

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Perfil transcricional de genótipos de feijoeiro-comum contrastantes para a
resposta à infecção por *Meloidogyne incognita*

Nicole Orsi

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2022

Nicole Orsi
Engenheira Agrônoma

Perfil transcricional de genótipos de feijoeiro-comum contrastantes para a resposta à
infecção por *Meloidogyne incógnita*

versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Profa. Dra. **MARIA LUCIA CARNEIRO VIEIRA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas

Piracicaba
2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Orsi, Nicole

Perfil transcricional de genótipos de feijoeiro-comum contrastantes para a resposta à infecção por *Meloidogyne incognita* / Nicole Orsi. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

78 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. *Meloidogyne incognita* 2. *Phaseolus vulgaris* 3. Resistência moderada 4. RNA-Seq 5. Transcriptoma 6. Genes diferencialmente expressos I. Título

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Dirceu e Sandra, e irmãos, Bruna e Gabriel

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

À minha amada família, meu pai Dirceu, minha mãe Sandra, minha irmã Bruna e meu irmão Gabriel, por todo o apoio, amor, confiança e encorajamento ao longo de toda a minha vida. Meus pais, vocês são meu exemplo de vida e o apoio que me dão em continuar estudando, mesmo com a distância, é o que me dá forças nesta jornada. Sem vocês, nada disso seria possível. Eu amo muito vocês!

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, pela oportunidade em fazer parte do Programa de Genética e Melhoramento de Plantas, em especial aos professores do Departamento da Genética, pelos ensinamentos.

À minha orientadora, Professora Maria Lucia Carneiro Vieira, pelos ensinamentos, pela confiança em mim depositada, pela orientação e pelo incentivo em buscar alcançar o meu melhor. Sou muito grata por todas as oportunidades que recebi desde que entrei em seu laboratório e por toda sua dedicação em minha formação acadêmica e profissional.

À equipe do Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas, em especial ao técnico Carlos Alberto de Oliveira, pelo auxílio ao longo deste dois anos na condução deste projeto.

Ao Professor Daniel Guariz Pinheiro, pelos ensinamentos e por todo o auxílio nas análises de bioinformática, me fornecendo as ferramentas necessárias para a conclusão deste trabalho.

Aos Professores Antônio Vargas de Oliveira Figueira e Ricardo Ferraz, e à equipe do Instituto Agrônomo (IAC), do Centro de Grãos e Fibras, pela concessão de espaço para a condução do ensaio de inoculação.

Ao Dr. João Paulo Marques, pelo auxílio nas análises histológicas e no delineamento do estudo do desenvolvimento de nematoides.

Às instituições que forneceram apoio financeiro para execução deste projeto, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processo 2020/02755-2) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, processo 132018/2020-9).

A todos que de alguma forma contribuíram para a condução deste trabalho e para a minha formação acadêmica e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1. A cultura do feijoeiro-comum no Brasil.....	17
2.2. Problemas fitossanitários.....	18
2.3. Nematoides das galhas (<i>Meloidogyne incognita</i>).....	19
2.4. Interações planta-nematoide.....	21
2.5. Resistência a doenças: aspectos conceituais.....	24
2.6. RNA-Seq	25
2.7. Estudos genéticos e moleculares envolvendo o patossistema <i>P. vulgaris</i> – <i>M. incognita</i>	25
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1. Genótipos contrastantes.....	27
3.2. Preparo do inóculo de <i>M. incognita</i>	27
3.3. Determinação dos períodos de coleta de RNA.....	28
3.4. Ensaio de inoculação	29
3.5. Extração do RNA	30
3.6. Construção e sequenciamento das bibliotecas.....	31
3.7. Análises de bioinformática dos dados do sequenciamento	34
3.7.1. Avaliação da qualidade das sequências	34
3.7.2. Mapeamento de <i>reads</i>	35
3.7.3. Análise quantitativa da expressão gênica	35
3.7.4. Anotação funcional das sequências e análise de enriquecimento.....	36
4. RESULTADOS	37
4.1. Determinação dos períodos de coleta de RNA.....	37
4.2. Extração do RNA	39
4.3. Dados do sequenciamento	41
4.4. Análises de bioinformática	42
4.4.1. Filtragem das sequências de alta qualidade.....	42

4.4.2. Alinhamento das <i>reads</i> ao genoma de <i>P. vulgaris</i>	43
4.4.3. Detecção de genes diferencialmente expressos	44
4.4.4. Anotação funcional	47
4.4.4.1. Plataforma Blast2GO	47
4.4.4.2. Enriquecimento funcional de vias metabólicas por KEGG	49
4.4.4.3 Genes diferencialmente expressos (GDEs) em todas as condições	51
4.4.4.4. GDEs em IAC-Tybatã.....	52
4.4.4.5. GDEs em Branquinho	56
4.4.4.6. Panorama geral das respostas dos genótipos à <i>M. incognita</i>	59
5. DISCUSSÃO	61
6. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	68

RESUMO

Perfil transcricional de genótipos de feijoeiro-comum contrastantes para a resposta à infecção por *Meloidogyne incognita*

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) é uma cultura anual herbácea, de importância econômica e social, cujos grãos proveem uma das principais fontes de proteína de origem vegetal. Problemas fitossanitários causam severos impactos sobre o cultivo de feijoeiro. Dentre os patógenos mais frequentes e danosos à cultura do feijoeiro estão os do gênero *Meloidogyne*, chamados ‘nematoides das galhas’ (RKN), com destaque para *M. incognita*, amplamente disseminado nas regiões produtoras brasileiras. É consenso que a base genética e molecular da resistência/suscetibilidade de plantas aos RKNs é complexa e o seu entendimento demanda o emprego de variadas abordagens. Por exemplo, a análise do transcriptoma pode ser uma excelente estratégia para a identificação de genes envolvidos na resposta do feijoeiro a este patógeno. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil transcricional de genótipos de feijoeiro contrastantes para a resposta à *M. incognita* (IAC-Tybatã, resistente vs. Branquinho, suscetível) e, assim, identificar os genes diferencialmente expressos em dois tempos durante a interação (4 e 10 dias após a inoculação, DAI). No total, foram 8 tratamentos, com 3 repetições, gerando 24 bibliotecas de RNA que foram construídas e sequenciadas. Foi obtido um total de 587 milhões de *reads*. Em média, considerando ambos os genótipos, o alinhamento das sequências ao genoma de referência produziu 537 milhões de *reads* (~92%). Foram encontrados 4.862 e 4.835 genes diferencialmente expressos em IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S), respectivamente. Foi realizada a anotação funcional de 6.938 genes (89%) pela plataforma Blast2GO, com o maior número de genes atribuídos às categorias funcionais “atividade catalítica e ligação”, “processos metabólicos e celulares” e “membrana”. Usando o banco de dados KEGG, as categorias funcionais “biossíntese de metabólitos secundários”, “processos celulares” e “sinalização” apresentaram-se mais enriquecidas em IAC-Tybatã (R) comparativamente a Branquinho (S), onde a categoria “metabolismo de carboidratos” se mostrou mais enriquecida. Mudanças nos níveis de expressão gênica em resposta à infecção por *M. incognita* foram identificadas em ambos os genótipos. Por exemplo, genes que codificam proteínas putativas de resistência a doenças com domínios LRR, proteínas quinases, citocromos, fatores de transcrição myb e WRKY e receptores de membrana mostraram-se superexpressos no genótipo resistente. Por outro lado, genes envolvidos nas vias hormonais, com destaque para a via da auxina, mostraram-se superexpressos no genótipo suscetível, e genes que codificam fatores de transcrição (WRKY, myb e MYC2), proteínas com domínios ANK, proteínas com repetições tetratricopeptídicas e beta glucosidases mostraram-se reprimidos. Um modelo foi proposto na tentativa de elucidar as respostas do feijoeiro-comum à infecção por *M. incognita*.

Palavras-chave: *Meloidogyne incognita*, *Phaseolus vulgaris*, Resistência moderada, RNA-Seq, Transcriptoma, Genes diferencialmente expressos

ABSTRACT

Transcriptional profiling of common bean contrasting genotypes in response to *Meloidogyne incognita* infection

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) is an annual herbaceous crop of economic and social importance whose grains provide one of the main sources of plant proteins. Phytosanitary problems may cause severe impacts on common bean cultivation. Of the most common and harmful pathogens to the common bean crop are those of *Meloidogyne* genus, known as 'root-knot nematodes' (RKN), predominantly *M. incognita*, which is widespread in Brazilian agricultural areas. It is a consensus that the genetic and molecular basis of plant resistance/susceptibility to RKNs is complex and its understanding requires the use of diverse approaches. For instance, the transcriptome analysis may be an excellent strategy for the identification of genes involved in the common bean response to this pathogen. The objective of the present study was to evaluate the transcriptional profile of common bean genotypes with contrasting responses against *M. incognita* (IAC-Tybatã, resistant vs. Branquinho, susceptible) in order to identify differentially expressed genes at two different time points during this interaction (4 and 10 days after the inoculation, DAI). In total, there were 8 treatments, with 3 replicates, generating 24 RNA libraries that were constructed and sequenced. We have obtained 587 million reads. On average, taking into account both genotypes, the sequence alignment to the reference genome produced 537 million reads (~92%). A total of 4,862 and 4,835 differentially expressed genes were found in IAC-Tybatã and Branquinho, respectively. The functional annotation of 6,938 genes (89%) was performed using the Blast2GO platform, with the largest number of genes assigned to the functional categories "catalytic activity and binding", "metabolic and cellular processes" and "membrane". Using KEGG database resource, the functional categories "biosynthesis of secondary metabolites" and "cellular processes" and "signaling" were the most enriched in IAC-Tybatã (R) in comparison to Branquinho, in which "carbohydrate metabolism" was the most enriched category. Genes showing changes in expression levels under *M. incognita* infection were identified in both genotypes. For instance, genes coding for disease resistance proteins with LRR domains, protein kinases, cytochromes, myb and WRKY transcription factors and receptors-like kinases were overexpressed in the resistant genotype. On the other hand, genes involved in hormonal pathways, namely auxin pathway, were overexpressed in the susceptible genotype, and genes coding for transcription factors (WRKY, myb and MYC2), proteins with ANK domains, proteins with tetratricopeptide repeats and beta glucosidases were repressed. A tentative model was proposed to explain the responses of common bean to *M. incognita* infection.

Keywords: *Meloidogyne incognita*, *Phaseolus vulgaris*, Moderate resistance, RNA-Seq, Transcriptome, Differentially expressed genes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do patógeno *Meloidogyne incognita*, incluindo os cinco estádios de desenvolvimento (J_1 , J_2 , J_3 , J_4 e adulto) até a formação dos ovos..... 21
- Figura 2.** O modelo zig-zag da resposta imune das plantas. Inicialmente, as plantas detectam os PAMPs pelos PRRs e desencadeiam a PTI, de amplitude média de defesa. A seguir, patógenos podem suprimir a PTI ejetando efetores, resultando em ETS. O efector pode então ser reconhecido por uma proteína NB-LRR, ativando a ETI, que possui uma amplitude alta de defesa, muito comumente resultando em uma reação de hipersensibilidade. Novos efetores podem surgir, que podem ser reconhecidos por outras NB-LRR, e assim consecutivamente.. .. 22
- Figura 3.** Resposta dos 175 acessos do painel avaliado para: A. Valores Preditos (*Best Linear Unbiased Predictors* - BLUPs) para o número de massas de ovos, onde IAC-Tybatã foi o 1º mais resistente e Branquinho foi o 14º mais suscetível e B. BLUPs para o índice de galhas, onde IAC-Tybatã foi o 3º mais resistente e Branquinho foi o 13º mais suscetível. Puebla e Jamapa foram usados como padrão de resistência e de suscetibilidade, respectivamente..... 27
- Figura 4.** Ciclo de vida do nematoide das galhas (*M. incognita*), representando os juvenis de segundo (J_2), terceiro (J_3) e quarto (J_4) estádio, as fêmeas e os machos adultos.. 29
- Figura 5.** Ensaio de inoculação de feijoeiro-comum infectado com *M. incognita*; A. Experimento implantado segundo o protocolo de Atamian et al. (2012), em câmara de crescimento; B. Genótipos Branquinho (S) e IAC-Tybatã (R), 18 dias após início do ensaio, com desenvolvimento adequado para a inoculação com o patógeno. 29
- Figura 6.** Esquema ilustrativo das etapas para a construção e sequenciamento de bibliotecas. 33
- Figura 7.** Fluxograma das etapas das análises de bioinformática a partir dos dados .fastq obtidos do sequenciamento, com indicação dos *softwares* e formatos de arquivos utilizados em cada etapa..... 34
- Figura 8.** Número médio de indivíduos de *M. incognita* por estádio de desenvolvimento (J_2 , J_3/J_4 e adultos) encontrado nas raízes dos genótipos de feijoeiro-comum: MR, moderadamente resistente (IAC-Tybatã); S, suscetível (Branquinho). Para cada período e genótipo, respectivamente, as letras minúsculas e maiúsculas distintas representam médias que diferem pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$)..... 37
- Figura 9.** Estádios de desenvolvimento de *M. incognita* no interior das raízes dos genótipos IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S), sob microscopia de campo escuro. Aos 4 DAI, os J_2 penetram as raízes; aos 7 DAI, os J_2 sofrem ecdise para J_3/J_4 ; aos 10 DAI são formadas as galhas (G, *galls*) e estabelecidos os sítios de alimentação (FS, *feeding sites*); aos 22 DAI observam-se fêmeas adultas, as quais produzem ovos (E, *eggs*) aos 30 DAI.. 38
- Figura 10.** Padrão de bandas do RNA total obtido em equipamento Bioanalyzer. A visualização das bandas dos RNAs ribossomais indica integridade. Em A estão as amostras do genótipo IAC-Tybatã (R) e em B as de Branquinho (S)..... 40
- Figura 11.** Eletroferograma das amostras de RNA total de IAC-Tybatã (R) utilizadas para a construção de bibliotecas de RNA-Seq. 40
- Figura 12.** Eletroferograma das amostras de RNA total de Branquinho (S) utilizadas para a construção de bibliotecas de RNA-Seq. 41
- Figura 13.** Número de genes diferencialmente expressos nos diferentes estádios de infecção com *M. incognita* em IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S) em comparação com os respectivos controles. Up indica genes superexpressos e Down indica genes reprimidos. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI. 45

Figura 14. Diagrama de Venn mostrando a intersecção entre o conjunto de dados e o número de genes diferencialmente expressos amostrados em IAC-Tybatã (R) e em Branquinho (S). A elipse **1** corresponde ao IAC-Tybatã aos 4 DAI; **2**, IAC-Tybatã aos 10 DAI; **3**, Branquinho aos 4 DAI e **4**, Branquinho aos 10 DAI.46

Figura 15. Número de genes diferencialmente expressos e anotação funcional levando em conta os termos GO (Ontologia Gênica) em resposta à infecção por *M. incognita* em IAC-Tybatã (R) (A) e Branquinho (S) (B). Genes superexpressos (*up*, em azul) e reprimidos (*down*, em vermelho). As linhas verticais indicam as funções de acordo com a categoria funcional, PB, Processo Biológico; FM, Função Molecular e CC, Componente Celular. .48

Figura 16. Distribuição de categorias funcionais do KEGG para os genes diferencialmente expressos nas comparações entre PVRIT1/PVRCT1 (A); PVRIT2/PVRCT2 (B); PVSIT1/PVSCT1 (C) e PVSIT2/PVSCT2 (D). Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.....50

Figura 17. *Heatmap* dos genes de feijoeiro-comum com expressão diferencial ($\log_2 FC \geq 1,0$ e $\leq -1,0$ e $FDR \leq 0,05$) em ambos os períodos e genótipos. Foi feita a clusterização dos valores de $\log_2 FC$, gerando o dendrograma mostrado à esquerda. As cores indicam mudança no nível de expressão, azul indica aumento e vermelho indica diminuição. Na direita, estão os IDs dos genes de acordo com suas categoriais funcionais. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.....51

Figura 18. *Heatmap* dos genes de feijoeiro-comum com expressão diferencial ($\log_2 FC \geq 1,0$ e $\leq -1,0$ e $FDR \leq 0,05$) em ambos os períodos no genótipo IAC-Tybatã (R), de acordo com sua atuação em vias hormonais (A); como proteínas quinases ou com domínios LRR, TIR ou NB-ARC (B) e fatores de transcrição WRKY ou myb (C). Foi feita a clusterização dos valores de \log_2 fold change, gerando o dendrograma mostrado à esquerda. As cores indicam mudança no nível de expressão, azul indica aumento e vermelho indica diminuição. À direita, estão os IDs dos genes de acordo com suas categoriais funcionais. Nas siglas: R, resistente; I, inoculado; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.53

Figura 19. *Heatmap* dos genes de feijoeiro-comum com expressão diferencial ($\log_2 FC \geq 1,0$ e $\leq -1,0$ e $FDR \leq 0,05$) em ambos os períodos no genótipo Branquinho (S). Foi feita a clusterização dos valores de $\log_2 FC$, gerando o dendrograma mostrado à esquerda. As cores indicam mudança no nível de expressão, azul indica aumento e vermelho indica diminuição. À direita, estão os IDs dos genes de acordo com suas categoriais funcionais. Nas siglas: S, suscetível; I, inoculado; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.56

Figura 20. Modelo da resposta dos genótipos IAC-Tybatã (R) (A) e Branquinho (S) (B) à *Meloidogyne incognita*. AST, aspartato aminotransferase; YUCCA, indol-3-piruvato monooxygenase; AUX/IAA, GH3 e SAUR, proteínas responsivas a auxina; ARF, fator de resposta a auxina; ACS e ACO, ACC sintase e oxidase; EFE, enzima formadora de etileno; LOX, lipoxigenase; AOS e AOC, aleno sintase e ciclase; JMT, jasmonato metiltransferase; JAZ, domínio ZIM; ERF, fator de resposta a etileno; EIN3, proteína insensível a etileno; PR, *pathogenesis-related*; PAL, fenilalanina amônia-liase, SNC1, supressor da NPR1; bZIP, WRKY e myb, fatores de transcrição; RLK, receptor como quinase; PK, proteína quinase; LRR, repetições ricas em leucina; CAM, calmodulina; CML, proteína de ligação a cálcio; MAPK, MAPKK e MAPKKK, proteínas MAP quinases; CDPK, proteína quinase dependente de cálcio; PER, peroxidase; LAC, laccase; GST, glutathiona S-transferase; OXI3, proteína de estresse oxidativo e ACD2, morte celular acelerada. Números subscritos indicam quantidade de GDEs com repressão ou superexpressão/quantidade total de GDEs.60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição das comparações entre os tratamentos e as respectivas as siglas de cada comparação.	36
Tabela 2. Controle de qualidade das 24 amostras de RNA total selecionadas para sequenciamento, segundo os parâmetros de concentração, razão de absorbância A260/A280 e número de integridade do RNA (RIN), de acordo com o tratamento, a nomenclatura e o volume total de diluição do RNA.	39
Tabela 3. Número total e média de <i>reads</i> obtidas nos genótipos IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S) de acordo com os tratamentos inoculados e controles nos dois períodos avaliados da interação <i>P. vulgaris</i> - <i>M. incognita</i>	42
Tabela 4. Número total de <i>reads</i> para cada biblioteca antes e após a filtragem visando selecionar sequências de alta qualidade. Nas siglas: R, resistente; S, suscetível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI; R1, 2 e 3, repetição.	43
Tabela 5. Número total de <i>reads paired-end</i> e sequências únicas alinhadas ao genoma de referência de <i>P. vulgaris</i> e rendimento das <i>reads</i> alinhadas. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI; R1, 2 e 3, repetição.....	44
Tabela 6. Distribuição das expressões nas comparações entre os tratamentos inoculados e controles. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.	46
Tabela 7. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Tybatã (R) aos 4 DAI.	54
Tabela 8. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Tybatã (R) aos 10 DAI.	55
Tabela 9. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Branquinho (S) aos 4 DAI.....	57
Tabela 10. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Branquinho (S) aos 10 DAI.....	58

1. INTRODUÇÃO

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) é uma cultura anual herbácea, cujos grãos são uma das principais fontes de proteína de origem vegetal, especialmente em países em desenvolvimento, com importância econômica e social (Akibode e Mareid, 2011). O Brasil, em 2021, foi classificado como o 3º maior produtor mundial de feijão, sendo o continente americano responsável por 32,4% do total da produção (Faostat 2018).

A produtividade e a qualidade de grãos de feijão podem ser limitadas por fatores abióticos, relacionados ao ambiente de cultivo, bem como por fatores bióticos, quais sejam, a presença de plantas daninhas, pragas e doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. Podendo ser cultivado em 3 safras ao longo do ano, o feijoeiro está exposto a uma ampla gama de problemas fitossanitários, com cerca de 15 doenças observadas com maior frequência nas áreas agrícolas brasileiras (Wendland et al. 2018).

Nematoides fitopatogênicos podem causar perdas econômicas anuais de até R\$ 35 bilhões para as culturas afetadas no território nacional (Embrapa 2017) e perdas de até 50% na produtividade de feijoeiro (Machado 2011). Dentre os nematoides mais frequentes e danosos à cultura estão os do gênero *Meloidogyne*, também chamados ‘nematoides das galhas’, que são endoparasitas obrigatórios, com destaque para as espécies *M. javanica* e *M. incognita*, que têm seu desenvolvimento favorecido em clima tropical e em solos com baixa fertilidade (Santos et al. 2012), consequentemente, estes patógenos são amplamente disseminados nas principais regiões produtoras brasileiras (Baida et al. 2011). O ciclo de vida de *M. incognita*, em uma temperatura de 27 °C, se completa em cerca de 25 dias. Os juvenis de segundo estágio (J₂) penetram nas raízes das plantas e estabelecem sítios de alimentação por diferenciação de células radiculares, formando as galhas (Perry e Moens 2011; Teillet et al. 2013).

M. incognita é um patógeno devastador, podendo atingir mais de 3000 espécies de plantas hospedeiras, havendo a presença de 4 raças fisiológicas nos solos brasileiros (Silva 2015; Ferreira et al. 2010). O manejo e controle de nematoides das galhas é complexo. Algumas medidas buscam reduzir a infestação do solo, como a rotação de culturas e a solarização, mas têm eficácia limitada. Quanto ao controle químico, existem poucos nematicidas disponíveis no mercado e são produtos de alto custo e alta toxicidade aos animais e ao meio ambiente (Husain et al. 2010). Desta maneira, a principal medida de manejo seria o uso de cultivares resistentes ou tolerantes selecionadas em programas de melhoramento genético (Teixeira 2013).

Na interação planta-nematoide, inicialmente, os nematoides injetam compostos diretamente no citoplasma das células do hospedeiro a fim de estabelecer o parasitismo (Baum et al. 2007). Em uma primeira linha de defesa, o hospedeiro, ao reconhecer PAMP's (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) do patógeno através de receptores de membrana e citoplasmáticos, ativa o seu sistema imune denominado como PTI (*PAMP-Triggered Immunity*), e uma série de eventos de sinalização molecular são iniciados (Jones e Dangl 2006; Holbein et al. 2016). Exemplificando, em plantas de algodão resistentes, genes associados à detoxificação e deposição de lignina dificultam a progressão de *M. incognita* (Kumar et al. 2019); já em soja, quatro genes associados a modificações da parede celular foram identificados (Pham et al. 2013). Outros possíveis eventos são mencionados: a deposição de calose, produção de metabólitos secundários e de fito-hormônios e a ativação de fatores de transcrição (Hamamouch et al. 2011; Tripathy e Oelmüller 2012). O patógeno pode liberar efetores de forma a superar a imunidade da planta e reestabelecer a doença, resultando em ETS (*Effector Triggered Susceptibility*) (Jones e Dangl 2006). Alguns efetores de *M. incognita* já foram identificados (Jaouannet e Rosso, 2013; Niu et al. 2016; Shi et al. 2018a), os quais atuam pela supressão da morte celular do hospedeiro, pela manutenção dos sítios de alimentação durante o parasitismo e pela interferência em rotas metabólicas como as do ácido salicílico e jasmônico. Em uma segunda linha de defesa, a planta pode

reconhecer os efetores especificamente pela ação de um gene R, ativando a ETI (*Effector Triggered Immunity*); nestes casos, observa-se resistência completa, qualitativa e raça-específica (Jones e Dangl 2006). Genes R de resistência a *M. incognita* já foram identificados em feijão-caupi (Petrillo et al. 2006), bem como seis genes análogos aos de resistência, com superexpressão frente à infecção (Santos et al. 2018); em pimenta (Bucki et al. 2017; Dijan-Caporalino et al. 2007); e tomate (Seah et al. 2004). Para o feijoeiro-comum existem relatos de resistência a nematoides (Ferreira et al. 2010; Santos et al. 2012; Bozbuga 2015; Costa et al. 2019; Oliveira et al. 2018), entretanto, as fontes de resistência são escassas e têm se mostrado pouco eficientes. Nesta cultura, predominam os casos de resistência parcial e quantitativa.

O estudo da resistência/suscetibilidade a patógenos, em si, é complexo e a sua compreensão demanda o emprego de variadas abordagens. Estudos vêm sendo feitos no sentido de compreender a arquitetura genética da resistência ao nematoide das galhas, como o uso de marcadores moleculares (Wang et al., 2012; Parsons et al. 2015), o mapeamento de QTLs associados à resistência (Li et al. 2018; Ndeve et al. 2019), além do mapeamento associativo (Zhang et al. 2017; Sallam et al. 2016). Entretanto, pouca informação tem sido gerada do ponto de vista celular e molecular, salvo a clonagem de genes de resistência (Gomes et al. 2015) e os perfis transcricionais de plantas inoculadas (Santini et al. 2016; Shukla et al. 2018), não havendo estudos voltados à compreensão do mecanismo molecular envolvido na resistência para a cultura do feijoeiro-comum.

Neste cenário, a análise do transcrito pode ser uma excelente estratégia para a identificação de genes envolvidos na interação feijoeiro-nematoide, ao possibilitar a avaliação do padrão global de expressão associado a condições variáveis. Atualmente, a principal tecnologia para a obtenção do transcrito ou conjunto completo de transcritos tem por base o sequenciamento em larga escala do RNA (RNA-Seq), gerando fragmentos (*reads*) com tamanho variável de acordo com a plataforma de sequenciamento (Westermann et al. 2012). A tecnologia de RNA-seq aplicada a estudos de expressão diferencial possibilita identificar genes putativamente associados à defesa do hospedeiro em plantas resistentes comparativamente a plantas não-inoculadas ou suscetíveis, permitindo obter uma visão das rotas metabólicas e reunir informações para definir um modelo molecular do patossistema, indicando eventos possivelmente associados a PTI ou ETI (Rubiales et al. 2015).

A primeira análise do perfil transcricional envolvendo a resposta do feijoeiro-comum ao patógeno *M. incognita* foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas da ESALQ/USP, a qual permitiu conhecer os genes e mecanismos moleculares implicados na suscetibilidade. Primeiramente, foram construídas e sequenciadas bibliotecas de RNA-Seq do genótipo suscetível 'TPR-Saracura' inoculado com *M. incognita* raça 3. Os transcritos foram mapeados contra o genoma de referência de *P. vulgaris* (G19833), resultando na identificação de 27.195 unigenes. A quantificação da expressão dos transcritos mapeados permitiu identificar 797 genes diferencialmente expressos. Aos 4 DAI, houve a superexpressão de genes de respostas a ferimentos (*wound induced* – Phvul.005G108000 e Phvul.005G18400) e genes associados a reação de hipersensibilidade (*TIR-NBS-LRR* – Phvul.008g195000), o que foi interpretado como uma tentativa do hospedeiro de resistir ao ataque do patógeno. Aos 10 DAI, a resposta do hospedeiro foi afetada pela repressão da rota do etileno/ácido jasmônico, resultando em uma reação compatível (Santini et al. 2016).

Recentemente, em nosso laboratório, foi otimizada uma estratégia de fenotipagem de alto rendimento baseada em Atamian et al. (2012), avaliando um painel pertencente ao Instituto Agronômico (IAC) composto de 175 genótipos de feijoeiro infectados por *M. incognita*, constatando-se que há variabilidade no painel para a resistência ao nematoide. Nessa avaliação, destacaram-se os genótipos 'IAC-Tybatã' e 'Branquinho', para a resistência e suscetibilidade, respectivamente. Neste mesmo estudo, foi feita a detecção de regiões genômicas associadas à

resposta do feijoeiro ao nematoide das galhas, via mapeamento associativo, permitindo avançar no entendimento da arquitetura genética da interação (Giordani et al. 2021).

Neste cenário, no presente estudo, se pretende avaliar o perfil transcricional dos genótipos contrastantes, IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S), e identificar os genes diferencialmente expressos envolvidos na resistência. Em resumo, se busca compreender o mecanismo molecular envolvido na complexa interação do feijoeiro-comum e o nematoide das galhas, reconhecendo as vias de sinalização e rotas específicas ativadas em reações compatíveis e incompatíveis, e indicar genes candidatos à resistência. Ademais, os resultados poderão ser aliados àqueles obtidos em estudos prévios sobre a arquitetura genética da resposta do feijoeiro ao nematoide, favorecendo um grande avanço na compreensão da interação. A presente pesquisa se insere na interface da fitopatologia molecular e do melhoramento genético, ao fornecer subsídios para a seleção e o desenvolvimento de linhagens resistentes à *M. incognita*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A cultura do feijoeiro-comum no Brasil

O feijoeiro-comum (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) é uma cultura que representa uma das principais fontes de proteína de origem vegetal no mundo, com grande importância econômica e social. É uma espécie diplóide ($2n=22$), autógama, com taxa de fecundação cruzada de até 5% e com flores que permanecem fechadas mesmo após o amadurecimento dos órgãos reprodutores (cleistogamia), o que favorece a autogamia (Burle et al. 2010). Do ponto de vista nutricional, os grãos são ricos em ferro e zinco, além do aminoácido lisina, com elevados teores de minerais, fibras, carboidratos e vitaminas, com destaque para o alto teor de proteínas, que pode chegar 28,7% em feijão comercial (Sathe 2008; Pereira et al. 2011).

A cultura tem origem no México, com posterior propagação para a América do Sul, nas regiões do Peru até a Argentina, sendo que existem dois *pools* gênicos: o Andino e o Mesoamericano. A domesticação data de 5.000 anos a.C., no México, e de 3.000 anos a.C., no Peru. Os *pools* gênicos apresentam grãos que diferem para várias características, dentre elas, observam-se grãos grandes, com maior teor de ferro, presença de faseolina dos tipos ‘T’, ‘C’, ‘H’ e ‘A’, e três raças distintas (Granada, Peru e Chile) com hábito de crescimento das plantas variável entre I, II, III e IV, em feijões andinos, e grãos pequenos, faseolina tipo ‘S’, e duas raças (Durango e Jalisco) com hábito de crescimento do tipo II e III, em feijões mesoamericanos (Blair et al. 2010; Gepts e Debouck 1991; Chiorato 2004). Estudos recentes indicam maior diversidade genética no pool gênico mesoamericano em comparação ao andino, no que diz respeito ao número de sítios variáveis, aos sítios informativos sob o critério de parcimônia, ao número e a diversidade de haplótipos (Bitocchi et al. 2013), além de polimorfismos SNPs (Rodríguez et al. 2015).

O Brasil é o terceiro maior produtor de feijão do mundo, com produção nacional de 3.179 mil t^{-1} e produtividade média de 1000 $kg\ ha^{-1}$, em uma área total de 2.939 mil ha^{-1} , na safra 2020/21, sendo que do total produzido apenas cerca de 179 mil t^{-1} foram exportadas, demonstrando a importância do grão na dieta dos brasileiros, com alto consumo interno. Cerca de 99% dos produtores de feijão realizam o cultivo em menos de 50 hectares, o restante cultiva entre 50 e 200 hectares ou acima de 200 hectares (Silva e Wander, 2013). Sendo assim, a cultura tem grande importância socioeconômica, com a produção nacional sendo creditada principalmente a pequenos produtores e à agricultura familiar, destacando a sua importância como uma lavoura de subsistência. Este aspecto também influencia a média nacional, mesmo considerando o pouco acesso a recursos tecnológicos por parte dos pequenos produtores. Por outro lado, há grandes produtores que conseguem alcançar uma produtividade de até 3000 $kg\ ha^{-1}$ (Moura e Brito 2015). O feijoeiro-comum é cultivado em três safras no Brasil e os principais estados produtores são Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina, sendo que a região Sul se destaca na produção de feijão preto, sendo responsável por 96% da produtividade deste tipo do grão (Conab 2020).

O consumo de feijão varia de acordo com as características morfológicas do grão, como formato, cor e tamanho da semente (Carneiro et al. 2005). Os principais tipos de grãos consumidos no Brasil são o ‘carioca’ e o ‘preto’, além destes, também ocorre o consumo em menor escala dos tipos ‘vermelho’, ‘roxo’, ‘mulatinho’ e ‘rosinha’ (Vieira 2005). O Brasil é o único produtor mundial de feijão do tipo carioca, de sementes pequenas, constituído como o tipo de maior consumo e interesse comercial no país (Ibrafe 2022), ocupando 53% da área de cultivo nacional (Morgante et al. 2014). O feijão carioca foi lançado em 1969, pelo Instituto Agrônomo (IAC), a partir de uma mutação no genótipo I-38700 selecionado a campo e posteriormente melhorado por seleção massal. Quando

lançada, as características da cultivar eram ciclo entre 90 e 100 dias, cultivo em até 3 safras no estado de São Paulo, hábito de crescimento indeterminado e produtividade entre 2 e 3 t ha⁻¹ (Bulisani 2008).

Os programas de melhoramento genético de feijoeiro-comum no Brasil são restritos e pouco numerosos, sendo predominantemente de iniciativa de órgãos públicos. Os primeiros programas iniciaram em 1930, com a maioria das atividades iniciando em 1970 (Voyses 2000). Instituições que se destacam são a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) - Arroz e Feijão, o Instituto Agronômico (IAC) e Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), além de universidades públicas, como a Universidade Federal de Lavras (UFLA) e a Universidade Federal de Viçosa (UFV) (Borém e Carneiro 2015). Dentre os objetivos dos programas estão o melhoramento visando à (ao):

1. Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN), pois ainda não há uma interação simbiótica de alta eficiência, como na soja (Pereira e Braidotti 2001);
2. resistência a doenças como a antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) (Bianchini 2005), a murcha-de-Cutobacterium (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*) (Morais 2012), ao nematoide das galhas (*Meloidogyne incognita*) (veja Giordani et al. 2021) e insetos como o *Zabrotes subfasciatus* (Baldin e Pereira 2010);
3. tolerância à seca (Gonçalves et al. 2019);
4. aumento na produção de grãos (Mambrin et al. 2015; Zeffa et al. 2020); e
5. menor tempo de cozimento (Ribeiro et al. 2003).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa 2022), existem 47 registros de proteção de cultivares de feijoeiro-comum, distribuídas em 12 instituições detentoras das cultivares; entretanto, em cerca de 81% das áreas plantadas é feito o uso de sementes não certificadas. Apesar do esforço dos programas de melhoramento genético de feijão, o uso das cultivares lançadas pelas instituições em áreas de cultivo ainda é baixo e existem poucas cultivares registradas com resistência a doenças, não havendo cultivares com resistência a algumas das principais doenças observadas em áreas de cultivo de feijão (Abrasem 2022).

2.2. Problemas fitossanitários

O feijoeiro-comum é cultivado em três safras distribuídas ao longo do ano e em diversas regiões do país, estando sujeito ao ataque de diversas doenças, havendo cerca de 70 doenças descritas, causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides (Pria e Silva 2010). Alguns patógenos fúngicos e bacterianos podem ser transmitidos pela semente, levando à sobrevivência por longos períodos e à infecção de novas áreas, com um novo ciclo de infecção a partir da semeadura. Os patógenos podem sobreviver e permanecer presentes na área de cultivo e causar a doença na presença de condições ambientais favoráveis, podendo afetar os cotilédones, o sistema radicular, o caule, as folhas, as vagens e os grãos (Epagri 2020).

No Brasil, as doenças fúngicas, bacterianas e virais têm sido foco dos programas de melhoramento, havendo cultivares com níveis de resistência à antracnose, como a BRS Esteio (EMBRAPA) e a IAC-Diplomata (IAC), à mancha-angular, como a BRS Sublime (EMBRAPA) e ao crestamento bacteriano, como a BRS Notável (EMBRAPA) (Wendland et al. 2018). Para o vírus do mosaico dourado, existe a cultivar transgênica BRS FC410 RMD (EMBRAPA, comercializada com o nome de RMD), resistente ao patógeno. Entretanto, para as doenças causadas por nematoides existem poucos estudos desenvolvidos para a obtenção de linhagens resistentes (Souza et al. 2016).

Os principais nematoides que causam doenças em feijão são os nematoides das lesões, *Pratylenchus brachyurus* spp., e os nematoides das galhas, do gênero *Meloidogyne* spp. Os nematoides das lesões causam manchas escuras sobre as raízes, sendo que o patógeno entra e sai das raízes, provocando destruição, dificultando o uso dos nutrientes e o estande das plantas. Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. mais comuns em áreas agrícolas de feijão são *M. incognita* e *M. javanica*, que causam sintomas no sistema radicular, que se torna mal-formado com o engrossamento característico das galhas e na parte aérea provocam amarelecimento das folhas, redução no crescimento, murcha nas horas mais quentes do dia e queda prematura das folhas, com agravamento dos sintomas quando da interação com o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*. O controle dos nematoides é de difícil execução, considerando a falta de cultivares resistentes, a grande quantidade de hospedeiros, a sobrevivência na área de cultivo, dificultando a rotação de culturas, e a pressão por alternativas aos nematicidas, visando à proteção ambiental (Lilley et al. 2011; Wendland et al. 2018).

Considerando a alta disseminação de doenças nas áreas de cultivo de feijão, buscando opções alternativas ao controle químico, o investimento no desenvolvimento de linhagens resistentes aos principais patógenos via melhoramento genético seria de grande valor, entretanto, uma das dificuldades encontradas é a obtenção de cultivares que reúnam a resistência com o tipo de grão exigido pelo consumidor (Pádua 2013).

2.3. Nematoides das galhas (*Meloidogyne incognita*)

Os nematoides do gênero *Meloidogyne* spp. são os mais disseminados e economicamente relevantes (Khan et al. 2019), especialmente em países tropicais e subtropicais, considerando o favorecimento da reprodução em temperaturas elevadas e em áreas de solos arenosos (Cabi 2020). Mais de 100 espécies do gênero já foram descritas no mundo, destas, *M. incognita*, *M. javanica*, *M. arenaria* e *M. hapla* são as mais encontradas em áreas agrícolas. Com uma variedade de hospedeiros de mais de 3.000 espécies, o patógeno pode afetar quase todas as plantas cultivadas (Archana e Saxena 2012). A perda em produtividade causada por nematoides parasitas de plantas varia de 5 a 35% do total, dependendo da cultura. Estes nematoides são endoparasitas obrigatórios, biotróficos, sedentários e altamente polípagos (Jones et al. 2013). Podem completar seu ciclo de vida em 25 dias a 27 °C, com uma variação de 3 a 8 semanas, dependendo da espécie do nematoide e das condições ambientais (Favery et al. 2016).

Meloidogyne incognita é uma das espécies de maior dano, considerando a grande quantidade de hospedeiros e a alta taxa de reprodução (Ferraz e Brown 2016). Estes nematoides causam a formação de galhas, que afetam a absorção de água e nutrientes, a translocação dos produtos da fotossíntese e podem afetar a incidência e severidade da doença da murcha do *Fusarium*, causada pelo patógeno *Fusarium oxysporum* f. sp. *Phaseoli*. Além disso, as folhas tornam-se amareladas e murchas e o crescimento é estagnado, tanto da parte aérea quanto das raízes, que se tornam mais curtas (Priya et al. 2011; Ma et al. 2013). As lesões causadas por este patógeno favorecem patógenos secundários, como bactérias, fungos e vírus patogênicos (Smant et al. 2018).

Existem quatro distintas raças fisiológicas de *M. incognita*, definidas pelos hospedeiros do algodoeiro e do fumo: a raça 1 mostra incompatibilidade com o algodoeiro e fumo, a raça 2 e a 3 apresentam incompatibilidade com o algodoeiro e com o fumo, respectivamente, e a raça 4 é compatível com as duas espécies (Sasser 1980). A raça 3 é a mais encontrada nos solos brasileiros em áreas de produção agrícola (Inomoto 2001). A determinação de raças fisiológicas auxilia na escolha de cultivares resistentes a uma raça específica que seja predominante em uma determinada região (Franzener et al. 2005).

Dentre as estratégias de manejo, o uso de nematicidas é o mais eficiente, entretanto, há diversos agentes prejudiciais que podem afetar o meio ambiente e os animais, pois os resíduos podem se manter presentes na cadeia alimentar (Onkendi et al. 2014; Walter e Heil 2017). Pode ser feito o controle biológico com alguns fungos que se mostram antagonistas à *M. incognita*, como os pertencentes aos gêneros *Acremonium*, *Chaetomium*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* (Sharon et al. 2009). Controles culturais tais como limpeza de implementos agrícolas, uso de sementes ou mudas saudáveis, rotação de culturas e solarização podem ser utilizadas, sendo que a solarização por três semanas ajuda a reduzir a população de *M. incognita*; entretanto, é uma técnica difícil de ser executada em áreas produtivas (Nicol et al. 2011). O uso de cultivares resistentes é altamente recomendado, sendo que genes de resistência já foram identificados para certas culturas, como o gene *Rmc-1* em batata silvestre (*Solanum commersonii*) (Brown et al. 2006), o gene *Mi-1.2* em tomate (*Solanum lycopersicum*) (Corbett et al. 2011) e os genes *Me* e *N* em pimenta (*Capsicum annuum*) (Mitekowski e Abawi 2022), sendo que para a cultura do feijoeiro-comum ainda nenhum gene de resistência foi identificado.

O ciclo de vida de *M. incognita* se dá a partir da penetração dos juvenis de segundo estágio (J_2) nas raízes da planta hospedeira, havendo três mudas até a formação do adulto, com a produção dos ovos em uma massa gelatinosa (Figura 1). A temperatura afeta o ciclo, podendo durar de 20 a 30 dias em condições de 25 a 30 °C. A temperatura ótima para a incubação dos ovos varia de 15 a 30 °C e os J_2 podem sobreviver em temperaturas de 10 a 30 °C e por até 380 dias a 15 °C (Zhao-Hui et al. 2006). No solo, os J_2 sobrevivem em um estado quiescente se alimentando de reservas lipídicas armazenadas no intestino (Perry e Starr 2009). A primeira muda do juvenil de primeiro estágio (J_1 - J_2) ocorre no interior do ovo. Os J_2 têm um período de vida livre no solo próximo a rizosfera das plantas antes de penetrar as raízes na zona de alongação, secretando pelo estilete enzimas que degradam a parede celular do hospedeiro. No interior das raízes, os J_2 se direcionam até o ápice radicular e entram no cilindro vascular, migrando pelo espaço intercelular até se estabelecer em uma região da zona de diferenciação onde se tornam sedentários e injetam secreções da glândula faríngea pelo seu estilete em células do parênquima, induzindo a divisão nuclear sem citocinese, as tornando multinucleadas e hipertrofiadas, assim formando sítios de alimentação conhecidos com células gigantes, culminando nas estruturas das galhas, com rediferenciação de 6 a 8 células por nematoide (Abad et al. 2003; Caillaud et al. 2008). Em condições favoráveis, ocorrem mudas para o juvenil de terceiro (J_3) e quarto (J_4) estágio e, finalmente, para o adulto. Os machos não são parasitas, têm vida livre e deixam as raízes da planta hospedeira, enquanto as fêmeas permanecem sedentárias e produzem os ovos na superfície da raiz em uma matriz gelatinosa que fornece proteção contra o ataque de predadores e à perda de água, a partir de reprodução por partenogênese, sendo que cada fêmea pode ovopositar entre 500 e 2.000 ovos (Abad et al. 2009).

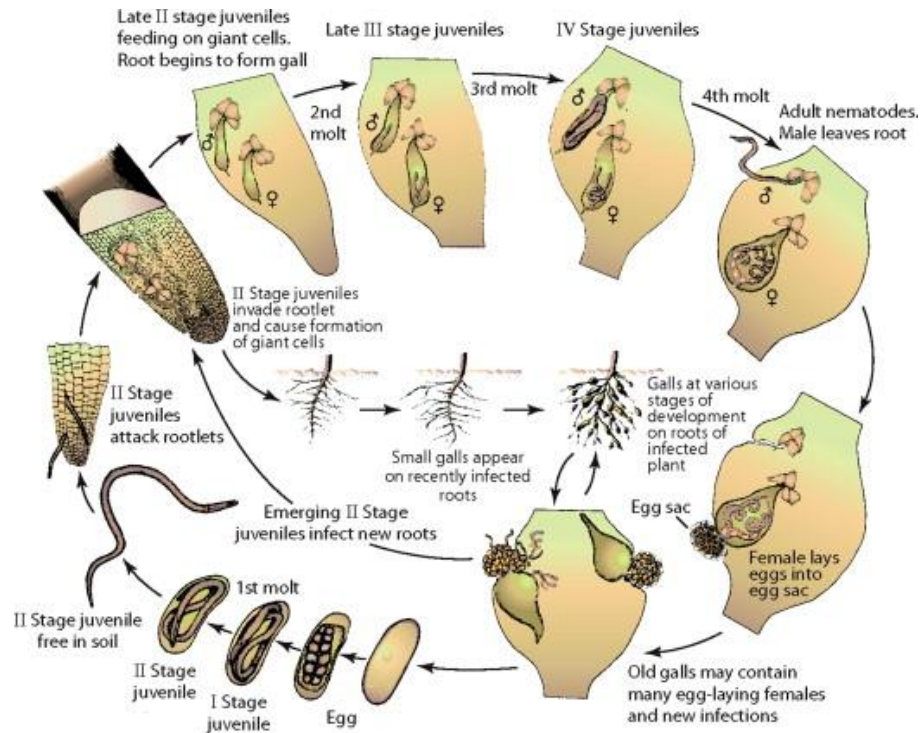


Figura 1. Ciclo de vida do patógeno *Meloidogyne incognita*, incluindo os cinco estádios de desenvolvimento (J₁, J₂, J₃, J₄ e adulto) até a formação dos ovos.

Fonte: Mugniéry e Phillips (2007).

A resistência ou suscetibilidade de genótipos vegetais pode ser avaliada conforme o desenvolvimento e a reprodução de *M. incognita*, como pelo índice de galhas (IG), pelo índice de massa de ovos (IMO) e pelo fator de reprodução (FR). O FR representa a multiplicação da população de nematoide, sendo $FR = \text{População final (Pf)} / \text{População inicial (Pi)}$ (Oostenbrink 1966), sendo feita a contagem de juvenis sobre uma lâmina em microscópio ótico. O IMO é obtido de acordo com uma escala de notas que varia de 0 a 5, onde: 1) 0 massas de ovos; 2) 3 a 10; 3) 11 a 30; 4) 31 a 100 e 5) mais que 100 (Taylor e Sasser 1978). O IG é obtido pela escala de notas de Bridge e Page (1980), que varia de 0 a 10, onde: 0) nenhuma galha; 5) 50% das raízes com galhas e 10) presença de galhas grandes em todo o sistema radicular, planta morta.

2.4. Interações planta-nematoide

As plantas, seja no ambiente natural ou agrícola, estão expostas a diversos agentes biológicos como bactérias, vírus, fungos e nematoides, o que faz com que necessitem de mecanismos de reação contra estes estresses. Ao longo da evolução, as plantas desenvolveram mecanismos diversos de defesa contra patógenos, acionados em decorrência da infecção, desencadeando a percepção em vias de resposta (Garcia et al. 2015).

As plantas possuem duas estratégias para detectar patógenos, descritas de acordo com o modelo zig-zag de Jones e Dangl (2006), que representa as etapas da imunidade das plantas (Figura 2). Na face externa da célula do hospedeiro, Padrões Moleculares Associados a Patógenos (em inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns* ou PAMPs) são reconhecidos por proteínas receptoras ou receptores de reconhecimento de padrão (em inglês, *Pattern Recognition Receptors* ou PRRs). Os compostos que constituem PAMPs são componentes essenciais para classes de patógenos, como flagelinas para bactérias ou quitina para fungos. A percepção das moléculas do patógeno leva ao estímulo de

uma primeira linha de defesa chamada imunidade desencadeada por PAMPs (*PAMP Triggered Immunity* ou PTI). A segunda linha de percepção envolve o reconhecimento por receptores intracelulares de moléculas de virulência do patógeno chamadas efetores. Patógenos podem suprimir as respostas de PTI, através dos efetores, e assim causar a doença. Ao contrário dos PAMPs, os efetores são componentes variáveis e dispensáveis dos patógenos, existindo uma grande diversidade de efetores e dos receptores que os reconhecem até mesmo dentro de uma mesma espécie, enquanto os PRRs costumam ser altamente conservados entre famílias. O reconhecimento dos efetores pode desencadear em uma segunda linha de defesa chamada de imunidade desencadeada por efetores (*Effector Triggered Immunity* ou ETI). A PTI e a ETI podem levar a respostas de defesa similares, entretanto, a ETI costuma desencadear uma resposta mais forte e rápida, normalmente envolvendo a morte celular localizada, conhecida como resposta hipersensitiva ou reação de hipersensibilidade. A PTI costuma ser efetiva contra um maior número de patógenos em um processo chamado de resistência de não-hospedeiro, enquanto a ETI é efetiva para patógenos específicos (Boller e Felix 2009; Dodds e Rathjen 2010). A amplitude da resistência ou suscetibilidade a doença seria proporcional a [PTI – ETS + ETI] (Jones e Dangl 2006).

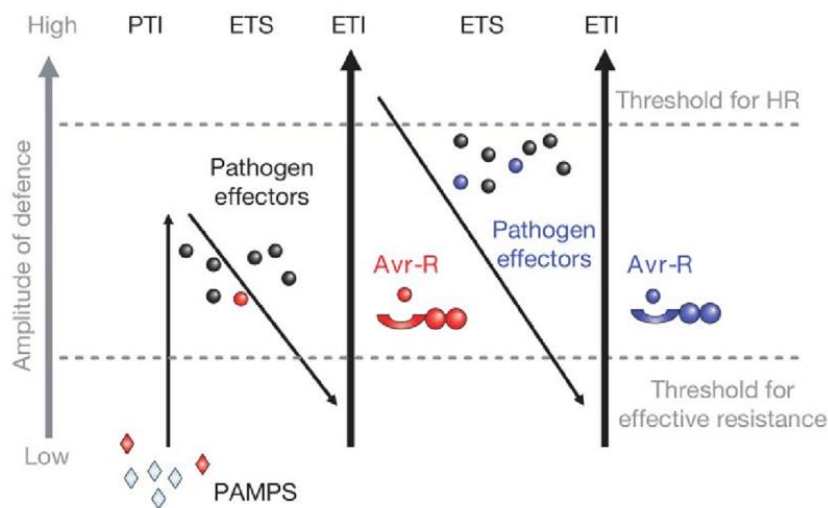


Figura 2. O modelo zig-zag da resposta imune das plantas. Inicialmente, as plantas detectam os PAMPs pelos PRRs e desencadeiam a PTI, de amplitude média de defesa. A seguir, patógenos podem suprimir a PTI ejetando efetores, resultando em ETS. O efector pode então ser reconhecido por uma proteína NB-LRR, ativando a ETI, que possui uma amplitude alta de defesa, muito comumente resultando em uma reação de hipersensibilidade. Novos efetores podem surgir, que podem ser reconhecidos por outras NB-LRR, e assim consecutivamente.

Fonte: Jones e Dangl (2006).

Os PRRs mais conhecidos são os receptores transmembranas quinases e os receptores como proteínas (Zipfel 2008), enquanto os PAMPs reconhecidos podem ser carboidratos, proteínas e lipídeos (Boller e Felix 2009). Os nematoides do gênero *Meloidogyne* injetam secreções, incluindo moléculas efectoras, nas células dos hospederios pelo seu estilete, sendo que uma análise proteômica da saliva de *M. incognita* identificou 486 potenciais proteínas efectoras (Bellafiore et al. 2008). A maior parte das proteínas receptoras intracelulares de reconhecimento de efetores possuem os domínios LRR, de repetições ricas em leucina, e NB (*nucleotide binding*), de ligação de nucleotídeos, sendo que muitas proteínas NB-LRR também contém um domínio TIR (*Toll, interleukin-1 receptor*) ou um domínio CC (*coiled-coil*), ambos N-terminal (Gay e Gangloff 2007).

M. incognita possui oito moléculas efectoras já identificadas, com atuação no apoplasto (Jaouannet et al. 2013), no citoplasma (Xie et al. 2016; Shi et al. 2018b), participando na manutenção das células gigantes e

interferindo nas vias de sinalização mediadas por ácido jasmônico e ácido salicílico, no núcleo (Shi et al. 2018a), interferindo na via de sinalização de ácido jasmônico, no citoplasma e no núcleo (Niu et al. 2016; Wang et al. 2018; Nguyen et al. 2018), suprimindo a morte celular e interferindo na via de sinalização do ácido salicílico em estádios iniciais do parasitismo, e em localização desconhecida (Leelarasamee et al. 2018), ligando e manipulando monômeros de actina nas plantas, que passam por reorganização para formação das células gigantes. Rocha et al. (2021), em um estudo do perfil transcricional ao longo de quatro estádios de desenvolvimento de *M. incognita*, identificaram um *motif* nomeado Mel-DOG, altamente conservado no gênero *Meloidogyne*, putativamente associado a genes efetores, indicando proteínas como uma L-Fucosidase (GH29), relacionada a família de CAZymes (*Carbohydrate-Active enZymes*), com funções na patogenicidade.

Os vegetais possuem mecanismos de resistência natural contra agentes bióticos, que se baseiam em barreiras e mecanismos de defesa pré-existentes ao ataque pelo patógeno, que permanecem inativos ou latentes, sendo ativados apenas quando expostos a esses agentes indutores (Carvalho e Barcelos 2012). Estas defesas podem ser estruturais, como ceras cuticulares, tricomas e o movimento dos estômatos, ou químicas, como a presença de metabólitos secundários, a exemplo das fitoalexinas. Os mecanismos pré-formados podem ficar inoperantes, havendo ativação de mecanismos pós-formados quando do reconhecimento do patógeno. Neste caso, diversos eventos celulares associados a PTI e ETI são conhecidos, como o rápido influxo de cálcio do meio externo, a formação de espécies reativas de oxigênio, a ativação de MAP quinases (*Mitogen-Activated Protein Kinase*), a reprogramação da expressão dos genes, aposições de parede celular como deposições de calose no sítio de infecção e a reação de hipersensibilidade (HR) ou morte localizada (Boller e Felix 2009). A expressão de genes “assinatura” em PTI e ETI é similar, indicando que as respostas podem ser as mesmas, com diferença na magnitude.

As vias à jusante da ativação das proteínas PRR e NB-LRR ainda não são completamente conhecidas (Tao et al. 2003), entretanto, uma das vias mais compreendidas é a da sinalização por MAP quinases (MAPK), que transferem sinais de receptores extracelulares a respostas celulares, que normalmente consiste de uma MAPK quinase quinase (MAPKKK), que fosforila uma MAPK quinase (MAPKK), que fosforila, por fim, a MAPK, sendo uma via associada tanto a PTI como a ETI e que regula a atividade de substratos diversos, como proteínas quinase e fatores de transcrição. Uma via alternativa a das MAPKs é a das CDP quinases (*Calcium-Dependent Protein Kinase*) (Boudsocq et al. 2010). A sinalização de ETI é pouco conhecida, envolvendo genes específicos de cada patossistema ou membros de um complexo de chaperonas necessário para a função de muitas proteínas NB-LRR (Shirasu e Schulze-Lefert 2003); entretanto, poucas proteínas sinalizadoras de receptores como os NB-LRR já foram identificadas, sendo a mais conhecida a EDS1 (*Enhanced Disease Susceptibility 1*) (Wiermer et al. 2005).

Apesar da lacuna no conhecimento das vias de sinalização que levam à resposta, existem vias de resposta desencadeadas por ETI e PTI já bem caracterizadas, como as vias do ácido salicílico e do etileno/ácido jasmônico (Bari e Jones 2009), que costumam atuar de forma antagonista, com ácido salicílico envolvido na resistência a patógenos biotróficos e etileno/ácido jasmônico na resistência a necrotróficos e insetos; entretanto, existem estudos que indicam interação complexa destes hormônios, atuando de forma sinérgica na amplificação da resposta de defesa (Tsuda et al. 2009). Mesmo na ausência de ácido salicílico, a via etileno/ácido jasmônico pode contribuir mantendo um nível substancial de resistência ao patógeno (Dodds e Rathjen 2010).

As plantas possuem mecanismos de defesa em resposta ao ataque dos patógenos, entretanto, em alguns casos, os patógenos conseguem superar as respostas de defesa e estabelecer a doença, em uma reação de compatibilidade.

2.5. Resistência a doenças: aspectos conceituais

A resistência é a capacidade da planta de bloquear ou retardar a entrada ou desenvolvimento de um patógeno em seus tecidos através de barreiras morfológicas ou bioquímicas, sendo caracterizada de acordo com o número de genes atuantes na defesa da planta contra o patógeno, podendo ser um gene (monogênica) ou vários genes (poligênica). Os genótipos de uma espécie vegetal são afetados por raças de um patógeno, podendo ser resistência de hospedeiro ou de não-hospedeiro (Dallagnol 2018).

Na resistência monogênica, também chamada de resistência completa, vertical e qualitativa, toda a resistência é conferida por um único gene ou poucos genes (oligogênica) de efeito maior, sendo o gene único denominado como gene R, que reconhece e responde ao sinal emitido pela proteína do gene de virulência *Avr*, do patógeno. Não existem graus intermediários, apenas resistência ou suscetibilidade, ou seja, fenótipo chamado tudo ou nada. Quando há resistência, os sintomas da doença não são observados, podendo ser observadas, entretanto, pequenas lesões necróticas decorrentes de reação de hipersensibilidade, que correspondem a morte de células na região da tentativa de penetração do patógeno. Alternativamente, quando os sintomas da doença são observados, caracteriza-se a suscetibilidade (Trigiano et al. 2010). Já a resistência poligênica é controlada por vários genes de efeito menor, podendo ser chamada de resistência parcial ou moderada, horizontal e quantitativa. Neste caso, ocorrem graus intermediários, sendo possível quantificar um nível de resistência, variando entre o máximo de suscetibilidade e o máximo de resistência para os genótipos hospedeiros. Neste caso, a resistência não é específica para raças do patógeno, sendo efetiva para um amplo espectro de raças patogênicas, e é mais durável e estável, já que é menor a possibilidade de quebra de resistência para vários genes. Sendo assim, o progresso da doença é mais lento na planta resistente comparativamente a um genótipo suscetível (Camargo 2011; Dallagnol 2018).

A resistência pode ser classificada como de hospedeiro ou de não-hospedeiro. A resistência de todos os genótipos de uma determinada espécie vegetal contra todos os indivíduos da espécie do patógeno é denominada resistência de não-hospedeiro (RNH), enquanto, inversamente, a resistência de hospedeiro (RH) é aquela de genótipos específicos de uma espécie vegetal contra indivíduos específicos do patógeno. A resistência de não-hospedeiro é considerada mais durável, pois permanece eficaz por um maior período em uma cultivar de uso generalizado. Plantas RNH são imunes, apresentando mecanismos que impedem a infecção e o desenvolvimento do patógeno (Niks e Marcel 2009).

Um termo frequentemente utilizado em nematologia é a tolerância, sendo referente a capacidade da planta de suportar ou de se recuperar de efeitos adversos causados pelo parasitismo dos fitonematoides. A tolerância é diferente da resistência ao proteger a planta hospedeira enquanto mantém um efeito que varia de neutro a positivo em relação a aptidão do patógeno, reduzindo o efeito da infecção em sua aptidão independentemente do nível de multiplicação do patógeno, enquanto a resistência depende da habilidade do hospedeiro em afetar o desenvolvimento, reprodução ou sobrevivência do patógeno (Mccarville et al. 2017). Existe divergência entre autores quanto à existência de polimorfismos para tolerância a doenças (Pagán et al. 2008; Carr et al. 2006), entretanto, Pagán e García-Arenal (2018) indicam que, apesar da teoria que prediz a fixação de alelos de tolerância em plantas hospedeiras, existe evidência de polimorfismos para tolerância independentemente do patógeno considerado.

2.6. RNA-Seq

A transcrição é a primeira etapa do processo que culmina na expressão de genes, antes da sua tradução em proteínas ou enzimas. Um transcriptoma constitui o conjunto completo de transcritos em uma célula (mRNA, rRNA, tRNA e RNA não codante), incluindo a sua quantidade, de acordo com um estágio de desenvolvimento (embrionário, por exemplo) ou uma condição fisiológica. A metodologia do RNA-Seq permite conhecer o conjunto de transcritos e, assim, obter entendimento do ponto de vista molecular sobre um processo biológico, examinando seqüências de RNA e suas quantidades em uma amostra, utilizando tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS) (Wang et al. 2009).

O principal objetivo da técnica é a determinação de quais são e em que quantidade os genes estão diferencialmente expressos sob uma ou mais condições experimentais, comparativamente a um controle. Neste caso, o *workflow* usual inicia com a extração do RNA, seguido da construção de bibliotecas com enriquecimento de mRNA (removendo moléculas de rRNA, tRNA e RNAs pequenos), síntese de cDNA e ligação de adaptadores, com sequenciamento em plataformas de nova geração. Os resultados são analisados utilizando ferramentas de bioinformática. A técnica também pode ser utilizada em estudos de *splicing* alternativo de mRNA, detecção de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), identificação de novas isoformas, regulação da expressão dos genes por moléculas de RNA não codantes e níveis de expressão alelo-específico (Stark et al. 2019).

O surgimento das plataformas de NGS alavancou as análises de transcriptomas, eliminando dificuldades impostas por metodologias como os microarranjos baseados em hibridização e abordagens baseadas sequenciamento de Sanger, permitindo obter dados em larga escala e em pouco tempo, com custo cada vez mais baixos. As plataformas NGS começaram a ser comercializadas em 2005 e, atualmente, existem diversas plataformas disponíveis, com predomínio das plataformas Illumina, que usam a abordagem de sequenciamento por síntese (Bentley et al. 2008) para *reads* curtas. Há também a plataforma Pacific Biosciences (PacBio) para *reads* longas, adequada para a montagem *de novo* de transcriptomas e para a identificação de isoformas de *splicing* (Au et al. 2013). Outras plataformas disponíveis são a 454 FLX (Roche), a primeira a ser desenvolvida, a Ion Torrent (Life Technologies), a SOLiD (Applied Biosystems) e a Nanopore (Oxford Nanopore Technologies), sendo que a PacBio e a Nanopore são plataformas de terceira geração (Suk e Aluru 2014).

2.7. Estudos genéticos e moleculares envolvendo o patossistema *P. vulgaris* – *M. incognita*

O Laboratório de Genética Molecular de Plantas Cultivadas (LGMPC), da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ/USP, no qual o presente estudo foi desenvolvido, conta com uma linha de pesquisa em feijoeiro-comum e sua interação com o nematoide das galhas, visando gerar resultados de natureza genética e molecular, em parceria com o Programa de Melhoramento de Feijão do Instituto Agrônômico. Frutos desta parceria, inicialmente, foi gerada uma *core collection* de 180 genótipos, representativa da diversidade do banco ativo de germoplasma de feijoeiro do IAC, composta de 87 linhagens do IAC, 62 linhagens do CIAT (*International Center for Tropical Agriculture*), 12 da EMBRAPA, 9 variedades brasileiras e 10 cultivares comerciais. Este painel de diversidade foi genotipado por GBS (*Genotyping by Sequencing*), permitindo detectar marcadores e explorar SNPs (Perseguini et al. 2015; Diniz 2016). O painel também foi fenotipado para a resposta a *M. incognita* (Giordani et al. 2021), sendo que

175 genótipos puderam ser avaliados para a sensibilidade a *M. incognita*, com número de massa de ovos variando de 1 a 470 e o índice de galhas de 0 a 5, com apenas três genótipos com menos de 100 massas de ovos e 27 com índice de galhas inferior a 2. Utilizando a estratégia GWAS (do inglês, *Genome Wide Association Studies*), em um conjunto de 10.362 SNPs, foram encontrados 4 SNPs associados ao índice de massa de ovos nos cromossomos Pv06, Pv07, Pv08 e Pv11 e 4 SNPs associados ao índice de galhas nos cromossomos Pv01, Pv02, Pv05 e Pv10. Neste mesmo trabalho, foi feita uma validação por mapeamento de QTLs, utilizando uma população construída pelo cruzamento de dois genótipos do IAC contrastantes para a resposta fenotípica ao nematoide das galhas, sendo que um QTL controlando o índice de galhas foi encontrado no cromossomo Pv05, na posição 18.6 cM, explicando 9,24% da variação fenotípica e com efeito aditivo de -0.17. Dentro das regiões genômicas associadas, foram preditos 14 genes análogos aos de resistência (RGAs), contendo domínios NB-ARC, CC, LRR ou TIR, e 5 genes que haviam sido detectados com expressão diferencial em um estudo prévio de análise de transcriptoma (Santini et al. 2016). Também foi feita uma avaliação histoquímica da produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) nas raízes de quatro genótipos de feijoeiro, sendo que os genótipos moderadamente resistentes IAC-Tybatã e Puebla-152-CIAT apresentaram maior produção de H₂O₂ em 24 h após a inoculação, indicando que estas moléculas possam atuar em mecanismos de resistência ao patógeno.

Santini et al. (2016) estabeleceram o estudo do perfil transcricional de uma cultivar suscetível de feijoeiro-comum, IPR Saracura, ao patógeno *M. incognita*, em um estágio inicial e um estágio intermediário da interação, i.e., 4 e 10 dias após a infecção (DAI), respectivamente. Foram encontrados 797 genes diferencialmente expressos, dentre os quais, genes envolvidos em resposta a ferimentos (Phvul.005G087200, Phvul.005G108400), um gene de resistência TIR-NBS-LRR (Phvul.008G195000) superexpresso (com expressão induzida em resposta à infecção pelo patógeno) no início da interação, representando uma tentativa do hospedeiro de resistir ao ataque, genes de *heat shock proteins* (Phvul.001G039700) e genes das vias de sinalização de etileno/ácido jasmônico (Phvul.001G160200) reprimidos no estágio intermediário, culminando em suscetibilidade. Apesar da expressão de um gene de resistência no início da interação em resposta à infecção pelo patógeno, a repressão de proteínas *heat shock* (necessárias para a resistência do hospedeiro mediada por genes R), levou à falta de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e, por consequência, ausência de uma resposta hipersensitiva. Além disso, a defesa basal contra o patógeno é quebrada pela repressão nas vias do etileno/ácido jasmônico, fazendo com os sítios de alimentação pudessem ser estabelecidos e que o patógeno fosse capaz de continuar o seu desenvolvimento nas raízes do hospedeiro, resultando em uma reação de compatibilidade.

Santos et al. (2018) realizaram o mapeamento de QTLs e a análise de transcriptoma em feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L.) frente à infecção por *M. incognita*, no sentido de encontrar genes candidatos à resistência. No estudo de QTLs, uma população de 84 linhas obtidas do cruzamento entre dois genótipos contrastantes foi genotipada, e uma população oriunda do cruzamento entre duas linhas quase isogênicas contrastantes para a resistência foi fenotipada para o número de massa de ovos. O genoma de *P. vulgaris* foi usado como referência. Foram obtidos 14.202 SNPs e a fenotipagem mostrou uma variação de 31 a 216 massas de ovos, sendo encontrado um QTL importante, associado à reduzida produção de massa de ovos na posição 13.37 cM do grupo de ligação LG9, responsável por 64% da variação fenotípica. Para o transcriptoma, foram encontrados 386 genes diferencialmente expressos (GDEs). As informações dos GDEs e dos QTLs foram associadas, sendo assim, 15 genes candidatos foram identificados, sendo que seis pertencem à família de genes de resistência TIR-NBS-LRR (Phvul.004G139900, Phvul.004G140400, Phvul.004G140500, Phvul.004G140700, Phvul.004G140800 e Phvul.011G030000), dentre os quais três estão superexpressos em pelo menos um dos dois tempos avaliados (3 e 9 dias após inoculação).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Genótipos contrastantes

Foram utilizados os acessos de feijoeiro-comum IAC-Tybatã e Branquinho como moderadamente resistente e suscetível, respectivamente, os quais se destacaram dentre 175 acessos de um Painel de diversidade do Banco Ativo de Germoplasma do IAC – Centro de Grãos e Fibras, segundo os resultados de Giordani et al. (2021) (Figura 1).

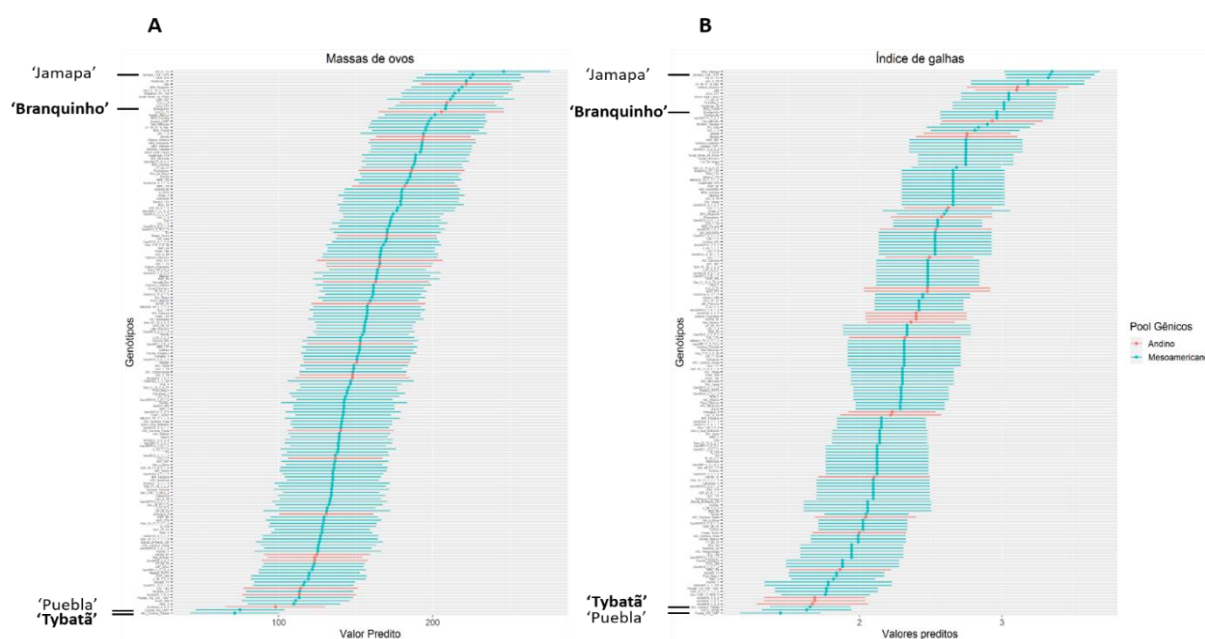


Figura 3. Resposta dos 175 acessos do painel avaliado para: A. Valores Preditos (*Best Linear Unbiased Predictors* - BLUPs) para o número de massas de ovos, onde IAC-Tybatã foi o 1º mais resistente e Branquinho foi o 14º mais suscetível e B. BLUPs para o índice de galhas, onde IAC-Tybatã foi o 3º mais resistente e Branquinho foi o 13º mais suscetível. Puebla e Jamapa foram usados como padrão de resistência e de suscetibilidade, respectivamente.

Fonte: Giordani et al. (2021).

Além do notável contraste fenotípico quanto à resposta ao nematoide, ambos os acessos também são contrastantes para outros caracteres agrônômicos, quais sejam doenças foliares (mancha angular e antracnose), porte e ciclo de maturação (Perseguini et al. 2011; Silva 2011), denotando o seu potencial para o melhoramento da cultura pela condução da população derivada do cruzamento entre eles.

3.2. Preparo do inóculo de *M. incognita*

O inóculo de *M. incognita* raça 3 foi multiplicado em tomateiro (*Solanum lycopersicum*) suscetível da cultivar 'Santa Clara VF5600', da empresa Sakata Seed Sudamérica (<https://www.sakata.com.br>), com condução em casa de vegetação durante 60 dias. Para a extração dos ovos, as raízes dos tomateiros infectados foram coletadas, lavadas, cortadas e agitadas por 2 min em 500 ml de solução de NaOCl – 10%. A solução passou por peneiras consecutivas de 425, 90 e 25 µm, sobrando apenas os ovos retidos, os quais foram alocados sobre papel extrafino (*Kimwipe®*) em

placa de Petri com água destilada, onde permaneceram por um período de 5 a 8 dias, permitindo a eclosão e obtenção dos nematoides juvenis (J_2) que transpassaram o papel. Sob microscópio ótico, foi estimada a concentração de nematoides J_2 /ml através da contagem em lâmina de Peters. Por fim, a solução de inoculação foi preparada por diluição, resultando em $200 J_2 \text{ ml}^{-1}$.

3.3. Determinação dos períodos de coleta de RNA

No sentido de determinar os períodos mais adequados para a extração do RNA e construção das bibliotecas de RNA-Seq, foi realizado um ensaio inteiramente casualizado, com três repetições, em casa de vegetação, com avaliação do desenvolvimento dos nematoides nas raízes de IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S). O ensaio foi conduzido em ausência de solo, pelo método Atamian et al. (2012) com adaptações, utilizando sacos plásticos com fechamento de zíper (24 x 17 cm) contendo papel de germinação, acomodados em uma caixa em posição vertical, nos quais foram semeadas as plântulas previamente germinadas em câmara de crescimento do tipo BOD a 28 °C. A irrigação foi feita com solução nutritiva de Hoagland (50%) (Hoagland e Arnon 1950), conforme necessidade, e com água autoclavada. Após um período de 10 a 14 dias, com a formação de raízes terciárias, foi realizada a inoculação com 10 ml de solução contendo $200 J_2 \text{ ml}^{-1}$ de *M. incognita*, distribuída uniformemente ao longo das raízes de cada planta.

A coleta das raízes para avaliação foi feita em 7 períodos: 2, 4, 7, 10, 14, 22 e 30 DAI. Em cada um destes períodos as raízes foram coradas com fúcsina ácida (Byrd et al. 1983). Inicialmente, as raízes foram separadas da parte aérea com o auxílio de um bisturi e mantidas em uma solução com NaOCl 1,5%, por 6 min., com posterior lavagem em água corrente. Em seguida, foram inseridas em uma solução aquosa 30:1 do corante fúcsina ácida (3,5 g.l⁻¹ fúcsina ácida, 250 ml ácido acético e 750 ml água destilada), e submetidas ao banho-maria por 30 s a 100 °C, posteriormente sendo esfriadas em temperatura ambiente. Por fim, as raízes foram colocadas em lâmina para visualização e fotografia sob microscópio de campo escuro.

Para cada um dos períodos, também foi realizada a contagem do número de nematoides por estágio de desenvolvimento, considerando as características de cada estágio do patógeno, de acordo com Eisenback e Triantaphyllou (1991) e Karssen e Moens (2006) (Figura 1), sendo:

J_2 : Corpo vermiforme, penetram as raízes intercelularmente;

J_3/J_4 : Em J_3 , o nematoide tem formato de garrafa, perde o estilete e a ponta da cauda torna-se transparente. Fêmeas e machos começam a desenvolver órgãos reprodutivos. Formado após a segunda troca de cutícula. Em J_4 , as fêmeas tem maior diâmetro e formato piriforme, após a terceira troca de cutícula. O macho tem forma alongada e vermiforme e é formado dentro da terceira cutícula, permanecendo dobrado no interior da quarta cutícula;

Adultos: A fêmea adulta é piriforme e, posteriormente, globosa e produz uma matriz gelatinosa que contém os ovos. O macho, de forma vermiforme, após a quarta ecdise, tem o estilete e os órgãos reprodutivos e digestivos reconstituídos.

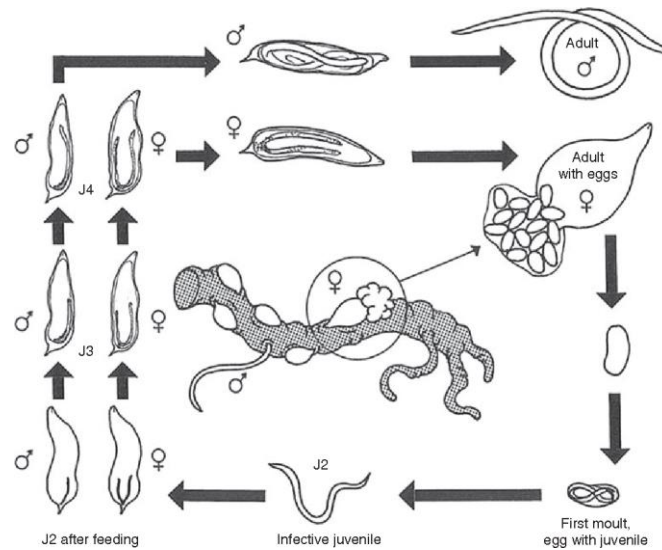


Figura 4. Ciclo de vida do nematoide das galhas (*M. incognita*), representando os juvenis de segundo (J₂), terceiro (J₃) e quarto (J₄) estágio, as fêmeas e os machos adultos.

Fonte: Moens et al. (2009), adaptado de Karssen e Moens (2006).

3.4. Ensaio de inoculação

As sementes dos genótipos contrastantes foram semeadas em rolos de papel de germinação umedecidos com água autoclavada e mantidas sob temperatura de 28 °C em câmara de crescimento do tipo BOD, até que as radículas atingissem de 1 a 2 cm. O ensaio foi conduzido segundo Atamian et al. (2012) com adaptações. As caixas contendo os saquinhos zip lock com papel de germinação e as plântulas foram alocados em câmara de crescimento durante 18 dias, até o desenvolvimento adequado do sistema radicular com raízes terciárias, a 28 °C, fotoperíodo de 16 h, irrigações diárias com água destilada e autoclavada, sendo fertirrigadas com solução de Hoagland (50%) (Hoagland e Arnon 1950) durante os primeiros três dias.

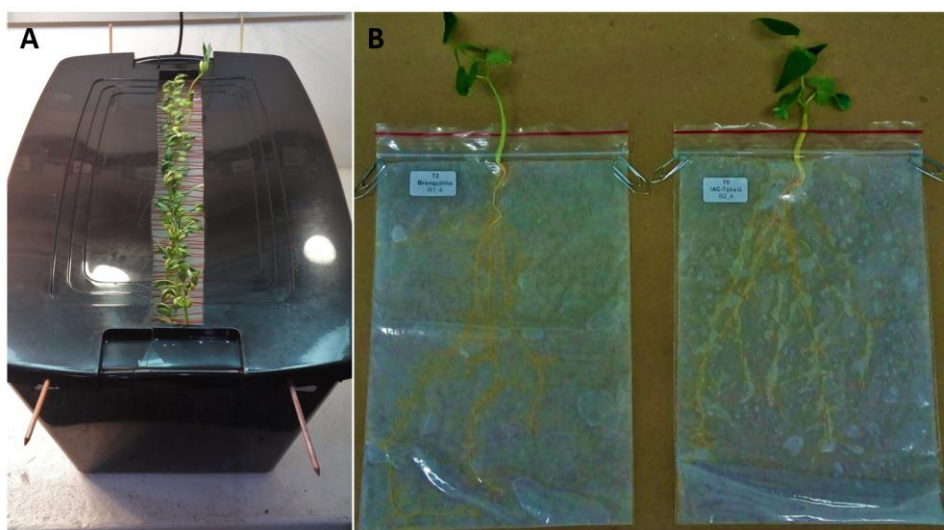


Figura 5. Ensaio de inoculação de feijoeiro-comum infectado com *M. incognita*; A. Experimento implantado segundo o protocolo de Atamian et al. (2012), em câmara de crescimento; B. Genótipos Branquinho (S) e IAC-Tybatã (R), 18 dias após início do ensaio, com desenvolvimento adequado para a inoculação com o patógeno.

O ensaio foi feito com 2 genótipos contrastantes (IAC-Tybatã e Branquinho), 2 períodos de coleta das raízes (4 e 10 DAI) e 2 condições de inoculação (inoculado e controle), resultando em 8 tratamentos, com 3 repetições, totalizando de 24 parcelas.

As raízes de feijoeiro foram inoculadas com 10 ml de solução, considerando o valor de $200 J_2 \text{ ml}^{-1}$ obtido no preparo do inóculo, resultando em 2.000 J_2 , distribuída uniformemente sobre toda a superfície radicular com auxílio de uma pipeta. As plantas referentes ao controle foram inoculadas com água destilada. Após a inoculação, as plantas foram mantidas por 24 h em posição horizontal para facilitar a infecção e a distribuição do inóculo, e foram cobertas com papel alumínio. Após este período, as plantas retornaram para posição vertical em caixas e permaneceram em câmara de crescimento até completar os períodos de 4 e 10 DAI, com irrigações conforme necessidade.

As raízes foram coletadas em duas etapas de acordo com os períodos (4 e 10 DAI). Inicialmente, a parte aérea foi separada do sistema radicular com um bisturi esterilizado em uma lupa, e as raízes foram divididas longitudinalmente em duas porções, com uma porção sendo preservada em nitrogênio líquido e armazenada em ultrafreezer ($-80 \text{ }^\circ\text{C}$), para a extração de RNA total, e a outra porção sendo corada com fucsina ácida (Byrd et al. 1983) para verificar a presença de nematoides em todas as repetições biológicas, com o auxílio de microscópio óptico.

3.5. Extração do RNA

O RNA total foi extraído das raízes de cada tratamento usando o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) e purificado com DNase (Promega, Madison, WI, USA), seguindo o protocolo dos fabricantes, resumido a seguir.

Para a extração do RNA total, o tecido radicular foi macerado em nitrogênio líquido e transferido para tubos Falcon de 15 ml, onde foi adicionado 1 ml de Trizol para cada 100 mg de tecido vegetal, incubando o macerado em temperatura ambiente por 5 min. Foi feita a transferência de 1 ml do macerado em Trizol para eppendorfs de 1,5 ml, nos quais foram adicionados 200 μl de clorofórmio, com posterior agitação e incubação em temperatura ambiente por 5 min. Os eppendorfs foram transferidos para centrífuga a 13.000 rpm por 15 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo que nesta etapa ocorre a separação em três fases: fase aquosa superior (transparente – RNA); interfase (branca – clorofórmio + DNA + proteínas) e fase inferior orgânica (avermelhada – fenol). Foram transferidos 400 μl da fase superior aquosa para um novo eppendorf (1,5 ml), ao qual foram adicionados 500 μl de isopropanol, com posterior homogeneização em vórtex e incubação (temperatura ambiente, 10 min). Após nova centrifugação (12.000 rpm, 10 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), foi observada a formação do pellet. O sobrenadante foi descartado, e foi feita a adição de 1 ml de etanol 75% gelado, com homogeneização em vórtex para soltar o pellet. Após outra centrifugação (11.000 rpm, 5 min, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), o sobrenadante foi descartado e os eppendorfs foram mantidos em câmara de fluxo laminar até secar o pellet, em temperatura ambiente. Por fim, foi feita a ressuspensão do pellet em 20 μl de água DEPC. Para a purificação, foram adicionadas 2 U da enzima RQ1 RNase-Free DNase (Promega) e 2 μl de tampão da reação 10 x (Promega) a cada uma das amostras, que foram incubadas a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. As amostras de RNA foram armazenadas em ultrafreezer a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

A concentração e qualidade do RNA extraído foi estimada por espectrofotometria, em equipamento *NanoDrop* 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm,

sendo consideradas como amostras de boa qualidade aquelas com razão de absorvância (A_{260}/A_{280}) entre 1,8 e 2,0. A concentração também foi inferida pelo fluorômetro Qubit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A integridade foi inferida por eletroforese convencional ($60 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$) em gel de agarose (1,5%), com formaldeído 2% e corante SYBR SAFE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (0,5%), em tampão TAE 1x, com visualização do resultado em equipamento Multi Doc-It Digital Imaging System (UVP).

3.6. Construção e sequenciamento das bibliotecas

As etapas de construção e sequenciamento das 24 bibliotecas de RNA foram realizadas pela empresa NGS Soluções Genômicas (<https://ngsgenomica.com.br/>), pela abordagem de RNA-Seq. Previamente, foi feita uma nova análise da integridade das amostras no equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies) e as amostras de RNA que apresentaram alta qualidade, considerando o número de integridade do RNA (RIN) superior a 9, foram utilizadas. A construção das bibliotecas foi executada usando o kit TruSeq® Stranded mRNA library prep (LS) (Illumina), seguindo os procedimentos recomendados pelo fabricante, representado ilustrativamente na figura 6 e descrito resumidamente a seguir, em 7 etapas:

1. Inicialmente, foi feita a purificação do RNA mensageiro (mRNA) a partir das amostras de RNA total, em uma concentração de 500 ng, por enriquecimento da cauda poli-A usando *beads* magnéticas ligadas a oligo-(dT). Para a purificação, o RNA foi eluído em 50 μl de água ultrapura livre de nucleases e foram adicionados 50 μl de solução *RNA purification beads* (Illumina) a cada amostra, com homogeneização por pipetagem. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 min e em gelo por 1 min para desnaturação, e mantidas em temperatura ambiente por 5 min. A placa contendo as amostras foi colocada em um suporte magnético, até o líquido se tornar claro e o mRNA ficar temporariamente aderido à lateral da placa, para remoção do sobrenadante por pipetagem. Foram adicionados 200 μl de *Bead Washing Buffer* (Illumina) e as amostras foram colocadas em suporte magnético para descarte do sobrenadante. Por fim, foram adicionados 50 μl de *Elution Buffer* (Illumina), e as amostras mantidas a 80 °C em um sistema de aquecimento por 2 min e em gelo por 1 min, para a eluição do mRNA das *beads* magnéticas. Para a fragmentação do mRNA, foram adicionados 50 μl de *Bead Binding Buffer* (Illumina) a cada amostra, com homogeneização por pipetagem, incubação a temperatura ambiente por 5 min, sendo as amostras mantidas em suporte magnético por 5 min, com descarte do sobrenadante. O *Bead Washing Buffer* (Illumina) foi adicionada para lavagem. Por fim, foram adicionados 19,5 μl de *Fragment, Prime, Finish Mix* (Illumina) a cada amostra, que foram levadas ao termociclador para a eluição, fragmentação e preparo do mRNA para a síntese de cDNA.

2. A etapa seguinte é de síntese da primeira fita de cDNA. Para tal, as amostras foram retiradas do termociclador e mantidas em suporte magnético por 5 min. 17 μl do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para uma nova placa. Foram adicionados 8 μl de uma mistura de *First Strand Synthesis Act D Mix* (Illumina) e transcriptase reversa *SuperScript II* (Illumina) (7:1), com homogeneização por pipetagem. A placa foi levada ao termociclador e mantida a 25 °C por 10 min, 40 °C por 50 min e 70 °C por 15 min.

3. A seguir, procedeu-se a síntese da segunda fita de cDNA. Foram adicionados 20 μl de *Second Strand Marking Master Mix* (Illumina), como homogeneização por pipetagem e incubação a 16 °C por 1 h em termociclador. Posteriormente, foram adicionados 90 μl de *AMPure XP beads* (Illumina) a cada amostra. feitas amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 15 min e alocadas em suporte magnético por 5 min, com remoção de 135 μl de sobrenadante de cada poço. As amostras foram lavadas em duas etapas com 200 μl de etanol 80% (v/v), com posterior descarte de sobrenadante e remoção do etanol residual com pipeta (20 μl), deixando-as secarem em

temperatura ambiente por 15 min no suporte magnético. Em seguida, 17,5 µl de *Resuspension Buffer* (Illumina) foram adicionados a cada amostra, com incubação em temperatura ambiente por 2 min e alocação em suporte magnético por 5 min. Por fim, 15 µl do sobrenadante, contendo cDNA dupla fita purificado, foram transferidos para uma nova placa.

4. A etapa seguinte consistiu na adenilação das extremidades 3', no sentido de evitar a formação de quimeras proveniente da ligação dos fragmentos uns aos outros, durante a etapa de ligação de adaptadores. A cada amostra foram adicionados 2,5 µl de uma diluição 1:1000 de *A-Tailing Control* (1 µl de *A-Tailing Control* + 99 µl de *Resuspension Buffer*) (Illumina). Foi adicionada 12,5 µl de *A-Tailing Mix* (Illumina), com homogeneização por pipetagem. A placa foi incubada em termociclador a 37 °C por 30 min, 70 °C por 5 min e, em gelo, por 1 min.

5. A seguir, os adaptadores foram ligados às extremidades do cDNA, possibilitando a hibridização a *flowcell* do sequenciamento. A cada amostra, foram adicionadas 2,5 µl de *Ligation Control* (Illumina) diluído, 2,5 µl do *Ligation Mix* (Illumina) e 2,5 µl de *RNA Adapters* (Illumina), com homogeneização por pipetagem e incubação a 30 °C por 10 min. Para finalizar a ligação, foram adicionados 5 µl de *Stop Ligation Buffer* (Illumina). As amostras passaram por limpeza, adicionando-se 42 µl de *AMPure XP Beads* (Illumina), que foram homogeneizadas e incubadas em temperatura ambiente por 15 min. A placa foi colocada em suporte magnético por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Foi feita uma nova limpeza (2 x), utilizando etanol 80% (v/v), conforme descrito na etapa 3. 52,5 µl de *Resuspension Buffer* (Illumina) foram adicionadas, com incubação a temperatura ambiente por 2 min. A placa foi colocada em suporte magnético e houve a transferência de 50 µl de sobrenadante para uma nova placa.

6. A etapa seguinte foi a de enriquecimento dos fragmentos de DNA, no sentido de selecionar e aumentar o número de cópias dos fragmentos que possuem adaptadores ligados a ambas as extremidades. Para tal, a placa de PCR foi mantida em gelo e adicionados 5 µl de *PCR Primer Cocktail* (Illumina) e 25 µl de *PCR Master Mix* (Illumina), com homogeneização por pipetagem. A amplificação se deu em 15 ciclos de 10 s a 98 °C, 30 s a 60 °C e 30 s a 72 °C, com extensão final em 72 °C por 5 min. A seguir, foram adicionados 50 µl de *AMPure XP Beads* (Illumina), com homogeneização e incubação a temperatura ambiente por 15 min. A placa foi colocada em suporte magnético, com descarte do sobrenadante. Foi feita a lavagem com etanol 80% (conforme descrito na etapa 3). Foram adicionados 32,5 µl de *Resuspension Buffer* (Illumina), com homogeneização e incubação por 2 min. 30 µl foram transferidos para uma nova placa de PCR.

7. As bibliotecas tiveram sua qualidade checada usando o equipamento *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies); a seguir, foi feita a quantificação por PCR quantitativa (qPCR), usando o termociclador StepOne (Applied Biosystems). Para a normalização, 10 µl das amostras das bibliotecas foram transferidas, com posterior diluição com Tris-HCL 10 mM (pH 8,5) com Tween 20 (0,1%). Para as reações de amplificação, foram utilizados 2 µl de DNA, 0,2 µM de primer 1 e 0,2 µM do primer 2, 2x do tampão KAPA SYBR FAST Master Mix Universal (Kapa Biosystems) e água ultrapura livre de nucleases para completar 20 µl. Para fazer um pool das bibliotecas, fez-se a transferência de 10 µl de cada biblioteca normalizada em um único poço de uma nova placa.

O sequenciamento foi realizado pela estratégia *paired-end* (2x100 pb), utilizando 30 milhões de leituras pareadas por amostra (15 milhões de clusters), em equipamento NovaSeq 6000, pela empresa NGS, no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP.

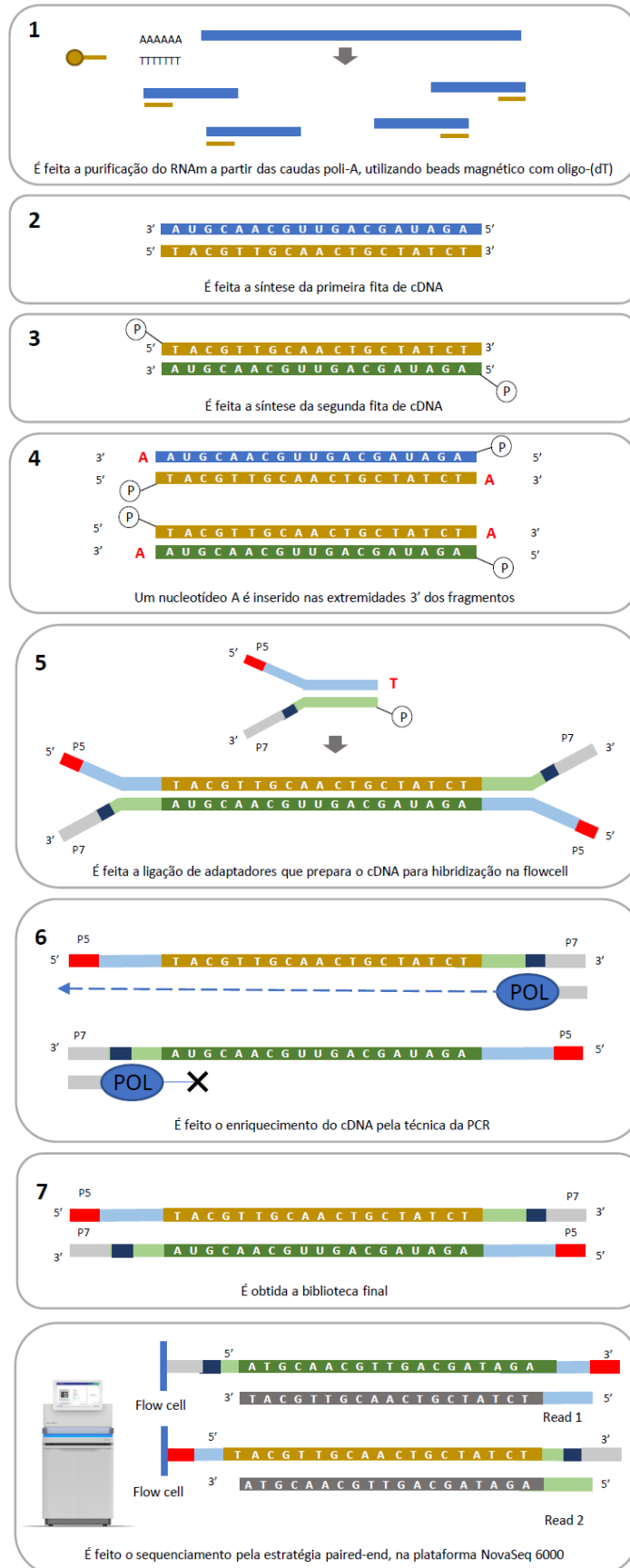


Figura 6. Esquema ilustrativo das etapas para a construção e sequenciamento de bibliotecas. Fonte: Adaptado de Illumina (2017) (<https://support.illumina.com/>).

3.7. Análises de bioinformática dos dados do sequenciamento

Os dados resultantes do RNA-Seq foram entregues no formato .fastq, sendo, então, utilizados em análises de bioinformática em etapas de controle de qualidade, alinhamento ao genoma de referência e análise da expressão quantitativa e diferencial dos genes (Figura 7).

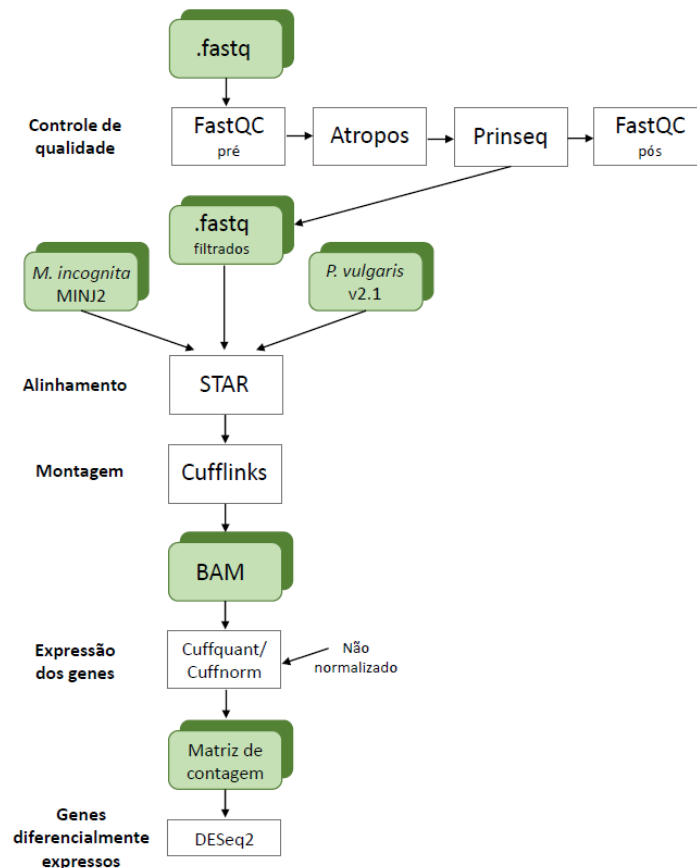


Figura 7. Fluxograma das etapas das análises de bioinformática a partir dos dados .fastq obtidos do sequenciamento, com indicação dos *softwares* e formatos de arquivos utilizados em cada etapa.

3.7.1. Avaliação da qualidade das sequências

Primeiramente os dados passaram por pré-processamento, buscando determinar as sequências de alta qualidade. Para tal, parâmetros de qualidade das *reads* foram verificados usando o *software* FastQC (Andrews 2010), para determinar as estratégias de filtragem dos dados. Dentre os parâmetros, foram considerados o conteúdo de adaptadores, os *scores* de qualidade Phred, a presença de *reads* vazias, de *reads* pequenas e de sequências contaminantes, considerando o genoma de referência de *M. incognita* MINJ2, projeto PRJBD9394, disponível no banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_014132215.1).

A remoção de contaminantes se deu usando a ferramenta de alinhamento Bowtie2 (Langmead e Salzberg 2012). A ferramenta Atropos (Lonnberg et al. 2011) foi adotada a fim de remover resquícios de sequências de adaptadores utilizados no sequenciamento e de, eventualmente, corrigir bases de leituras pareadas quando há sobreposição entre elas. Com a ferramenta Prinseq (Schmieder e Edwards 2011) se fez a remoção de 5 nucleotídeos

das extremidades 3' e 5', de cada uma das sequências analisadas, no sentido de remover resquílios de cauda poli-A, além da seleção de sequências com $Q\text{-score} \leq 30$ e tamanho mínimo das *reads* de 50 pb. A ferramenta FASTQ foi usada para observação dos dados trimados. Neste sentido, as *reads* remanescentes após as etapas elencadas formaram o conjunto de dados base para o mapeamento.

3.7.2. Mapeamento de *reads*

Para a identificação dos genes e demais transcritos, as *reads* foram alinhadas ao genoma de referência de *Phaseolus vulgaris* v2.1 (ID: 442), disponível no banco de dados Phytozome 1.4 (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris_v2_1). Para tal, foi usado o *software* STAR (Dobin et al. 2013), utilizando como parâmetros: número máximo de *hits* por *read*: 20; tamanho mínimo do íntron: 30; tamanho máximo do íntron: 10000; raio de *mismatches* em relação ao tamanho da *read*: 0,02 e número máximo de *mismatches* por par: 999. Ademais, foi feita a remoção de junções não-canônicas. Também, empregou-se o *software* Cufflinks (Trapnell et al. 2010), para a montagem dos transcritos e do transcriptoma final em cada condição, utilizando os seguintes parâmetros: número máximo de *hits* por *read*: 20; tamanho mínimo do transcrito montado: 200 pb; porcentagem mínima de *reads* para a cobertura do transcrito: 4; gap entre *reads* para disparar uma nova montagem: 25; FPKM mínimo para o transcrito: 4; média do tamanho do fragmento: 160 pb; desvio padrão do tamanho do fragmento: 60; tamanho mínimo do íntron: 30; tamanho máximo do íntron: 10000; .

O pacote Cuffquant foi empregado para a quantificação e estimativa da abundância de transcritos, gerando arquivos .cxb que foram repassados ao pacote Cuffnorm, para obter as matrizes de contagens de *reads* por gene/isoforma/cds. O Cuffnorm executa a normalização FPKM, que foi retirada utilizando a função 'de-normalize' no ambiente R (R Core Team 2022) no sentido de obter os dados brutos de contagem sem normalização.

3.7.3. Análise quantitativa da expressão gênica

Para análise da expressão diferencial de genes foi usado o pacote DESeq2 v. 3.14 do R/Bioconductor (Love et al. 2014), através da função DESeq e em design multi-fatorial, considerando os seguintes tratamentos: genótipos contrastantes, períodos de coleta e inoculações. Como *input*, foi usada a matriz de contagem não normalizada, com os dados brutos de contagem do número de *reads* associada a cada transcrito para cada grupo experimental, obtida após a etapa de alinhamento. A normalização foi executada pela metodologia de *median of ratios* (Anders e Huber 2010), que considera a profundidade de sequenciamento e composição do RNA, onde é determinada a média geométrica da contagem do transcrito para as amostras, usada como divisor para a contagem dos transcritos em cada amostra (dividendo), gerando razões que determinam uma nova média, a qual serve como fator de normalização por amostra.

Para checar a significância estatística da expressão diferencial dos genes adotou-se a metodologia FDR (False Discovery Rate) (Benjamini e Hochberg 1995), considerando o *p*-valor corrigido para múltiplos testes, segundo o nível de significância $\alpha \leq 0,05$, e valores mínimos absolutos de *fold-change* (FC) iguais a 2, permitindo identificar os genes com expressão reprimida ou aumentada comparativamente entre os tratamentos. Os valores significantes de expressão foram transformados na escala logarítmica de $\log_2 \text{fold change}$ ($\log_2 \text{FC}$), utilizando o ambiente R (R Core Team 2022).

Foram feitas comparações entre os tratamentos controles com aqueles inoculados com *M. incognita* (Tabela 1).

Tabela 1. Descrição das comparações entre os tratamentos e as respectivas as siglas de cada comparação.

Sigla da amostra	Descrição
PVRIT1 * PVRCT1	Resistente aos 4 DAI, inoculado com <i>M. incognita</i> * Resistente aos 4 DAI, controle
PVRIT2 * PVRCT2	Resistente aos 10 DAI, inoculado com <i>M. incognita</i> * Resistente aos 10 DAI, controle
PVSIT1 * PVSCT1	Suscetível aos 4 DAI, inoculado com <i>M. incognita</i> * Suscetível aos 4 DAI, controle
PVSIT2 * PVSCT2	Suscetível aos 10 DAI, inoculado com <i>M. incognita</i> * Suscetível aos 10 DAI, controle

3.7.4. Anotação funcional das sequências e análise de enriquecimento

A anotação funcional das bibliotecas de expressão visou determinar a função putativa dos transcritos. Inicialmente, fez-se a associação dos IDs dos genes com o arquivo de anotação de feijoeiro-comum (Pvulgaris_442_v2.1.annotation_info.txt), disponível no Phytozome (https://phytozome-next.jgi.doe.gov/info/Pvulgaris_v2_1), pela função merge, no ambiente R (R Core Team 2022).

Em seguida, procedeu-se a busca por similaridade usando o algoritmo BLAST, considerando o número máximo de 20 hits por sequência e assumindo como limiar de significância o $e\text{-value} \leq 1 \times 10^{-5}$. O mapeamento e a anotação de termos *Gene Ontology* (GO) foram executados segundo os parâmetros padrão do Blast2GO. O enriquecimento dos termos GO foi implementado na plataforma WEGO v.2.0 (Ye et al. 2018). Finalmente, para visualizar os processos e as rotas metabólicas às quais os transcritos diferencialmente expressos se relacionam, foi utilizado o banco de dados KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), pela ferramenta BlastKOALA (<https://www.kegg.jp/blastkoala/>).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação dos períodos de coleta de RNA

No ensaio realizado para avaliar a penetração e o desenvolvimento de *M. incognita*, foi feita a contagem dos nematoides em diferentes estádios de desenvolvimento, em cada um dos sete períodos, em ambos os genótipos. Os J₂ penetraram nas raízes em quantidade superior aos 4 DAI em comparação aos 2 DAI, entretanto, em ambos os períodos, houve um maior número de nematoides no interior das raízes de Branquinho (S). Aos 7 DAI, os nematoides sofrem ecdises para J₃/J₄, sendo observadas diferenças no número de J₃/J₄ entre os genótipos aos 10 e aos 14 DAI, demonstrando atraso no desenvolvimento do patógeno em IAC-Tybatã (MR). Observou-se uma tendência de queda no número de nematoides em estágio avançado de desenvolvimento, o que prevalece dos 22 aos 30 DAI, quando foram observados nematoides no estágio de vida adulto, com diferença entre os genótipos e menor número de adultos apenas no genótipo moderadamente resistente (Figura 8).

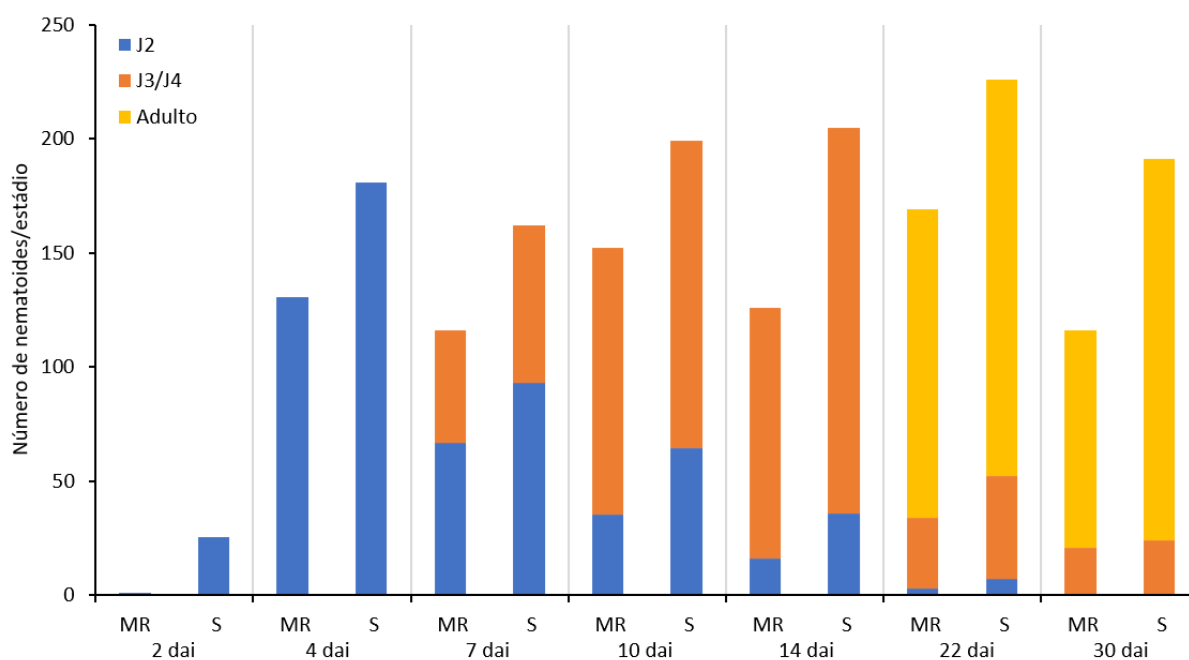


Figura 8. Número médio de indivíduos de *M. incognita* por estágio de desenvolvimento (J₂, J₃/J₄ e adultos) encontrado nas raízes dos genótipos de feijoeiro-comum: MR, moderadamente resistente (IAC-Tybatã); S, suscetível (Branquinho).

Sob microscopia de campo escuro, os nematoides puderam ser visualizados penetrando as raízes aos 4 DAI em ambos os genótipos. Aos 7 DAI, foi observado o seu desenvolvimento no interior das raízes, para a forma de vida sedentária em J₃/J₄. Aos 10 DAI, houve o estabelecimento de sítios de alimentação em células do cilindro vascular e o início da formação das galhas. As fêmeas adultas puderam ser observadas aos 22 DAI, com continuidade no desenvolvimento de células gigantes multinucleadas, sendo que aos 30 DAI pôde ser observada a produção de ovos, iniciando um novo ciclo de infecção em ambos os genótipos (Figura 9).

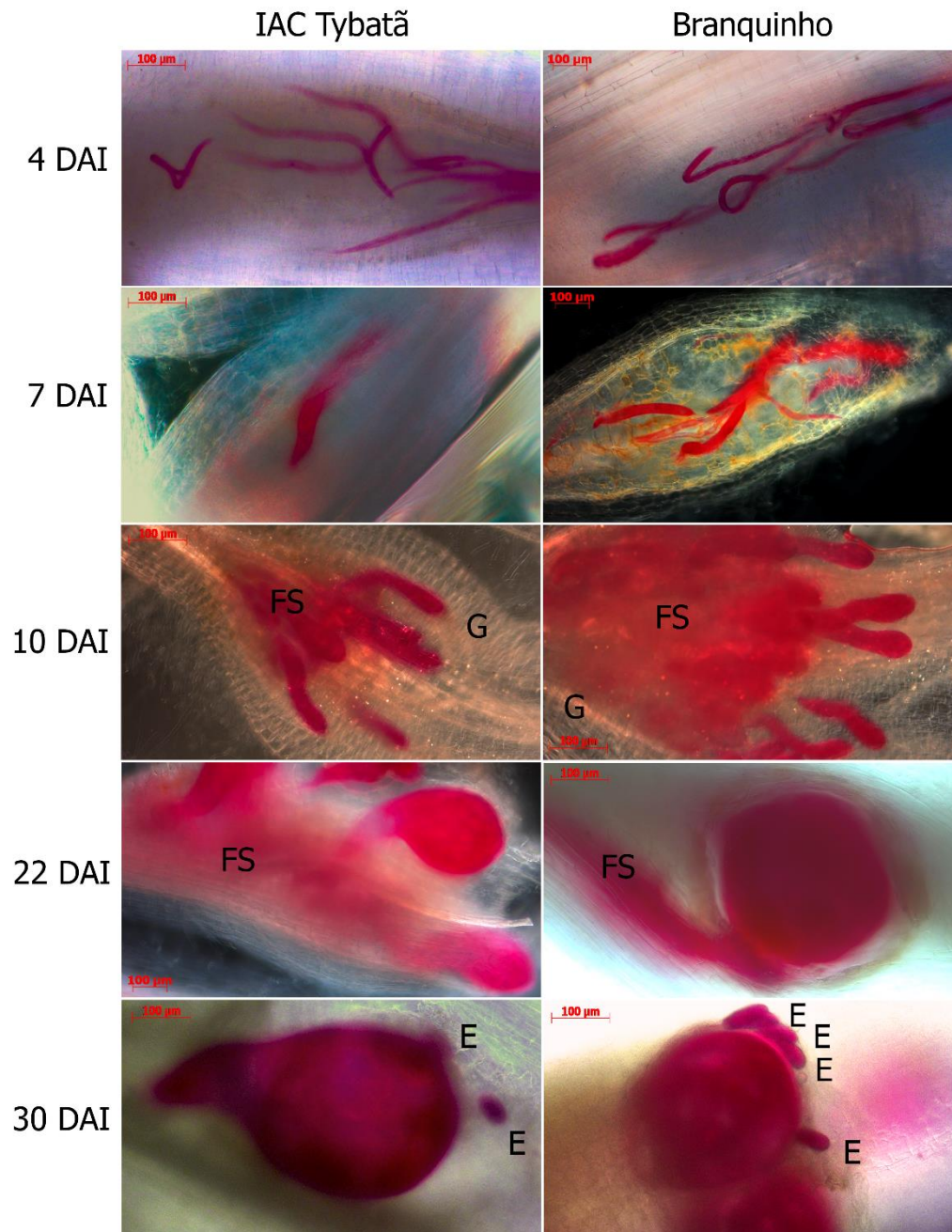


Figura 9. Estádios de desenvolvimento de *M. incognita* no interior das raízes dos genótipos IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S), sob microscopia de campo escuro. Aos 4 DAI, os J₂ penetram as raízes; aos 7 DAI, os J₂ sofrem ecdise para J₃/J₄; aos 10 DAI são formadas as galhas (G, *galls*) e estabelecidos os sítios de alimentação (FS, *feeding sites*); aos 22 DAI observam-se fêmeas adultas, as quais produzem ovos (E, *egg*) aos 30 DAI.

Os períodos de 4 e 10 DAI foram escolhidos para a coleta de RNA de ambos os genótipos, sendo os 4 DAI representativos de um período inicial da interação, onde há a penetração dos patógenos no interior das raízes, e os 10 DAI representativos de um período intermediário, onde uma visível distinção entre os genótipos no desenvolvimento dos juvenis pôde ser observada, com atraso na formação de J₃/J₄, além de diferenças na formação das galhas e no estabelecimento dos sítios de alimentação.

4.2. Extração do RNA

As amostras coletadas no ensaio de inoculação foram submetidas a extração do RNA, sendo selecionadas aquelas que passaram no controle de qualidade. A concentração do RNA variou entre cerca de 100 e 500 ng μl^{-1} , em um rendimento total de 2.000 e 5.000 ng μl^{-1} . As razões de absorvância (A_{260}/A_{280}) variaram entre cerca de 1,8 e 2,0, atendendo aos critérios de qualidade estabelecidos. O RIN (*RNA Integrity Number*) foi satisfatório para todas as amostras, variando de 9,0 a 10 (Tabela 2). Foram selecionadas 3 amostras inoculadas e 3 amostras controle de cada genótipo, nas duas épocas de avaliação, para o sequenciamento, quais sejam, amostras mais concentradas e com maior integridade de acordo com o padrão de bandas, resultando em 24 bibliotecas de RNA-Seq.

Tabela 2. Controle de qualidade das 24 amostras de RNA total selecionadas para sequenciamento, segundo os parâmetros de concentração, razão de absorvância A_{260}/A_{280} e número de integridade do RNA (RIN), de acordo com o tratamento, a nomenclatura e o volume total de diluição do RNA.

	Tratamento	Nomenclatura	Volume ¹	Concentração ²	A_{260}/A_{280}	RIN
1		PVRIT1R1	20	143	1,92	9,3
2	IAC-Tybatã inoculado 4 DAI	PVRIT1R2	20	516	1,78	9,9
3		PVRIT1R3	20	196	1,90	10
4		PVRIT2R1	20	218	1,93	9,9
5	IAC-Tybatã inoculado 10 DAI	PVRIT2R2	20	212	1,87	9,8
6		PVRIT2R3	20	206	1,84	9,9
7		PVRCT1R1	20	248	1,90	9,6
8	IAC-Tybatã controle 4 DAI	PVRCT1R2	20	568	1,96	9,7
9		PVRCT1R3	20	320	1,99	9,6
10		PVRCT2R1	20	190	1,97	9,6
11	IAC-Tybatã controle 10 DAI	PVRCT2R2	20	163	1,93	9,1
12		PVRCT2R3	20	214	1,93	9,6
13		PVSIT1R1	20	191	1,93	9,8
14	Branquinho inoculado 4 DAI	PVSIT1R2	20	252	1,86	9,8
15		PVSIT1R3	20	104	1,89	9,7
16		PVSIT2R1	20	172	1,91	10
17	Branquinho inoculado 10 DAI	PVSIT2R2	20	200	1,94	9,9
18		PVSIT2R3	20	149	1,93	9,9
19		PVSCT1R1	20	292	1,92	9,8
20	Branquinho controle 4 DAI	PVSCT1R2	20	304	1,91	10
21		PVSCT1R3	20	408	1,99	10
22		PVSCT2R1	20	161	1,93	9,9
23	Branquinho controle 10 DAI	PVSCT2R2	20	204	1,93	9,8
24		PVSCT2R3	20	173	1,94	9,6

¹Volume em μl ; ²Concentração em ng μl^{-1} . Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI; R1, 2 e 3, repetição.

A eletroforese capilar, realizada em equipamento 2100 *Bioanalyzer* (*Agilent*), revelou RNAs íntegros em todas as amostras, com padrão bem definido de bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos, sem rastros significativos abaixo das bandas. A banda que corresponde aos RNAs 28S apresentou o dobro da intensidade daquela dos 18S (Figura 10).

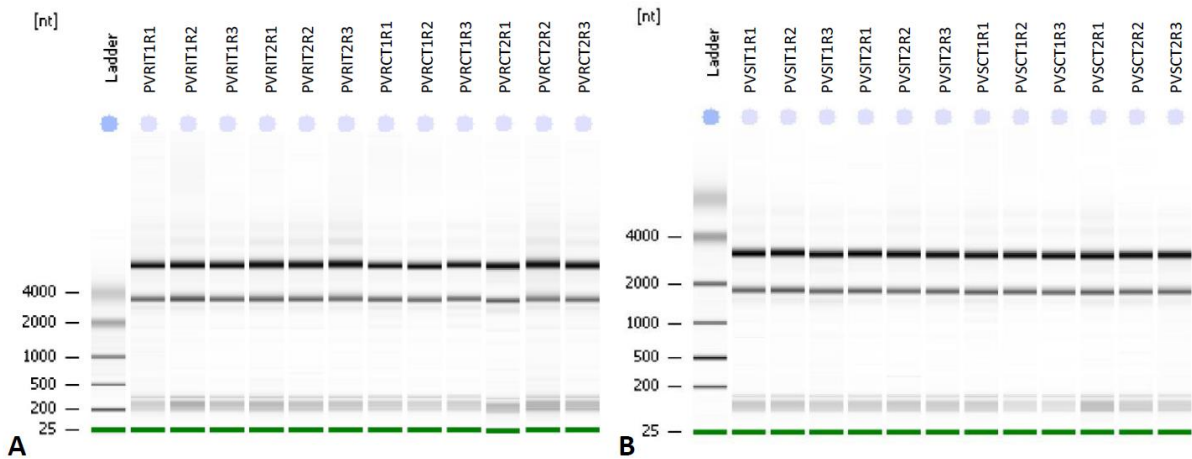


Figura 10. Padrão de bandas do RNA total obtido em equipamento Bioanalyzer. A visualização das bandas dos RNAs ribossomais indica integridade. Em A estão as amostras do genótipo IAC-Tybatã (R) e em B as de Branquinho (S).

Pelo equipamento *Bioanalyzer* também foi obtido um eletroferograma, gráfico com picos de fluorescência por segundo, sendo cada pico correspondente as bandas dos RNAs ribossomais 5S, 18S e 28S. Os eletroferogramas das 24 amostras atenderam aos parâmetros de qualidade necessários ao sequenciamento, com os picos bem definidos, sem ruídos à sua volta, indicando RNA total com boa integridade (Figuras 11 e 12).

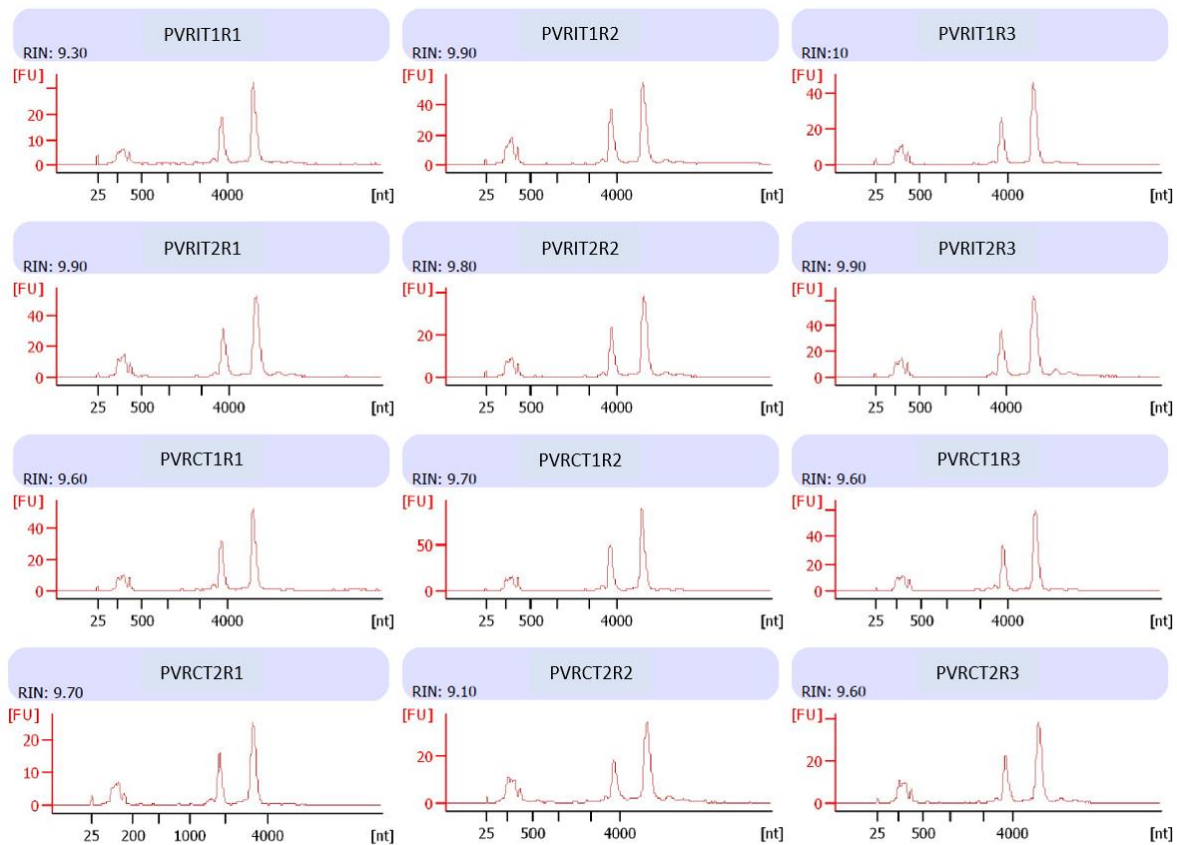


Figura 11. Eletroferograma das amostras de RNA total de IAC-Tybatã (R) utilizadas para a construção de bibliotecas de RNA-Seq.

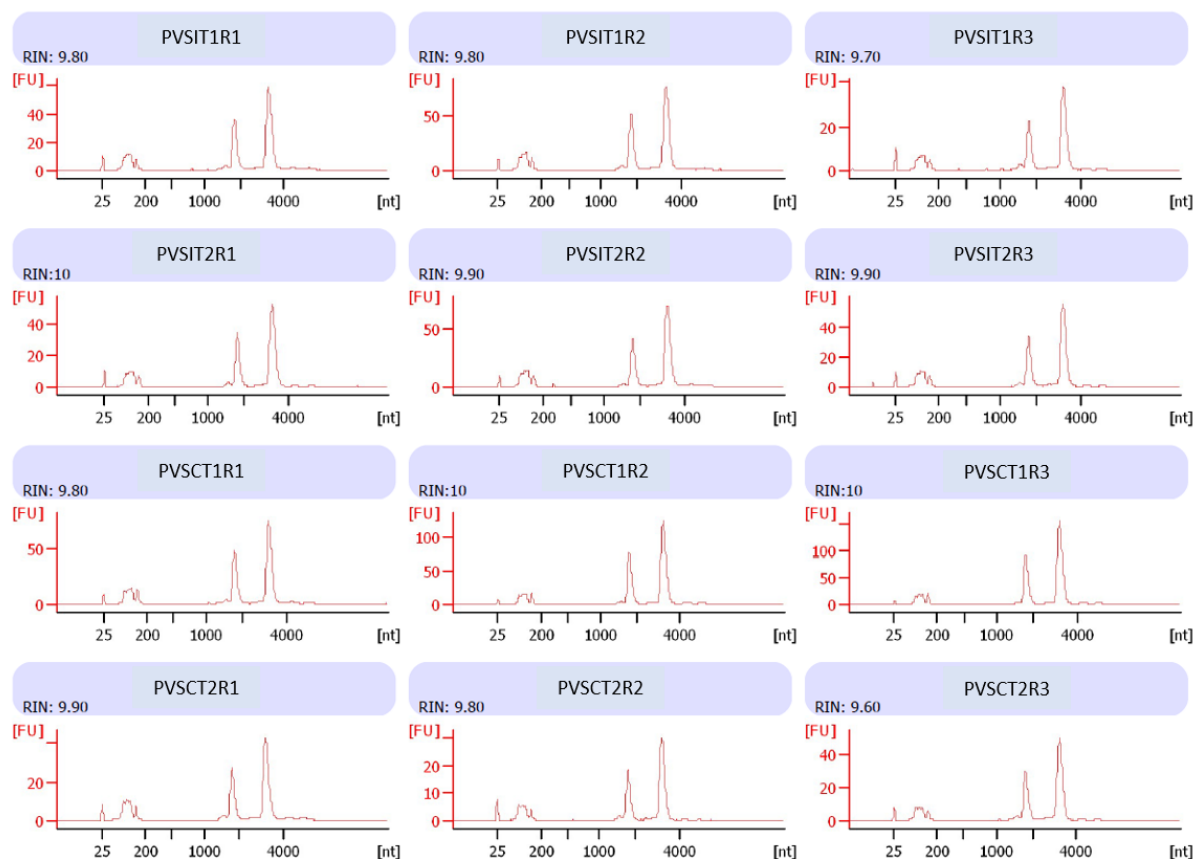


Figura 12. Eletroferograma das amostras de RNA total de Branzinho (S) utilizadas para a construção de bibliotecas de RNA-Seq.

4.3. Dados do sequenciamento

O sequenciamento das bibliotecas de RNA-Seq na plataforma Illumina gerou cerca de 587 milhões de *reads*, sendo 305 milhões (51,95%) para o genótipo IAC-Tybatã (R) e 281 milhões (48,05%) para o genótipo Branzinho (S).

Por época de avaliação, para o genótipo IAC-Tybatã (R), foram geradas 153 milhões de *reads* aos 4 DAI e 152 milhões aos 10 DAI, enquanto para o genótipo Branzinho (S), foram geradas 142 milhões de *reads* aos 4 DAI e 139 milhões aos 10 DAI. As médias dos números de *reads* para cada um dos genótipos relativamente aos tempos de interação estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3. Número total e média de *reads* obtidas nos genótipos IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S) de acordo com os tratamentos inoculados e controles nos dois períodos avaliados da interação *P. vulgaris* - *M. incognita*.

Genótipo	Tratamento	Período	Repetição	Número de <i>reads</i>	Total de <i>reads</i>	Média de <i>reads</i>
IAC-Tybatã	Inoculado	4 DAI	1	27.660.674	74.278.599	24.759.533
			2	22.897.889		
			3	23.720.036		
		10 DAI	1	24.103.529		
			2	27.070.641		
			3	26.651.113		
	Controle	4 DAI	1	27.900.235	78.767.395	26.255.798
			2	28.484.203		
			3	22.382.957		
		10 DAI	1	23.466.495		
			2	25.5907.11		
			3	25.8209.74		
Branquinho	Inoculado	4 DAI	1	25.876.023	72.760.278	24.253.426
			2	25.701.448		
			3	21.182.807		
		10 DAI	1	23.985.069		
			2	21.543.978		
			3	22.733.701		
	Controle	4 DAI	1	22.381.629	69.315.491	23.105.164
			2	22.806.432		
			3	24.127.430		
		10 DAI	1	21.816.273		
			2	24.896.402		
			3	24.202.011		
				587.002.660		

4.4. Análises de bioinformática

4.4.1. Filtragem das sequências de alta qualidade

A filtragem das sequências para eliminação de *reads* com baixa qualidade foi executada conforme descrito em 3.7.1. Com a filtragem, foram formados dois subgrupos para cada biblioteca, um subgrupo referente a sequências únicas, provenientes de *reads* cujos pares foram eliminados devido à baixa qualidade, e outro subgrupo referente a *reads paired-end*. As bibliotecas apresentaram alta qualidade, com variação de 98 a 99% no aproveitamento de *reads* após filtragem e remoção das sequências de adaptadores, de contaminantes e de baixa qualidade de acordo com o *score Phred* de qualidade, comparativamente às sequências totais antes da filtragem (Tabela 4). A média do rendimento foi similar para o genótipo IAC-Tybatã (R) (99,45%) e Branquinho (S) (99,51%).

Tabela 4. Número total de *reads* para cada biblioteca antes e após a filtragem visando selecionar sequências de alta qualidade. Nas siglas: R, resistente; S, suscetível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI; R1, 2 e 3, repetição.

Amostra	Antes da filtragem		Após filtragem		Rendimento ²
	<i>Paired-reads</i> total ¹	Sequências únicas ¹	<i>Paired reads</i> total ¹		
PVRIT1R1	27,60	1,68	25,78	99,49	
PVRIT1R2	22,89	1,45	21,20	98,95	
PVRIT1R3	23,72	1,54	22,09	99,62	
PVRIT2R1	24,10	1,2	22,54	98,51	
PVRIT2R2	27,07	1,32	25,57	99,34	
PVRIT2R3	26,65	1,8	24,59	99,02	
PVRCT1R1	27,90	1,73	26,09	99,71	
PVRCT1R2	28,48	1,22	27,18	99,72	
PVRCT1R3	22,38	1,06	21,27	99,78	
PVRCT2R1	23,46	1,01	22,40	99,79	
PVRCT2R2	25,59	0,76	24,75	99,69	
PVRCT2R3	25,82	1,66	24,09	99,73	
PVSIT1R1	25,87	0,9	24,87	99,61	
PVSIT1R2	25,70	1,33	24,29	99,69	
PVSIT1R3	21,18	1,42	19,65	99,48	
PVSIT2R1	23,98	0,84	22,96	99,25	
PVSIT2R2	21,54	0,95	20,41	99,16	
PVSIT2R3	22,73	1,46	21,02	98,90	
PVSCT1R1	22,38	1,24	21,05	99,60	
PVSCT1R2	22,80	1,13	21,61	99,74	
PVSCT1R3	24,12	1,27	22,79	99,75	
PVSCT2R1	21,81	1,18	20,56	99,68	
PVSCT2R2	24,89	0,65	24,14	99,60	
PVSCT2R3	24,20	1,52	22,60	99,67	

¹Número em milhões de *reads*; ²Rendimento em porcentagem das sequências após filtragem em relação as sequências antes da filtragem.

4.4.2. Alinhamento das *reads* ao genoma de *P. vulgaris*

O alinhamento das sequências ao genoma de referência de *P. vulgaris* gerou resultados muito satisfatórios, ou seja, 279 milhões de *reads* de IAC-Tybatã (R), com aproveitamento de 92,07% daquelas usadas no mapeamento contra o genoma de referência (303 milhões), obtidas após controle de qualidade (item 4.4.1).

De Branquinho (S), foram obtidas 257 milhões de *reads*, com aproveitamento de 90,11% daquelas usadas no mapeamento contra o genoma de referência (279 de milhões).

A média do aproveitamento, considerando ambos os genótipos, foi de 92,05%, com uma variação de 90 a 94%, em IAC-Tybatã (R), e variação de 86 a 94%, em Branquinho (S), e o número total de *reads* alinhadas foi de 537 milhões, considerando sequências únicas e *paired-end*. Para as sequências únicas, a variação no número total de *reads* alinhadas foi de cerca de 210 a 420 mil, em IAC-Tybatã (R), e de cerca de 190 a 330 mil, em Branquinho (S). Já para as sequências *paired-end*, a variação no número total foi de cerca de 20 a 26 milhões, em IAC-Tybatã (R), e de 18 a 23, em Branquinho (S). No geral, houve um maior número de *reads* de IAC-Tybatã (R) alinhadas ao genoma de referência (Tabela 5).

Tabela 5. Número total de *reads paired-end* e sequências únicas alinhadas ao genoma de referência de *P. vulgaris* e rendimento das *reads* alinhadas. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI; R1, 2 e 3, repetição.

Amostra	Paired-end ¹	Sequências únicas ¹	Reads alinhadas ²
PVRIT1R1	24,82	0,28	91,41
PVRIT1R2	20,19	0,30	90,46
PVRIT1R3	21,18	0,33	91,03
PVRIT2R1	21,58	0,32	92,25
PVRIT2R2	24,59	0,30	92,56
PVRIT2R3	23,39	0,42	90,22
PVRCT1R1	25,20	0,38	91,95
PVRCT1R2	26,36	0,29	93,84
PVRCT1R3	20,59	0,25	93,33
PVRCT2R1	21,51	0,28	93,08
PVRCT2R2	23,80	0,21	94,12
PVRCT2R3	23,04	0,38	90,95
PVSIT1R1	23,95	0,22	93,79
PVSIT1R2	23,16	0,27	91,45
PVSIT1R3	18,78	0,25	90,32
PVSIT2R1	22,13	0,19	93,78
PVSIT2R2	19,64	0,20	92,88
PVSIT2R3	20,03	0,28	90,35
PVSCT1R1	20,29	0,33	92,51
PVSCT1R2	20,93	0,26	93,18
PVSCT1R3	22,02	0,33	92,89
PVSCT2R1	19,64	0,30	91,72
PVSCT2R2	23,23	0,20	94,51
PVSCT2R3	20,63	0,25	86,57
	530,68	6,82	

¹Número em milhões de reads; ²Porcentagem do total das *reads* alinhadas (*paired-end* e únicas) em relação ao número de *reads* de entrada.

4.4.3. Detecção de genes diferencialmente expressos

Um total de 34.226 isoformas foram identificadas usando o pacote DESeq2, do ambiente R, entre as amostras comparadas ($\log_2 FC \geq 1,0$ e $\leq -1,0$; $p\text{-valor} \leq 0,05$). Considerando a totalidade dos tratamentos inoculados comparativamente aos controles, foram encontrados 6.994 genes diferencialmente expressos (GDEs), dentre os quais, 94 genes apresentaram expressão diferencial em todas as comparações.

Em IAC-Tybatã (R), foram observados 4.862 GDEs considerando ambos os períodos, dos quais, 3.621 e 713 se mostraram expressos exclusivamente aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente, enquanto outros 528 se mostraram diferencialmente expressos nos 2 períodos. Aos 4 DAI e 10 DAI, 63% e 77% dos GDEs se apresentaram com superexpressão no tratamento inoculado comparativamente ao controle, respectivamente. A variação nos valores de expressão em $\log_2 FC$ foi de -28 a 22 , no 1º período, e de -24 a 39 , no 2º período.

Em Branquinho (S), foram observados 4.835 GDEs considerando em ambos os períodos, com 4.106 e 452 se mostrando expressos exclusivamente aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente, com 277 GDEs em comum nos 2 períodos. Cerca de 43% e 35% dos genes se apresentaram superexpressos no tratamento inoculado em

comparação ao controle, aos 4 e 10 DAI, respectivamente. A variação nos valores de expressão foi de -30 a 49, no 1º período, e de -48 a 36, no 2º período.

Um maior número de genes diferencialmente expressos foi detectado aos 4 DAI para ambos os genótipos. Entretanto, comparativamente, IAC-Tybatã (R) apresentou um maior número de GDEs superexpressos em ambos os períodos, enquanto Branquinho (S) apresentou maior número de genes reprimidos (Figura 13).

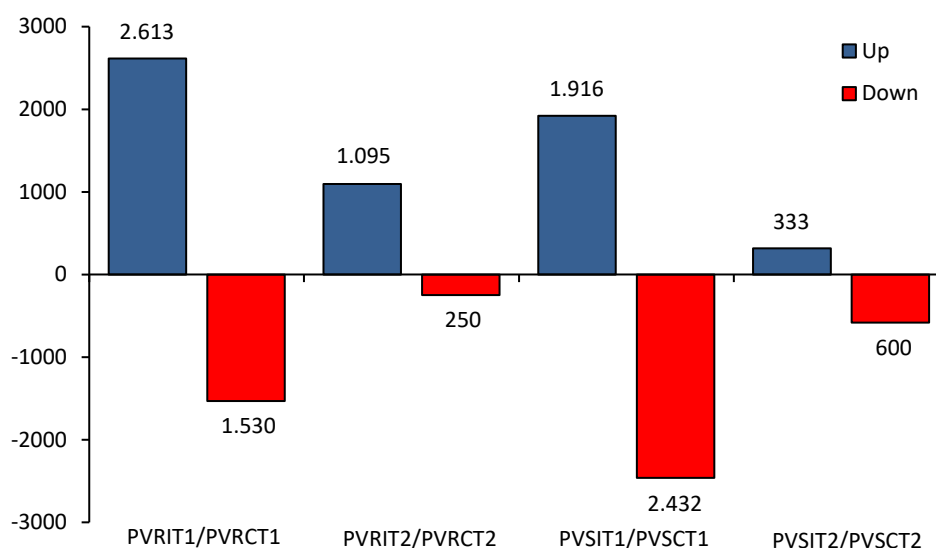


Figura 13. Número de genes diferencialmente expressos nos diferentes estádios de infecção com *M. incognita* em IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S) em comparação com os respectivos controles. Up indica genes superexpressos e Down indica genes reprimidos. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.

Pela construção do diagrama de Venn, foi possível identificar genes com expressão diferencial em comum entre os tratamentos: 94 genes se apresentaram diferencialmente expressos nas quatro comparações, 421 genes se apresentaram diferencialmente expressos em ao menos três comparações e 1.061 genes em duas comparações. O maior número de GDEs em comum entre três tratamentos foi de 237, nas comparações entre IAC-Tybatã (R) aos 4 DAI, IAC-Tybatã (R) aos 10 DAI e Branquinho (S) aos 10 DAI.

O maior número de GDEs em comum aos dois tratamentos foi de 2.293 genes ao se comparar IAC-Tybatã (R) com Branquinho (S) aos 4 DAI. Considerando os genes exclusivamente expressos em cada comparação de um tratamento inoculado com o controle, aos 4 DAI, Branquinho (S) apresentou o maior número de GDEs, ou seja, 1.175 genes, seguido por IAC-Tybatã (R), com 1.065 genes. Aos 10 DAI, de IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S) foram detectados 379 e 452 GDEs específicos, respectivamente (Figura 14).

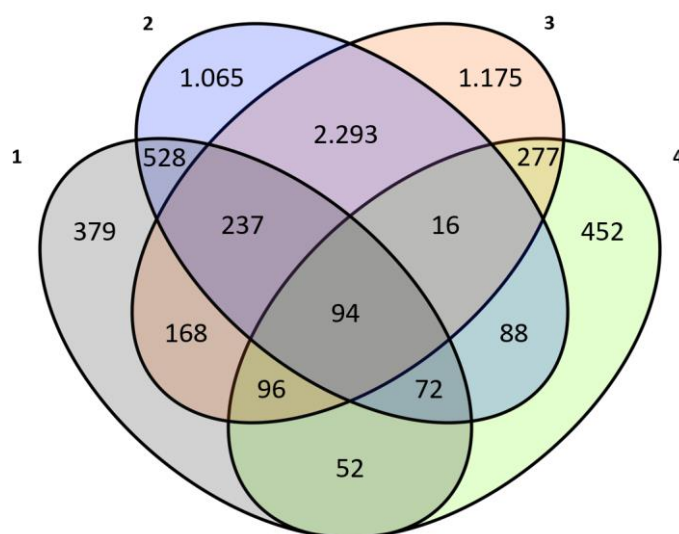


Figura 14. Diagrama de Venn mostrando a intersecção entre o conjunto de dados e o número de genes diferencialmente expressos amostrados em IAC-Tybatã (R) e em Branquinho (S). A elipse 1 corresponde ao IAC-Tybatã aos 4 DAI; 2, IAC-Tybatã aos 10 DAI; 3, Branquinho aos 4 DAI e 4, Branquinho aos 10 DAI.

A respeito dos valores de expressão, em \log_2 FC, resultados variando entre 1 e 2 foram encontrados para a maioria dos genes de IAC-Tybatã (R) em ambos os períodos, sendo 31,9% dos genes do total aos 4 DAI e 43,5% dos genes aos 10 DAI. Valores entre -2 e -1 foram encontrados para a maioria dos genes de Branquinho (S), em ambos os períodos, com 38% do total de genes expressos aos 4 DAI e 35,6% aos 10 DAI.

Em todas as comparações, a maior concentração de GDEs foi observada entre os menores intervalos de \log_2 FC, de -3 a -2 , -2 a -1 , 1 a 2 e de 2 a 3. A comparação entre PVRIT1/PVRCT1 se destacou para a maior quantidade de genes com expressão entre 3 a 5 (12,1%) e 10 a 20 (0,4%) em relação ao total, enquanto a comparação PVRIT2/PVRCT2 se destacou para os genes com expressão superior a 20 (2,1%), reafirmando a maior quantidade de genes superexpressos no genótipo moderadamente resistente. Interessantemente, Branquinho (S) se destacou na expressão de genes reprimidos nos valores extremos de <-20 (1,6%), -10 a -5 (7,0%) e -5 a -3 (8,1%), na comparação PVSIT2/PVSCT2 (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das expressões nas comparações entre os tratamentos inoculados e controles. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.

Log2 Fold Change	PVRIT1/PVRCT1	PVRIT2/PVRCT2	PVSIT1/PVSCT1	PVSIT2/PVSCT2
<-20	8 (0,19%)	5 (0,45%)	13 (0,29%)	15 (1,66%)
-20 a -10	2 (0,04%)	1 (0,09%)	3 (0,06%)	3 (0,33%)
-10 a -5	33 (0,79%)	31 (2,83%)	67 (1,52%)	63 (7,00%)
-5 a -3	52 (1,25%)	25 (2,28%)	177 (4,04%)	73 (8,12%)
-3 a -2	277 (6,68%)	35 (3,19%)	534 (12,19%)	109 (12,12%)
-2 a -1	1.156 (27,88%)	154 (14,06%)	1.666 (38,03%)	320 (35,59%)
1 a 2	1.326 (31,99%)	478 (43,75%)	944 (21,55%)	169 (18,79%)
2 a 3	585 (14,11%)	149 (13,60%)	536 (12,23%)	44 (4,89%)
3 a 5	504 (12,15%)	107 (9,77%)	323 (7,37%)	48 (5,33%)
5 a 10	176 (4,24%)	83 (7,57%)	101 (2,30%)	44 (4,89%)
10 a 20	17 (0,41%)	3 (0,27%)	4 (0,09%)	1 (0,11%)
>20	9 (0,21%)	24 (2,19%)	12 (0,27%)	10 (1,11%)

Em parênteses, porcentagem dos genes em cada intervalo em relação ao total.

4.4.4. Anotação funcional

Foi identificado um total de 34.226 isoformas de transcritos (92%), sendo que 31.091 transcritos tiveram as suas funções anotadas. Em relação aos GDEs, foi feita a anotação funcional de um total de 6.938 (99%). A lista completa dos GDEs e respectivos valores de expressão e anotação funcional está disponível sob consulta ao autor, os genes de destaque foram aqui mencionados. Ademais, a anotação funcional também foi obtida considerando termos de ontologia gênica (GO) na plataforma Blast2GO e pela ortologia KEGG (KO).

4.4.4.1. Plataforma Blast2GO

A anotação de termos GO foi feita para os GDEs. Do total, 6.790 genes (97%) foram identificados por BLASTx e 3.781 genes (55%) foram anotados. Para alguns genes foi atribuído mais de um termo GO, em mais de uma categoria funcional, resultando em 6.722 termos GO relacionados às sequências anotadas. Na categoria funcional de nível 2, 2.568 termos GO pertencem a “processos biológicos”; 766 pertencem à “componente celular” e 3.388 à “função molecular”. As funções às quais o maior número de genes foram atribuídos são: processos metabólicos e celulares, dentro de “processo biológico”, à atividade catalítica e ligação, dentro de “função molecular” e à membrana, dentro de “componente celular”, para ambos os genótipos (Figura 15 A e B).

Em IAC-Tybatã (R), aos 4 DAI e 10 DAI, respectivamente, 742 e 136 termos GO foram atribuídos a genes com expressão reprimida e 1.559 e 472 termos GO foram atribuídos a genes com superexpressão. Já em Branquinho (S), aos 4 DAI e 10 DAI, respectivamente, 1.239 e 281 termos GO foram atribuídos a genes com expressão reprimida e 1.153 e 169 a genes com superexpressão. Ademais, ainda em “processos biológicos”, podem ser destacadas as funções de sinalização, onde o maior número de genes superexpressos foi atribuído à transdução de sinais. Quanto à resposta a estímulos, o maior número de genes superexpressos foi atribuído à resposta a estresse e resposta a estímulo biótico, em IAC-Tybatã (R), e à resposta a estresse e resposta celular a estímulo, em Branquinho (S). Em “função molecular”, na função atividade antioxidante, foi observada superexpressão de 29 peroxidases, em IAC-Tybatã (R), e superexpressão e repressão de 31 e 25 peroxidases, respectivamente, em Branquinho (S).

Comparativamente ao genótipo moderadamente resistente, em todas as funções, a diferença entre o número de termos GO em genes reprimidos e superexpressos foi menor em Branquinho (S). Importante, neste genótipo, em todas as funções de “componente celular”, nas funções de atividade de transportador e regulador de função molecular, dentro de “função molecular”, e nas funções de organização de componente celular e localização, dentro de “processos biológicos”, o número de genes reprimidos foi superior ao de genes superexpressos. Ainda em Branquinho, às funções adicionais de complexo supramolecular e região extracelular (“componente celular”) foram atribuídos apenas genes reprimidos.

Igualmente relevante, em IAC-Tybatã (R), todas as funções apresentaram maior número de genes superexpressos comparativamente ao de genes reprimidos.

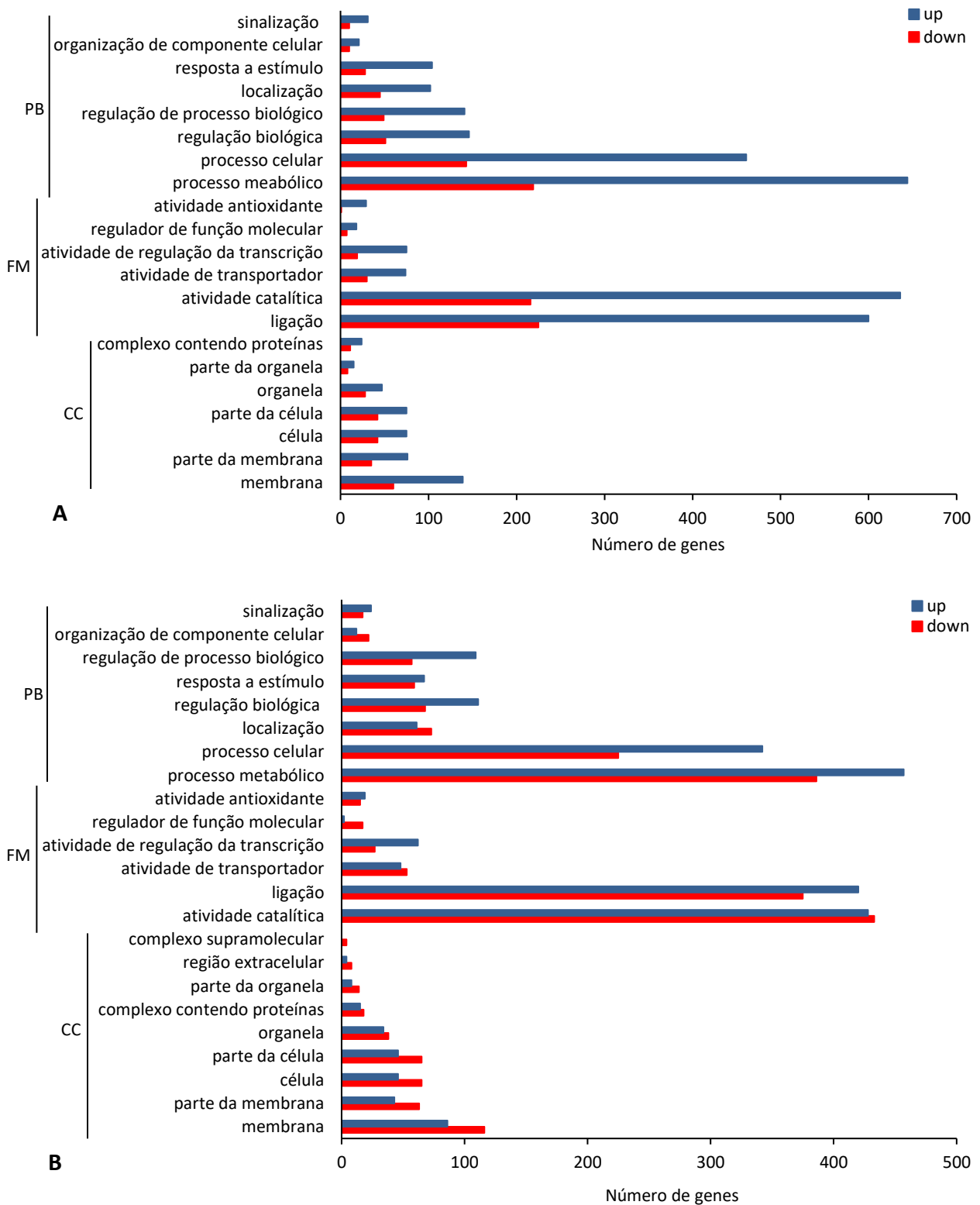


Figura 15. Número de genes diferencialmente expressos e anotação funcional levando em conta os termos GO (Ontologia Gênica) em resposta à infecção por *M. incognita* em IAC-Tybatã (R) (A) e Branquinho (S) (B). Genes superexpressos (*up*, em azul) e reprimidos (*down*, em vermelho). As linhas verticais indicam as funções de acordo com a categoria funcional, PB, Processo Biológico; FM, Função Molecular e CC, Componente Celular.

4.4.4.2. Enriquecimento funcional de vias metabólicas por KEGG

Com base na anotação funcional no banco de dados KEGG, os GDEs enriquecidos foram analisados para identificar as vias metabólicas nas quais atuam ($p < 0,05$).

Aos 4 DAI, foram anotados 44% dentre os 1.823 GDEs do genótipo IAC-Tybatã (R). Dentre as principais categoriais funcionais enriquecidas estão a família de proteínas envolvida no processamento de informação genética, a família de proteínas envolvida em processos celulares e sinalização, na qual se destacaram vias de crescimento e morte celular (26 genes anotados), a biossíntese de metabólitos secundários (108 genes anotados), e o processamento de informação ambiental, onde se destacaram vias de transdução de sinais, como vias de sinalização de MAP quinases (19 genes anotados) e vias hormonais (18 genes anotados) (Figura 16A).

Já aos 10 DAI, foram anotados 36,4% dentre os 427 GDEs de IAC-Tybatã (R). A principal categoria funcional anotada permaneceu sendo a de famílias de proteínas envolvidas no processamento de informação genética. Ademais, foi observado enriquecimento das categorias metabolismo de carboidratos e das famílias de proteínas envolvidas em processos celulares e sinalização. Foram anotados 18 genes envolvidos no crescimento e morte celular (Figura 16B). No processamento de informação ambiental, foram anotados 13 genes envolvidos em sinalização por MAP quinases, 3 envolvidos em sinalização de cálcio e 8 em transdução de sinais por hormônios. Além disso, foram anotados 81 genes na categoria de biossíntese de metabólitos secundários.

Aos 4 DAI, foram anotados 34,2% dentre os 1456 GDEs do genótipo Branquinho (S). As principais categorias funcionais anotadas foram a do metabolismo de carboidratos, das famílias de proteínas associadas ao processamento da informação genética e das famílias de proteínas associadas ao metabolismo (Figura 16C). Foram anotados genes envolvidos em crescimento e morte celular (10 genes), de biossíntese de metabólitos secundários (77 genes), de vias de sinalização por MAP quinases (13 genes) e de vias hormonais (15 genes).

Aos 10 DAI, foram anotados 35,6% dentre os 303 GDEs do genótipo Branquinho (S). As principais categorias enriquecidas foram a de família de proteínas associadas à informação genética, do processamento de informação genética e do metabolismo de carboidratos (Figura 16D). Foram anotados 5 genes associados a crescimento e morte celular, 9 genes de cascatas de MAP quinases e 10 genes de vias hormonais. Ademais, esta foi a única comparação onde o metabolismo de lipídios não esteve entre as 11 categorias principais enriquecidas, estando no lugar a categoria de metabolismo de energia. Dentre as comparações, esta foi aquela em que a categoria de biossíntese de metabólitos secundários se mostrou com menor número de GDEs anotados (54).

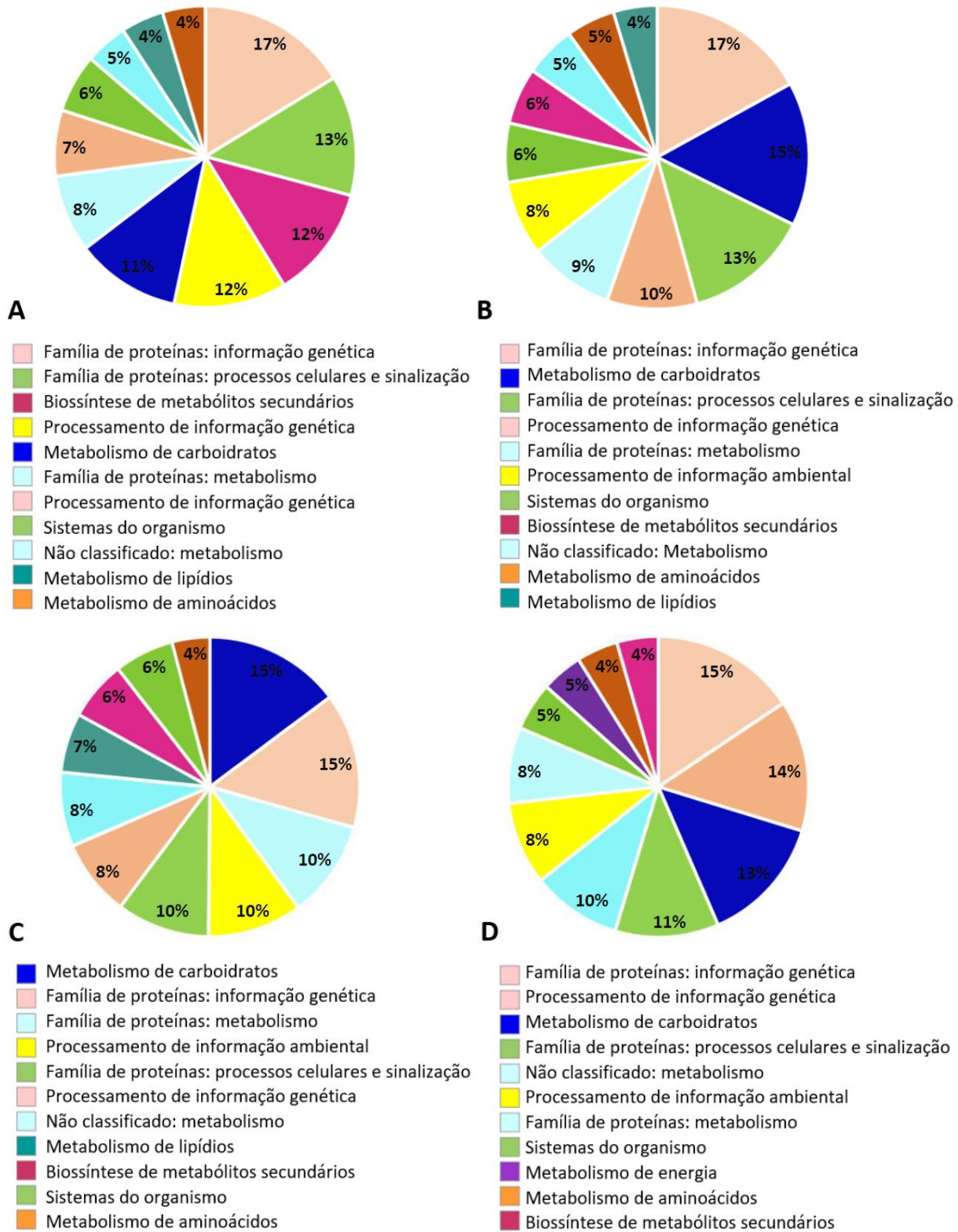


Figura 16. Distribuição de categorias funcionais do KEGG para os genes diferencialmente expressos nas comparações entre PVRIT1/PVRCT1 (A); PVRIT2/PVRCT2 (B); PVSIT1/PVSCT1 (C) e PVSIT2/PVSCT2 (D). Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.

4.4.4.3. Genes diferencialmente expressos (GDEs) em todas as condições

Dentre os 94 GDEs em todas as comparações (tratamentos versus controles), foi possível fazer a anotação funcional de 80 deles. Para ambos os genótipos, a maioria dos genes apresentou repressão aos 4 DAI e superexpressão aos 10 DAI, entretanto, houve diferença entre os genótipos na intensidade de expressão (Figura 17).

Proteínas *heat shock* ou chaperonas foram as mais predominantes. Dentre os genes que as codificam, oito foram expressos em todas as comparações, aos 10 DAI, cinco superexpressos e um reprimido, em ambos os genótipos, e dois superexpressos apenas em IAC-Tybatã (R). Genes de proteínas quinases também apresentaram expressão diferencial em todas as comparações, duas com expressão superior aos 4 DAI em IAC-Tybatã (R) comparativamente a Branquinho (S), mas reprimidas aos 10 DAI, em ambos os genótipos.

O gene de uma *NSP-interacting kinase 1* (NSP1) quinase mostrou superexpressão aos 10 DAI, em ambos os genótipos, e outro de *Receptor-Like Kinase* (RLK) mostrou superexpressão aos 4 DAI apenas em IAC-Tybatã (R). Além disso, os genes de uma MAP quinase (MAPK) e uma MAP quinase quinase quinase (MAPKKK) apresentaram-se diferencialmente expressos em todas as condições. Em relação às vias hormonais, o gene de uma ACC sintase, enzima envolvida na rota do etileno, mostrou repressão apenas aos 4 DAI em IAC-Tybatã (R), e o de uma giberelina oxidase mostrou superexpressão aos 10 DAI, em ambos os genótipos. Ademais, o gene de uma proteína quitinase apresentou alta superexpressão em IAC-Tybatã (R) aos 4 DAI.

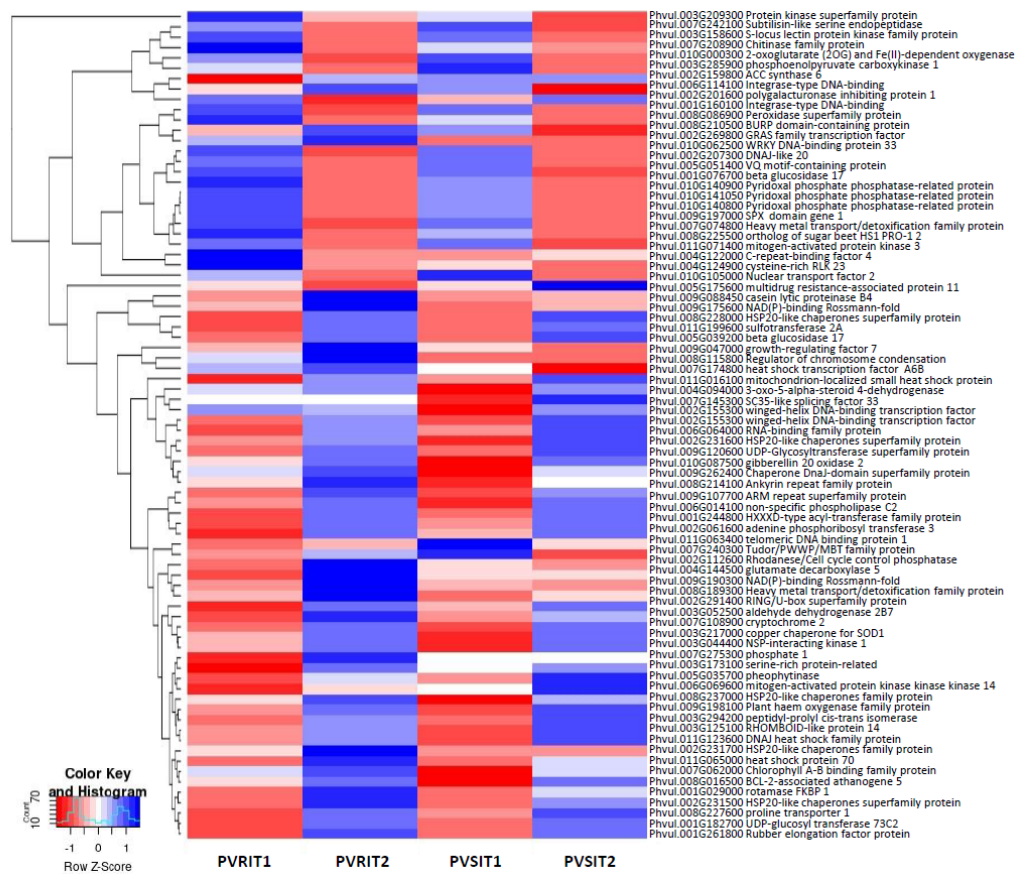


Figura 17. *Heatmap* dos genes de feijoeiro-comum com expressão diferencial ($\log_2 FC \geq 1,0$ e $\leq -1,0$ e $FDR \leq 0,05$) em ambos os períodos e genótipos. Foi feita a clusterização dos valores de $\log_2 FC$, gerando o dendrograma mostrado à esquerda. As cores indicam mudança no nível de expressão, azul indica aumento e vermelho indica diminuição. Na direita, estão os IDs dos genes de acordo com suas categoriais funcionais. Nas siglas: R, resistente; S, susceptível; I, inoculado; C, controle; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.

4.4.4.4. GDEs em IAC-Tybatã

Dentre os 4.862 GDEs de IAC-Tybatã (R) (tratamentos versus controles), foi possível realizar a anotação funcional de 4.435 (91%) deles. A maioria dos genes se mostrou superexpresso, em ambos os períodos.

Dentre os 528 GDEs nos dois períodos, foi possível realizar a anotação funcional de 496 (94%), destacando-se os genes com função de: proteínas putativamente associadas a resistência a doenças com domínios LRR, TIR ou NB-ARC e proteínas quinases (Figura 18B); peroxidases e fatores de transcrição WRKY (Figura 18C), havendo superexpressão, além de proteínas *heat shock* ou chaperonas, havendo repressão. Ademais, genes de proteínas com domínios ANK (*Ankyrin*) também se destacaram. Importante, dentre os citados, pode ser destacar um gene que codifica uma proteína quinase com domínio LRR (Phvul.008G245600) com valores elevados de expressão, com \log_2 FC de 18 e 46, aos 4 DAI e 10 DAI, respectivamente.

Ademais, 16 genes relacionados a vias hormonais se mostraram DEs nos dois períodos, sendo cinco envolvidos na via do etileno e três associados à rota do ácido jasmônico. São eles: uma ACC sintase, um fator de resposta a etileno 1, uma enzima formadora de etileno, um fator de ligação responsivo a etileno e uma proteína PR4 (*pathogenesis-related*), assinatura da via do etileno/ácido jasmônico, duas lipoxigenases associadas a transmissão de sinal e uma proteína com domínio ZIM, repressora da via do jasmonato.

Dos genes da via do etileno/ácido jasmônico, apenas um que codifica uma lipoxigenase e outro um fator de ligação responsivo ao etileno se mostraram reprimidos, aos 4 DAI e aos 10 DAI, respectivamente.

Quanto à via do ácido salicílico, houve superexpressão do transcrito de uma fenilalanina amônia-liase, associada a biossíntese, em ambos os períodos, e de uma proteína PR1 (*Pathogenesis-Related*), assinatura da via de resposta do ácido salicílico, cujo transcrito mostrou superexpressão aos 10 DAI.

Quanto à giberelina, houve expressão diferencial dos transcritos de duas giberelinas oxidases, de uma família de proteína regulada por giberelina e de um gene PYR1, da via de biossíntese hormonal (Figura 18A).

GDEs associados a cálcio também foram anotados, dentre eles, calmodulinas, proteínas de ligação a cálcio e uma proteína quinase dependente de cálcio (CDPK). Transcritos de quitinases, de receptores como quinases (RLKs) e de fatores de transcrição myb se mostraram superexpressos.

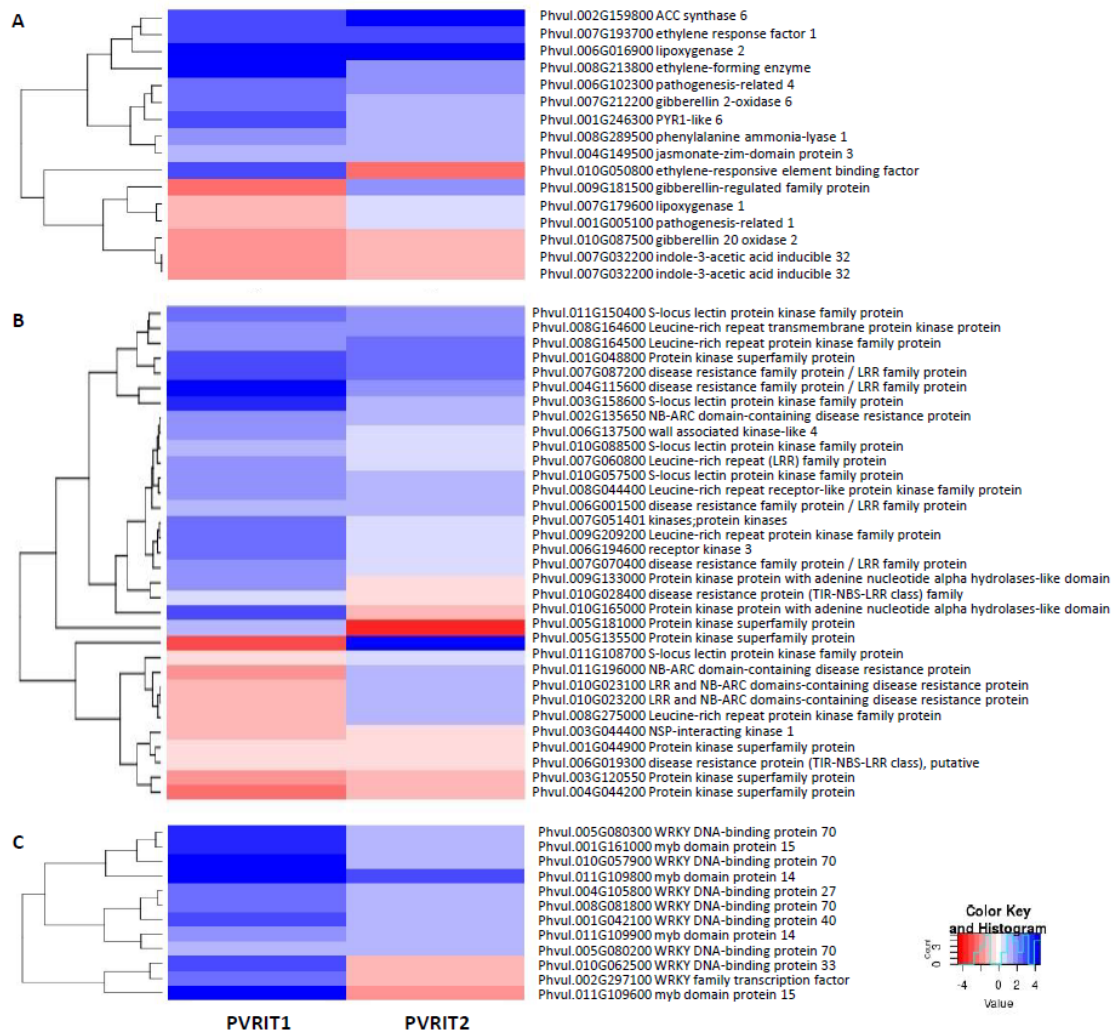


Figura 18. *Heatmap* dos genes de feijoeiro-comum com expressão diferencial (\log_2 FC $\geq 1,0$ e $\leq -1,0$ e FDR $\leq 0,05$) em ambos os períodos no genótipo IAC-Tybatã (R), de acordo com sua atuação em vias hormonais (A); como proteínas quinases ou com domínios LRR, TIR ou NB-ARC (B) e fatores de transcrição WRKY ou myb (C). Foi feita a clusterização dos valores de \log_2 fold change, gerando o dendrograma mostrado à esquerda. As cores indicam mudança no nível de expressão, azul indica aumento e vermelho indica diminuição. À direita, estão os IDs dos genes de acordo com suas categoriais funcionais. Nas siglas: R, resistente; I, inoculado; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.

As anotações funcionais com maior abundância de GDEs associados são apresentadas nas tabelas 7 (4 DAI) e 8 (10 DAI).

Aos 4 DAI, 72% dos GDEs relacionados a oito anotações mais relevantes se mostraram superexpressos. Ademais, funções de proteínas com domínios ANK, proteínas *heat shock*, proteínas com repetições ARM também apresentaram elevado número de GDEs. O transcrito codificador de uma proteína com domínio NB-ARC (Phvul.004G009521) se mostrou altamente superexpresso (valor de \log_2 FC 20). Dois genes com repetições tetratricopeptídicas também apresentaram expressão elevada (valores \log_2 FC de 18 (Phvul.009G175100) e 22 (Phvul.008G285500)).

Em relação àqueles envolvidos em vias hormonais, destacam-se os genes: das rotas de biossíntese e de transmissão de sinal de ácido salicílico, das rotas de etileno e ácido jasmônico, com expressão diferencial de transcritos de proteínas PR1, PR3 e PR4 (*Pathogenesis-Related*), do fator de transcrição MYC2, de auxina, com

expressão diferencial de transcritos de proteínas responsivas à auxina tipo SAUR e GH3, de giberelina e de brassinoesteróides (Tabela 7).

Tabela 7. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Tybatã (R) aos 4 DAI.

Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
Domínios LRR, TIR ou NB-ARC	176	130	46
Proteínas quinases	118	93	25
Citocromos p450 e b561	57	28	29
Fator de transcrição myb	47	32	15
Fator de transcrição WRKY	30	29	1
RLKs	44	38	6
Proteínas RING/U-box	37	15	22
Proteínas com repetições pentatricopeptídicas	35	30	5
GDEs envolvidos em vias hormonais			
Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
ACC sintase	4	3	1
Enzima formadora de etileno	6	6	0
Fator de resposta a etileno	6	6	0
Fator responsivo a etileno	7	7	0
Proteína insensível a etileno	4	4	0
PR3	1	0	1
PR4	1	1	0
PR1	6	4	2
Lipoxigenase	4	3	1
Metiltransferases de ácido jasmônico	2	2	0
Aleno ciclase	3	3	0
Aleno oxidase	2	2	0
Domínio ZIM	6	5	0
Fator de transcrição MYC2	1	1	0
Isocorismato sintase	1	0	1
Fenilalanina amônia-liase	3	2	1
Supressor da atividade da NPR1	3	2	1
Fator de transcrição bZIP	5	1	4
Regulador transcricional AUX/IAA	2	2	0
Proteína de efluxo de auxina	4	3	1
Fator de resposta a auxina	1	0	1
Proteína responsiva a auxina (GH3)	7	4	3
Proteína responsiva a auxina SAUR	8	5	3
Giberelina oxidase	3	3	0
PYR-1	3	2	1
Regulador de brassinoesteróides (BZR1)	2	1	1

Outros genes que podem ser destacados são codificadores de duas proteínas de autofagia, uma com elevada superexpressão (Phvul.003G295800) (valor de \log_2 FC 20). Um gene codificador de uma glutationa S-transferase (Phvul.002G098300) e uma pectina-liase (Phvul.005G022500) também apresentaram expressão elevada (valores de \log_2 FC 22 e 10, respectivamente). Quitinases, proteínas de síntese de calose, glutationas S-transferase, peroxidases, calmodulinas e quinases associadas à parede celular mostraram os respectivos transcritos superexpressos, principalmente, enquanto laccases, proteínas de resposta oxidativa, nodulinas, e tiorredoxinas se destacaram por mostrarem os respectivos transcritos reprimidos. Cascatas de sinalização de MAP quinases e de proteínas associadas a cálcio também apresentaram os respectivos transcritos com expressão diferencial.

Aos 10 DAI, 75% dos GDEs relacionados a oito anotações mais relevantes se mostraram superexpressos, sendo que houve redução no número de GDEs nesta fase da interação. Genes codificadoras de duas proteínas putativas de resistência a doenças com domínios TIR-NBS-LRR (Phvul.010G029700) e NB-ARC

(Phvul.004G012801) apresentaram expressão elevada, (valores de \log_2 FC de 21 e 23, respectivamente), além de duas proteínas de 2-oxoglutarato (Phvul.004G049500, Phvul.004G049600), ambas com valor de \log_2 FC de 23.

Em relação aos genes envolvidos em vias hormonais, houve expressão diferencial daqueles envolvidos nas rotas do ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico, especialmente, a superexpressão de um transcrito de uma PR1 e de um transcrito de uma PR4, além da superexpressão de proteínas SAUR, na rota da auxina. Transcritos das rotas de giberelina e brassinoesteróides também mostraram expressão diferencial.

Tabela 8. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Tybatã (R) aos 10 DAI.

Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
Domínios LRR, TIR ou NB-ARC	43	42	1
Citocromos p450 e b561	12	3	9
Proteína 2-oxoglutarato	10	7	3
Domínio ANK	7	7	0
Proteína quinase	7	5	2
Proteína UDP-glicosiltransferases	7	3	4
Domínio NADP com dobra de Rossmann	6	1	5
Proteína Bhlh (<i>basic helix-loop-helix</i>)	5	5	0
GDEs envolvidos em vias hormonais			
Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
ACC sintase	2	1	1
Enzima formadora de etileno	1	1	0
S-adenosilmetionina	2	2	0
PR4	1	1	0
PR1	1	1	0
Lipoxigenase	3	3	0
Aleno oxidase	1	1	0
Supressor da atividade da NPR1	1	1	0
Ácido indolacético	2	2	0
Proteína responsiva a auxina SAUR	3	2	1
Giberelina oxidase	2	2	0
Proteína regulada por giberelina	2	2	0
Proteína responsiva a brassinoesteróides	1	1	0

Outros genes que podem ser destacados como superexpressos são: um gene de morte celular acelerada (ACD2) (Phvul.008G280200), com valor de \log_2 FC 7, genes de quitinases, nodulinas, pectina-liases, PPRs, TPRs, peroxidases, glutionas S-transferases e laccases, genes associados a cálcio, dentre eles, quinases dependentes de cálcio (*Calcium Dependent Protein Kinases*, ou CDPKs), uma proteína de ligação a cálcio e calmodulinas, sendo que uma calmodulina (Phvul.007G263950) apresentou valor de \log_2 FC 23.

Em resumo, houve maior quantidade de GDEs em ambos os períodos e, exclusivamente, aos 4 e 10 DAI, relativamente àqueles análogos aos de resistência, com domínios LRR, TIR ou NB-ARC, com destaque para a sua expressão elevada. Proteínas quinases também apresentaram alta atividade, com superexpressão da maior parte dos genes codificadores. Houve elevado número de GDEs das vias hormonais aos 4 DAI (116 genes), com queda aos 10 DAI (36 genes), embora ainda ativadas, culminando na superexpressão de proteínas PR4 e PR1. Transcritos de proteínas associadas a cálcio, peroxidases, RLKs e fatores de transcrição WRKY e myb mostraram-se superexpressos nos dois períodos de análise.

4.4.4.5. GDEs em Branquinho

Dentre os 4.865 GDEs de Branquinho (S), (tratamentos versus controles) foi possível realizar a anotação funcional de 4.276 (87%) deles. A maioria dos genes se mostrou reprimido, em ambos os períodos.

Dentre os 277 GDEs nos dois períodos, foi possível realizar a anotação funcional de 233 (84%). Dentre estes, destacam-se genes com expressão reprimida, com funções de: proteínas *heat shock*; de citocromo p450, de UDP-glicosiltransferases, de proteínas de detoxificação; de proteínas com domínios de ligação NADP com dobra de Rossmann e de proteínas fosfatases piridoxal, além de peroxidases, cujos transcritos mostraram superexpressão.

Quanto às vias hormonais, apenas seis genes relacionados se mostraram DEs nos dois períodos, que codificam: duas enzimas formadoras de etileno, um fator de resposta a etileno ERF1, duas giberelinas oxidases e uma lipoxigenase.

Uma glutathione S-transferase (Phvul.002G098300) merece destaque já que o transcrito mostrou altos valores de expressão, aos 4 e 10 DAI, com valores de \log_2 FC de -21 e -38, respectivamente. GDEs associados a cálcio foram anotados, dentre eles, duas proteínas de ligação a cálcio e duas calmodulinas. Transcritos de quitinases, de proteínas com domínios LRR e NB-ARC, de proteínas quinases, de uma MAPK e uma MAPKKK e de fatores de transcrição WRKY e myb se mostraram diferencialmente expressos (Figura 19).

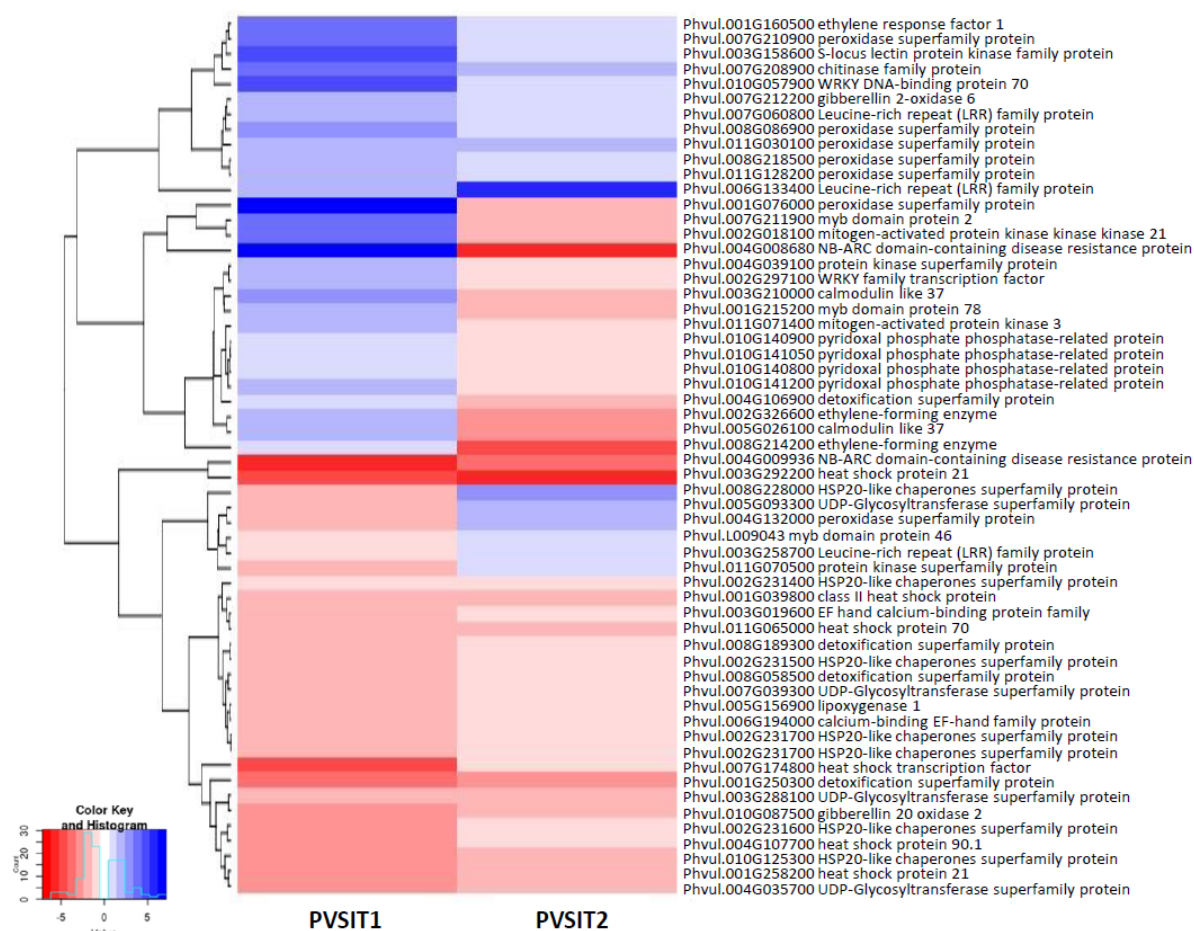


Figura 19. Heatmap dos genes de feijoeiro-comum com expressão diferencial (\log_2 FC $\geq 1,0$ e $\leq -1,0$ e FDR $\leq 0,05$) em ambos os períodos no genótipo Branquinho (S). Foi feita a clusterização dos valores de \log_2 FC, gerando o dendrograma mostrado à esquerda. As cores indicam mudança no nível de expressão, azul indica aumento e vermelho indica diminuição. À direita, estão os IDs dos genes de acordo com suas categoriais funcionais. Nas siglas: S, suscetível; I, inoculado; T1, 4 DAI; T2, 10 DAI.

As anotações funcionais com maior abundância de GDEs associados são apresentadas nas tabelas 9 (4 DAI) e 10 (10 DAI).

Aos 4 DAI, 57% dos GDEs relacionados às oito anotações mais relevantes se mostraram superexpressos. Dentre estes, os transcritos codificadores de uma TPR (Phvul.009G175100), de uma proteína quinase (Phvul.004G043800) e de uma TIR-NBS-LRR (Phvul.002G323712) mostraram valores de \log_2 FC iguais a -32, 18 e 20, respectivamente.

Em relação às vias hormonais, genes das rotas de biossíntese e de transmissão de sinal de ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico mostraram-se DEs e codificam PR1, PR3 e PR4 (*Pathogenesis-related*), com destaque para a via da auxina, quais sejam, transcritos de proteínas responsivas à auxina tipo SAUR e GH3, da giberelina, os brassinoesteróides e do ácido abscísico (Tabela 9). Um transcrito de uma proteína com domínio ZIM (Phvul.009G221800) apresentou alta expressão (\log_2 FC 21).

Tabela 9. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Branquinho (S) aos 4 DAI.

Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
Domínios LRR, TIR ou NB-ARC	182	106	76
Proteínas quinases	114	96	18
Citocromos p450 e b561	63	20	43
Proteína <i>heat shock</i>	51	6	55
Fator de transcrição myb	44	23	21
Fator de transcrição WRKY	41	36	5
RLKs	45	39	6
Proteínas RING/U-box	40	9	31
UDP-glicosiltransferases	40	20	20
GDEs envolvidos em vias hormonais			
Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
ACC sintase	1	1	0
ACC oxidase	1	0	1
S-adenosilmetionina	2	1	1
Enzima formadora de etileno	5	5	0
Fator de resposta a etileno	4	4	0
Fator responsivo a etileno	5	5	0
Proteína insensível a etileno	4	4	0
PR3	1	0	1
PR4	2	2	0
PR1	9	3	6
Lipoxigenase	8	5	3
Metiltransferases de ácido jasmônico	1	1	0
Aleno ciclase	2	2	0
Aleno oxidase	2	1	1
Domínio ZIM	6	6	0
Fenilalanina amônia-liase	5	3	2
Supressor da atividade da NPR1	3	3	0
Fator de transcrição bZIP	5	3	2
Regulador transcricional AUX/IAA	5	2	3
Proteína de efluxo de auxina	3	2	1
Fator de resposta a auxina	4	1	3
Proteína responsiva a auxina (GH3)	3	3	0
Proteína responsiva a auxina SAUR	11	4	15
Giberelina oxidase	3	3	0
Proteína regulada por giberelina	2	0	2
PYR-1	4	1	3
Proteína responsiva a ácido abscísico	5	0	5
Regulador de brassinoesteróides (BZR1)	1	0	1

Destacam-se ainda os transcritos codificadores de: uma proteína de autofagia (Phvul.003G295800) com valor de \log_2 FC 39, uma proteína com repetição ARM (Phvul.004G026300) e uma proteína com domínio *zinc finger* (Phvul.008G200300), ambas com valor de \log_2 FC -25. Beta-glucosidases, celulose sintases, expansinas, laccases, pectina-liases e tiorredoxinas mostraram transcritos predominantemente reprimidos. Glutathionas S-transferases e oxidases de queima respiratória mostraram os respectivos transcritos superexpressos. Os transcritos relacionados à cascata de sinalização de MAP quinases e sinalização por cálcio se mostraram predominantemente superexpressos.

Aos 10 DAI, 22% dos GDEs relacionados às oito anotações mais relevantes se mostraram superexpressos. Dentre estes, podem ser destacados os transcritos codificadores de duas proteínas TPR (Phvul.002G054600 e Phvul.003G222100), com valores de \log_2 FC 20 e -23, respectivamente, além de uma proteína com domínio NB-ARC (Phvul.004G016000), com valor de \log_2 FC -22.

Em relação às vias hormonais, genes das rotas de biossíntese e de transmissão de sinal etileno e ácido jasmônico mostraram-se DEs; entretanto, aqueles de proteínas PR1, PR3 e PR4 DEs não foram detectados. Relativos à via da auxina, foram observados transcritos de proteínas responsivas à auxina tipo SAUR e GH3 e à giberelina, os brassinoesteróides. Nesta fase da interação, não foram detectados GDEs associados às vias de ácido abscísico e ácido salicílico (Tabela 10).

Tabela 10. Anotação funcional dos GDEs mais abundantes e dos GDEs envolvidos em vias hormonais em Branquinho (S) aos 10 DAI.

Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
Citocromos p450 e b561	11	1	10
Domínios LRR, TIR ou NB-ARC	9	5	4
Proteína <i>heat shock</i>	8	2	6
UDP-glicosiltransferases	8	0	8
Proteína quinase	6	4	2
Domínio NADP com dobra de Rossmann	8	0	8
Proteína Bhlh (<i>basic helix-loop-helix</i>)	6	0	6
Proteína com repetições tetratricopeptídicas	6	2	4
GDEs envolvidos em vias hormonais			
Anotação funcional	Nº de GDEs	Superexpressos	Reprimidos
ACC sintase	5	1	4
Proteína insensível a etileno	1	0	1
Fator responsivo a etileno	1	1	0
Lipoxigenase	3	0	3
Domínio ZIM	1	1	0
YUCCA	1	0	1
Proteína responsiva a auxina SAUR	3	2	1
Proteína responsiva a auxina GH3	1	0	1
Giberelina oxidase	1	0	1

Outros genes que podem ser destacados codificam uma proteína com repetição ARM (Phvul.L001951) e uma beta-glucosidase (Phvul.007G134300) sendo o primeiro fortemente reprimido (\log_2 FC -22) e o outro fortemente expresso (\log_2 FC 23). Proteínas RLK, uma peroxidase e expansinas mostraram transcritos com superexpressão, enquanto proteínas de detoxificação, fatores de transcrição myb, nodulinas, proteínas de estresse oxidativo e tiorredoxinas se mostraram reprimidos. Houve a repressão de genes associados a cálcio e a cascatas de MAP quinases.

Resumidamente, houve maior número de GDEs que codificam proteínas *heat shock*, proteínas de resistência a doenças com domínios LRR, TIR ou NB-ARC e citocromos p450 e b561. Aos 4 DAI, mesmo em Branquinho (S), a resposta de defesa se encontra ativa, com superexpressão de genes codificadores de proteínas com

domínios LRR, TIR ou NB-ARC, proteínas quinases, peroxidases, cascatas de sinalização MAPK. Destacam-se também, genes associados a cálcio, codificadores dos fatores de transcrição WRKY e myb, além daqueles das vias hormonais do etileno/ácido jasmônico, já que houve superexpressão de transcritos de proteínas PR4 e PR1. Entretanto, aos 10 DAI, diminuem os transcritos de proteínas LRR, TIR ou NB-ARC e quinases. Os genes das cascatas de MAPK e genes associados a cálcio mostraram-se reprimidos, além disso, houve repressão na via do etileno/ácido jasmônico.

4.4.4.6. Panorama geral das respostas dos genótipos à *M. incognita*

Um modelo explicativo da resposta dos genótipos de feijoeiro-comum à infecção por *M. incognita* é aqui proposto (Figura 20).

O genótipo moderadamente resistente, IAC-Tybatã, mostrou maior número de genes superexpressos envolvidos em vias hormonais do etileno/ácido jasmônico e do ácido salicílico, por consequência, levando à ativação de fatores de transcrição MYC2 e proteínas PR, atuantes em respostas de defesa a patógenos. Entretanto, o genótipo suscetível, Branquinho, mostrou repressão em genes que codificam proteínas envolvidas em vias de biossíntese e sinalização dos hormônios, levando à ausência de fatores de transcrição MYC2 diferencialmente expressos e à repressão de proteínas PR. A via da auxina culminou em superexpressão de proteínas responsivas à auxina do tipo SAUR, aos 10 DAI, em ambos os genótipos.

A sinalização por cálcio mostrou-se favorecida no genótipo com resistência, com superexpressão de genes codificadores de calmodulinas, no período inicial da interação, e de proteínas quinases dependentes de cálcio e proteínas de ligação a cálcio, em ambos os períodos. Por outro lado, no genótipo suscetível, houve repressão de calmodulinas e proteínas de ligação a cálcio, no período intermediário (10 DAI), e superexpressão de CDPKs apenas no início da interação (4 DAI).

Ademais, alta atividade de receptores como os genes de RLKs, de proteínas quinases e de proteínas com repetições ricas em leucina foi observada em ambos os genótipos no início da interação (4 DAI), com queda na atividade no período intermediário, embora mantida em níveis elevados no genótipo moderadamente resistente. A atividade de cascatas de sinalização de MAP quinases foi favorecida no genótipo com resistência, especialmente no período intermediário da interação, culminando em alta atividade de peroxidases, laccases, glutatona S-transferases e de uma proteína de morte celular acelerada, indicando atividade em respostas de estresse oxidativo. Fatores de transcrição WRKY e myb apresentaram alta expressão no genótipo moderadamente resistente.

No genótipo suscetível, genes envolvidos em cascatas de MAP quinases e em respostas de estresse oxidativo também se apresentaram DEs; entretanto, sua atividade foi desfavorecida pela repressão dos genes em questão, como de laccases, glutatona S-transferases e proteínas de estresse oxidativo, especialmente no período intermediário. Além disso, a maioria dos genes de fatores de transcrição WRKY e myb se mostrou reprimida no período intermediário, comprometendo a defesa da planta.

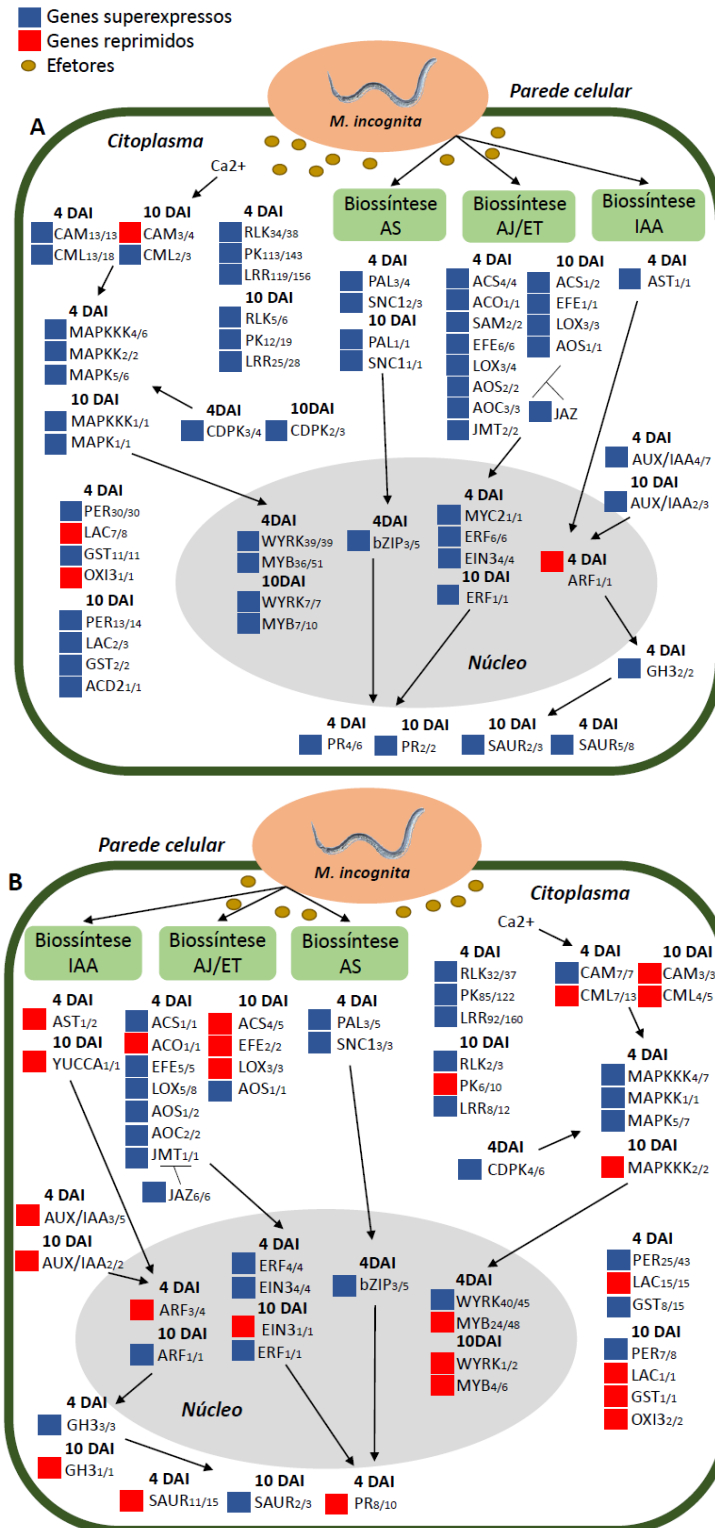


Figura 20. Modelo explicativo da resposta dos genótipos IAC-Tybatã (R) (A) e Branquinho (S) (B) à *M. incognita*. AST, aspartato aminotransferase; YUCCA, indol-3-piruvato monooxygenase; AUX/IAA, GH3 e SAUR, proteínas responsivas a auxina; ARF, fator de resposta a auxina; ACS e ACO, ACC sintase e oxidase; EFE, enzima formadora de etileno; LOX, lipoxigenase; AOS e AOC, aleno sintase e ciclase; JMT, jasmonato metiltransferase; JAZ, domínio ZIM; ERF, fator de resposta a etileno; EIN3, proteína insensível a etileno; PR, *pathogenesis-related*; PAL, fenilalanina amônia-liase, SNC1, supressor da NPR1; bZIP, WRKY e myb, fatores de transcrição; RLK, receptor como quinase; PK, proteína quinase; LRR, repetições ricas em leucina; CAM, calmodulina; CML, proteína de ligação a cálcio; MAPK, MAPKK e MAPKKK, proteínas MAP quinases; CDPK, proteína quinase dependente de cálcio; PER, peroxidase; LAC, laccase; GST, glutatona S-transferase; OXI3, proteína de estresse oxidativo e ACD2, morte celular acelerada. Números subscritos indicam quantidade de GDEs com repressão ou superexpressão/quantidade total de GDEs.

5. DISCUSSÃO

O RNA-Seq é uma ferramenta relevante em estudos de interação planta-patógeno, permitindo compreender, pelo menos em parte, a base molecular da interação no que tange ao perfis transcricionais da planta hospedeira e do patógeno, caso sejam sequenciados ambos os transcritomas.

Neste trabalho, a análise do perfil transcricional de genótipos de *Phaseolus vulgaris* inoculados com *Meloidogyne incognita* permitiu determinar o contraste nas respostas de defesa do hospedeiro em reações compatíveis e incompatíveis e destacar genes relevantes envolvidos no período inicial e intermediário da interação. Até então, o único relato sobre a interação *P. vulgaris* – *M. incognita* havia apresentado os genes envolvidos na suscetibilidade ao patógeno (Santini et al. 2016). O presente estudo é pioneiro em indicar os genes candidatos putativamente envolvidos na resistência.

Uma das primeiras etapas em análises de transcriptoma é determinar períodos chave para o estudo. Para os genótipos IAC-Tybatã (R) e Branquinho (S), a penetração de nematoides foi significativa aos 4 DAI, com formação de galhas aos 10 DAI, entretanto, a ocorrência destes eventos não necessariamente indica que os nematoides são capazes de produzir ovos ou se reproduzir satisfatoriamente.

Uma clara distinção entre os genótipos pôde ser visualizada a partir dos 10 DAI até os 30 DAI. Houve atraso no desenvolvimento do patógeno no interior das raízes de IAC-Tybatã (R), culminando em menor número de fêmeas adultas aos 30 DAI, o que pode estar associado ao menor número de massas de ovos neste genótipo, tal como relatado por Giordani et al. (2021), ao analisar um painel de genótipos de feijoeiro-comum infectados por *M. incognita*.

Esta complexa interação já foi estudada em muitas plantas hospedeiras, havendo espécies onde a resistência está associada à supressão da produção de massas de ovos ou da formação de galhas, como em feijoeiro-comum (Mullin et al. 1991) e em feijão-caupi (Santos et al. 2018). Por outro lado, há espécies onde a resistência está associada ao atraso no desenvolvimento do patógeno, como em pepino (Li et al. 2021; Ling et al. 2017; Wang et al., 2018), com bloqueio em estádios coincidentes à formação de galhas (J₃/J₄), culminando em poucas fêmeas adultas. Os resultados sugerem que a ativação das respostas de defesa leve ao atraso no desenvolvimento do patógeno, afetando a sua reprodução e multiplicação.

Logo, decidiu-se que os períodos chave para o patossistema sob estudo são o período inicial da interação (4 DAI), definido pelo elevado número de J₂ penetrando as raízes, em quantidade superior em Branquinho (S), e o período intermediário (10 DAI), no qual os genótipos claramente se distinguem e é observado o estabelecimento de sítios de alimentação em células do cilindro vascular e o início da formação das galhas, com os nematoides em estádios J₃/J₄. Nossos resultados corroboram os achados de Santini et al. (2016), que igualmente identificaram os períodos de 4 e 10 DAI estudando a resposta da cultivar suscetível de feijoeiro-comum, IPR-Saracura, quando infectada com *M. incognita*.

A extração de RNA de alta qualidade a partir de amostras biológicas radiculares costuma ser um processo difícil quando da condução do ensaio em solo, pois, na etapa de coleta, as raízes passam por lavagens consecutivas, podendo sofrer danos mecânicos, culminando em efeitos do processo de amostragem nos perfis de expressão detectados, tal como relatado por Okamura et al. (2020). Assim, aqui, foi adotado um protocolo na ausência de solo.

A morfologia e a constituição das raízes, dado o alto conteúdo de fibra e metabólitos secundários, dificulta a extração do RNA. No entanto, neste trabalho, foram obtidos bons resultados referentes a todos os parâmetros indicativos de qualidade do RNA. O rendimento foi adequado para o protocolo de construção de

bibliotecas, o qual demanda de 0,1 a 1 µg de RNA total (Illumina 2017). Relativamente à razão de absorvância, resultados foram igualmente satisfatórios, entre 1,8 e 2,0, pois valores inferiores indicam contaminação por proteínas ou fenóis (Morgante et al. 2015). O valor de integridade de RNA indica quão íntegra ou degradada está uma molécula de RNA e varia de 1 (totalmente degradada) a 10 (molécula intacta), sendo que um RIN >7 já é adequado para aplicações de RNA-Seq (Schroder et al. 2006).

Devido à disponibilidade dos genomas de referência, foi possível a separação dos transcritos do hospedeiro e do patógeno por alinhamento. As sequências alinhadas ao genoma de *M. incognita* foram consideradas como contaminantes e foram eliminadas. Pelas análises de mapeamento, notou-se que as bibliotecas de expressão foram constituídas predominantemente por transcritos de *P. vulgaris*, o que era esperado, considerando que a extração do RNA foi feita em regiões variadas do sistema radicular, incluindo aquelas onde os nematoides não estavam presentes.

Um total de 6.994 GDEs foi identificado adotando-se um limiar abrangente comparativamente à literatura (Przybylska et al. 2018) para classificar um gene como DE, no que diz respeito aos critérios de valor de expressão (*fold change*) e significância estatística. Santini et al. (2016), estudando o mesmo patossistema, observaram 120 GDEs aos 4 DAI e 71 GDEs aos 10 DAI, utilizando um critério mais restrito, i.e., $\log_2 FC \geq 2$ e ≤ -2 , e a metade do número de tratamentos utilizados neste estudo (4 tratamentos). Caso o mesmo critério de valor de expressão tivesse sido aqui utilizado, o número de GDEs seria reduzido em ~50%, resultando em 3.471 GDEs para todas as condições, portanto discrepante. É comum em análises de transcriptomas que os GDEs estejam concentrados em valores de expressão menos extremos, i.e., $\log_2 FC$ entre 2 e -2, pois apenas os genes de maior efeito na condição sob estudo irão se mostrar altamente expressos ou reprimidos (Castañeda et al. 2017). Chandrasekar et al. (2022), avaliando dois genótipos (4 tratamentos, no total) contrastantes de batata (*Solanum tuberosum*) aos 14 DAI, obtiveram um total de 3.016 genes GDEs, utilizando outra ferramenta de bioinformática (NOISeq) e um limiar de $\log_2 FC \geq 1$ e ≤ -1 e *p*-valor=0,09. Concluindo, o total de GDEs varia muito de acordo com os limiares adotados de *p*-valor e $\log_2 FC$, critérios e ferramentas de bioinformática, com o patossistema sob estudo, número de tratamentos adotados e momento da interação.

A anotação das sequências segundo os termos do Gene Ontology revelou categorização em diversos processos, demonstrando a complexidade da interação. Uma tendência de repressão de genes putativamente associados à defesa foi observada apenas em Branquinho (S), em particular, os referentes às categorias de sinalização, de atividade de antioxidantes e de transportadores, de resposta a estímulo, de atividade catalítica e de membrana. Houve um maior número de genes anotados em “processos biológicos”, com predomínio de superexpressão em todas as subcategorias apenas em IAC-Tybatã (R). De acordo com o que é relatado na literatura em investigações sobre as interações planta-*M. incognita* (Santos et al. 2018; Li et al. 2021; Chandrasekar et al. 2022; Ling et al. 2017), houve predominância de termos ontológicos atribuídos às categorias “processos celulares” e “processos metabólicos”, o que pode ser, em parte, atribuído a hiperatividade das células metabólicas, que servem como fonte de alimento para o nematoide (Caillaud et al. 2008). As categorias “resposta a estímulo” e “atividade antioxidante” mostraram-se enriquecidas; o ataque pelo patógeno pode ser identificado como um estímulo ao qual a planta reage, desencadeando respostas como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Esta resposta é comum em casos em que a resistência é conferida por genes R, estando associada à atividade de enzimas antioxidantes, como peroxidases (com expressão favorecida em IAC-Tybatã (R), especialmente aos 10 DAI), que atuam sobre os radicais livres e protegem as células contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo (Aggarwal et al. 2011).

A anotação funcional pelo KEGG também permitiu identificar quais vias metabólicas estão enriquecidas. Houve maior número de GDEs na categoria “metabólitos secundários”, com superexpressão em IAC-Tybatã (R), corroborando os achados da literatura (Li et al. 2021; Ling et al. 2017) quanto à biossíntese e atuação de metabólitos secundários em reações incompatíveis, na deposição de calose, no acúmulo de EROs e na ligação a proteínas receptoras (Kantz et al. 2015; Erb e Kliebenstein 2020).

A categoria “sinalização” também se apresentou enriquecida, com padrões de expressão distintos entre os genótipos. Sinalizações por hormônios, em especial etileno/ácido jasmônico e ácido salicílico, e por cascatas de MAP quinases se mostraram favorecidas em IAC-Tybatã (R). Os hormônios citados estão envolvidos em rotas que ativam proteínas relacionadas à patogênese (PR) que, por sua vez, ativam respostas de defesa.

As cascatas de MAP quinases são as mais estudadas em interações planta-patógeno, regulando respostas de defesa à jusante de múltiplos receptores, alterando níveis de fitohormônios como ácido jasmônico, etileno e ácido salicílico, atuando no acúmulo de metabólitos e em resposta de estresse oxidativo (Bigeard e Hirt 2018). Ademais, a categoria funcional de “metabolismo de lipídios” se mostrou enriquecida apenas em IAC-Tybatã (R) nos dois períodos; mudanças no metabolismo de lipídios podem tanto estar envolvidos em facilitar a defesa e adaptação da planta, através de sinalização ou como precursores de hormônios e fitoalexinas, quanto em manipulação pelo patógeno em facilitar a colonização (Beccaccioli et al. 2019).

Ao penetrar os tecidos radiculares, os nematoides provocam danos mecânicos similares aos decorrentes de estresses abióticos. Transcritos de *heat shock proteins* podem se mostrar DEs em resposta a esses danos, sendo a superexpressão favorável ao acúmulo de EROs e à reação de hipersensibilidade. Ademais, estas proteínas podem atuar em receptores de reconhecimento de padrão, como os RLKs, e em genes R, conferindo estabilidade devido ao seu envolvimento no dobramento, montagem, translocação e degradação de proteínas (Park e Seo 2015).

Os GDEs anotados como *heat shock proteins* estiveram entre os mais enriquecidos apenas em Branquinho (S), com 55% dos transcritos mostrando-se reprimidos, indicando prejuízo na defesa da planta. É comum que transcritos destas proteínas se mostrem DEs em resposta a patógenos, com comportamentos discrepantes, de superexpressão em feijoeiro-comum resistente ao nematoide dos cistos (*Heterodora glycines*) (Jain et al. 2016) e de repressão em alfafa resistente ao nematoide das galhas (Postnikova et al. 2015). Santini et al. (2016) destacaram a repressão de um transcrito de *heat shock protein* (Phvul.001g039700) com impacto no acúmulo de EROs em feijoeiro-comum suscetível ao nematoide das galhas, resultado similar ao encontrado em Branquinho (S), aos 10 DAI, indicando possível relevância deste transcrito ao se mostrar DE em dois genótipos suscetíveis de um mesmo patossistema.

Como esperado, um maior número de GDEs codificadores de proteínas putativamente associadas à resistência a doenças com domínios LRR, TIR ou NB-ARC foi detectado em IAC-Tybatã (R), em ambos os períodos. Estas proteínas estão envolvidas no reconhecimento de efetores de patógenos, com mudanças conformacionais nos seus domínios quando interagem com as moléculas do patógeno. Acredita-se que há a troca de ADP por ATP pelo domínio NBS, favorecendo cascatas de sinalização por mecanismos complexos ainda não completamente elucidados, levando à resistência do hospedeiro (Lee e Yeom 2015). Giordani et al. (2021), analisando o painel de diversidade de feijoeiro do IAC (que inclui IAC-Tybatã e Branquinho) detectaram 15 RGAs putativos nas regiões genômicas associadas aos fenótipos de massas de ovos e índice de galhas. Neste estudo, quatro deles mostraram-se diferencialmente expressos exclusivamente em IAC-Tybatã (R). Santos et al. (2018), trabalhando com genótipos contrastantes de feijão-caupi, detectaram cinco RGAs putativos, os quais, neste estudo, também se mostraram DEs aos 4 DAI, sendo três deles superexpressos em ambos os genótipos e um superexpresso apenas em

IAC-Tybatã (R). Estes genes têm alta homologia com genes R de feijão-caupi contra o vírus do mosaico do tabaco (Dinesh-Kumar et al. 2000). Ademais, seis genes podem ser destacados pela superexpressão em ambos os períodos apenas em Tybatã (R), corroborando a importância dos genes com domínios LRR no estabelecimento da resistência.

As proteínas quinases estiveram entre as categorias funcionais mais enriquecidas em comum nos dois períodos em IAC-Tybatã (R), com a maioria dos transcritos mostrando-se superexpresso. Apesar disso, especificamente aos 4 DAI, um elevado número de transcritos de quinases superexpressos foi observado também no genótipo suscetível. As proteínas quinases são compostos chave na defesa da planta (Chandrasekar et al. 2022; Padder et al. 2016; Foucher et al. 2020), atuando como receptores na percepção de diversos PAMPs e na atividade de proteínas envolvidas em vias de sinalização em resposta a um estresse biótico, no controle da atividade e síntese de fatores de transcrição, enzimas, hormônios, peptídeos e compostos químicos antimicrobianos, através da fosforilação de proteínas pela transferência de grupos ATP ou GTP para resíduos de serina, treonina ou tirosina (Shukla et al. 2018; Romeis e Herde 2014; Tena et al. 2011). Mesmo em casos de suscetibilidade, componentes do sistema imune podem ser ativados, especialmente em períodos iniciais da interação, como observado para as proteínas quinases em Branquinho (S), entretanto, o patógeno é capaz de superar as respostas de defesa e se estabelecer, enquanto em IAC-Tybatã (R) uma atividade elevada de quinases permanece aos 10 DAI. Santini et al. (2016) observaram a presença de cinco transcritos de quinases DEs apenas aos 4 DAI, corroborando os resultados aqui obtidos.

Li et al. (2021) propõem um modelo de resistência de um genótipo de pepino contra *M. incognita* onde a regulação mediada por cálcio funciona como um acionador entre cascatas de MAPK, PTI, ETI e vias de ácido salicílico e ácido jasmônico. Neste estudo, a superexpressão em IAC-Tybatã (R) de transcritos das principais vias de sinalização em resposta a patógenos indica ativação de proteínas de defesa.

Genes envolvidos em estresse oxidativo se mostraram DEs, com padrão geral de expressão distinto entre genótipos, de superexpressão em IAC-Tybatã (R) e de repressão em Branquinho (S). EROs atuam contra o patógeno ou promovem a morte celular, impedindo a progressão do patógeno nos tecidos da planta ao mesmo tempo em que causa danos àquela região. Peroxidases, laccases e glutatona S-transferases, proteínas cujos transcritos se mostraram superexpressos em IAC-Tybatã (R), atuam como antioxidantes atenuando os efeitos deletérios das EROs, afetando a reação de hipersensibilidade; para que a morte celular seja favorável à planta, deve ocorrer de forma rápida e localizada no sítio de infecção do patógeno, sendo assim, tanto a indução quanto a limitação da produção e atuação de EROs pode proteger as espécies vegetais (Leitão et al. 2021; Arantes e Goodell 2014; Gullner et al. 2018).

Interessantemente, uma enzima similar a uma peroxidase (Phvul.001G201300) foi detectada nos estudos de Santini et al. (2016), com base na análise do transcrito da cultivar IPR-Saracura (S) em resposta à *M. incognita* e, neste estudo, em IAC-Tybatã (R) aos 10 DAI. Segundo Giordani et al (2021), esta enzima está localizada em uma região genômica associada à formação de galhas e foi igualmente detectada em estudos de mapeamento associativo examinando a resposta individual de acessos de feijoeiro-comum à *M. incognita*. Ainda no estudo de Giordani et al. (2021), análises histoquímicas permitiram detectar produção elevada de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), uma ERO, em IAC-Tybatã (R) comparativamente ao seu controle quando da infecção pelo nematoide das galhas. Também, um transcrito de proteína de morte acelerada apresentou superexpressão em IAC-Tybatã (R) aos 10 DAI. Em *Arabidopsis*, esta proteína modula a profundidade de morte celular em suas folhas quando da infecção por *Pseudomonas syringae* (Matthews et al. 2014) enquanto em nas raízes de soja a superexpressão desta proteína reduziu o índice de fêmeas em 55%, em resposta ao nematoide *Heterodora glycines* (Yao e Greenberg 2006).

A principal classe de proteínas na regulação de genes são os fatores de transcrição, que estão envolvidos em vias de sinalização hormonal e de proteínas quinases, como as MAPKs e CDPKs, em resposta a estresses

(Abdullah-Zawawi et al. 2021). A maioria dos GDEs com função de fatores de transcrição WRKY e myb se mostraram superexpressos aos 4 e 10 DAI, em IAC-Tybatã (R), e reprimidos aos 10 DAI, em Branquinho (S). Diversos trabalhos indicam transcritos de fatores de transcrição superexpressos em respostas de resistência ao nematoide das galhas (Chandrasekar et al. 2022; Kumar et al. 2019; Wang et al. 2018). Santini et al. (2016) observaram repressão em transcritos de fatores de transcrição WRKY e myb, destacando um WRKY53, bem estudado em sua atuação contra *Pseudomonas syringae* em *Arabidopsis*, cuja repressão afeta a resposta do sistema basal de defesa, o qual se mostrou superexpresso em IAC-Tybatã (R) (Murray et al. 2007).

Fatores de transcrição WRKY70, superexpressos em IAC-Tybatã (R), já foram citados em resistência em soja após infecção com *M. incognita* (Ibrahim et al. 2013) e na resistência de tomate à *M. javanica* mediada pelo gene R *Mi-1*, atuando na interferência das vias do ácido salicílico e do etileno/ácido jasmônico (Derksen et al. 2013; Atamian et al. 2012). Já os MYC2 favorecem o acúmulo de ácido jasmônico e regulam genes de metabolismo e de resposta a danos mecânicos. Concluindo, a superexpressão de transcritos de diversos fatores de transcrição em IAC-Tybatã (R), que regulam genes que codificam proteínas chave em respostas de defesa por quinases e hormônios vegetais, explicam a ocorrência de resistência.

As auxinas são hormônios envolvidos na manutenção de sítios de alimentação dos nematoides, favorecendo o aumento das células e a ativação do ciclo celular em células gigantes (Perrot-Rechenmann 2010). O GH3 (IAA-amido sintetase), promotor responsivo a auxina, que se mostrou reprimido em Branquinho (S) aos 10 DAI, tem sua atuação inibida em genótipos de pepino resistentes à *M. incognita*, portanto, se distinguindo dos resultados aqui obtidos (Wang et al. 2018; Li et al. 2021).

Convém mencionar que a resistência em IAC-Tybatã (R) não é completa, a formação de células gigantes ainda ocorre, embora os sintomas se apresentem com menor severidade (Giordani et al. 2021), ademais, fatores de respostas à auxina (ARFs), que se mostraram reprimidos em IAC-Tybatã (R), podem se ligar a promotores dos genes e regular a sua expressão, o que pode explicar a ausência de transcritos de GH3 DEs aos 10 DAI. Genes AUX/IAA codificam uma proteína responsiva a auxina que causa repressão transcricional e genes codantes de proteínas SAUR (do inglês, *small auxin up-regulated RNA*) são responsivos e induzidos por auxina. Assim, os resultados de Li et al. (2021) corroboram os aqui apresentados, de superexpressão de transcritos de proteínas AUX/IAA, no genótipo com resistência, e repressão de transcritos de SAUR, aos 4 DAI, no genótipo suscetível, o que poderia indicar uma menor concentração de auxina em IAC-Tybatã (R). Santini et al. (2016) relataram superexpressão de genes relacionados a auxina ao 4 DAI, mas não aos 10 DAI. A resposta diferencial de genes relacionados a auxina entre os genótipos permite entendimento do desenvolvimento discrepante dos J₂ e das células gigantes.

A via do etileno/ácido jasmônico se mostrou favorecida em IAC-Tybatã (R). A MYC2 e a proteína insensível a etileno (EIN3) interagem entre si, onde MYC2 depende de EIN3 para realzar sua atividade transcricional, seja de forma antagonista ou sinérgica (Zheng et al. 2017), justificando a atividade de MYC2 apenas em IAC-Tybatã (R), onde não há repressão de transcritos de EIN3.

A atividade de proteínas relacionadas à patogênese PR3 e PR4 é assinatura da via de etileno/ácido jasmônico; fatores de resposta a etileno (ERFs) ativam a transcrição destas proteínas (Fujimoto et al. 2014). Efeitores de patógenos podem interagir diretamente com proteínas PR, podendo reduzir a carga do patógeno em tecidos infectados (Breen et al. 2017). É mais comum que patógenos necrotróficos estejam associados ao estímulo da via do etileno/ácido jasmônico, i.e., à resistência sistêmica induzida, desencadeando acúmulo de PR3 e PR4 (Ali et al. 2017). Entretanto, estudos indicam a atuação destas proteínas e desta via hormonal na ativação da defesa da planta também

contra patógenos biotróficos, com superexpressão de transcritos com tal função em genótipos resistentes a nematoides com *M. incognita* e *M. arenaria* (Li et al. 2021; Przybylska et al. 2018).

Genes de proteínas relacionadas à patogênese do tipo PR1, assinatura da via do ácido salicílico, i.e., à resistência sistêmica adquirida, se mostraram com expressão elevada em IAC-Tybatã (R) em ambos os períodos. Li et al. (2021), analisando um genótipo de pepino resistente à *M. incognita*, relataram superexpressão de transcritos como os detectados neste estudo, exceto pela SNC1, relatando superexpressão do transcrito da NPR1, e não de seu supressor (SNC1). O papel da proteína NPR1 é bem conhecido: atua como reguladora positiva da SAR, à jusante do ácido salicílico na indução de genes PR (Cao et al. 1994; Cao et al. 1997). A SNC1, por sua vez, atua numa via dependente de ácido salicílico, mas independente da NPR1, na indução de resistência local após infecção pelo patógeno pela expressão constitutiva de genes de proteínas PR (Li et al. 2001). Neste sentido, o ácido salicílico atua na resistência em feijoeiro-comum através de uma via alternativa para indução de proteínas PR, a qual já foi descrita em resistência de soja ao nematoide dos cistos (*Heterodora glycines*) (Maldonado et al. 2014). Santini et al. (2016) apontaram que as vias do etileno/ácido jasmônico e do ácido salicílico atuam de forma antagonista no genótipo IPR-Saracura e sugerem que a ativação da via do etileno/ácido jasmônico afetou negativamente a ativação da via do ácido salicílico, levando a uma interação compatível. Todavia, estudos de pepino infectado por *M. incognita* (Li et al. 2021) e *Fusarium oxysporum* (Di et al. 2017) demonstram que as vias também podem atuar sinergicamente, apesar de outros estudos demonstrarem o oposto (Does et al. 2013; Caarls et al. 2015).

Até onde se sabe, este é o primeiro estudo que elucidou os mecanismos moleculares envolvidos na **suscetibilidade** de feijoeiro-comum ao nematoide das galhas. Foi possível elucidar vias até então desconhecidas no patossistema, a exemplo da (i) atuação da auxina no favorecimento da suscetibilidade; (ii) repressão da via do ácido salicílico e de uma possível interação sinérgica com os hormônios etileno/ácido jasmônico, (iii) repressão de GDEs em resposta a um influxo de cálcio desencadeado pelo estresse, possivelmente afetando cascatas de sinalização de proteínas quinases e, por fim, (iv) levando à ausência de uma reação de hipersensibilidade.

Outros genes (não alocados nas vias de resposta de defesa mais bem descritas), codificadores de proteínas com domínios ANK, beta-glucosidases e proteínas com repetições tetratricopeptídicas (TPR) também se mostraram reprimidos no genótipo suscetível.

O avanço no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na **resistência** é ainda maior, pois, pela primeira vez, genes candidatos puderam ser indicados, dentre eles, codificadores de proteínas com domínios LRR, TIR ou NB-ARC, com elevado número de GDEs superexpressos, receptores de PAMPs ou efetores, fatores de transcrição WRKY, myb e MYC2, sendo o último exclusivamente DE no genótipo resistente.

A validação dos resultados por RT-qPCR deve confirmar o papel dos genes aqui apontados como candidatos, confirmando a confiabilidade da técnica de RNA-Seq e dos resultados obtidos neste estudo, podendo ser utilizados em estudos funcionais, incluindo a edição gênica, com vistas à melhor compreensão do mecanismo molecular de resistência e à contribuição com o melhoramento da cultura.

6. CONCLUSÕES

Os genótipos IAC-Tybatã (moderadamente resistente) e Braquinho (suscetível) se mostraram contrastantes quanto ao desenvolvimento dos J₂ de *Meloidogyne incognita*, com atraso no desenvolvimento em IAC-Tybatã, culminando em um menor número de fêmeas adultas aos 30 DAI;

As bibliotecas de expressão aqui construídas representam satisfatoriamente os dois momentos da interação *P. vulgaris* – *M. incognita* e disponibilizam um grande número de sequências do transcriptoma do hospedeiro;

Um padrão geral contrastante na expressão de genes pôde ser observado entre os genótipos, com os GDEs em Braquinho (S) mostrando uma tendência de repressão e, em IAC-Tybatã (R), uma tendência de superexpressão.

Genes candidatos putativamente associados à resistência puderam ser indicados, pela superexpressão em IAC-Tybatã (R), com funções de: proteínas PR, ativadas pelas vias hormonais do ácido salicílico e do etileno/ácido jasmônico; proteínas quinases em cascatas de sinalização, como MAP quinases e quinases dependentes de cálcio; proteínas de biossíntese e processamento de EROs, as quais podem atuar em reação de hipersensibilidade e proteínas putativas de resistência com domínios LRR, TIR ou NB-ARC, com elevado número de GDEs com alto nível de superexpressão.

Genes candidatos associados a suscetibilidade puderam ser indicados em Braquinho (S), especialmente os com funções de biossíntese e transmissão de sinal de auxina, favorecendo a manutenção de sítios de alimentação, além da repressão nas principais vias de defesa supracitadas como superexpressas em IAC-Tybatã (R). A ausência do gene do fator de transcrição MYC2 como DE pode ter afetado a defesa da planta.

Genes não alocados nas principais vias de defesa, mas altamente reprimidos em Braquinho (S), com funções de proteínas com domínios ANK (*ankyrin*), beta-glucosidases e proteínas com repetições tetratricopeptídicas (TPR) podem ter contribuído para o estabelecimento de uma reação compatível.

Um modelo explicativo dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência e na suscetibilidade de feijoeiro-comum à *M. incognita* foi proposto.

REFERÊNCIAS

- Abad P, Favery B, Rosso MN, et al (2003) Root-knot nematode parasitism and host response: molecular basis of a sophisticated interaction. **Mol Plant Pathol** 4:217–224.
- Abdullah-Zawawi MR, Ahmad-Nizammuddin NF, Govender N, et al (2021) Comparative genome-wide analysis of WRKY, MADS-box and MYB transcription factor families in *Arabidopsis* and rice. **Sci Rep** 11:1–18.
- Aggarwal M, Sharma S, Kaur N, et al (2011) Exogenous proline application reduces phytotoxic effects of selenium by minimising oxidative stress and improves growth in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. **Biol Trace Elem Res** 140:354–367.
- Akibode S, Maredia M (2011) **Global and regional trends in production, trade and consumption of food legume crops**. 1 ed. Food and Resource Economics, Michigan, 87 p.
- Ali S, Mir ZA, Bhat JA, et al (2017) Identification and comparative analysis of *Brassica juncea* pathogenesis-related genes in response to hormonal, biotic and abiotic stresses. **Acta Physiol Plant** 39:1–15.
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. **Genome Biol** 11:1–12.
- Andrews S (2010) **FastQC**: a quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>>. Acesso em: 02 mai. 2022.
- Arantes V, Goodell B (2014) Current understanding of brown-rot fungal biodegradation mechanisms: a review. **ACS Symposium Ser** 1158:3–21.
- Archana B, Saxena R (2012) Nematicidal effect of root extract of certain medicinal plants in control of *Meloidogyne incognita* *in vitro* and *in vivo* conditions. **Pak J Nematol** 30:179–187.
- Associação Brasileira de Sementes e Mudas (ABRASEM) (2022) **Estatísticas**. Disponível em: <<http://www.abrasem.com.br/site/estatisticas/#>>. Acesso em: 12 mai. 2022.
- Atamian HS, Roberts PA, Kaloshian I (2012) High and low throughput screens with root-knot nematodes *Meloidogyne* spp. **J Vis Exp** 61:1–5.
- Au KF, Sebastiano V, Afshar PT, et al (2013) Characterization of the human ESC transcriptome by hybrid sequencing. **Proc Natl Acad Sci** 110:4821–4830.
- Baida F, Santiago DC, Takahashi LSA, et al. (2011) Reação de linhagens de feijão-vagem ao *Meloidogyne javanica* e *M. paranaenses* em casa-de-vegetação. **Acta Sci** 33:237–241.
- Baldin EEL, Pereira JM (2010) Resistência de genótipos de feijoeiro a *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Ciência e Agrotecnologia** 34:1507–1513.
- Bari R, Jones JD (2009) Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Mol Biol** 69:473–488.
- Baum TJ, Hussey RS, Davis EL (2007) **Root-knot and cyst nematode parasitism genes: the molecular basis of plant parasitism**. In: Setlow JK (ed) Genetic engineering, 1 ed. Springer US, Boston, pp. 17–43.
- Beccaccioli M, Reverberi M, Scala V (2019) Fungal lipids: biosynthesis and signalling during plant-pathogen interaction. **Front Biosci** 24:172–185.
- Bellaïf S, Shen Z, Rosso MN, et al (2008) Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. **PLoS Pathog** 4:1–12.
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **J R Stat Soc** 57:289–300.
- Bentley DR, Balasubramanian S, Swerdlow HP, et al (2008) Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature** 456:53–59.

- Bianchini A (2005) **Manual de fitopatologia**: doenças das plantas cultivadas, 2 ed. Agronômica Ceres, São Paulo, pp 333–349.
- Bigeard J, Hirt H (2018) Nuclear signaling of plant MAPKs. **Front Plant Sci** 9:1–18.
- Bitocchi E, Bellucci E, Giardini A (2013) Molecular analysis of the parallel domestication of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) in Mesoamerica and the Andes. **New Phytol** 197:300–313.
- Blair MW, Gonzales LF, Kimani P (2010) Inter-genepool introgression, genetic diversity and nutritional quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from central Africa. **Theor Appl Genet** 121:237–248.
- Boller T, Felix GA (2009) Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. **Annu Rev Plant Biol** 60:379–406.
- Borém A, Carneiro JES (2015) A cultura. In: Carneiro JES, Paula Júnior TJ, Borém A (eds) **Feijão**: do plantio à colheita, 1 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp 9–15.
- Boudsocq M, Willmann MR, McCormack M, et al (2010) Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. **Nature** 464:418–422
- Bozbuga R (2015) Identification of common bean (*Phaseolus vulgaris*) genotypes having resistance against root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **Legume Res** 38:669–674.
- Breen S, Williams SJ, Outram M, et al (2017) Emerging insights into the functions of pathogenesis-related protein 1. **Trends Plant Sci** 22:871–879.
- Bridge J, Page SLJ (1980) Estimation of root-knot nematode infestation levels on roots using a rating chart. **Trop Pest Manag** 26:296–298.
- Brown CR, Mojtahedi H, James S, et al (2006) Development and evaluation of potato breeding lines with introgressed resistance to Columbia root-knot nematode (*Meloidogyne chitwoodi*). **AJPR** 83:1–8.
- Bucki P, Paran P, Ozalvo R, et al (2017) Pathogenic Variability of *Meloidogyne incognita* populations occurring in Pepper-Production Greenhouses in Israel Toward Me1, Me3, and N pepper resistance genes. **Plant Dis** 101:1391–1401.
- Buliani EA (2008) **Feijão carioca** - uma história de sucesso, 1ed. InfoBibos, São Paulo, 7 p.
- Burle ML, Fonseca JR, Kami JA (2010) Microsatellite diversity and genetic structure among common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces in Brazil, a secondary center of diversity. **Theor Appl Genet** 121:801–813.
- Byrd DW, Kirkpatrick T, Barker KR (1983) An improved technique for clearing and staining plant tissues for detection of nematodes. **J Nematol** 15:142–143.
- Caarls L, Pieterse CMJ, Wees CSMV (2015) How salicylic acid takes transcriptional control over jasmonic acid signaling. **Front Plant Sci** 6:1–11.
- Caillaud MC, Dubreuil G, Quentin M, et al. (2008) Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. **J Plant Physiol** 165:104–113.
- Camargo EAL (2011) Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) **Manual de Fitopatologia**: princípios e conceitos, 4 ed. Agronômica Ceres, Piracicaba, pp 119–132.
- Cao H, Bowling SA, Gordon AS, et al (1994) Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance. **Plant Cell** 6:1583–1592.
- Cao H, Glazebrook J, Clarke JD, et al (1997) The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. **Cell** 88:57–63.
- Carneiro JCS, Minim VPR, Souza Junior MM (2005) Perfil sensorial e aceitabilidade de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 25:18–24.

- Carr DE, Murphy EJ, Eubanks MD (2006) Genetic variation and covariation for resistance and tolerance to Cucumber mosaic virus in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae): a test for costs and constraints. **J Hered** 96:29–38.
- Carvalho NL, Barcelos AL (2012) Adoção do manejo integrado de pragas baseado na percepção e educação ambiental. **Rev Eletrônica Gest Educ Tecnol Ambient** 5:749–766.
- Castañeda NEN, Alves GSC, Almeida RM, et al (2017) Gene expression analysis in *Musa acuminata* during compatible interactions with *Meloidogyne incognita*. **Ann Bot** 5:915–930.
- Chandrasekar S, Natarajan P, Mhatre PH, et al (2022) Rna-seq of cyst nematode infestation of potato (*Solanum tuberosum* L.): a comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible cultivars. **Plants** 11:1–20.
- Chiorato AF (2004) **Divergência genética em acessos de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) do banco de germoplasma do Instituto Agrônomo – IAC**. Tese (Mestrado em Melhoramento Vegetal), Instituto Agrônomo de Campinas, Campinas, 85 p.
- Conab – Companhia Nacional De Abastecimento (2020) **Perspectivas para a agropecuária, safra 2020/21**, 8 ed. Edição Grãos, Brasília, 56 p.
- Corbett BP, Jia L, Saylor RJ, et al (2011) The effects of root-knot nematode infection and mi-mediated nematode resistance in tomato on plant fitness. **J Nematol** 43:82–89.
- Costa JPG, Soares PLM, Vidal RL, et al (2019) Reaction of common bean genotypes to the reproduction of *Meloidogyne javanica* and *Meloidogyne incognita*. **Pesqui Agropecu Trop** 49:1–6.
- Dallagnol LJ (2018) **Resistência genética: de plantas a patógeno**. 1 ed. UFPel, Pelotas, 437 p
- Derksen H, Rampitsch C, Daayf F (2013) Signalling cross-talk in plant disease resistance. **Plant Sci** 207:79–87.
- Di X, Gomila J, Takken FLW (2017) Involvement of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling pathways in the susceptibility of tomato to *Fusarium oxysporum*. **Mol Plant Pathol** 18: 1024–1035.
- Dijan-Caporalino C, Pijarowski L, Fazari A, et al (2007) High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci Me3 and Me4 conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). **Theor Appl Genet** 103:592–600.
- Dinesh-Kumar SP, Baker BJ (2000) Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. **Proc Natl Acad Sci** 97:1908–1921.
- Diniz AL (2016) **Regiões genômicas envolvidas no controle de caracteres agronômicos e no teor de macro e micronutrientes em grãos de feijão-comum via mapeamento associativo**. Tese (Doutorado em Agronomia) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 97 p.
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, et al (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics** 29:15–21.
- Dodds P, Rathjen J (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. **Nat Rev Genet** 11:539–548.
- Does VD, Leon-Reyes D, Koornneef A, et al (2013) Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCF^{COI1}-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59. **Plant Cell** 25:744–761.
- Eisenback JD, Triantaphyllou HH (1991) **Root-knot Nematodes: Meloidogyne species and races**. In: Nickle WR (ed) *Manual of Agricultural Nematology*. 1 ed. Marcel Dekker, New York, pp. 281–286.
- Embrapa (2017) **Catálogo de cultivares de feijão comum**. 2 ed. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, 27 p.
- Erb M, Kliebenstein DJ (2020) Plant Secondary Metabolites as Defenses, Regulators, and Primary Metabolites: The Blurred Functional Trichotomy. **Plant Physiol** 184:39–52.

- Faostat (2018) **Crops**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 6 mai. 2022.
- Favery B, Quentin M, Jaubert-Possamai S, et al (2016) Gall-forming root-knot nematodes hijack key plant cellular functions to induce multinucleate and hypertrophied feeding cells. **J Insect Physiol** 84:60–69.
- Ferraz LCCB, Brown DJF (2016) **Nematologia de plantas: fundamentos e importância**. Norma Editora, Manaus, 215 p.
- Ferreira S, Gomes LAA, Maluf WR, et al (2010) Resistance of dry bean and snap bean cultivars to root-knot nematodes. **HortSci** 45:320–322.
- Foucher J, Ruh M, Préveaux A, et al (2020) Common bean resistance to *Xanthomonas* is associated with upregulation of the salicylic acid pathway and downregulation of photosynthesis. **BMC Genomics** 21:1–18.
- Franzener G, Unfried JR, Stangarlin JR, et al (2005) Nematoides formadores de galha e cisto patogênicos à cultura da soja em municípios do Oeste do Paraná. **Nemat Bras** 29:261–265.
- Gay NJ, Gangloff M (2007) Structure and function of Toll receptors and their ligands. **Annu Rev Biochem** 76:141–165.
- Gepts P, Debouck D (1991) Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In Voysest O, VanSchoonhoven A (eds) **Common beans: Research for crop improvement**, 1 ed. CAB International, pp 7–53.
- Giordani W, Gama HC, Chiorato AF, et al (2021) Genetic mapping reveals complex architecture and candidate genes involved in common bean response to *Meloidogyne incognita* infection. **Plant Genome** 15:1–20.
- Gomes JAA, Andrade Júnior VC, Oliveira CM, et al (2015) Resistance of sweet potato clones to *Meloidogyne incognita* races 1 and 3. **Bragantia** 74:291–297.
- Gonçalves JGR, Andrade ER, Silva DA, et al (2019) Drought tolerance evaluated in common bean genotypes. **Ciênc Agrotec** 43:1–9.
- Gullner G, Komives T, Királi L, et al (2018) Glutathione S-Transferase Enzymes in Plant-Pathogen Interactions. **Front Plant Sci** 9:1–19.
- Hamamouch N, Li C, Seo PJ, et al (2011) Expression of *Arabidopsis* pathogenesis-related genes during nematode infection. **Mol Plant Pathol** 12:355–364.
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Circular. **Calif Agric** 347:1–32.
- Holbein J, Grundler FMW, Siddique S (2016) Plant basal resistance to nematodes: an update. **J Exp Bot** 67:2049–2061
- Husain K, Ansari RAL, Ferder L (2010) Pharmacological agents in the prophylaxis/treatment of organophosphorous pesticide intoxication. **Indian J Exp Biol** 48:642–650.
- Ibrafe – Instituto Brasileiro Do Feijão (2022) **Bom futuro para o feijão do Brasil**. Disponível em: <<http://www.ibrafe.org/artigo/bom-futuro-para-o-feijao-do-brasil/>>. Acesso em: 22 mai. 2022.
- Ibrahim HM, Hosseini P, Alkharouf NW, et al (2013) Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. **BMC Genomics** 12:1–16.
- Illumina (2017) **TruSeq Stranded mRNA**. Disponível em: < <https://support.illumina.com/>>. Acesso em: 06 mai. 2022.
- Inomoto MM (2001) Atacado por Nematóides. **Rev Cultivar** 30:05–07.

- Jain S, Chittem K, Brueggeman R, et al (2016) Comparative Transcriptome Analysis of Resistant and Susceptible Common Bean Genotypes in Response to Soybean Cyst Nematode Infection. **PLoS One** 11:1–21.
- Jaouannet M, Magliano M, Arguel MJ, et al (2013) The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. **MPMI** 26:97–105.
- Jaouannet M, Rosso MN (2013) Effectors of root sedentary nematodes target diverse plant cell compartments to manipulate plant functions and promote infection. **Plant Signal Behav** 8:1–5.
- Jones JDG, Dangl JL (2006). The plant immune system. **Nature** 444:323–329.
- Jones JT, Haegeman A, Danchin EGJ (2013) Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. **Mol Plant Pathol** 14:946–961.
- Karssen G, Moens M (2006) **Root-knot nematodes**. In: Perry RN, Moens M (eds) Plant nematology. 1 ed. CABI Publishing, Wallingford, pp. 59–90.
- Khan MTA, Mukhtar T, Saeed M (2019) Resistance or susceptibility of eight aubergine cultivars to *Meloidogyne javanica*. **Pak J Zool** 51:2187–2192.
- Kumar P, Khanal S, Silva MD, et al (2019) Transcriptome analysis of a nematode resistant and susceptible upland cotton line at two critical stages of *Meloidogyne incognita* infection and development. **PLoS ONE** 14:1–19.
- Langmead B, Salzberg SL (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nat Methods**, 4:357–359.
- Lee H, Yeom S (2015) Plant NB-LRR proteins: tightly regulated sensors in a complex manner. **Brief Funct Genom** 14:233–242.
- Leelarasamee N, Zhang L, Gleason C (2018) The root-knot nematode effector MiPFN3 disrupts plant actin filaments and promotes parasitism. **PLoS Pathog** 14:1–15.
- Leitão ST, Santos C, Araújo SS, et al (2021) Shared and tailored common bean transcriptomic responses to combined fusarium wilt and water deficit. **Hortic Res** 8:1–18.
- Li X, Clarke JD, Zhang Y, et al (2001) Activation of an EDS1-mediated R-gene pathway in the *snc1* mutant leads to constitutive, NPR1-independent pathogen resistance. **Mol Plant Microbe Interact** 14:1131–1139.
- Li X, Sun Y, Yang Y, et al (2021) Transcriptomic and histological analysis of the response of susceptible and resistant cucumber to *Meloidogyne incognita* revealing complex resistance via multiple signalling pathways. **Front Plant Sci** 12:1–12.
- Li X, Xing X, Tian P, et al (2018) Comparative Transcriptome Profiling Reveals Defense-Related Genes against *Meloidogyne incognita* invasion in Tobacco. **Molecules** 23:1–16.
- Lilley CJ, Kyndt T, Gheysen G (2011) Nematode Resistant GM Crops in Industrialised and Developing Countries. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) **Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions**, 1 ed. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 517–541.
- Ling J, Mao Z, Zhai M, et al (2017) Transcriptome profiling of *Cucumis metuliferus* infected by *Meloidogyne incognita* provides new insights into putative defense regulatory network in Cucurbitaceae. **Sci Rep** 7:1–15.
- Lonnberg J, Malmi L, Ben-Ari M (2011) Evaluating a visualization of the execution of a concurrent program. **Koli Calling** 11:39–48.
- Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biol** 15:1–21.
- Ma J, Kirkpatrick TL, Rothrock CS, et al (2013) Effects of soil compaction and *Meloidogyne incognita* on cotton root architecture and plant growth. **J Nematol** 45:112–121.

- Machado ACZ (2011) **Nematoides em feijão**: perdas de 10% podem chegar a 50%. Disponível em: <<http://nematologia.com.br/2011/12/nematoides-em-feijao-perdas-de-10-podemchegar>>. Acesso em: 06 mai. 2022.
- Maldonado A, Youssef R, McDonald M, et al (2014) Modification of the expression of two NPR1 suppressors, *SNC1* and *SNI1*, in soybean confers partial resistance to the soybean cyst nematode, *Heterodera glycine*. **Funct Plant Biol** 44:714–726.
- Mambrim BR, Ribeiro ND, Storck L, et al (2015) Seleção de linhagens de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) baseada em caracteres morfológicos, fenológicos e de produção. **Revista de Agricultura** 90:141–155.
- MAPA (2022) **Cultivarweb**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/php/snpc/cultivarweb/cultivares_protegidas.php?txt_ordem=&postado=1&acao=pesquisar&cod_especie=4&>. Acesso em: 20 abr. 2022.
- Matthews BF, Beard H, Brewer E, et al (2014) Arabidopsis genes, AtNPR1, AtTGA2 and AtPR-5, confer partial resistance to soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) when overexpressed in transgenic soybean roots. **BMC Plant Biol** 96:1–19.
- Mccarville MT, Marett CC, Mullaney MP, et al (2017) Increase in soybean cyst nematode virulence and reproduction on resistant soybean varieties in Iowa from 2001 to 2015 and the effects on soybean yield. **Plant Health Prog** 18:146–155.
- Mitkowski N, Abawi G (2022) **Root-knot nematodes**. Disponível em: <<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/nematodes/pages/rootknotnematode.aspx>>. Acesso em: 02 mai. 2022.
- Moens M, Perry RN, Starr JL (2009) **Meloidogyne species** – a diverse group of novel and important plant parasites. In: Moens M, Perry RN, Starr JL (eds) Root-knot nematodes. 1 ed. CAB International, Wallingford, pp. 1–17.
- Morais PPP (2012) Seleção precoce em plantas segregantes de feijoeiro para resistência à murcha de *Curtobacterium*. **Revista Ceres** 59:803–808.
- Morgante CV, Martins ACQ, Silva AK, et al (2015) **Protocolo de extração de RNA total de *Arachis* spp. e avaliação do efeito de contaminantes por meio de análises espectrofotométricas**. 1 ed. Embrapa Semiárido, Petrolina, 25 p.
- Moura AD, Brito LM (2015) **Aspectos socioeconômicos**. In: Carneiro JE, Paula Júnior TJ, Borém A (eds) Feijão do plantio à colheita, 1 ed. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp 16–36.
- Mugniéry D, Phillips MS (2007) **The nematodes parasites of potato**. In: Vreugdenhil D (ed) Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives. 1 ed. Elsevier, Oxford, pp. 569–594.
- Mullin BA, Abawi GS, Pastor-Corrales MA (1991) Modification of resistance expression of *Phaseolus vulgaris* to *Meloidogyne incognita* by elevated soil temperatures. **J Nematol** 23:182–187.
- Murray SL, Ingle RA, Petersen LN, et al (2007) Base resistance against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis* involves WRKY53 and a protein with homology to nematode resistance protein. **Mol Plant Microbe Interact** 20:1431–1438.
- Ndeve AD, Santos JRP, Matthews WC, et al (2019) A novel root-knot nematode resistance QTL on chromosome VU01 in cowpea. **G3: Genes Genomes Genet** 9:1199–1209.
- Nguyen CN, Barbeoch-Perfus L, Quentin M, et al (2018) A root-knot nematode small glycine and cysteine-rich secreted effector, MiSGCR1, is involved in plant parasitism. **New Phytol** 217:687–699.

- Nicol JM, Turner SJ, Coyne DL, et al (2011) Current Nematode Threats to World Agriculture. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) **Genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions**, 1 ed. Springer, London, pp 320–359.
- Niks RE, Marcel TC (2009) Nonhost and basal resistance: how to explain specificity? **New Phytol** 182:817–828.
- Niu J, Liu P, Liu Q, et al (2016) Msp40 effector of root-knot nematode manipulates plant immunity to facilitate parasitism. **Sci Rep** 6:1–13.
- Okamura S, Mumtahina N, Shimono H, et al (2020) Root sampling and RNA extraction methods for field-based gene expression analysis of soybean. **Plant Prod Sci** 24:339–345.
- Oliveira CL, Oliveria SN, Oliveira MS, et al (2018) Reaction of common bean to *Meloidogyne incognita* race 1 and *Meloidogyne javanica*. **Rev Ceres** 65:321–328.
- Onkendi EM, Kariuki GM, Marais, M, et al (2014) The threat of root- knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in Africa: a review. **Plant Pathol** 63:727–737.
- Oostenbrink M (1996) Major characteristics of the relation between nematodes and plants. Meded. Landbouwhoges. **Wageningen** 66:1–46.
- Padder BA, Kanfwa K, Awale HE, et al (2016) Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris* – *Colletotrichum lindemathianum* pathosystem. **PLoS One** 11:1–26.
- Pádua JMV (2013) **Implicações da seleção precoce para a resistência á antracnose no melhoramento genético do feijoeiro**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Lavras, Lavras, pp 1–75.
- Pagán I, Alonso-Blanco C, García-Arenal F (2008) Host Responses in Life-History Traits and Tolerance to Virus Infection in *Arabidopsis thaliana*. **PLoS Pathog** 8:1–10.
- Pagán I, García-Arenal F (2018) Tolerance to Plant Pathogens: Theory and Experimental Evidence. **Int J Mol Sci** 3:1–17.
- Park CJ, Seo YS. Heat Shock Proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. **Plant Pathol J** 31:323–333.
- Parsons J, Matthews W, Iorizzo M, et al (2015) *Meloidogyne incognita* nematode resistance QTL in carrot. **Mol Breed** 35:2–11.
- Pereira PAA, Braidotti W (2001) Comparação de métodos de melhoramento de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) para o incremento da fixação simbiótica de nitrogênio. **Pesquisa Agropecuária Tropical** 31:15–21.
- Pereira T, Coelho CMM, Santos JCP (2011) Diversidade no teor de nutrientes em grãos de feijão crioulo no estado de Santa Catarina. **Acta Sci Agron** 33:477-485.
- Perrot-Rechenmann C (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2:1–15.
- Perry RN, Moens M (2011) **Introduction to plant-parasitic-nematodes: modes of parasitism**. In: Jones J, Gheysen G, Fenoll C (eds) *Genomics and Molecular Genetics of Plant-Nematode Interactions*, 1 ed. Springer, New York, pp 3–20.
- Perry RN, Starr JL (2009) *Root-Knot Nematodes*, 1 ed. CABI International, London, 37 p.
- Perseguiini JMCK, Silva GSB, Rosa JRBF, et al (2015) Developing a common bean core collection suitable for association mapping studies. **Genet Mol Biol** 38:67–78.
- Petrillo MD, Matthews WC, Roberts PA (2006) Dynamics of *Meloidogyne incognita* Virulence to Resistance Genes *Rk1* and *Rk2* in Cowpea. **J Nematol** 38:90–96.

- Pham AT, McNally K, Haleem HA, et al (2013) Fine mapping and identification of candidate genes controlling the resistance to southern root-knot nematode in PI 96354. **Theor Appl Genet** 126:1825–1838.
- Postnikova OA, Hult M, Shao J, et al (2015) Transcriptome analysis of resistant and susceptible alfalfa cultivars infected with root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. **PLoS One** 10:1–17.
- Pria DM, Silva OC (2010) **Cultura do feijão: doenças e controle**. 1 ed. UEPG, Ponta Grossa, 454 p.
- Priya DB, Somasekhar N, Prasad JS, et al (2011) Transgenic tobacco plants constitutively expressing *Arabidopsis* NPR1 show enhanced resistance to root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. **BMC Res Notes** 4:1–5.
- Przybylska A, Kornobis F, Obrepalska-Stepłowska A, et al (2018) Analysis of Defense Gene Expression Changes In Susceptible and Tolerant Cultivars of Maize (*Zea mays*) Upon *Meloidogyne Arenaria* Infection. **Physiol Mol Plant Pathol** 103:78–83.
- R Core Team (2020) **R: A language and environment for statistical computing**. Disponível em: <<https://www.r-project.org/>>. Acesso em: 16 mai. 2022.
- Ribeiro ND, Silva SM, Garcia DC (2003) Variabilidade genética para absorção de água em grãos de feijão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha** 9:77–83.
- Rocha MD, Bournaud C, Dazeniere J, et al (2021) Genome expression dynamics reveal the parasitism regulatory landscape of root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and a promoter motif associated with effector genes. **Genes** 12:1–25.
- Rodriguez M, Rau D, Bitocchi E, et al (2015) Landscape genetics, adaptive diversity and population structure in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytol** 209:1781–1794.
- Romeis T, Herde M (2014) From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. **Curr Opin Plant Biol** 20:1–10.
- Rubiales D, Fondevilla S, Chen W, et al (2015) Achievements and Challenges in Legume Breeding for Pest and Disease Resistance. **Crit Rev Plant Sci** 34:195–236.
- Sallam A, Arboui M, El-esawi M, et al (2016) Identification and verification of QTL associated with frost tolerance using linkage mapping and GWAS in winter faba bean. **Front Plant Sci** 7:1–16.
- Santini L, Munhoz CF, Bonfim Jr MF, et al (2016) Host Transcriptional Profiling at Early and Later Stages of the Compatible Interaction Between *Phaseolus vulgaris* and *Meloidogyne incognita*. **Phytopathol** 106:282–294.
- Santos JRP, Ndeve AD, Huynh BL, et al (2018) QTL mapping and transcriptome analysis of cowpea reveals candidate genes for root-knot nematode resistance. **PLoS ONE** 13:1–22.
- Santos LNS, Alves FR, Belan LL, et al (2012) Damage quantification and reaction of bean genotypes (*Phaseolus vulgaris* L.) to *Meloidogyne incognita* race 3 and *M. javanica*. **Summa Phytopathol** 30:24–29.
- Sasser JN (1980) Root-knot nematodes a global menace to crops production. **Plant Dis** 64:36–41.
- Sathe SK (2008) Dry bean protein functionality (Review). **Crit Rev Biotechnol** 22:175–223.
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics** 6:863–864.
- Schroder A, Mueller O, Stocker S, et al (2006) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. **BMC Plant Biol** 7:1–14.
- Seah S, Yaghoob J, Rossi M, et al (2004) The nematode-resistance gene, Mi-1, is associated with and inverted chromosomal segment in susceptible compared to resistant tomato. **Theor Appl Genet** 108:1635–1642.
- Sharon E, Chet I, Spiegel Y (2009) Improved attachment and parasitism of *Trichoderma* on *Meloidogyne javanica* in vitro. **Eur J Plant Pathol** 123:291–299.

- Shi Q, Mao Z, Zhang X, et al (2018a) The Novel Secreted *Meloidogyne incognita* Effector MiISE6 Targets the Host Nucleus and Facilitates Parasitism in *Arabidopsis*. **Front Plant Sci** 9:1–16.
- Shi Q, Mao Z, Zhang X, et al (2018b) A *Meloidogyne incognita* effector MiISE5 suppresses programmed cell death to promote parasitism in host plant. **Sci Rep** 8:1–12.
- Shirasu K, Schulze-Lefert P (2003) Complex formation, promiscuity and multi-functionality: protein interactions in disease-resistance pathways. **Trends Plant Sci** 8:252–258.
- Shukla N, Yadav R, Kaur P, et al (2018) Transcriptome analysis of root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) infected tomato (*Solanum lycopersicum*) roots reveals complex gene expression profiles and metabolic networks of both host and nematode during susceptible and resistance responses. **Mol Plant Pathol** 19:615–633.
- Silva FHA (2015) **Qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp) utilizadas no Rio Grande do Norte**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 85 p.
- Silva GMB (2011) **Formação de um painel de diversidade genética em feijão comum**. Dissertação (Mestrado), Instituto Agronômico de Campinas, Campinas, 50 p.
- Silva OF, Wander AE (2013) **O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro**, 1 ed. Embrapa Arroz e Feijão, Goiânia, 63 p.
- Smant G, Helder J, Govere A (2018) Parallel adaptations and common host cell responses enabling feeding of obligate and facultative plant parasitic nematodes. **Plant J** 93:686–702.
- Souza TLPO, Faria JC, Aragão JCL, et al (2016) **BRS FC401 RMD: Cultivar de Feijão Carioca Geneticamente Modificada com Resistência ao Mosaico-dourado**, 1 ed. Embrapa Arroz e Feijão, Santo Antônio de Goiás, pp 1–6.
- Stark R, Grzelak M, Hadfield J (2019) RNA sequencing: the teenage years. **Nat Rev Genet** 20:631–656.
- Suk ME, Aluru NR (2014) Ion transport in sub-5-nm graphene nanopores. **J Chem Phys** 140, 1–12.
- Tao Y, Xie Z, Chen W, et al (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. **Plant Cell** 15:317–330.
- Taylor AL, Sasser JN (1978) **Biology, identification, and control of rootknot nematodes (*Meloidogyne* spp.)**. Cooperative Publication. 1 Ed. N.C. Carolina State University and U.S. Agency for International of Development, Raleigh, 111 p
- Teillet A, Dibal K, Kerry BR (2013) Transcriptional changes of the Root-Knot Nematode *Meloidogyne incognita* in response to Arabidopsis thaliana root signals. **PLoS One** 8:1–11.
- Teixeira RA (2013) **Reação de cultivares de soja a *Meloidogyne incognita* e *M. javanica***. 2013. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas), Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 60 p.
- Tena G, Boudsocq M, Sheen J (2011) Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. **Curr Opin Plant Biol** 14:519–529.
- Trapnell C, Williams B, Pertea G, et al (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nat Biotechnol** 28:511–515.
- Trigiano RN, Windham MT, Windham AS (2010) **Fitopatologia: conceitos e exercícios de laboratório**. 2 ed. Artmed, Porto Alegre, 576 p.
- Tripathy BC, Oelmüller R (2012) Reactive oxygen species generation and signaling in plants. **Plant Signal Behav** 7:1621–1633.
- Tsuda K, Sato M, Stoddard T, et al (2009). Network properties of robust immunity in plants. **PLoS Genet** 5:1–16.

- Vieira C (2005) Melhoramento do Feijão. In: Borém A (ed) **Melhoramento de espécies cultivadas**. Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, pp 301–392.
- Voysesst VO (2000) **Mejoramento genético del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)**: legado de variedades de América Latina 1930-1999. Centro Internacional de Agricultura Tropical, 195 p.
- Wang C, Ulloa M, Mullens TR, et al (2012) QTL analysis for transgressive resistance to root-knot nematode in interspecific cotton (*Gossypium* spp.) progeny derived from susceptible parents. **PLoS One** 7:1–9.
- Wang X, Xue B, Dai X, et al (2018) A novel *Meloidogyne incognita* chorismate mutase effector suppresses plant immunity by manipulating the salicylic acid pathway and functions mainly during the early stages of nematode parasitism. **Plant Pathol** 67:1436–1448.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nat Rev Genet** 10:57–63.
- Wendland A, Lobo Junior M, Faria JC (2018) **Manual de identificação das principais doenças do feijoeiro-comum**. 1 ed. Embrapa, Brasília, 49 p.
- Westermann AJ, Gorski SA, Vogel J, et al (2012) Dual RNA-seq of pathogen and host. **Nat Rev Microbiol** 10:618–630.
- Wiermer M, Feys BJ, Parker, JE (2005) Plant immunity: the EDS1 regulatory node. **Curr Opin Plant Biol** 8:383–389.
- Xie J, Li S, Mo C, et al (2016) A novel *Meloidogyne incognita* effector Misp12 suppresses plant defense response at latter stages of nematode parasitism. **Front Plant Sci** 7:1–12.
- Yao N, Greenberg JT (2006) *Arabidopsis* Accelerated Cell Death2 modulates programmed cell death. **Plant Cell** 18:397–411.
- Ye J, Zhang Y, Cui H, et al (2018) WEGO 2.0: a web tool for analyzing and plotting GO annotations, 2018 update. **Nucleic Acids Res** 46:71–75.
- Zeffa DM, Cirino VM, Medeiro IA, et al (2020) Genetic Progress of Seed Yield and Nitrogen Use Efficiency of Brazilian *carioca* Common Bean Cultivars Using Bayesian Approaches. **Front Plant Sci** 11:1–14.
- Zhang C, Zhou Z, Yong H, et al (2017) Analysis of the genetic architecture of maize ear and grain morphological traits by combined linkage and association mapping. **Theor Appl Genet** 130:1001–1029.
- Zheng Y, Lan Y, Shi T, et al (2017) Diverse contributions of MYC2 and EIN3 in the regulation of *Arabidopsis* jasmonate-responsive gene expression. **Plant Direct** 4:1–8.
- Zipfel, C (2008) Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. **Curr Opin Immunol** 20:10–16.