genes for normalization of qPCR gene expression data from *Coffea* spp. hypocotyls inoculated with *Colletotrichum kahawae*. **BMC research notes**, v.6, p.388, 2013.

FINATTO, T.; VIANA, V.E.; WOYANN, L.G.; BUSANELLO, C.; MAIA, L.C.D.; OLIVEIRA, A.C.D. Can WRKY transcription factors help plants to overcome environmental challenges? **Genetics and molecular biology**, v.41, p.533-544, 2018.

FINKE, A.; ROZHON, W.; PECINKA, A. Analysis of DNA methylation content and patterns in plants. In **Polyamines**, p. 277-298. Humana Press, New York, NY, 2018.

FORSYTH, A.; MANSFIELD, J.W.; GRABOV, N.; DE TORRES, M.; SINAPIDOU, E.; GRANT, M.R. Genetic dissection of basal resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in accessions of *Arabidopsis*. **Molecular Plant-Microbe Interact**, v.23, p.1545–1552, 2010.

FUKUOKA, S.; YAMAMOTO, S.I.; MIZOBUCHI, R.; YAMANOUCHI, U.; ONO, K.; KITAZAWA, N.; YASUDA, N.; FUJITA, N.; NGUYEN, T.T.T.; KOIZUMI, S.; SUGIMOTO, K.; MATSUMOTO, T.; YANO, M. Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. **Scientific Reports**, v.4, p.4550, 2014.

FULTZ, D.; CHOUDURY, S.G.; SLOTKIN, R.K. Silencing of active transposable elements in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v.27, p.67-76, 2015.

GALLUSCI, P.; DAI, Z.; GÉNARD, M.; GAUFFRETAU, A.; LEBLANC-FOURNIER, N.; RICHARD-MOLARD, C.; VILE, D.; BRUNEL-MUGUET, S. Epigenetics for plant improvement: Current Knowledge and Modeling avenues. **Trends in Plant Science**, v.22, p.610-623, 2017.

GAO, Y.; ZAN, X.L.; WU, X.F.; YAO, L.; CHEN, Y.L.; JIA, S.W.; ZHAO, K.J. Identification

of fungus-responsive cis-acting element in the promoter of *Brassica juncea* chitinase gene, *BjCHI1*. **Plant Science**, v.215, p.190–198, 2014.

GARDINER, L.J.; QUINTON-TULLOCH, M.; OLOHAN, L.; PRICE, J.; HALL, N.; HALL, A. A genome-wide survey of DNA methylation in hexaploid wheat. **Genome Biology**, v.16, p.273, 2015.

GÖHRE, V.; ROBATZEK, S. Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. **Annual Review of Phytopathology**, v.46, p.189-215, 2008.

GÖHRE, V.; JONES, A.M.; SKLENÁŘ, J.; ROBATZEK, S.; WEBER, A.P. Molecular crosstalk between PAMP-triggered immunity and photosynthesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25, p.1083-1092, 2012.

GOODSTEIN, D.M.; SHU, S.; HOWSON, R.; NEUPANE, R.; HAYES, R.D.; FAZO, J.; MITROS, T.; DIRKS, W.; HELLSTEN, U.; PUTNAM, N.; ROKHSAR, D.S. Phytozome: a comparative platform for green plant genomics, *Nucleic Acids Research*. 2012 40 (D1): D1178- D1186 Disponível em: <<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>>.

GOSZCZYNSKA, T.; SERFONTEIN, J.J. Milk-Tween agar, a semi-selective medium for isolation and differentiation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* and *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. [S.l.]: **Journal Microbiological Methods**, p.65-72, 1998.

GOURBAL, B.; PINAUD, S.; BECKERS, G.J.; VAN DER MEER, J.W.; CONRATH, U.; NETEA, M.G. Innate immune memory: An evolutionary perspective. **Immunological Reviews**, v.283, p.21-40, 2018.

GOYAL, N.; BHATIA, G.; SHARMA, S.; GAREWAL, N.; UPADHYAY, A.; UPADHYAY, S. K.; SINGH, K. Genome-wide characterization revealed role of NBS-LRR genes during powdery mildew infection in *Vitis vinifera*. **Genomics**, 2019.

GUPTA, B.; HUANG, B. Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. **International journal of genomics**, v. 2014, 2014.

GUST, A.A.; PRUITT, R.; NÜRNBERGER, T. Sensing danger: key to activating plant immunity. **Trends in plant science**, v.22, p.779-791, 2017.

HAEUSSLER M.; JOLY J. L.; When needles look like hay: How to find tissuespecific enhancers in model organism genomes. **Developmental Biology**, v.350, p.239-254 2010.

HAILU, N.; FININSA, C.; TANA, T.; MAMO, G. Effects of temperature and moisture on growth of common bean and its resistance reaction against common bacterial blight (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* strains). **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v.8, p.1-6, 2017.

HERNANDEZ-GARCIA, C.M.; FINER, J.J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Science**, v.217, p.109-119, 2014.

HEWEZI, T. epigenetic regulation of plant development and stress responses. **Plant Cell Reports**, v.37, p.1-2, 2018.

HIROYUKI, K.; TERAUCHI, R. Regulation of expression of rice thaumatin-like protein: inducibility by elicitor requires promoter W-box elements. **Plant Cell Reports**, v.27, p.1521–1528, 2008.

HOLOCH, D.; MOAZED, D. RNA-mediated epigenetic regulation of gene expression. **Nature Reviews Genetics**, v.16, p.71–84, 2015.

HOSSAIN, M. S.; KAWAKATSU, T.; DO KIM, K.; ZHANG, N.; NGUYEN, C.T.; KHAN, S.M.; BATEK, J.M.; JOSHI, T.; SCHMUTZ, J.; GRIMWOOD, J.; SCHMITZ, R.J.; XU, D.; JACKSON, S.A.; ECKER, J.R.; STACEY, G. Divergent cytosine DNA methylation patterns in single-cell, soybean root hairs. **New Phytologist**, v.214, p.808-819, 2017.

HOU, S.; ZHANG, C.; YANG, Y.; WU, D. Recent advances in plant immunity: recognition, signaling, response, and evolution. **Biologia Plantarum**, v.57, p.11-25, 2013.

ITO, T.M.; TREVIZAN, C.B.; SANTOS, T.B.; SOUZA, S.G.H. Genome-Wide Identification and Characterization of the *Dof* Transcription Factor Gene Family in *Phaseolus vulgaris* L. **American Journal of Plant Sciences**, v.8, p.3233-3257, 2017.

JAMIESON, P.A.; SHAN, L.; HE, P. Plant cell surface molecular cypher: receptor-like proteins and their roles in immunity and development. **Plant science**, v.274, p.242-251, 2018.

JIAO, Q.S.; FENG, H.Q.; TIAN, W.Y.; BAI, J.Y.; SUN, K.; JIA, L.Y.; ZHANG, J.P. Extracellular ATP functions in alleviating the decrease of PSII photochemistry caused by the infection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Plant Pathology**, v.65, p.819-825, 2016.

KADOTA, Y.; LIEBRAND, T.W.H.; GOTO, Y.; SKLENAR, J.; DERBYSHIRE, P.; MENKE, F.L.H.; TORRES, M.A.; MOLINA, A.; ZIPFEL, C.; COAKER, G.; SHIRASU, K. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals common regulatory mechanisms between effector-and PAMP-triggered immunity in plants. **New Phytologist**, v.221, p. 2160-2175, 2019.

KANG, H.; WANG, Y.; PENG, S.; ZHANG, Y.; XIAO, Y.; WANG, D.; QU, S.; LI, Z.; YAN, S.; WANG, Z.; LIU, W.; NING, Y.; KORNILIEV, P.; LEUNG, H.; MEZEY, J.; MCCOUCH, S.R.; WANG, G.L. Dissection of the genetic architecture of rice resistance to the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant Pathology**, v.17, p.959-972, 2016.

KANYUKA, K.; RUDD, J.J. Cell surface immune receptors: the guardians of the plant's extracellular spaces. **Current Opinion in Plant Biology**, v.50, p.1-8, 2019.

KAUR, A.; PATI, P.K.; PATI, A.M.; NAGPAL, A.K. In-silico analysis of cis-acting regulatory elements of pathogenesis-related proteins of *Arabidopsis thaliana* and

Oryza sativa. **PloS one**, v.12, p.e0184523, 2017.

KHAN, M.; SETO, D.; SUBRAMANIAM, R.; DESVEAUX, D. Oh, the places they'll go! A survey of phytopathogen effectors and their host targets. **The Plant Journal**, v.93, p.651-663, 2018.

KIM, S.; CHO, Y.J.; SONG, E.S.; LEE, S.H.; KIM, J.G.; KANG, L.W. Time-resolved pathogenic gene expression analysis of the plant pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. **BMC Genomics**, v.17, p.345, 2016.

KONG, W.; DING, L.; CHENG, J.; WANG, B. Identification and expression analysis of genes with pathogen-inducible *cis*-regulatory elements in the promoter regions in *Oryza sativa*. **Rice**, v.11, p.52, 2018.

KOURELIS, J.; VAN DER HOORN, R.A.L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. **The Plant Cell**, v.30, p.285-299, 2018.

KUMAR, S. Epigenomics of plant responses to environmental stress. **Epigenomes**, v.2, p.2-17, 2018.

KUSHALAPPA, A.C.; YOGENDRA, K.N.; KARRE, S. Plant innate immune response: qualitative and quantitative resistance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.35, p.38-55, 2016.

LÄMKE, J.; BÄURLE, I. Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. **Genome biology**, v.18, p. 124, 2017.

LAURIA, M.; ECHEGOYEN-NAVA, R.A.; RODRÍGUEZ-RÍOS, D.; ZAINA, S.; LUND, G. Inter-individual variation in DNA methylation is largely restricted to tissue-specific differentially methylated regions in maize. **BMC Plant Biology**, v.17, p.52, 2017.

LE, B.; NAWAZ, M.A.; REHMAN, H.M.; LE, T.; YANG, S.H.; GOLOKHAVAST, K.S.; SON, E.; CHUNG, G. Genome-wide characterization and expression pattern of auxin response factor (ARF) gene family in soybean and common bean. **Genes & Genomics**, v.38, p.1165-1178, 2016.

LE, T.N.; SCHUMANN, U.; SMITH, N.A.; TIWARI, S.; AU, P.C.K.; ZHU, Q.H.; TAYLOR, J.M.; KAZAN, K.; LLEWELLYN, D.J.; ZHANG, R.; DENNIS, E.S.; WANG, M.B. DNA demethylases target promoter transposable elements to positively regulate stress responsive genes in Arabidopsis. **Genome Biology**, v.15, p.458, 2014.

LEBEN, C.; SLEESMAN, J.P. Bacterial pathogens: reducing seed and in vitro survival by physical treatments. **Plant Disease**, v.65, p.876-878, 1981.

LESCOT, M.; DÉHAIS, P.; THIJS, G.; MARCHAL, K.; MOREAU, Y.; VAN DE PEER, Y.; ROUZÉ, P.; ROMBAUTS, S. PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.325-327, 2002.

LETA, A.; LAMESSA, F.; AYANA, G. Occurrence and Importance of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L) Seed Produced under Different Seed Production System in Central Rift Valley of Ethiopia. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v.8, p.1-5, 2017.

LI, C.; LIU, Y.; ZHENG, Y.; YAN, C.; ZHANG, T.; SHAN, S. Cloning and characterization of an NBS-LRR resistance gene from peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.84, p.70–75, 2013.

LIMA-PRIMO, H.E.; HALFELD-VIEIRA, B.D.A.; NECHET, K.D.L.; SOUZA, G.R.; MIZUBUTI, E.S.; OLIVEIRA, J.R. Influence of Bacterial Blight on different phenological stages of cowpea. **Scientia Horticulturae**, v.255, p.44-51, 2019.

LIU, F.; GUO, D.D.; TU, Y.H.; XUE, Y.R.; GAO, Y.; GUO, M.L. Identification of reference genes for gene expression normalization in safflower (*Carthamus tinctorius*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.26, p.564-570, 2016.

LOZANO, R.; HAMBLIN, M.T.; PROCHNIK, S.; JANNINK, J.L. Identification and distribution of the NBS-LRR gene family in the Cassava genome. **BMC Genomics**, v.16, p.360, 2015.

LU, D.; WU, S.; GAO, X.; ZHANG, Y.; SHAN, L.; HE, P. A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.107, p.496-501, 2010.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes, Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras Para Análise de Sementes**. 1. ed. Brasília: MA-SDA-CGAL, 2009.

MARIANO, R. L. R.; SILVEIRA, E. B. Isolamento de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Editora da Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000. p.27-35.

MARINGONI, A.C. **Método de quantificação de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro**. Curso de detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. Campinas: CATI, 1998, 8 p.

MENG, X., ZHANG, S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling. **Annual review of phytopathology**, v.51, p.245-266, 2013.

MENG, Y.; LI, N.; TIAN, J.; GAO, J.; ZHANG, C. Identification and validation of reference genes for gene expression studies in postharvest rose flower (*Rosa hybrida*). **Scientia Horticulturae**, v.158, p.16-21, 2013.

MIKLAS, P.N.; FOURIE, D.; CHAVES, B.; CHIREMBE, C. Common bacterial blight resistance QTL BC420 and SU91 effect on seed yield. **Crop Science**, v.57, p. 802-811, 2017.

MOKRANI, S.; RAI, A.; BELABID, L.; CHERIF, A.; CHERIF, H.; MAHJOURI, M.; NABTI, E. *Pseudomonas* diversity in western Algeria: role in the stimulation of bean germination and common bean blight biocontrol. **European Journal of Plant Pathology**, v.153, p.397-415, 2019.

MONTEIRO, F.; SEBASTIANA, M.; PAIS, M.S.; FIGUEIREDO, A. Reference gene selection and validation for the early responses to downy mildew infection in susceptible and resistant *Vitis vinifera* cultivars. **PLoS ONE**, v.8, p.e72998, 2013.

MUTHUSAMY, S.K.; DALAL, M.; CHINNUSAMY, V.; BANSAL, K.C. Genome-wide identification and analysis of biotic and abiotic stress regulation of small heat shock protein (HSP20) family genes in bread wheat. **Journal of plant physiology**, v.211, p.100-113, 2017.

MUTLU, N.; VIDAVER, A.K.; COYNE, D.P.; STEADMAN, J.R.; LAMBRECHT, P.A.; REISER, J. Differential pathogenicity of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. fuscans* subsp. *fuscans* strains on bean genotypes with common blight resistance. **Plant Disease**, v.92, p. 546-554, 2008.

NEJAT, N.; ROOKES, J.; MANTRI, N.L.; CAHILL, D.M. Plant–pathogen interactions: toward development of next-generation disease-resistant plants. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.37, p.229-237, 2017.

NOMAN, A.; AQEEL, M.; LOU, Y. PRRs and NB-LRRs: From Signal Perception to Activation of Plant Innate Immunity. **International journal of molecular sciences**, v. 20, p. 1882, 2019.

OSDAGHI, E.; ZADEMOHAMAD, A.A. *Phaseolus lunatus*, a New Host of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in Iran. **Journal of Phytopathology**, v. 164, p. 56-60, 2016.

PANDEY, S.; SUBRAMANAYM REDDY, C.; YAQOUB, U.; NEGI, Y.K.; ARORA, S. In silico Analysis of cis acting Regulatory Elements CAREs in Upstream Regions of Ascorbate Glutathione Pathway Genes from *Oryza sativa*. **Biochemistry and Physiology**, v.4 p.2, 2015.

PASSRICHA, N.; SAIFI, S.; ANSARI, M.W.; TUTEJA, N. Prediction and validation of cis-regulatory elements in 5' upstream regulatory regions of lectin receptor-like kinase gene family in rice. **Protoplasma**, v.254, p.669-684, 2017.

PATIL, A.G.; AMBADKAR, C.V.; KASHID, V.S.; NAVGIRE, K.D. Standardization of methods for pathogenicity of pomegranate bacterial blight caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *punicae*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v.6, p.1763-1765, 2017.

PAULUS, J.K.; VAN DER HOORN, R.A. Tricked or trapped—Two decoy mechanisms in host–pathogen interactions. **PLoS Pathogens**, v.14, e1006761, 2018.

PENG, X.; WANG, H.; JANG, J.C.; XIAO, T.; HE, H.; JIANG, D.; TANG, X. OsWRKY80-OsWRKY4 module as a positive regulatory circuit in rice resistance against

Rhizoctonia solani. **Rice**, v.9, p.63, 2016.

PENG, Y.; VAN WERSCH, R.; ZHANG, Y. Convergent and divergent signaling in PAMP-triggered immunity and effector-triggered immunity. **Molecular plant-microbe interactions**, v.31, p.403-409, 2018.

PETRICCIONE, M.; MASTROBUONI, F.; ZAMPELLA, L.; SCORTICHINI, M. Reference gene selection for normalization of RT-qPCR gene expression data from *Actinidia deliciosa* leaves infected with *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*. **Scientific reports**, v.5, p.16961, 2015.

PÉREZ-BUENO, M.L.; PINEDA, M.; DÍAZ-CASADO, E.; BARÓN, M. Spatial and temporal dynamics of primary and secondary metabolism in *Phaseolus vulgaris* challenged by *Pseudomonas syringae*. **Physiologia Plantarum**, v.153, p.161-174, 2015.

RIBEIRO, T.; AZEVEDO, C.V.G.; ESTEVES, J.A.D.F.; CARBONELL, S. A. M.; ITO, M.F.; CHIORATO, A.F. Reaction of common bean lines to *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.17, p.40-46, 2017.

RICHARD, M.M.; GRATIAS, A.; THAREAU, V.; KIM, K.D.; BALZERGUE, S.; JOETS, J.; JACKSON, S.A.; GEFFROY, V. Genomic and epigenomic immunity in common bean: the unusual features of NB-LRR gene family. **DNA Research**, v.25, p.161-172, 2017.

ROACH, H.I.; HASHIMOTO, K. PCR-based methods to determine DNA methylation status at specific CpG sites using methylation-sensitive restriction enzymes. In: **Methods Express: PCR**, ed. S. Hughes and A. Moody, pp. 279–292. Bloxham, Oxfordshire, UK: Scion Publishing Ltd, 2007.

RODRIGUES, L. M.; ALMEIDA, I. M.; PATRÍCIO, F. R.; BERIAM, L. O.; MACIEL, K. W.; BRAGHINI, M. T.; GUERREIRO FILHO, O. Aggressiveness of strains and inoculation methods for resistance assessment to bacterial halo blight on coffee seedlings. **Journal of Phytopathology**, v.165, p.105-114, 2017.

RODRÍGUEZ DE LUQUE, J.J.; CREAMER, B. Major constraints and trends for common bean production and commercialization; establishing priorities for future research. **Agronomia Colombiana**, v.32, p. 423-431, 2015.

RASBAND, W.S. ImageJ. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. (1997-2015) <http://imagej.nih.gov/ij>

SAGI, M.S.; DEOKAR, A.A.; TAR'AN, B. Genetic analysis of NBS-LRR gene family in chickpea and their expression profiles in response to *Ascochyta* blight infection. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.838, 2017.

SATO, Y.; MIYASHITA, S.; ANDO, S.; TAKAHASHI, H. Increased cytosine methylation at promoter of the NB-LRR class R gene RCY1 correlated with compromised resistance to cucumber mosaic virus in EMS-generated src mutants of *Arabidopsis*

thaliana. **Physiological and molecular plant pathology**, v.100, p.151-162, 2017.

SCHMUTZ, J.; MCCLEAN, P.E.; MAMIDI, S.; WU, G.A.; CANNON, S.B.; GRIMWOOD, J.; JENKINS, J.; SHU, S.; SONG, Q.; CHAVARRO, C.; TORRES-TORRES, M.; GEFFROY, V.; MOGHADDAM, S.M.; GAO, D.; BRIAN ABERNATHY, B.; BARRY, K.; BLAIR, M.; BRICK, M.A.; CHOVIATIA, M.; GEPTS, P.; GOODSTEIN, D.M.; GONZALES, M.; HELLSTEN, U.; HYTEN, D.L.; JIA, G.; KELLY, J.D.; KUDRNA, D.; LEE, R.; RICHARD, M.M.S.; MIKLAS, P.N.; OSORNO, J.M.; RODRIGUES, J.; THAREAU, V.; URREA, C.A.; WANG, M.; YU, Y.; ZHANG, M.; WING, R.A.; CREGAN, P.B.; ROKHSAR, D.S.; JACKSON, S.A. A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. **Nature Genetics**, v.46, 707-713, 2014.

SCHUMACHER, A.; KAPRANOV, P.; KAMINSKY, Z.; FLANAGAN, J.; ASSADZADEH, A.; YAU, P.; VIRTANEN, C.; WINEGARDEN, N.; CHENG, J.; GINGERAS, T.; PETRONIS, A. Microarray-based DNA methylation profiling: technology and applications. **Nucleic Acids Research**, v.34, p.528-542, 2006.

SHAO, Z.Q.; XUE, J.Y.; WU, P.; ZHANG, Y.M.; WU, Y.; HANG, Y.Y.; WANG, B.; CHEN, J.Q. Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns. **Plant physiology**, v.170, p.2095-2109, 2016.

SHARMA, R.; RAWAT, V.; SURESH, C.G. Genome-wide identification and tissue-specific expression analysis of nucleotide binding site-leucine rich repeat gene family in *Cicer arietinum* (kabuli chickpea). **Genomics data**, v.14, p.24-31, 2017.

SHEHZADI, A.; MUHAMMAD, H.; ABBAS, K.; AHMED, Z.; SALEEM, S. Effect plant disease resistance genes: recent applications and future perspectives. **Journal of Innovation Bio-Research**, v.1, p.86-103, 2017.

SHI, L.; WENG, J.; LIU, C.; SONG, X.; MIAO, H.; HAO, Z.; XIE, C.; LI, M.; ZHANG D, BAI L, PAN G, LI X, ZHANG S. Identification of promoter motifs regulating Zmelf4E expression level involved in maize rough dwarf disease resistance in maize (*Zea mays* L.). **Molecular Genetics and Genomics**, v.288, p.89–99, 2013.

SHI, Q.; FEBRES, V.J.; JONES, J.B.; MOORE, G.A. Responsiveness of different citrus genotypes to the *Xanthomonas citri* ssp. *citri*-derived pathogen-associated molecular pattern (PAMP) flg22 correlates with resistance to citrus canker. **Molecular plant pathology**, v.16, p.507-520, 2015.

SILVA, A.D.; SANTOS, I.D.; BALBINOT, A.L.; MATEI, G.; OLIVEIRA, P.D. Reação de genótipos de feijão ao crestamento bacteriano comum, avaliado por dois métodos de inoculação. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, p.2019-2024, 2009.

SILVA, F.C.; SOUZA, R.M. de; ZACARONI, A.B.; LELIS, F.M.V.; FIGUEIRA, A. dos R. Otimização da técnica de PCR para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão. **Summa Phytopathologica**, v.39, p.45-50, 2013.

SONG, H.; WANG, P.F.; LI, T.T.; XIA, H.; ZHAO, S.Z.; HOU, L.; ZHAO, C.Z. Genome-wide identification and evolutionary analysis of nucleotide-binding site-encoding

resistance genes in *Lotus japonicus* (Fabaceae). **Genetics and Molecular Research**, v.14, p.16024-16040, 2015.

SONG, Q.X.; LU, X.; LI, Q.T.; CHEN, H.; HU, X.Y.; MA, B.; ZHANG, W.K.; CHEN, S.Y.; ZHANG, J.S. Genome-wide analysis of DNA methylation in soybean. **Molecular Plant**, v.6, p.1961-1974, 2013.

SOUSA CARDOSO, T.C.; PORTILHO, L.G.; OLIVEIRA, C.L.; MCKEOWN, P.C.; MALUF, W.R.; GOMES, L.A.A.; TEIXEIRA, T.A.; AMARAL, L.R.; SPILLANE, C.; SOUZA GOMES, M. Genome-wide identification and in silico characterisation of micro RNAs, their targets and processing pathway genes in *Phaseolus vulgaris* L. **Plant Biology**, v.18, 206-219, 2016.

SRIVASTAVA, P.K.; MOTURU, T.R.; PANDEY, P.; BALDWIN, I.T.; PANDEY, S.P.A comparison of performance of plant miRNA target prediction tools and the characterization of features for genome-wide target prediction. **BMC Genomics**, v.15, p.348, 2014.

SSEKIWOKO, F.; KIGGUNDU, A.; TUSHEMEREIRWE, W.K.; KARAMURA, E.; KUNERT, K. *Xanthomonas vasicola* pv. *musacearum* down-regulates selected defense genes during its interaction with both resistant and susceptible banana. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.90, p.21-26, 2015.

SULTANA, R.; ISLAM, S.; ISLAM, A.; SIKDAR, B. Identification of pathogen causing common bacterial blight (CBB) of bean through the biochemical and molecular pathway and their management system. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.6, p.752-757, 2018.

SUN, R.; WANG, S.; MA, D.; LIU, C. Genome-Wide Analysis of LRR-RLK Gene Family in Four *Gossypium* Species and Expression Analysis during Cotton Development and Stress Responses. **Genes**, v.9, p.592, 2018.

TAÏBI, K.; TAÏBI, F.; ABDERRAHIM, L.A.; ENNAJAH, A.; BELKHODJA, M.; MULET, J.M. Effect of salt stress on growth, chlorophyll content, lipid peroxidation and antioxidant defence systems in *Phaseolus vulgaris* L. **South African Journal of Botany**, v.105, p.306-312, 2016.

TAKAHASHI, S.; OSABE, K.; FUKUSHIMA, N.; TAKUNO, S.; MIYAJI, N.; SHIMIZU, M.; YASUDA, T.T.; SUZUKI, Y.; DENNIS, E.S.; SEKI, M.; FUJIMOTO, R. Genome-wide characterization of DNA methylation, small RNA expression, and histone H3 lysine nine di-methylation in *Brassica rapa* L. **DNA Research**, v.25, p.511-520, 2018.

TAKKEN F.; REP, M. The arms race between tomato and *Fusarium oxysporum*. **Molecular Plant Pathology**, v.11, p.309-314, 2010.

TANG, K.; LANG, Z.; ZHANG, H.; ZHU, J.K. The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. **Nature Plants**, v.2, p.16169, 2016.

TATIS, P.A.D.; CORZO, M.H.; CABEZAS, J.C.O.; CIPAGAUTA, A.M.; PRÍAS, M.A.;

VERDIER, V.; AGUIRRE, P.C.; CARRASCAL, C.E.L. The overexpression of *RXam1*, a cassava gene coding for an RLK, confers disease resistance to *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Planta**, v.247, p.1031-1042, 2018.

THEODORO, G.F.; CORREIA, H.C.; CHUMPATI, A.A. Avaliação da transmissão de *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* via semente-algodoeiro em condições de campo, no cerrado sul-mato-grossense. **Bioscience Journal**, v.27, p.701-705, 2011.

THULASI, K.D.; LI, X.; ZHANG, Y. MAP kinase signalling: interplays between plant PAMP- and effector-triggered immunity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.75, p.2981–2989, 2018.

TORRES, J.P.; MARINGONI, A.C. Métodos de inoculação, estádios de desenvolvimento fenológico da planta e reação de cultivares de feijoeiro a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.23, p.124-129, 1999.

TORRES, M.J.; PÉREZ BRANDAN, C.; SABATÉ, D.C.; PETROSELLI, G.; ERRA-BALSELLS, R.; AUDISIO, M.C. Biological activity of the lipopeptide-producing *Bacillus amyloliquefaciens* PGPBacCA1 on common bean *Phaseolus vulgaris* L. pathogens. **Biological Control**, v.105, p.93–99, 2017.

TRINDADE, R.S. Melhoramento para resistência genética ao cretamento bacteriano comum em feijão comum e feijão-de-vagem: aspectos gerais, avanços desafios e perspectivas. **Enciclopédia Biosfera**, v.8, n.15, p.1204-1231, 2012.

TUGUME, J.K.; TUSIIME, G.; SEKAMATE, A.M.; BURUCHARA, R.; MUKANKUSI, C. Diversity and interaction of common bacterial blight disease-causing bacteria (*Xanthomonas* spp.) with *Phaseolus vulgaris* L. **The Crop Journal**, v.7, p.1-7, 2019.

UNTERGASSER A.; NIJVEEN H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, 41 J. A. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, v.35, p.71– 74, 2007.

VAN DER BURGH, A.M.; JOOSTEN, M.H.A.J. Plant Immunity: Thinking Outside and Inside the Box. **Trends in Plant Science**, 2019.

VAN DER WOLF, J.M.; DE HAAN, E.G.; KASTELEIN, P.; KRIJGER, M.; DE HAAS, B.H.; VELVIS, H.; MENDES, O.; KOOMAN-GERSMANN, M.; VAN DER ZOUWEN, P.S. Virulence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliense* on potato compared with that of other *Pectobacterium* and *Dickeya* species under climatic conditions prevailing in the Netherlands. **Plant Pathology**, v.66, p.571-583, 2016.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v.3, p.1-12, 2002.

VIGO, S.C.; MARINGONI, A.C.; CÂMARA, R. DE C.; LIMA, G.P.P. Ação de tinturas e óleos essenciais de plantas medicinais sobre o cretamento bacteriano comum do

feijoeiro e na produção de proteínas de indução de resistência. **Summa Phytopathologica**, v.35, p.293-304, 2009.

VIVAN, G.A.; ROBAINA, A.D.; PEITER, M.X.; PARIZI, A.R.C.; BARBOZA, F.S.; SOARES, F.C. Rendimento e rentabilidade das culturas da soja, milho e feijão cultivados sob condições de sequeiro. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, 2015.

WAN, Q.; CHEN, S.; SHAN, Z.; YANG, Z.; CHEN, L.; ZHANG, C.; YUAN, S.; HAO, Q.; ZHANG, X.; QIU, D.; CHEN, H.; ZHOU, X. Stability evaluation of reference genes for gene expression analysis by RT-qPCR in soybean under different conditions. **PLoS One**, v.12, p.e0189405, 2017.

WANG, G.; ZENG, H.; HU, X.; ZHU, Y.; CHEN, Y.; SHEN, C.; WANG, H.; POOVAIAH B.W.; DU, L. Identification and expression analyses of calmodulin-binding transcription activator genes in soybean. **Plant and soil**, v.386, p.205-221, 2015.

WANG, K.; SENTHIL-KUMAR, M.; RYU, C.M.; KANG, L.; MYSORE, K.S. Phytosterols play a key role in plant innate immunity against bacterial pathogens by regulating nutrient efflux into the apoplast. **Plant Physiology**, v.158, p.1789-1802, 2012.

WANG, P.; XIA, H.; ZHANG, Y.; ZHAO, S.; ZHAO, C.; HOU, L.; LI, C.; LI, A.; MA, C.; WANG, X. Genome-wide high-resolution mapping of DNA methylation identifies epigenetic variation across embryo and endosperm in maize (*Zea mays*). **BMC genomics**, v.16, p.21, 2015.

WANG, Z.; WU, X.; WU, Z.; AN, H.; YI, B.; WEN, J.; MA, C.; SHEN, J.; FU, T.; TU, J. (2018). Genome-wide DNA methylation comparison between *Brassica napus* genic male sterile line and restorer line. **International Journal of Molecular Sciences**, v.19, p.2689, 2018.

WANI, Z.A.; ASHRAF, N. Transcriptomic Studies Revealing Enigma of Plant-Pathogen Interaction. In: **Molecular Aspects of Plant-Pathogen Interaction**. Springer, Singapore, 2018. p. 219-238.

WEI, Z.; WANG, J.; YANG, S.; SONG, Y. Identification and expression analysis of the LRR-RLK gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) Heinz 1706. **Genome**, v.58, p.121-134, 2015.

WENDTE, J.M.; ZHANG, Y.; JI, L.; SHI, X.; HAZARIKA, R.R.; SHAHRYARY, Y.; JOHANNES, F.; SCHMITZ, R.J. Epimutations are associated with CHROMOMETHYLASE 3-induced de novo DNA methylation. **eLife**, v.8, e47891, 2019.

WITTKOPP, P.J.; KALAY, G. Cis-regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence. **Nature Reviews Genetics**, v.13, p.59, 2012.

WU, J.; ZHAO, Q.; YANG, Q.; LIU, H.; LI, Q.; YI, X.; CHENG, Y.; GOU, L.; FAN, C.; ZHOU, Y. Comparative transcriptomic analysis uncovers the complex genetic network for resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Brassica napus*. **Scientific reports**, v.6,

p.19007, 2016.

WU, J.; ZHU, J.; WANG, L.; WANG, S. Genome-wide association study identifies NBS-LRR-encoding genes related with anthracnose and common bacterial blight in the common bean. **Frontiers in Plant Science**, v.8, p.1398, 2017.

YANG, X.; WANG, J. Genome-wide analysis of NBS-LRR genes in Sorghum genome revealed several events contributing to NBS-LRR gene evolution in grass species. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 12, p. EBO. S36433, 2016.

YANG, Y.; ZHOU, Y.; CHI, Y.; FAN, B.; CHEN, Z. Characterization of soybean WRKY gene family and identification of soybean WRKY genes that promote resistance to soybean cyst nematode. **Scientific reports**, v.7, 17804, 2017.

YOODEE, S.; KOBAYASHI, Y.; SONGNUAN, W.; BOONCHIRD, C.; THITAMADEE, S.; KOBAYASHI, I.; NARANGAJAVANA, J. Phytohormone priming elevates the accumulation of defense-related gene transcripts and enhances bacterial blight disease resistance in cassava. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.122, p.65-77, 2018.

YUE, C.; CAO, H.; LIN, H.; HU, J.; YE, Y.; LI, J.; HAO, Z.; HAO, X.; SUN, Y.; YANG, Y.; WANG, X. Expression patterns of alpha-amylase and beta-amylase genes provide insights into the molecular mechanisms underlying the responses of tea plants (*Camellia sinensis*) to stress and postharvest processing treatments. **Planta**, p.1-18, 2019.

YUN, S.H.; ZHAO, J.P.; JIANG, X.L.; ZHANG, B.Y.; SU, X.H. Involvement of microRNA-mediated gene expression regulation in the pathological development of stem canker disease in *Populus trichocarpa*. **PLoS ONE**, v.7, e44968, 2012.

ZHANG, H.; LANG, Z.; ZHU, J.K. Dynamics and function of DNA methylation in plants. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.19, p.489-506, 2018.

ZHANG W.; RUAN J.; HO T.D.; YOU Y.; YU T.; QUATRANO R.S.; Cis-regulatory element based targeted gene finding: genome-wide identification of abscisic acid and abiotic stress-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. **Bioinformatics**, v.21, p.3074–3081, 2005.

ZHANG, Y.; XIA, R.; KUANG, H.; MEYERS, B.C. The diversification of plant NBS-LRR defense genes directs the evolution of microRNAs that target them. **Molecular biology and evolution**, v.33, p.2692-2705, 2016.

ZHAO, B.; CAO, J.F.; HU, G.J.; CHEN, Z.W.; WANG, L.Y.; SHANGGUAN, X.X.; WANG, L.L.; MAO, B.Y.; ZHANG, T.Z.; WENDEL, J.F.; CHEN, X.Y. Core cis-element variation confers subgenome-biased expression of a transcription factor that functions in cotton fiber elongation. **New Phytologist**, v.218, p.1061-1075, 2018.

ZHENG, J.; LIU, F.; ZHU, C.; LI, X.; DAI, X.; YANG, B.; ZOU, X.; MA, Y. Identification, expression, alternative splicing and functional analysis of pepper WRKY gene family in response to biotic and abiotic stresses. **PLoS one**, v.14, e0219775, 2019.

ZHOU, M.; LI, D.; LI, Z.; HU, Q.; YANG, C.; ZHU, L.; LUO, H. Constitutive Expression of a miR319 Gene Alters Plant Development and Enhances Salt and Drought Tolerance in Transgenic Creeping Bentgrass. **Plant Physiology**, v.161, p.1375-1391, 2013.

ZIPFEL, C. Plant pattern-recognition receptors. **Trends in Immunology**, v.35, p.345–351, 2014.

ZOU, C.; SUN, K.; MACKALUSO, J.D.; SEDDON, A.E.; JIN, R.; THOMASHOW, M.F.; SHIU, S.H. *Cis*-regulatory code of stress-responsive transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.108, p.14992-14997, 2011.