

CÍNTIA CARLA CLAUDINO GRANGEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL TRANSCRICIONAL DE FATORES
DE TRANSCRIÇÃO BHLH EM VIDEIRA SOB ESTRESSE BIÓTICO**

RECIFE – PE

2021

CÍNTHIA CARLA CLAUDINO GRANGEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL TRANSCRICIONAL DE FATORES
DE TRANSCRIÇÃO BHLH EM VIDEIRA SOB ESTRESSE BIÓTICO**

Dissertação a ser apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia - Melhoramento Genético de Plantas (PPGAMGP) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Melhoramento Genético de Plantas.

Orientador: Reginaldo de Carvalho

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

Dr^a Roberta Lane De Oliveira Silva

Recife – PE

2021

(FICHA CATALOGRÁFICA)

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL TRANSCRICIONAL DE FATORES
DE TRANSCRIÇÃO BHLH EM VIDEIRA SOB ESTRESSE BIÓTICO**

CÍNTIA CARLA CLAUDINO GRANGEIRO

Aprovado em: _____ de julho de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Reginaldo de Carvalho – Orientador
Depto. de Biologia - UFRPE

Dr. João Pacífico Bezerra Neto
Instituto de Ciências biológicas - UPE

Dra. Roseane Cavalcanti dos Santos
Embrapa Algodão

Recife – PE

2021

Agradecimentos

A princípio agradeço a Jesus e a Santíssima Maria por nunca me abandonarem.

Ao meu orientador Reginaldo de Carvalho por me orientar nos caminhos da ciência, pelo apoio e conhecimento transmitido.

Às minhas coorientadoras Ana Benko-Iseppon e Roberta Lane pelas quais tenho tanta admiração e respeito, sou grata pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa no LGBV, pelo apoio e carinho, vocês são fontes de inspirações.

À minha mãe, meu pai e irmã e toda a minha família por me apoiarem de diversas maneiras, mesmo que distante.

Às queridas amigas do PPG, Agnes por toda ajuda que me foi dada durante todo o mestrado, a Flavinha pelas conversas que deram tanta força.

Aos membros do LGBV que infelizmente não tive o contato que queria devido a quarentena do último ano. A João Pacífico por compartilhar seu conhecimento e experiência, o qual cooperou bastante para minha formação e pesquisa.

Às minhas amigas Thamisis Maia, Laís Alves e Danny Florêncio de longas datas que sempre estiveram presentes me apoiando em todos os momentos, vocês são essências!

Ao meu amor José Alfredo, que foi extremamente necessário para que eu conseguisse seguir sempre em frente, em meio a tantas pressões e tubulações vividas nesta pandemia, por me apoiar sempre, e nunca soltar minha mão, te amo!

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, e aos docentes do Programa de Pós Graduação em Melhoramento Genético de Plantas pelos conhecimentos me repassado durante estes dois anos.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa, e à EMBRAPA Semiárido pela concessão do material vegetal utilizado na pesquisa.

"Até aqui nos ajudou o SENHOR"

1 Samuel 7:12

LISTA DE ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
APG	Grupo de Filogenia de Angiospermas, <i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
BLAST	Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local, <i>Basic Alignment Search Tool Local</i>
BLOSSUM	Matriz de substituição de blocos de aminoácidos, <i>Blocks of Amino Acid Substitution Matrix</i>
cDNA	DNA Complementar, <i>Complementary DNA</i>
DDBJ	Banco de Dados de DNA do Japão, <i>DNA DataBase of Japan</i>
DEGs	Genes Diferencialmente Expressos, <i>Differently Expressed Genes</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, <i>Desoxyribonucleic Acid</i>
EMBL	Laboratório Europeu de Biologia Molecular, <i>European Molecular Biology Laboratory</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ET	Etileno, <i>Ethylene</i>
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FT	Fator de transcrição, <i>Transcription Factor</i>
MEGA	Análises Genéticas da Evolução Molecular, <i>Molecular Evolutionary Genetic Analysis</i>
MEME	Multiple EM for Motif Elicitation
mRNA	RNA mensageiro, <i>Messenger RNA</i>
NCBI	Centro Nacional para Informação Biotecnológica, <i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGS	Sequenciamento de Nova Geração, <i>Next Generation Sequencing</i>
pb	Pares de bases, <i>Base pairs</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PR	Proteína Relacionada À Patogênese, <i>Pathogen Related</i>
RNA	Ácido Ribonucleico, <i>Ribonucleic Acid</i>
RNA-Seq	Sequenciamento do RNA, <i>RNA Sequencing</i>
qPCR	PCR quantitativa em Tempo Real, <i>Quantitative Real Time PCR</i>
SA	Ácido salicílico, <i>Ácido salicílico</i>
UniProt	Banco de Dados Universal de Proteínas, <i>Universal Protein Database</i>

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

- Figura 1. Sintomas de *Xanthomonas citri* (cancro bacteriano). A – folha; B – pecíolo; C – ramo; D – baga. 19
- Figura 2. Esquema das vias de sinalização envolvidas nas respostas aos estresses abiótico e biótico..... 33
- Figura 3. Estrutura dos FTs bHLH, representada por duas alfa-hélices que medeiam a dimerização, e um domínio básico, que se liga às sequências E-box no DNA. 35

CAPÍTULO II:

- Figura 1. Sintomas de *Xanthomonas citri* (cancro bacteriano). A – folha; B –pecíolo; C –ramo; D – baga..... 19
- Figura 2. Esquema das vias de sinalização envolvidas nas respostas ao estresse abiótico e biótico..... 33
- Figura 3. Estrutura dos FTs bHLH, representada por duas alfa-hélices que medeiam a dimerização, e um domínio básico, que se liga às sequências E-box no DNA. 35
- Figura 1. Ponto isoelétrico e peso molecular preditos para as proteínas bHLH de videira. Cada ponto observado no gráfico representa uma sequência candidata. ... 57
- Figura 2. Alinhamento de sequências proteicas dos FTs bHLH de *V. vinifera*. (A) Aminoácidos conservados. (B) Domínios conservados. As estrelas indicam resíduos altamente conservados identificados previamente na literatura. 58
- Figura 3. Árvore fenética construída com sequências de proteínas de *VvbHLH* e *V. davidii*. 59
- Figura 4. Árvore fenética, análise de motivos e perfil de expressão de FTs bHLH de *Vitis* spp. sob inoculação por *X. citri*. Cada ramo colorido representa um grupo distinto e as sequências que possuem asterisco apresentam $\text{Log}_2\text{FC} > 0.50$ e < -0.50 . Os blocos de motivos conservados em vermelho, azul e verde representam a Logo 1, 2 e 3, respectivamente. 60
- Figura 5. Perfil de expressão in silico ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ e < -1) dos FTs bHLH de *Vitis* spp. sob inoculação por *X. citri*. 61
- Figura 6. Representação esquemática dos 19 pseudocromossomos de videira com a localização de 96 genes bHLH. Os genes que formaram clusters estão identificados com uma barra ao lado. 62
- Figura 7. Anotação funcional via Ontologia Gênica (GO) de genes *VvbHLH* e análise de enriquecimento de promotores (A) Processos biológicos. (B.) Função Molecular. (C) Classe proteica..... 64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO GERAL E REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1. Ômicas utilizadas no estudo da Biologia de Sistemas.	24
Tabela 2. Softwares utilizados na bioinformática e suas aplicações.	27
Tabela 3. Ferramentas utilizadas para caracterização de genes candidatos.	28
Tabela 4. Trabalhos recentes com utilização de transcriptomas em videira.....	31
Tabela 5. Estudos recentes realizados com fatores de transcrição em videira.	34
Tabela 6. Banco de dados públicos com informações disponíveis para fatores de transcrição de plantas.	37

SUMÁRIO

1. Introdução	15
2. Revisão de Literatura	17
2.1 Gênero <i>Vitis</i> : aspectos botânicos, taxonomia e origem	17
2.2 Cancro bacteriano	17
2.2.1 Origem, características e disseminação	17
2.2.2 Formas de controle	20
2.2.3 Fontes de resistência	21
2.3. Recursos genéticos, melhoramento e biotecnologia de videiras	21
2.3.1. Programas de melhoramento da videira no Brasil	22
2.3.2 Cultivares resistentes a patógenos	23
2.4. Biologia de Sistemas	23
2.5. Bioinformática: importância e aplicações	26
2.6. Genomas e transcriptomas sequenciados em videira	28
2.6.1 Genômica da videira	29
2.6.2 Transcriptoma da videira	30
2.7. Fatores de transcrição (FTs) e seu papel na defesa contra patógenos	32
2.7.1. Mecanismos de ação na defesa vegetal	32
2.7.2 Fatores de transcrição bHLH	34
2.7.3 Bancos de dados específicos para TFs em plantas	36
REFERÊNCIAS	37
Capítulo II	50
Introdução	51
Material e Métodos	52
Material vegetal e imposição do estresse	52
Extração de RNA, construção das bibliotecas de RNA-Seq, sequenciamento e síntese de cDNA	53
Análise de qualidade do sequenciamento e montagem das bibliotecas	54
Identificação e caracterização de genes bHLH	54
Identificação de motivos e análise fenética	54
Localização cromossômica e análise de duplicação	55
Análise de promotores e anotação GO	55
Análise de expressão <i>in silico</i>	56
Resultados	56
Mineração e caracterização dos FTs bHLH	56
Propriedades físico-químicas e localização subcelular	56
Análise de motivos conservados, fenograma e perfil de expressão <i>in silico</i>	57
Localização cromossômica e duplicação gênica	62
Ontologia Gênica (GO) de proteínas VvbHLH	63

Discussão	65
Identificação de genes bHLH	65
Resíduos de aminoácidos conservados no domínio bHLH e sua capacidade de ligação ao DNA	65
Localização cromossômica	66
Classificação das proteínas VvbHLH baseada na similaridade fenética e análise de motivos	67
Análise <i>in silico</i> de transcritos VvbHLH diferencialmente expressos e anotação GO	68
Considerações Finais	70
REFERÊNCIAS	71

RESUMO

A videira é uma das espécies frutíferas de grande importância para o agronegócio brasileiro, devido à sua boa adaptação em regiões distintas, sendo cultivada desde o semiárido ao clima temperado, bem como pela sua produção, que pode atingir mais de duas safras por ano no submédio do Vale do São Francisco (VSF), Pernambuco / Bahia. No entanto, a viticultura tem sofrido com problemas fitossanitários

relacionados ao ataque da bactéria *Xanthomonas citri*, causadora do cancro bacteriano, que tem comprometido as plantações de diversas espécies de *Vitis* cultivadas nessa região. Fatores de transcrição (FTs) são proteínas responsáveis por regular genes alvos que participam de vias metabólicas envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo a resposta a estresses abióticos e bióticos. As proteínas basic helix-loop-helix (bHLH) constituem a maior família de FTs em organismos eucariontes, com atuação reconhecida na regulação da deiscência de frutos, desenvolvimento de anteras e células epidérmicas, sinalização hormonal, biossíntese de metabólitos secundários, tolerância/resistência a estresse abióticos e bióticos, entre outros. Até o nosso conhecimento, não existem relatos sobre a atuação dessas proteínas na interação patogênica entre a videira e a bactéria *X. citri*. Dessa forma, o presente trabalho se propôs a avaliar o papel de FTs bHLH relacionados ao processo de defesa de *Vitis* spp. inoculadas com *X. citri* avaliando sua expressão, diversidade e função no contexto em questão. Bibliotecas de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) foram geradas a partir de ensaio experimental utilizando clones de duas cultivares (Red Globe e IAC-572) inoculadas com *X. citri*. De posse do transcriptoma, foram realizadas as análises *in silico* através de ferramentas de bioinformática, onde, inicialmente, foram obtidas sequências sondas disponíveis em bancos de dados públicos (NCBI e Uniprot) para mineração de sequências candidatas no genoma de *Vitis vinifera* disponível no Phytozome. Domínios e motivos conservados foram verificados no batch CD Search e MEME, respectivamente. O ponto isoelétrico foi predito no *Isoelectric point calculator*, o peso molecular por meio do JVirGel 2.0 e a localização subcelular através do Cell-PLoc 2.0. A árvore fenética foi gerada por meio do MEGA7, e a análise de ontologia gênica foi enriquecida por meio do GO consortium. O perfil de expressão *in silico* foi observado por meio de *heatmaps* gerados via software CLUSTER 3.0 e visualizados pelo TreeView. Foram identificadas 102 sequências com domínios completos e motivos conservados, as quais foram nomeadas de acordo com a localização cromossômica, VvbHLH01 a VvbHLH102. O ponto isoelétrico variou de 4.5 a 9.8, o peso molecular de 10,19 kDa a 69,30 kDa, e todas as proteínas apresentaram localização predita no núcleo celular. Os motivos conservados identificados foram correspondentes à região básica e a hélice-alça-hélice que constituem o domínio característico de FTs bHLH. Além disso, foram identificados 20 resíduos conservados. Na árvore fenética, além das sequências proteicas de *Vitis* spp. foram utilizadas sequências de *Vitis davidii*, sendo verificada a formação de 25 subgrupos.

O grupo XII destacou-se por ser o mais representativo, e possuir três domínios em sua sequência. Com o enriquecimento da ontologia gênica foi possível verificar que o processo biológico mais enriquecido corresponde à detecção de bactéria e atividade de proteínas quinases. Foram mapeados 96 genes em 18 dos 19 pseudocromossomos de videira, e identificados eventos de duplicação em tandem. A análise de expressão *in silico* identificou 34 genes diferencialmente expressos (Log FC>0.50 e <-0.50), com a maior parte dos transcritos sendo induzida no híbrido IAC-572. A identificação desses genes é de grande importância para uso em estudos posteriores que envolvam eventos de transformação ou edição genética (CRISPR-Cas9) em videira, os quais poderão contribuir para o lançamento de cultivares resistentes ao cancro bacteriano.

Palavras-chave: Cancro bacteriano; Defesa vegetal; RNA-Seq; *Vitis vinifera*.

ABSTRACT

The vine is one of fruit species of great importance for Brazilian agribusiness, due its good adaptation in different regions, being cultivated from the semi-arid to temperate climate, as well as for its production, which can reach more than two harvest per year in São Francisco Valley (VSF) sub-middle region, Pernambuco/Bahia. However, viticulture has suffered with phytosanitary problems related to *Xanthomonas citri*

bacteria infection, which causes bacterial canker, which has impaired several species of *Vitis* cultivated in this region. Transcription factors (TFs) are proteins responsible for regulating target genes that participate in metabolic pathways involved in several biological processes, including response to abiotic and biotic stresses. Basic helix-loop-helix (bHLH) proteins constitute the largest family of TFs in eukaryotic organisms, presenting role in fruit dehiscence regulation, development of anthers and epidermal cells, hormonal signaling, secondary metabolite biosynthesis, tolerance/resistance to abiotic and biotic stress, among others. There are no reports about the role of these proteins in pathogenic interaction between grapevine and *X. citri* bacteria. Thus, the present work aimed to evaluate bHLH TFs role related to defense process of *Vitis* spp. inoculated with *X. citri* evaluating its expression, diversity, and function. RNA-Seq libraries (Illumina HiSeq2500) were generated from an experimental assay using clones of two cultivars (Red Globe and IAC-572) inoculated with *X. citri*. Owing the transcriptome, *in silico* analyzes were performed using bioinformatics tools, where, initially, probe sequences available in public databases (NCBI and Uniprot) were obtained for mining candidate sequences in *Vitis vinifera* genome available in Phytozome. Domains and motifs were evaluated in batch CD-Search and MEME, respectively. Isoelectric point was predicted in 'Isoelectric point calculator', molecular weight predicted through JVirGel 2.0 and subcellular localization predicted using Cell-PLoc 2.0. The phenetic tree was generated using MEGA7, and gene ontology analysis was enriched using the GO consortium data. The *in silico* expression profile was observed through heatmaps generated via CLUSTER 3.0 software and visualized by TreeView. Where identified 102 sequences with complete domains and conserved motifs, named according to their chromosomal location, from VvbHLH01 to VvbHLH102. The isoelectric point ranged from 4.5 to 9.8, molecular weight from 10.19 kDa to 69.30 kDa, and all proteins showed predicted location in the cell nucleus. The conserved motifs identified corresponded to basic region and the helix-loop-helix, that constitute bHLH characteristic domain. In addition, 20 conserved residues were identified. In phenetic tree, additionally to *Vitis* spp. protein sequences, *Vitis davidii* sequences were used, and the 25 bHLH subgroups were verified. Group XII stood out for being the most representative, presenting three domains in its sequence. The gene ontology enrichment enabled verify that the most enriched biological process corresponds to bacteria detection and protein kinase activity. Were mapped 96 genes in 18 of the 19 grapevine pseudochromosomes, and tandem duplication events were identified. *In*

silico expression analysis identified 34 differentially expressed genes (Log FC>0.50 and <-0.50), with most transcripts being induced in the hybrid IAC-572. The identification of these genes is of great importance for use in further studies involving transformation events or genetic editing (CRISPR-Cas9) in grapevine, which could contribute to development of resistant cultivars to bacterial infection.

Keywords: Bacteriano canker; Plant defense; RNA-Seq; *Vitis vinifera*.

CAPÍTULO I

Considerações gerais

1. Introdução

A videira é uma cultura amplamente cultivada no mundo, com destaque por ser uma commodity de grande importância mundial devido à sua utilização para fabricação de vinhos, espumantes e para consumo *in natura*. No Brasil, a área plantada com videira atingiu 74.750 hectares em 2020, o que corresponde a 1,1% do total mundial, produzindo 1.396.010 toneladas de uvas nesse período (IBGE, 2020).

O cultivo de uvas é relevante na economia do país, por apresentar grande extensão territorial associada aos diferentes climas, o que contribui para o cultivo de uma grande diversidade varietal nas diferentes regiões. Até meados do século XX, a viticultura se restringia aos estados do Sul, São Paulo e Minas Gerais, no entanto, houve uma expansão considerável da cultura com plantio de uvas adaptadas ao submédio do Vale do São Francisco (SVSF), localizado nos estados de Pernambuco e Bahia, destacando-se por produzir mais de duas safras por ano (Camargo *et al.*, 2011). Em poucos anos o SVSF tornou-se o maior polo de exportação de uvas do Brasil, com as cultivares BRS Vitória e Arra 15. Em 2019 o SVSF exportou aproximadamente 42 mil toneladas, e em 2020, houve um faturamento de cerca de U\$91.654,388 considerando-se os estados de Pernambuco e Bahia gerado através da viticultura (MDIC, 2020).

Em relação à fitossanidade dos parreirais, existem relatos sobre diversas doenças que afetam e causam prejuízos consideráveis para a viticultura, como o míldio e o oídio, que são amplamente distribuídos pelo mundo. Há outras doenças mais restritas a regiões que por vezes são influenciadas pela cultivar plantada e condições ambientais favoráveis, como é o caso da *Xanthomonas citri* pv. *viticola* – bactéria causadora do cancro bacteriano – que é muito agressiva e disseminada nos parreirais no VSF (Dantas *et al.*, 2010). Não há conhecimento, até o momento, sobre uma fonte de resistência para essa bactéria em videira, sendo o plantio de cultivares com resistência moderada à doença como forma de controle mais indicada (Chand, 1992). A BRS Cora e o híbrido IAC-572 apresentam resistência moderada à doença,

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

o que as tornam promissoras para aplicação em programas de melhoramento da videira (Zucal *et al.*, 2016). Por outro lado, as cultivares Red Globe e Itália Melhorada, apesar de muito difundidas no mercado, são as mais suscetíveis ao cancro bacteriano.

Nos últimos anos, estudos com tecnologias de sequenciamento de transcriptomas combinados com bioinformática cresceram significativamente, e facilitaram o conhecimento da relação planta-patógeno, uma vez que a análise transcriptômica fornece dados sobre genes diferencialmente expressos sob condições de estresse específicas (Liu *et al.*, 2020). Muitos destes genes são essenciais para a defesa vegetal, como por exemplo, genes codificantes de enzimas relacionadas à biossíntese de hormônios, como o ácido salicílico e etileno, além de genes responsáveis pelo transporte de água e íons, ou codificantes de proteínas relacionadas à expressão, regulação e transdução de sinais de estresses bióticos e abióticos, como os Fatores de Transcrição (FTs) (Benko-Iseppon *et al.*, 2011).

Os FTs são importantes reguladores responsáveis por ativar ou reprimir a transcrição de genes-alvo. A família bHLH (*basic Helix-Loop-helix*) representa uma das maiores famílias de FTs, se encontra tanto em animais e vegetais. Seu nome é devido ao domínio conservado bHLH, que compreende cerca de 60 aminoácidos, sendo composto por uma região básica e uma hélice-alça-hélice (Gao *et al.*, 2019). FTs bHLH atuam como ativadores ou repressores da transcrição, desempenhando um papel importante em processos metabólicos e de desenvolvimento (Feller *et al.*, 2011), bem como são comumente relatados atuando em resposta a estresse abióticos, como frio, seca e estresse salino (Feng *et al.*, 2013). Recentemente, Gao *et al.* (2019) comprovou a relação de bHLH na videira com envolvimento na resposta ao ataque dos fungos causadores do míldio e oídio, ressaltando a multifuncionalidade dessa família gênica. No entanto, pouco se sabe sobre aspectos moleculares relacionados à infecção causada pela bactéria *X. citri* em videira.

Dessa forma, este estudo teve como objetivo identificar e caracterizar, por meio de análises *in silico*, genes diferencialmente expressos da família bHLH durante infecção de duas cultivares (Red Globe e IAC-572) de videira inoculadas por *X. citri*. visando selecionar candidatos promissores para validação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).

2. Revisão de Literatura

2.1 Gênero *Vitis*: aspectos botânicos, taxonomia e origem

O gênero *Vitis* pertence à família *Vitaceae*, a qual possui aproximadamente 1000 espécies agrupadas em 17 gêneros, com plantas arbustivas ou lianas lenhosas morfológicamente caracterizadas pela presença de gavinhas opostas às folhas, necessitando de tutores para sustentação (Mullins *et al.*, 1992). As plantas pertencentes ao gênero *Vitis* são do tipo trepadeiras perenes, podendo ser monoicas ou dioicas, e suas inflorescências possuem flores que podem ser hermafroditas perfeitas masculinas, ou femininas. As folhas são alternadas durante a maior parte de sua vida, exceto quando juvenil, que podem ser simples ou compostas (Keller, 2015). A raiz é geralmente axial ou pivotante, bem ramificada, e em condições favoráveis, podem chegar a 20 metros de profundidade, sendo que a maioria das raízes se encontra nos primeiros 50 cm do solo, mas podem atingir vários metros de comprimento (Giovannini, 2014).

O gênero *Vitis* destaca-se por ser um dos mais antigos e cultivados pela humanidade, e por possuir grande importância econômica, uma vez que é o único gênero da família *Vitaceae* que possui frutos comestíveis (Leão e Borges, 2009). Suas plantas são vinhas perenes, ou arbustos com gavinhas, englobando cerca de 60 a 70 espécies (Keller, 2015). Anteriormente, o gênero foi dividido em dois subgêneros, o *Muscadinia* Planch, com número cromossômico $2n = 40$, e o *Euvitis* Planch, com $2n = 38$. No entanto, essa classificação vem caindo em desuso entre os taxonomistas, uma vez que o número de cromossomos difere entre as espécies do gênero e raramente o cruzamento entre os dois subgêneros produz híbridos férteis (Leão e Borges, 2009).

2.2 Cancro bacteriano

2.2.1 Origem, características e disseminação

O cancro bacteriano da videira é causado pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, a qual foi descrita inicialmente na Índia como *Pseudomonas viticola* sp. nov. (Nayudu, 1972). Sua ocorrência ficou restrita a região por muitos anos, sendo

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

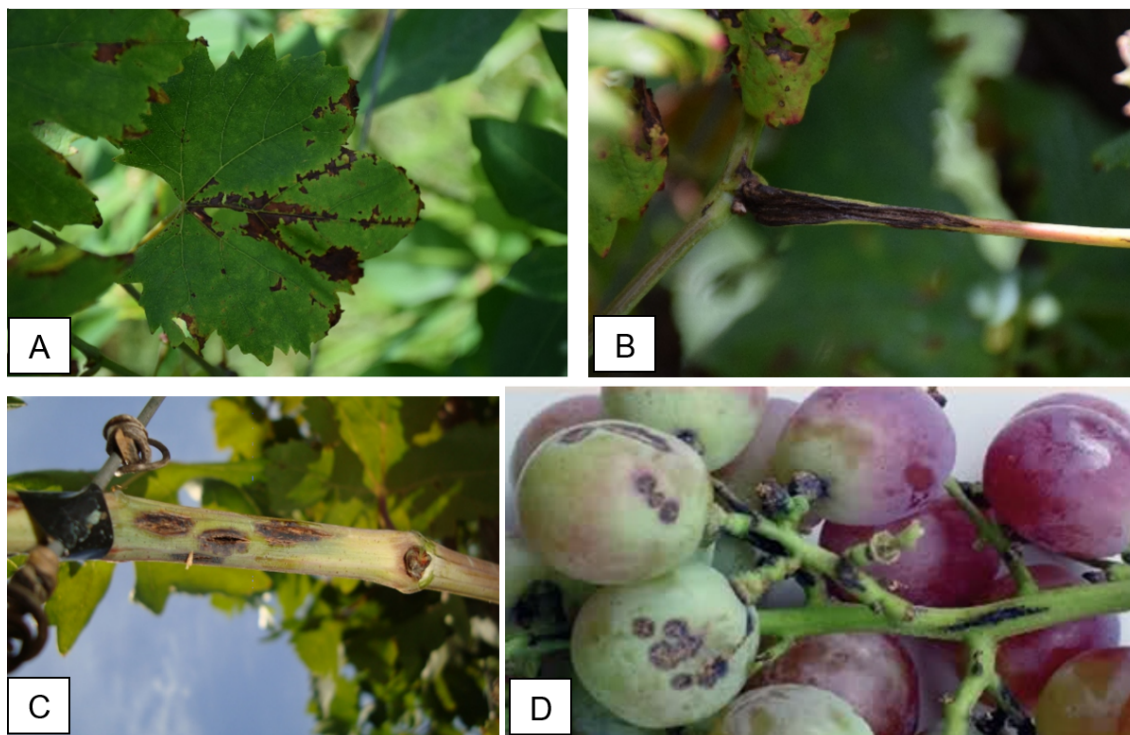
considerada de baixa importância até a ocorrência de surtos nos anos 80 (Chand e Kishun, 1990).

Em 1998, no Brasil, especificamente nos estados de Pernambuco e Bahia, foi relatada uma nova doença que estava afetando parreirais da cultivar Red Globe (Ferreira *et al.*, 2019). Posteriormente, videiras infectadas com o cancro bacteriano foram detectadas em outros estados brasileiros (Halfeld-Vieira e Nechet 2006; Rodrigues Neto *et al.*, 2011), onde medidas de erradicação foram ligeiramente adotadas, uma vez que a *X. citri* é classificada como praga quarentenária e está sujeita a medidas regulatórias (MAPA, 2014).

O agente causador da doença no Brasil foi identificado inicialmente como *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, no entanto, estudos baseados em sequenciamento multilocus e análise de genoma (Parkinson *et al.*, 2009; Midha e Patil, 2014; Ferreira *et al.*, 2019) apontaram este patógeno como pertencente a espécie *X. citri*, e recentemente, Da Gama *et al.*, (2018) sugeriram uma modificação na sua classificação, renomeando a espécie para *X. citri* pv. *viticola*.

Os sintomas da doença podem aparecer em diversas partes da planta. Nas folhas, surgem como pequenos pontos necróticos de 1-2 mm de diâmetro, que quando coalescem podem causar morte em extensas áreas do limbo foliar, pontos com ou sem halos amarelados. Nas nervuras e pecíolos das folhas, como também na ráquis e ramos dos frutos formam-se manchas escuras, que quando evoluem tornam-se fissuras longitudinais designadas de cancro, enquanto que as bagas crescem desuniformes em tamanho e cor, podendo também apresentar áreas necróticas (Figura 1) (Nascimento e Mariano, 2004).

Figura 1. Sintomas de *Xanthomonas citri* (cancro bacteriano). A – folha; B – pecíolo; C – ramo; D – baga.



Fonte: Adaptado de Garrido, (2015).

A intensidade dos sintomas pode variar de acordo com as condições ambientais. No semiárido brasileiro a doença tem se mostrado mais severa no primeiro semestre do ano devido às chuvas, uma vez que esta condição propicia a disseminação e infecção da bactéria (Lima e Moreira, 2002). Em condições não ideais para a infecção, a bactéria é capaz de sobreviver em cancras formados nas plantas em forma de inóculos, e com a ocorrência de chuvas este material é abundantemente exsudado a partir destes cancras, disseminando a bactéria. Restos de materiais vegetativos podados e remanescentes no pomar também podem ser responsáveis pela sobrevivência do patógeno (Araújo, 2001; Lima, 2008).

A disseminação a longas distâncias ocorre através do material propagativo de copa e porta-enxerto infectado e utilizado na enxertia ou formação de mudas. Em plantas do mesmo parreiral ou próximas o vento forte associado à chuva se torna um dos maiores responsáveis pela disseminação. O vento também pode causar ferimento nas folhas facilitando a entrada da bactéria na planta, além de manejos como podas e desbrotas realizadas em períodos chuvosos em cultivares suscetíveis (Lima, 2008).

2.2.2 Formas de controle

A incidência do cancro bacteriano é uma das maiores preocupações fitossanitárias no VSF, visto que a região é responsável por exportar quase que toda a uva de mesa do Brasil. Além da doença causar queda na produtividade da videira, ela também impede que o material vegetativo proveniente de estados atingidos seja transitado, limitando a exportação para mercados internos (Ferreira, 2016).

Como mencionado anteriormente, pela bactéria *X. citri* ser causadora de uma doença regulamentada, com classificação em praga quarentenária (A2), a mesma está sujeita a um programa oficial de controle segundo a Instrução Normativa (IN) Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014 (MAPA, 2014), na qual consta toda a regulamentação de procedimentos a serem adotados para controle da doença. Segundo a IN, em áreas onde não há sua ocorrência, é necessário usar apenas materiais propagativos saudáveis, impedir a entrada de pessoas e equipamentos provenientes de áreas contaminadas, e realizar inspeção visual frequente nas plantas, comunicando imediatamente quaisquer suspeitas de contaminação nos parreirais. Caso a praga seja identificada, o proprietário deve eliminar de imediato todas as plantas do parreiral por meio de arranquio e queima, incluindo daninhas, ficando proibido o plantio de cultivares suscetíveis ao cancro bacteriano por 3 anos no local (BRASIL, 2014).

Em áreas onde há ocorrência da doença, fica impedido a entrada de pessoas ou equipamentos provenientes de municípios sem ocorrência, com realização de podas em variedades mais suscetíveis em meses com menores índices pluviométricos, desinfestação dos equipamentos utilizados após as podas ou colheitas utilizando produtos sanitizantes, e por fim, a eliminação de todo o material resultante das podas através de queima ou enterro, seja para variedades suscetíveis ou sintomáticas (BRASIL, 2014). Desde o aparecimento da doença foram realizadas diversas pesquisas direcionadas a encontrar uma forma de controle químico, onde a eficiência variou, não chegando a uma eficiência comprovada (Chand *et al.*, 1994; Chand *et al.*, 1992; Lima e Mashima., 2000; Nascimento *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2000).

Por não existir um método eficiente para o controle do cancro bacteriano da videira, medidas preventivas para o controle e erradicação são as mais recomendadas, sendo o uso de sanitizantes para desinfetar as ferramentas de

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

corde uma das principais (Naue *et al.*, 2014). É recomendável que antes da implantação do parreiral, a propriedade seja cercada para que haja o controle do acesso de pessoas e veículos. Além disso, o uso de quebra-ventos é recomendado para proteger o parreiral da disseminação da *X. citri* em gotas de água transportadas pelo vento (Nascimento e Mariano, 2004).

2.2.3 Fontes de resistência

Até o momento não se tem conhecimento de cultivares que sejam completamente resistentes ou imunes ao cancro bacteriano. No entanto, os níveis da severidade da doença são demasiadamente variáveis, e fontes de resistência moderadas foram identificadas nas cultivares BRS Cora e Moscato, utilizadas para produção de vinho, entre outros acessos usados para processamento ou como porta enxertos (Zucal *et al.*, 2016).

Em cultivares destinadas ao uso em mesa ou para produção de sucos amplamente cultivadas no Brasil foi verificada baixa suscetibilidade ao cancro bacteriano, com destaque para a BRS Isis, BRS Magna, BRS Nubia, BRS Linda e BRS Vitória, lançamentos recentes da Embrapa, as quais foram avaliadas em condições de campo sob condições ambientais favoráveis a infecção da doença (Lourenço *et al.*, 2018).

Híbridos não comerciais (CPATSA 15-06, 15-06T, 21-42, 05-01, 21-32 e 14-05G) possuem potencial para utilização em programas de melhoramento por apresentarem resistência moderada ao cancro bacteriano (Farias *et al.*, 2016). O híbrido IAC-572, considerado moderadamente resistente à doença, é um porta-enxerto bastante utilizado no VSF (Peixoto Nascimento *et al.*, 2006). Em estudos realizados, a cultivar Red Globe foi utilizada como padrão para nível de suscetibilidade, por ela ser a cultivar mais suscetível conhecida (Peixoto Nascimento *et al.*, 2006; Farias *et al.*, 2016). Portanto, é de interesse nacional que a interação da videira com a *X. citri* seja elucidada, de modo que programas de melhoramento possam desenvolver cultivares resistentes ao cancro bacteriano, trazendo melhorias no manejo da cultura.

2.3. Recursos genéticos, melhoramento e biotecnologia de videiras

2.3.1. Programas de melhoramento da videira no Brasil

No Brasil, as pesquisas voltadas ao melhoramento genético e técnicas de produção da uva tiveram seu início em meados de 1887 no Instituto Agrônomo de Campinas (IAC) em São Paulo, que anos depois culminou na criação de três programas de melhoramento genético, nas cidades de São Roque, Jundiaí, e Campinas, respectivamente. As pesquisas iniciaram com a introdução de variedades europeias e americanas, que resultaram na seleção das cultivares Seibel 2, Catawba Rosa, Seyve Villard, entre outras, que por décadas foram de grande importância, e posteriormente, foram substituídas pelas cultivares americanas Isabel, Bordô e Niagara, as quais foram cultivadas em todo o país devido as suas características desejáveis. Além disso, o IAC também foi responsável pelo desenvolvimento de porta enxertos importantes, como o IAC 313 e 572, que foram a base para o plantio de uvas na região do VSF (Moura *et al.*, 2018).

Na década de 70, na estação experimental de Caxias do Sul – RS, a Embrapa Uva e Vinho deu início ao Programa de Melhoramento “Uvas do Brasil” visando à obtenção de novas cultivares destinadas a produção de uvas de mesa, vinhos e sucos, mais adaptadas as diversas condições climáticas, como também resistentes as principais doenças observadas no país. A partir desse programa foram lançadas 21 cultivares que apresentaram alta produtividade, em diferentes ciclos de produção e resistentes ao míldio e oídio. Em 2003, foram lançadas as primeiras variedades de uva sem sementes, a BRS Clara, BRS Linda e BRS Morena (EMBRAPA, 2021).

O programa “Uvas do Brasil” faz uso de métodos clássicos de melhoramento, como seleção massal, clonal e hibridações, e vem trabalhando com uma grande equipe técnica através de parcerias, como a Embrapa Semiárido que possui sua sede em Petrolina – PE, e desde 2003 gera subsídio e sustentabilidade a vitivinicultura do VSF, dando suporte a trabalhos voltados ao melhoramento e adaptabilidade da cultura em região semiárida. O principal objetivo da Embrapa Semiárido é obter híbridos de uva de mesa sem sementes com alta qualidade e resistentes às principais doenças da região (Leão e Borges, 2009).

Em 2020, a Embrapa Semiárido lançou a variedade “BRS Tainá”, que atende aos requisitos edafoclimáticos da região do VSF. Seu fruto é destinado ao consumo *in natura*, possuindo bagas firmes, boa aderência ao pedicelo, com característica apirênica, e sabor neutro (Leão *et al.*, 2020).

2.3.2 Cultivares resistentes a patógenos

O surgimento de trabalhos envolvendo melhoramento da videira se deu em meados do século 19, quando a filoxera (doença designada pelo ataque de insetos do gênero *Phylloxera*) dizimou vinhedos de *V. vinifera* na Europa, apresentando níveis de resistência variáveis entre as espécies de *Muscadinia*, americanas e asiáticas (Gessler *et al.*, 2011). Diversas espécies de *Muscadinia* possuem genes capazes de conferir resistência ao míldio, tais como a *V. riparia*, *V. rupestris*, *V. aestivalis* var. *lincecumii*, *V. labrusca*, *V. amuriensis*, *V. rotundifolia*, entre outras (Owens, 2008). Para a resistência ao oídio se tem utilizado espécies americanas como *V. riparia*, *V. aestivalis*, *V. cinerea* e *V. rotundifolia*. A transferência destes genes reconhecidamente resistentes para *V. vinifera* tem resultado em inúmeros híbridos, alguns com valor comercial (Alleweldt *et al.*, 1990; Reynolds, 2015).

No Brasil, seleções de cultivares resistentes à doenças vêm sendo continuamente realizadas nos programas de melhoramento das Embrapas Uva e Vinho e Semiárido, paralelamente ao interesse comercial direcionado para a produção de vinhos, espumantes, sucos e consumo *in natura*, tornando o cenário para o lançamento de novas cultivares bastante promissor (Ritschel *et al.*, 2015). Estes programas vêm lançando novas cultivares tendo como foco a produtividade, e principalmente, a resistência aos fungos causadores de míldio e oídio, com algumas cultivares já conhecidas e cultivadas. No entanto, atualmente as pesquisas estão sendo direcionadas ao cancro bacteriano, uma vez que ainda não há relatos de cultivares resistentes à doença, especialmente em estudos desenvolvidos no VSF.

2.4. Biologia de Sistemas

Premissas sobre o estudo da Biologia de Sistemas circundam o meio científico desde meados da década de 50, pela necessidade de atribuir uma abordagem ao estudo da complexidade recorrente ao organismo e meio ambiente. O conceito de Biologia de Sistemas se dá como sendo uma área que busca entender as interações entre os componentes de um sistema biológico, investigando como as interações influenciam a função e o comportamento do sistema. Nas décadas seguintes, a Biologia Molecular cresceu substancialmente, e com a chegada da genômica

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

funcional muitos dados tornaram-se disponível em bancos de dados, possibilitando a construção de modelos mais amplos. A partir dos anos 2000, quando o Instituto de Biologia de Sistemas – *Institute for Systems Biology* – teve sua fundação em Seattle nos Estados Unidos, o campo se tornou próprio com estímulo dos dados “ômicos” e da Bioinformática, que visavam o entendimento sistemático da Biologia (Poloni *et al.*, 2014).

As descobertas científicas recentes têm produzido uma quantidade de dados sem precedentes, sendo necessária uma abordagem interdisciplinar capaz de processar todas as informações disponíveis. O principal papel da Biologia de Sistemas é entender as funções de todos os produtos gênicos, e como eles interagem nas vias celulares, para assim entender o funcionamento do sistema. A essência deste campo de estudo é modelar organismos para prever como os mesmos interagem quando alguma via é afetada, e isto requer a atuação de pesquisadores de diversas áreas, uma vez que a Biologia de Sistemas é uma ciência essencialmente multidisciplinar (Tabela 1) (Gillaspy, 2008).

Tabela 1. Ômicas utilizadas no estudo da Biologia de Sistemas. Fonte: Poloni *et al.*, (2014).

Área	Molécula de interesse e/ou tipo de análise
Genômica	DNA
Transcriptômica	Transcritos
Proteômica	Proteínas
Interatômica	Interações proteicas
Interferômica/microRNômica	RNAi/miRNA
Epigenômica	Modificações na cromatina e no DNA
Metabolômica	Metabólitos
Fluxômica	Alterações dinâmicas de moléculas dentro de uma célula ao longo do tempo
Biômica	Bioma
Glicômica	Totalidade de carboidratos
Farmacogenômica	Genes que definem o comportamento de medicamentos
Nutrigenômica	Relação entre a dieta e os genes

individuais	
Toxicogenômica	Estrutura e atividade do genoma e os efeitos biológicos adversos da exposição à xenobióticos
Imunômica	Função molecular associada aos transcritos de mRNA relacionados à resposta imune

As tecnologias ômicas são os principais fornecedores de conjuntos de dados da Biologia de Sistemas, sendo os quatro principais campos de pesquisas a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica, que fornecem informações sobre o nível de expressão dos genes, transcritos, proteínas e metabólitos, respectivamente. No entanto, os dados brutos resultantes destas análises ainda são eventualmente massivos e sem conexões claras (Karahalil, 2016; Aizat *et al.*, 2018).

A genômica fornece dados através de análises das sequências de nucleotídeos, estrutura do genoma e sua composição, possibilitando identificar variações genéticas em indivíduos, relação entre diferentes genes, e resposta a doenças ou terapias (Karahalil, 2016). A transcriptômica se dá pelo conjunto de transcritos (mRNAs) de um organismo resultantes de uma determinada situação, como por exemplo, amadurecimento de fruto, estresses, entre outras, o transcriptoma ainda indica os transcritos que naquela situação estavam diferencialmente expressos (induzidos ou reprimidos) (Wang *et al.*, 2009).

A proteômica, por sua vez, busca investigar o conjunto de proteínas expressas sob determinado estado fisiológico e escala temporal, além de avaliar as mudanças na expressão de proteínas em resposta a condições e fatores biológicos (Pandey e Mann, 2000; Aebersold e Mann, 2003). A metabolômica é uma das mais recentes ômicas abordadas na Biologia de Sistemas. Visa elucidar o perfil metabólico de um sistema biológico com uso de técnicas analíticas e análise multivariada de dados (MP, 2021).

Todo esse conjunto das ciências ômicas geram milhares de dados que precisam ser analisados eficientemente para possibilitar a interpretação das informações e formulação de hipóteses. Com isso, a integralização dos dados se apresenta como uma maneira eficiente para sua análise, possibilitando resultados mais precisos e robustos (Gomez-Cabrero, 2014). Nesse contexto, a bioinformática surge para facilitar a manipulação e processamento destes dados de forma integrada, gerando predições sobre as interações biológicas.

2.5. Bioinformática: importância e aplicações

A bioinformática teve seu ponto de partida no início da década de 50, quando James Watson e Francis Crick publicaram seu clássico trabalho sobre a estrutura tridimensional da hélice do DNA na revista *Nature*. A partir dessa descoberta foi possível compreender detalhes estruturais da molécula bem como sua replicação e tradução do material genético. De forma geral, a bioinformática segue duas vertentes: a tradicional, que aborda diretamente as sequências de nucleotídeos e aminoácidos; e a estrutural, que trata de uma visão tridimensional de proteínas, abrangendo técnicas computacionais e de modelagem molecular (Verli, 2014).

Paralelamente ao crescimento da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) nos últimos anos, houve um aumento significativo no desenvolvimento de *softwares* de bioinformática com foco no processamento de dados gerados a partir das diversas metodologias de sequenciamento (Schloss *et al.*, 2009; Rognes *et al.*, 2016). No entanto, com o aumento no volume de dados cresce também a complexidade dos problemas a serem analisados e a necessidade de utilização de plataformas, equipamentos e redes mais robustas. Por outro lado, pesquisadores com menos recursos e que demandam de análises mais simplificadas podem trabalhar também neste campo, tornando a bioinformática uma área acessível quando comparada a outras (Verli, 2014).

A bioinformática possui papel fundamental na análise de dados de genomas e transcriptomas e na interpretação de sistemas e interações biológicas. Além disso, o uso de suas ferramentas possui aplicação nas mais diversas áreas. Na saúde humana e agronomia, por exemplo, auxilia no diagnóstico de doenças, mapeamento genético, descoberta de processos evolutivos, investigação da organização e funcionalidade de células, tecidos, órgãos específicos ou sistemas, bem como possibilita a identificação e caracterização funcional e estrutural de genes ou transcritos que influenciam em condições fisiológicas normais ou adversas, entre outros (Araujo *et al.*, 2008; Barh *et al.*, 2013; Van Emon, 2016). Atualmente, existe uma diversidade enorme de *softwares* disponíveis de forma gratuita que possibilitam a realização de várias análises de bioinformática, como pode ser observado na tabela 2.

Tabela 2. Softwares utilizados na bioinformática e suas aplicações.

Aplicações	Software	Referências
Pré-processamento de <i>reads</i>	FastQC	http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/
	Cutadapt	Martin (2011)
	FASTX-toolkit	http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html/
Montagem	SOPA DE NOVO	Luo <i>et al.</i> (2012)
	TRINITY	Grabherr <i>et al.</i> (2011)
Predição de genes e anotação	Emsembl genome annotation	http://www.ensembl.org/info/genome/genebuild/genome_annotation.html/
	Infernal	Nawrocki <i>et al.</i> (2009)
	(Meta) Genemark	Lomsadze <i>et al.</i> (2005)
	NCBI genome annotation	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK169439/
	Repeat masker	http://www.repeatmasker.org/
Mapeamento	Star	Dobin <i>et al.</i> (2013)
	Tophat	Trapnell <i>et al.</i> (2012)

O aumento de estudos abordando tecnologias de sequenciamento NGS para geração de genomas e transcriptomas, juntamente com ferramentas de bioinformática facilitaram indiscutivelmente os estudos envolvendo plantas e patógenos, possibilitando detectar genes e proteínas específicas associadas à resposta de defesa vegetal a diversos estresses, gerando grandes descobertas (Agrawal *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016).

Na literatura há inúmeras pesquisas recentes que buscaram identificar candidatos promissores (genes resistentes ou tolerantes a determinadas condições) utilizando a técnica de RNA-Seq, que possibilitaram a descoberta e caracterização de candidatos importantes em várias culturas de interesse agrônomo. Han *et al.* (2015), comparando o transcriptoma de cultivares de arroz suscetíveis e resistentes ao vírus *Ustilaginoidea virens* (Cooke.) Takah, concluíram que a resistência ao patógeno está relacionada a ativação de vias de sinalização de resistência, indução de proteínas PR, entre outros. Em videira, foram identificados DEGs possivelmente

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

regulados para proteger a planta da infecção com o míldio (Liu *et al.*, 2020). Em *Citrus sinensis*, Mosharaf *et al.*, (2021) analisaram a relação entre as famílias gênicas AGO, DCL e RDR, com o RNAi, verificando que as mesmas possuem forte relação no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como no controle da expressão ou supressão gênica, e quando em interação com FTs como MYB, Dof, ERF, NAC entre outros, são responsivos à luz, estresse e funções hormonais, Joshi *et al.*, (2021) identificaram genes da família gênica NHX com grande potencial para tolerância a salinidade em soja.

Portanto, é de suma importância a identificação e caracterização de genes candidatos para aplicação no melhoramento genético ou biotecnologia vegetal. Além disso, há diversas ferramentas de bioinformática disponíveis que podem auxiliar na caracterização funcional e estrutural desses genes (Tabela 3).

Tabela 3. Ferramentas utilizadas para caracterização de genes candidatos.

Ferramenta	Função	Referência
BLAST	Alinhamento local	Altschul <i>et al.</i> (1990)
est2genome	Alinhamento de íntrons e éxons com o genoma	(http://embos.s.bioinformatics.nl) (Rice <i>et al.</i> 2000).
Batch CD-Search	Análise de domínios conservados	Marchler-Bauer e Bryant (2004)
MEME	Análise de motivos	Bailey <i>et al.</i> (2015)
JvirGel 2.0	Predição de ponto isoelétrico e peso molecular	Hiller <i>et al.</i> (2006)
MEGA v.7	Análise genética e evolutiva	Kumar <i>et al.</i> (2018)
JPred4	Predição de estrutura secundária de proteína	Drozdetskiy <i>et al.</i> (2015)
SWISS-MODEL	Modelagem comparativa	Arnold <i>et al.</i> (2006)
Gene Structure Display Server (GSDS)	Visualização de composição e posição de exons/íntrons	Hu <i>et al.</i> (2015)
CLUSTER	Análise de expressão <i>in silico</i>	Eisen <i>et al.</i> (1998)
TreeView	Visualização de imagens	Page (1996)
Circos	Geração de diagramas	Krzywinski <i>et al.</i> (2009)

2.6. Genomas e transcriptomas sequenciados em videira

2.6.1 Genômica da videira

Por ser uma espécie de grande importância para a agricultura mundial, a videira foi a primeira planta frutífera a ter seu genoma sequenciado, sendo considerada um modelo biológico de relevância para espécies frutíferas em estudos de Biologia Molecular (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007). No entanto, interpretar a informação biológica de forma adequada a partir de genomas vegetais ainda é um dos principais desafios da Genética agrícola, visto que há uma imensa variação genética presente tanto nas coleções de germoplasmas, como na natureza (Myles *et al.*, 2010).

Estudos de mapeamento genético têm como finalidade identificar *loci* associados a variações fenotípicas e são fundamentais para melhorar cultivares através do melhoramento assistido por marcadores moleculares, como também para estabelecer um entendimento mais amplo da relação genótipo x fenótipo (Mackay, 2009). O mapeamento da variação genômica seja ela natural ou induzida, é uma das formas mais eficazes de entender funções gênicas relacionadas a diversos processos biológicos.

A primeira caracterização genômica da videira foi realizada por um grupo Franco-Italiano (*The French-Italian Public Consortium for Grapevine Genome Characterization*) utilizando o genótipo PN40024 derivado da cultivar *Pinot Noir*, que apresenta quase homozigose completa, cerca de 93% resultantes de autofecundações sucessivas (Jaillon *et al.*, 2007). Considerando apenas um dos haplótipos em cada região heterozigótica, o conjunto de dados consiste em 19.577 contigs e 3.514 supercontigs com um total de 487 Mb, valor próximo ao relatado na literatura para o tamanho do genoma da videira (Lodhi *et al.*, 1995).

Posteriormente, o centro de pesquisa IASMA sequenciou o genoma completo do clone ENTAV 115 da cultivar *Pinot Noir* em colaboração com laboratórios privados e Universidades visando à montagem do genoma, anotação funcional e estrutural dos genes, como também a identificação de polimorfismos. Neste estudo, foi utilizado o método Sanger para sequenciamento do genoma, utilizando uma cobertura de 6,5x, além de Sequenciamento por Síntese (SBS), com cobertura de 4,2x, para a identificação de sítios polimórficos. Após a montagem das sequências, foram identificados 120.000 contigs, que foram combinados com os dados SBS. Foram removidos 10.847 contigs repetitivos em tandem e 7.003 contigs menores

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico que 1.00 bp, restando 58.611 contigs, o que corresponde a 530,9 Mb de DNA genômico (Velasco *et al.*, 2007).

A possibilidade de identificar *locus* de resistência a doenças está crescendo significativamente devido ao avanço das técnicas de Biologia e Genética molecular. Estudos recentes de mapeamento genético têm facilitado a identificação de *locus* associados à resistência da videira ao míldio e oídio, com aproximadamente 48 *locus* já mapeados (Maul *et al.*, 2021). Os *loci* de resistência ao míldio (Ren3 e Ren9) são promissores para o melhoramento, uma vez que regiões QTL foram detalhadas e marcadores vinculados foram desenvolvidos (Zendler *et al.*, 2021). Velasco *et al.* (2007) ao sequenciar o genoma da *V. vinifera* (cultivar *Pinot Noir* clone ENTAV 115) identificaram 341 genes de resistência (R) da classe NBS e vários componentes responsáveis por sinalizar respostas de defesa codificados pelos genes EDS1, PAD4, COI1, MPK4, JAR1, ETR1 e NDR1, descritos como produtos de genes R.

Os dados resultantes dos sequenciamentos mencionados são de grande importância para o melhoramento genético da videira, pois permitem a criação de marcadores específicos para analisar regiões de interesse e selecionar genes candidatos.

2.6.2 Transcriptoma da videira

Organismos vegetais, por serem sésseis, desenvolveram estratégias ao longo de sua evolução que possibilitaram a adaptação a diversos estresses abióticos e bióticos. No entanto, este processo de resposta não é simples e envolve uma grande e complexa rede de transdução de sinais, que desencadeia respostas bioquímicas, fisiológicas e morfológicas (Kunkel e Brooks, 2002; Katagiri, 2004; Benko-Iseppon *et al.*, 2010).

Trabalhos que analisam o genoma em escala global, como também análises direcionadas a estágios vegetais específicos possuem um grande potencial para esclarecer os mecanismos envolvidos na defesa da planta, fornecendo candidatos promissores para utilização em programas de melhoramento (AbuQamar *et al.*, 2016). O início da era genômica trouxe muitas mudanças e avanços para estudos de Biologia molecular, o que possibilitou a realização de análises moleculares cada vez mais aprofundadas envolvendo a resposta vegetal em condições adversas.

A transcriptômica é a ciência responsável por analisar o conjunto de transcritos de um organismo em situações específicas, a exemplo de estresses de natureza biótica ou abiótica, fases de desenvolvimento, entre outros, possibilitando a identificação de transcritos diferencialmente expressos relacionados com tais condições (Wang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2020).

Diversos estudos recentes de transcriptômica com videira encontram-se disponíveis na literatura, envolvendo análises realizadas com diversos estresses e condições distintas, como pode ser observado na tabela 4.

Tabela 4. Trabalhos recentes com utilização de transcriptomas em videira.

Condição analisada	Metodologia Utilizada	Principais Impactos	Referência
Estresse hídrico – seca	<i>Microarray</i>	Foi identificado genes candidatos relacionados à resposta específica do genótipo ao déficit hídrico.	Catacchio <i>et al.</i> , 2019
Estresse biótico (Infecção com o fungo <i>Lasiodiplodia theobromae</i> - podridão seca)	Dual RNA-Seq	Avaliou os transcriptomas do hospedeiro e do patógeno simultaneamente, sugerindo que <i>L. theobromae</i> poderia usar a via fenilpropanóide para evitar a resposta de defesa do hospedeiro.	Gonçalves <i>et al.</i> , 2019
Estresse biótico (Infecção com míldio)	RNA-Seq	Construção de biblioteca de transcriptoma com inoculação de <i>P. viticola</i> , e geração de perfil de expressão diferencial, para identificar genes candidatos envolvidos na resistência ao míldio.	Liu <i>et al.</i> , 2020
Estresse por frio	RNA-Seq	Seleção de potenciais genes candidatos para aumento da tolerância ao frio.	Gu <i>et al.</i> , 2020
Estresse biótico por <i>Plasmopora viticola</i> (Infecção com míldio)	RNA-Seq	Relato de múltiplos agrupamentos de genes envolvidos na resposta à infecção por <i>P. viticola</i> . Estes continham uma série de genes parálogos que codificam proteínas provavelmente relevantes para o mecanismo de defesa em videiras.	Shimizu e Suzaki, 2020

Com o aumento de estudos de análises genômica nas últimas décadas, novos métodos voltados para quantificação de níveis de expressão gênica no transcriptoma foram desenvolvidos, sendo o RNA-Seq e DNA *microarray* os métodos de maior destaque com ampla utilização pelos pesquisadores (Kogenaru *et al.*, 2012). Catacchio (2019) e identificaram 1.037 DEGs (genes diferencialmente expressos) relacionados à resposta a estresse hídrico em videira utilizando a metodologia de *Microarray*. Recentemente, Liu (2020) identificaram 1.091 e 849 DEGs em cultivares resistente e suscetíveis ao míldio, respectivamente, a partir de bibliotecas de RNA-Seq.

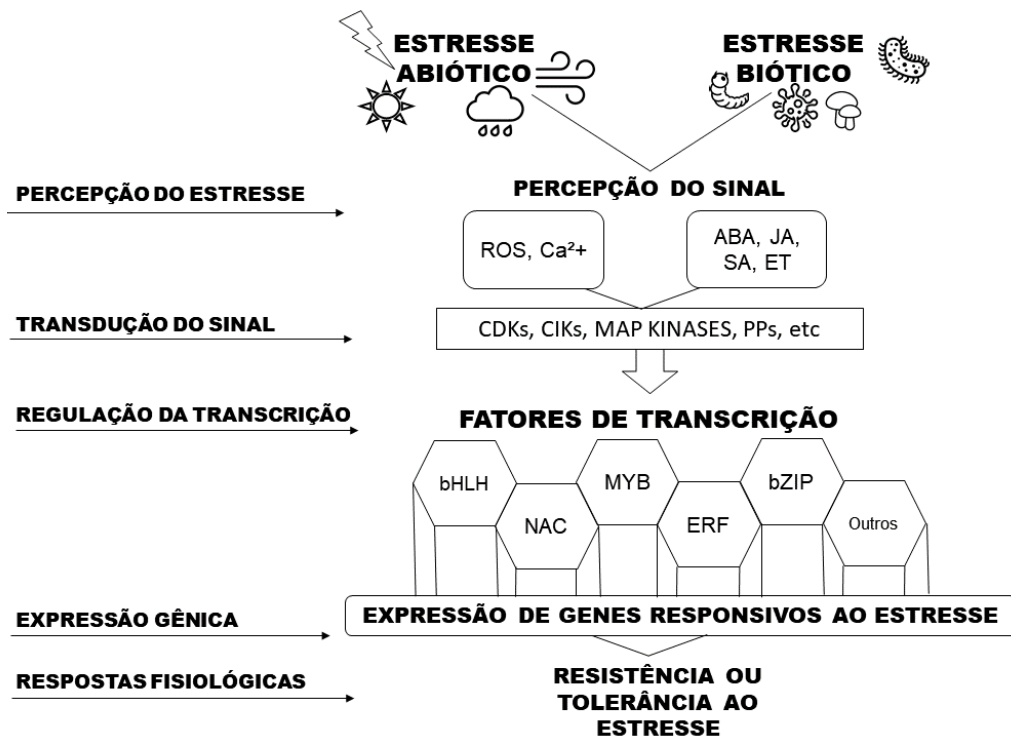
2.7. Fatores de transcrição (FTs) e seu papel na defesa contra patógenos

2.7.1. Mecanismos de ação na defesa vegetal

As respostas aos estresses são controladas por inúmeros genes-chave que codificam ativadores e repressores da transcrição, que regulam a expressão de genes e vias induzidas por estresses (Baillio *et al.*, 2019). Os fatores de transcrição (FTs) são responsáveis por regular a expressão gênica através de ligações com elementos cis-reguladores de genes-alvo que são modulados em situações específicas, como em estresses bióticos e abióticos (Gao *et al.*, 2019). Nos vegetais, cerca de 10% dos genes codificam os FTs nos mais diversos estágios de desenvolvimento afim de regular suas funções (Gonzalez, 2016; Inukai *et al.*, 2017).

Como as plantas necessitam desenvolver uma resposta rápida quando acometida por um estresse, uma cascata de sinais moleculares é acionada, que se inicia pela percepção do estresse e transdução de sinais, e por fim, pela ativação de genes responsivos ao estresse (Figura 2). As células, ao perceberem qualquer sinal de estresse, ativam sensores na parede celular que detectam o estímulo, seguida de uma rápida transdução do sinal externo para dentro da célula, onde cascatas de sinalização envolvendo moléculas intracelulares ou íons são ativadas. Estas cascatas estão relacionadas principalmente a espécies reativas de oxigênio (ROS) e íons de cálcio (Ca^{2+}) (Baillio, 2019).

Figura 2. Esquema das vias de sinalização envolvidas nas respostas ao estresse abiótico e biótico.



Fonte: Adaptado de Baillo *et al.* (2019).

Como segundos mensageiros que coordenam a percepção de sinal durante as respostas a estresses destacam-se os fitormônios, como o ácido abscísico (ABA), ácido jasmônico (JA), ácido salicílico (SA) e etileno (ET) (Figura 2). Adicionalmente, são ativadas as vias de transdução de sinais por meio de duas cascatas principais, que envolvem a ação de proteínas fosfatases e quinases (Proteínas quinases ativadas por mitogênio – MAPK e quinases dependentes de cálcio - CDPK).

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

Posteriormente, FTs específicos são ativados ou reprimidos por proteínas quinases ou fosfatases, e se ligam a elementos cis-reguladores de genes relacionados ao estresse, aumentando ou reprimindo sua transcrição (Kosová *et al.*, 2015; Hernandez-Garcia e Finer, 2014; Erpen *et al.*, 2018; Baillo *et al.*, 2019) (Figura 2).

Os FTs desempenham papéis cruciais no desenvolvimento vegetal. No que se refere à tolerância ou resistência a estresses existem seis famílias gênicas que se destacam, incluindo MYBs, bHLHs (*Basic Helix-Loop-Helix*), DREBs (*Dehydration responsive element-binding*), ERFs (*Ethylene responsive element binding factor*), bZIPs (*Basic region/leucine zipper motif*) e WRKY (Kavas *et al.*, 2016; Mao *et al.*, 2017).

Em videira, existem vários estudos recentes abordando FTs (Tabela 5), no entanto, ainda há muito o que se descobrir sobre algumas famílias de FTs que ainda são pouco caracterizadas em condições específicas, a exemplo da bHLH e sua atuação em estresses bióticos.

Tabela 5. Estudos recentes realizados com fatores de transcrição em videira.

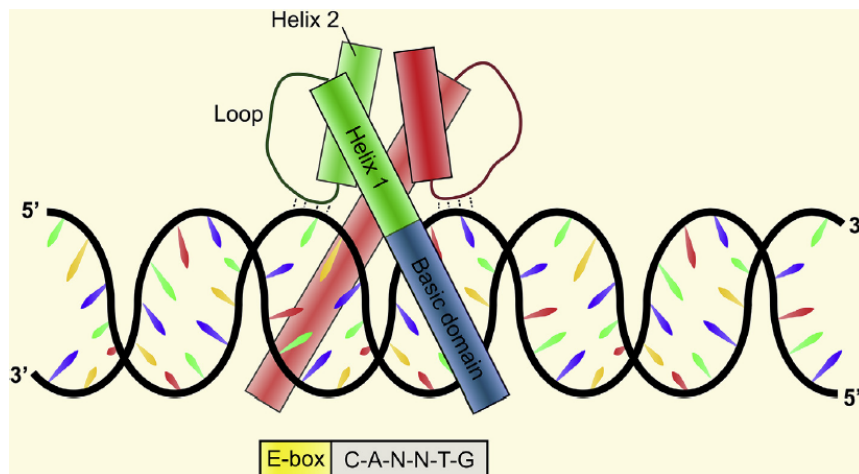
Papel na planta	Fator de Transcrição	Referência
Atuação na via de sinalização de açúcar e ácido abscísico	WRKY	Huang <i>et al.</i> (2021)
Regulação da biossíntese de proantocianidina e antocianina em bagas	MYB	Cheng <i>et al.</i> (2021)
Resposta ao estresse por frio	DOF	Wang <i>et al.</i> (2021)
Estresses abióticos e bióticos e desenvolvimento de frutos	ERF	Toups <i>et al.</i> (2020)
Estresse hídrico	WRKY	Hou <i>et al.</i> (2020)
Ativação da transcrição e aumento da resistência ao oídio	DOF	Yu <i>et al.</i> (2019)
Regulação do tamanho da célula vegetal, da biomassa vegetativa e rendimento reprodutivo	bHLH	Lim <i>et al.</i> (2018)

2.7.2 Fatores de transcrição bHLH

A família de proteínas bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*) é uma das mais representativas em plantas e animais. Seu nome deriva de um domínio bHLH altamente conservado, constituído por aproximadamente 60 aminoácidos. Possuem uma região básica e uma hélice-alça-hélice (HLH) (Figura 3) (Gao *et al.*, 2019).

Em vegetais, as proteínas bHLH constituem a segunda maior família de FTs, e desde a descoberta do domínio bHLH em músculos murinos (Murre *et al* 1989) foram realizados diversos trabalhos de análises estruturais e funcionais em plantas, animais e fungos, demonstrando sua importância na regulação da transcrição de genes envolvidos em processos biológicos relevantes (Feller *et al.*, 2011).

Figura 3. Estrutura dos FTs bHLH, representada por duas alfa-hélices que medeiam a dimerização, e um domínio básico, que se liga às sequências E-box no DNA.



Fonte: Dennis *et al.* (2019).

O domínio bHLH é caracterizado por duas regiões que possuem funções distintas, uma básica, localizada na região N-terminal do domínio, contendo cerca de 15 aminoácidos, com função de reconhecimento e ligação específica ao DNA, e uma região HLH, que se localiza na região C-terminal do domínio, com aproximadamente 50 aminoácidos, caracterizada por duas alfa-hélices anfipáticas conectadas a um *loop* variável, cuja função principal é permitir a homo ou heterodimerização com outros FTs, sendo essa dimerização necessária para que o FT bHLH se ligue ao motivo da sequência G-box (5'-CACGTG-3') ou seu cognato E-box (5'-CANNTG-3') (Atchley *et al.*, 1999; Nair e Burley, 2000; Nosaki, 2018).

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

Por possuir duas regiões funcionalmente distintas, é possível que haja interações simultâneas desses FTs com DNA e proteínas, o que torna bHLH importante em diversas redes de sinalizações, regulação gênica, como também na resposta a estresses (Wang *et al.*, 2019). FTs bHLH têm sido relatados em associação à diversos processos biológicos importantes para os vegetais, como na tolerância a seca e salinidade (Wang *et al.*, 2016), resistência a patógenos com ativação da síntese de ácido jasmônico (He *et al.*, 2018), alterações morfológicas adaptativas (Lim *et al.*, 2018; Buti *et al.*, 2020), regulação da biossíntese de flavonoides e antocianinas (Zhao *et al.*, 2019).

Em videira, Wang *et al.* (2018) identificaram e caracterizaram funcionalmente 94 FTs bHLH, além de avaliar o seu potencial de atuação frente a estresses abióticos (seca e frio) e na biossíntese de metabólitos secundários (antocianinas e flavonoides). Os autores verificaram que 21 FTs bHLH foram induzidos para o estresse de seca e 17 para o tratamento de frio, e que outros três genes estavam potencialmente relacionados a biossíntese de antocianinas e flavonoides. Recentemente, Gao *et al.* (2019) identificaram 126 FTs bHLH em videira e os classificaram em 24 subfamílias com base em análises filogenéticas, incluindo homólogos de outras espécies vegetais (*A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Populus trichocarpa*).

2.7.3 Bancos de dados específicos para TFs em plantas

Com o advento das ferramentas computacionais e sua integralização com as pesquisas ômicas se tornou necessária à criação de repositórios para o armazenamento de dados. Os três maiores e importantes bancos de dados fazem parte do *International Nucleotide Sequence Database Collaboration*, compreendendo o *DNA DataBank of Japan* (DDBJ), o *European Nucleotide Archive* (ENA) e o *GenBank* do NCBI, que trocam dados diariamente e possuem uma vasta coleção de sequências públicas. Até fevereiro de 2021, considerando apenas o *GenBank*, havia um total de 776.291.211.106 de bases, e 2.266.241.476 sequências depositadas (GenBank, 2021).

Os bancos de dados podem reunir diversos tipos de informações sobre moléculas, suas sequências e funções, como DNA, RNAm, proteínas, vias metabólicas, entre outros. Muitos bancos de FTs encontram-se disponíveis ao

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico público, fornecendo um grande número de informações e anotações sobre as mais diversas famílias de FTs de diferentes espécies e condições de análise (Tabela 6).

Tabela 6. Banco de dados públicos com informações disponíveis para fatores de transcrição de plantas.

Bancos de dados	Sites
Plant Transcription Factor Database	http://plantfdb.gao-lab.org/
Grass Transcription Factor Database	https://grassius.org/grasstfdb.php
iTAK-transcription Factor Database	http://itak.feilab.net/cgi-bin/itak/index.cgi
Phytozome database	https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#
PlnTFDB	http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v3.0/
Pfam	pfam.xfam.org
UniProt	https://www.uniprot.org
DDBJ	https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html

REFERÊNCIAS

- AbuQamar SF, Moustafa K e Tran LSP (2016) ‘Omics’ and plant responses to *Botrytis cinerea*. **Front. Plant Sci** 7: 1658.
- Aebersold R, Mann M (2003) Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** 422: 198-207
- Agrawal PK, Babu K e Saini N (2015) Omics of model plants. In Barh D, Khan MS, Davies E (Ed) **PlantOmics: The Omics of Plant Science**. Springer Science Business Media 1-132
- Aizat WM, Goh HH, e Baharum SN (2018) Omics Applications for Systems Biology. **Springer International Publishing**.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Alleweldt G, Spiegel-Roy P e Reisch B (1990) Grapes (*Vitis*). **Acta Horticulturae 290**: 291-337
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW e Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology 215**: 403-410
- Araújo JSP (2001) Perfil epidemiológico e subsídios para controle de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu) Dye, agente do cancro bacteriano da videira (*Vitis vinifera* L.) no Brasil. 121f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica.
- Araújo ND de, Farias RP de, Pereira PB, Figueirêdo FM de, Morais AMB de, Saldanha LC e Gabriel JE (2008) A era da bioinformática: seu potencial e suas implicações para as ciências da saúde. **Estudos de Biologia 30**: 70-72
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J e Schwede T (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics 22**: 195-201.
- Atchley WR, Terhalle W e Dress A (1999) Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. **Journal of molecular evolution 48**: 501-516.
- Bailey TL, Johnson J, Grant CE e Noble WS (2015) The MEME Suite. **Nucleic Acids Research 43**: 39-49.
- Baillo EH, Kimotho RN, Zhang Z e Xu P (2019) Transcription factors associated with abiotic and biotic stress tolerance and their potential for crops improvement. **Genes 10**: 771
- Barh D, Zambare V e Azevedo V (2013) Omics. Applications in biomedical, agricultural, and environmental sciences. **CRC Press**.
- Benko-Iseppon AM, Lins Galdino S, Calsa JrT, Akio Kido E, Tossi A, Carlos Belarmino L e Crovella S (2010) Overview on plant antimicrobial peptides. **Current protein & peptide Science 11**: 181
- Benko-Iseppon AM, Soares-Cavalcanti NM, Belarmino LC, Bezerra-Neto JP, Amorim LLB, Ferreira-Neto JRC, Pandolfi V, Azevedo HMA, Silva RLO, Santos MG, Alves MV e Kido EA (2011) Prospecção de genes de resistência à seca e à

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

salinidade em plantas nativas e cultivadas. **Revista Brasileira de Geografia Física 6**: 1112-1134.

Hu B, Jin J, Guo AY, Zhang H, Luo J e Gao G (2015) GSDB 2.0: an upgraded gene feature visualization server. **Bioinformatics 31**: 1296-1297.

Brasil (2014) Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n. 2, de 6 de fevereiro de 2014. Diário Oficial (da) República Federativa do Brasil, p. 9, 7 fev. 2014. Seção 1.

Buti S, Hayes S e Pierik R (2020) The bHLH network underlying plant shade-avoidance. **Physiologia plantarum 169**: 312-324.

Camargo UA, Tonietto J e Hoffmann A (2011) Progressos na viticultura brasileira. **Revista Brasileira de Fruticultura 33**: 144-149.

Catacchio CR, Alagna F, Perniola R, Bergamini C, Rotunno S, Calabrese FM, Crupi P, Antonacci D, Ventura M e Cardone MF (2019) Transcriptomic and genomic structural variation analyses on grape cultivars reveal new insights into the genotype-dependent responses to water stress. **Scientific Reports 9**: 1-15.

Chand R (1992) Sources of resistance to grapevine bacterial canker disease in *Vitis*. **Ind. Inst. Hort. Res. 31**: 83-86

Chand R e Kishun (1990) Outbreak of grapevine bacterial canker disease in India. **Vitis 29**: 183-188.

Chand R, Singh PN, Singh D e Singh R (1994) Copper and streptomycin resistance in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection** 487-491.

Cheng J, Yu K, Shi Y, Wang J e Duan C (2021) Transcription Factor VviMYB86 Oppositely Regulates Proanthocyanidin and Anthocyanin Biosynthesis in Grape Berries. **Frontiers in Plant Science 11**: 2263.

Da Gama MAS, Mariano RDLR, Da Silva Júnior WJ, De Farias ARG, Barbosa MAG, Ferreira MADSV, Costa CRL, Santos LA e De Souza EB (2018) Taxonomic repositioning of *xanthomonas campestris* pv. *Viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas Citri* Pv. *Viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 Comb. Nov. and Emendation of the Description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to Include

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

Pigmented Isolates Pathogenic to cashew plant. **Phytopathology 108**: 1143-1153.

Dantas SAF, Lima GML, Moreira INMA, Neiva MCH ... e Barbosa MAG (2010) Levantamento do cancro-bacteriano da videira no estado de Pernambuco. **Tropical Plant Pathology 35**:296-S296.

Dennis DJ, Han S e Schuurmans C (2019) bHLH transcription factors in neural development, disease, and reprogramming. **Brain research 1705**: 48-65.

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M e Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics 29**: 15-21.

Drozdetskiy A, Cole C, Procter J e Barton GJ (2015) JPred4: A protein secondary structure prediction server. **Nucleic Acids Research 43**: 389-394.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO e Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95**: 14863-14868.

Embrapa (2021) Uva e Vinho. Disponível em <<https://www.embrapa.br/uva-e-vinho/cultivares-e-porta-enxertos>>. Acesso em 12 de janeiro de 2021.

Erpen L, Devi HS, Grosser JW e Dutt M (2018) Potential use of the DREB/ERF, MYB, NAC and WRKY transcription factors to improve abiotic and biotic stress in transgenic plants. **Plant Cell Tissue Organ Cult 132**: 1-25.

Farias JWS, Rodrigues CA, Barbosa EGM, Bezerra DA, Leão PCS, Ritschel OS, e Barbosa MAG (2016) Avaliação da resistência genética de híbridos de videira ao cancro bacteriano no Vale do São Francisco. **Embrapa Semiárido 11**.

Feller A, MacHemer K, Braun EL e Grotewold E (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. **Plant Journal 66**: 94-116.

Feng, H. L., Ma, N. N., Meng, X., Zhang, S., Wang, J. R., Chai, S., et al. (2013). A novel tomato MYC-type ICE1-like transcription factor, SlICE1a, confers cold, osmotic and salt tolerance in transgenic tobacco. **Plant Physiol. Biochem 73**: 309–320.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Ferreira MASV (2016) Detecção e Variabilidade de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, Agente Causal do Cancro Bacteriano da Videira. **Estado da Arte em Fitobacterioses Tropicais**: 211.
- Ferreira MASV, Bonneau S, Briand M, Cesbron S, Portier P, Darrasse A, Gama MAS, Barbosa MAG, Mariano R de LR, Souza EB e Jacques MA (2019) *Xanthomonas citri* pv. *Viticola* affecting grapevine in Brazil: Emergence of a successful monomorphic pathogen. **Frontiers in Plant Science** **10**: 489.
- Gao M, Zhu Y, Yang J, Zhang H, Cheng C, Zhang Y, Wan R, Fei Z e Wang X (2019) Identification of the grape basic helix–loop–helix transcription factor family and characterization of expression patterns in response to different stresses. **Plant Growth Regulation** **88**: 18-39.
- Garrido LR (2015) Cancro da videira. **Embrapa Uva e Vinho**.
- GenBank (2021) Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>> Acesso em 26 de fevereiro de 2021.
- Gessler C, Pertot I e Perazzolli M (2011) *Plasmopara viticola*: A review of knowledge on downy mildew of grapevine and effective disease management. **Phytopathologia Mediterranea** **50**: 3-44.
- Gillaspy GE (2008) Plant Development and Physiology. In: Stewart CNJ. **Plant biotechnology and genetics: principles, techniques, and applications**.
- Giovannini E (2014) **Manual de viticultura: série Tekne**. Bookman Editora.
- Gomez-Cabrero D, Abugessaisa I, Maier D, Teschendorff A, Merkenchlager M, Gisel A, Ballestar E, Bongcam-Rudloff E, Conesa A e Tegnér J (2014) Data integration in the era of omics: current and future challenges. **BMC systems biology** **8**: 1-10.
- Gonçalves MFM, Nunes RB, Tilleman L, Van De Peer Y, Deforce D, Nieuwerburgh F Van, Esteves AC e Alves A (2019) Dual RNA sequencing of *vitis vinifera* during *lasiodiplodia theobromae* infection unveils host–pathogen interactions. **International Journal of Molecular Sciences** **20**:6083.
- Gonzalez DH (2016) Introduction to transcription factor structure and function. In **Plant Transcription Factors**. 3-11.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Grabherr MG, Haas BJ, Yassour M, Levin JZ, Thompson DA, Amit I, Adiconis X, Fan L, Raychowdhury R e Zeng Q. (2011) Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. **Nat Biotechnol** **29**:644.
- Gu B, Zhang B, Ding L, Li P, Shen L e Zhang J (2020) Physiological Change and Transcriptome Analysis of Chinese Wild *Vitis amurensis* and *Vitis vinifera* in Response to Cold Stress. **Plant Molecular Biology Reporter** **38**: 478-490.
- Halfeld-Vieira BA e Nechet KDL (2006) Bacterial canker of grapevine in Roraima, Brazil. **Fitopatologia Brasileira** **31**: 604-604.
- Han YQ, Zhang K, Yang J, Zhang N, Fang A, Zhang Y, Liu YF, Chen ZY, Hsiang T e Sun WX (2015) Differential expression profiling of the early response to *Ustilagoidea virens*, between false smut resistant and susceptible rice varieties. **BMC Genomics** **16**: 1-15.
- He X, Zhu L, Wassan GM, Wang Y, Miao Y, Shaban M, Hu H, Sun H, Zhang X (2018) GhJAZ2 attenuates cotton resistance to biotic stresses via the inhibition of the transcriptional activity of Ghb-HLH171. **Mol Plant Pathol** **19**: 896-908.
- Hernandez-Garcia CM e Finer JJ (2014) Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements. **Plant Sci** **217**: 109-119.
- Hiller K, Grote A, Maneck M, Münch R e Jahn D (2006) JVirGel 2.0: Computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. **Bioinformatics** **22**: 2441-2443.
- Hou L, Fan X, Hao J, Liu G, Zhang Z e Liu X (2020) Negative regulation by transcription factor VvWRKY13 in drought stress of *Vitis vinifera* L. **Plant Physiology and Biochemistry** **148**: 114-121.
- Huang T, Yang J, Yu D, Han X, e Wang X. (2021) Bioinformatics analysis of WRKY transcription factors in grape and their potential roles prediction in sugar and abscisic acid signaling pathway. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology** **30**: 67-80.
- IBGE (2020) Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Sistema IBGE de Recuperação Automática - SIDRA.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Inukai S, Kock KH e Bulyk ML (2017) Transcription factor–DNA binding: beyond binding site motifs. **Current opinion in genetics & development 43**: 110-119
- Jaillon O, Aury JM, Noel B, Policriti A, Clepet C, Casagrande A, ... e Wincker P (2007) The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. **Nature 449**: 463.
- Joshi S, Kaur K, Khare T, Srivastava AK, Suprasanna P e Kumar V (2021) Genome-wide identification, characterization and transcriptional profiling of NHX-type (Na⁺/H⁺) antiporters under salinity stress in soybean. **Biotech 11**: 1-17.
- Karahalil B (2016) Overview of Systems Biology and Omics Technologies. **Current Medicinal Chemistry 23**: 4221-4230.
- Katagiri F (2004) A global view of defense gene expression regulation - A highly interconnected signaling network. **Current opinion in plant biology 7**: 506-511.
- Kavas M, Baloğlu MC, Atabay ES, Ziplar UT, Daşgan HY e Ünver T (2016) Genome-wide characterization and expression analysis of common bean bHLH transcription factors in response to excess salt concentration. **Molecular Genetics and Genomics 291**: 129-143.
- Keller, M (2015) The Science of Grapevines: Anatomy and Physiology. **Academic Press**. London.
- Kogenaru S, Yan Q, Guo Y, e Wang N (2012) RNA-seq and microarray complement each other in transcriptome profiling. **BMC genomics 13**: 1-16.
- Kosová K, Vítámvás P, Urban MO, Klíma M, Roy A e Tom Prášil I (2015) Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops-a proteomic perspective. **International Journal of Molecular Sciences 16**: 20913-20942.
- Krzywinski M, Schein J, Birol I, Connors J, Gascoyne R, Horsman D, Jones SJ e Marra MA (2009) Circos: An information aesthetic for comparative genomics. **Genome Research 19**: 1639-1645.
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C e Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution 35**:1547.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Kunkel BN e Brooks DM (2002) Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current opinion in plant biology** 5: 325-331.
- Leão PCS e Borges RME (2009) Melhoramento genético da videira. **Embrapa Semiárido**.
- Leão, PCS, Borges RME, Melo NF, Barbosa MAG, Lima MAC, Ferreira RCF e Biasoto ACT (2020) BRS Tainá: nova cultivar de uvas sem sementes de cor branca para o Submédio do Vale do São Francisco. **Embrapa Semiárido**.
- Li D, Liu X, Shu L, Zhang H, Zhang S, Song Y e Zhang Z (2020) Global analysis of the AP2/ERF gene family in rose (*Rosa chinensis*) genome unveils the role of RcERF099 in Botrytis resistance. **BMC plant biology** 20: 1-15.
- Lim SD, Yim WC, Liu D, Hu R, Yang X e Cushman JC (2018) A *Vitis vinifera* basic helix-loop-helix transcription factor enhances plant cell size, vegetative biomass and reproductive yield. **Plant Biotechnology Journal** 16: 1595-1615.
- Lima MF (2008) Doenças que comprometem a produção e a comercialização da uva. **Embrapa Semi-Árido**.
- Lima MF e Mashima C (2000) Tratamento químico e térmico de bacelos de videira infectados com *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola*. **Embrapa Semiárido**.
- Lima MF e Moreira WA (2002) Doenças causadas por bactérias. **Embrapa Semiárido**.
- Liu L, Zhang B, Wang H, Yu SY, Guan TS, Huang YF e Liu CY (2020) Candidate resistance genes selection and transcriptome analysis for the early responses to *Plasmopara viticola* infection in grape cultivars. **Journal of Plant Pathology** 102: 857-869.
- Lodhi MA, Daly MJ, Ye GN, Weeden NF e Reisch BI (1995) A molecular marker based linkage map of *Vitis*. **Genome** 38: 786-794.
- Lomsadze A, Ter-Hovhannisyan V, Chernoff YO e Borodovsky M (2005) Gene identification in novel eukaryotic genomes by self-training algorithm. **Nucleic Acids Research** 33: 6494-6506.
- Lourenço DS, Farias JWS, Barbosa EGM, Batista DC e Barbosa MAG (2018) Resistência de cultivares de videira ao cancro bacteriano. **Embrapa Semiárido**.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Luo R, Liu B, Xie Y, Li Z, Huang W, Yuan J, ... e Wang Jun (2012) SOAPdenovo2: An empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. **Gigascience 1**: 2047-217X.
- MacKay TFC, Stone EA e Ayroles JF (2009) The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. **Nature reviews genetics 10**: 565-577.
- Mao K, Dong Q, Li C, Liu C e Ma F (2017) Genome wide identification and characterization of apple bHLH transcription factors and expression analysis in response to drought and salt stress. **Frontiers in Plant Science 8**:480.
- MAPA (2014) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). Instrução normativa Nº 2, de 6 de fevereiro de 2014. D.O.U. de 07/02/2014. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em:
<<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>>. Acesso em janeiro de 2021.
- Marchler-Bauer A e Bryant SH (2004) CD-Search: Protein domain annotations on the fly. **Nucleic Acids Research 32**: W327-W331.
- Martin M (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. **EMBnet J 17**: 10-12.
- Maul et al (2021) Vitis International Variety Catalogue - www.vivc.de. Acesso em 09 janeiro 2020.
- MDIC (2019) Exportação e Importação Geral – 1997- 2019. Disponível em: Comex Stat - Exportação e Importação Geral (mdic.gov.br). Acesso em 09 de dezembro de 2020.
- Midha S e Patil PB (2014) Genomic insights into the evolutionary origin of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and its ecological relatives. **Applied and Environmental Microbiology 80**: 6266-6279.
- Mosharaf MP, Rahman H, Ahsan MA, Akond Z, Ahmed FF, Islam MM, Moni MA e Mollah MNH (2021) In silico identification and characterization of AGO, DCL and RDR gene families and their associated regulatory elements in sweet orange (*Citrus sinensis* L.). **PLoS ONE 15**:e0228233.

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico

Moura MF, Hernandez JL e Junior MJP (2018) O Melhoramento Genético e Manejo Cultural da Uva no Instituto Agrônômico.

MP (2021) Metabolomics Platform. Disponível em: <<http://metabolomicsplatform.com/metabolomics-overview/>> Acesso em 08 de fevereiro de 2021.

Mullins MG, Bouquet A e Williams LE (1992) **Biology of the Grapevine**. Cambridge, University Press.

Murre C, McCaw PS e Baltimore D (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. **Cell 56**: 777-783.

Myles S, Chia JM, Hurwitz B, Simon C, Zhong GY, Buckler E e Ware D (2010) Rapid genomic characterization of the genus *Vitis*. **PLoS ONE 5**: e8219.

Nair SK e Burley SK (2000) Recognizing DNA in the library. **Nature 404**: 715-717.

Nascimento ARP e Mariano R de LR (2004) Cancro bacteriano da videira: etiologia, epidemiologia e medidas de controle. **Ciência Rural 34**: 301-307.

Nascimento ARP, Silva Z e Silva VAV (2000) Sensibilidade “in vitro” de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* a bactericidas e fungicidas. **Fitopatologia Brasileira 25**: 326-327.

Naue CR, Costa V, Barbosa M, Batista DC, Souza EB e Mariano R (2014) *Xanthomonas campestris* pv. *Viticola* on grapevine cutting tools and water: Survival and disinfection. **Journal of Plant Pathology 96**: 451-458.

Nawrocki EP, Kolbe DL e Eddy SR (2009) Infernal 1.0: Inference of RNA alignments. **Bioinformatics 25**: 1335-1337.

Nayudu M V (1972) *Pseudomonas viticola* sp. nov., Incitant of a New Bacterial Disease of Grape Vine. **Journal of Phytopathology 73**: 183-186.

Nosaki S, Miyakawa T, Xu Y, Nakamura A, Hirabayashi K, Asami T, Nakano T e Tanokura M (2018) Structural basis for brassinosteroid response by BIL1/BZR1. **Nat Plant 4**: 771-776.

Owens CL (2008) Grapes. in Hancock, J. F. (Ed) **Temperate fruit crop breeding: germplasm to genomics**. Springer Science & Business Media, 197-233.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Page, RDM (1996) Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. **Bioinformatics 12**: 357-358.
- Pandey A e Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. **Nature 405**: 837-846.
- Parkinson N, Cowie C, Heeney J e Stead D (2009) Phylogenetic structure of *Xanthomonas* determined by comparison of *gyrB* sequences. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 59**: 264-274.
- Peixoto Nascimento AR, Michereff SJ, Mariano RDLR e Viana IDO (2006) Reaction of grapevine clones to *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, based on epidemiological components of bacterial canker. **Ciencia Rural 36**: 1-7.
- Poloni JF, Feltes BC, Silva FR e Bonatto D (2014) Biologia de Sistemas. In Verli H (Ed) **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**.
- Reynolds A (2015) **Grapevine breeding programs for the wine industry**. Elsevier, Cambridge, 440.
- Ritschel OS, Maia JDG e Camargo UA (2015) Variedades resistentes: intersecção entre rusticidade e qualidade: a experiência brasileira. **Embrapa Uva e Vinho**.
- Rodrigues Neto J, Destéfano SAL, Rodrigues LMR, Pelloso DS e Oliveira Júnior L da C (2011) Grapevine bacterial canker in the State of São Paulo, Brazil: detection and eradication. **Tropical Plant Pathology 36**: 42-44.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C e Mahé F (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. **PeerJ 4**: e2584.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, ... e Weber CF (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology 75**: 7537-7541.
- Shimizu T e Suzaki K (2020) Multiple gene clusters responsive to *Plasmopara viticola* infection in grapevines. **European Journal of Plant Pathology 158**: 681-691.
- Silva VAV, Aguiar IF, Castro GSS, Nascimento ARP, e Paz CD (2000) Ação in vitro de produtos químicos em relação a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Fitopatologia Brasileira 25**.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Toups HS, Cochetel N, Gray D e Cramer GR (2020) VviERF6Ls: An expanded clade in *Vitis* responds transcriptionally to abiotic and biotic stresses and berry development. **BMC Genomics 21**: 1-27.
- Trapnell C, Roberts A, Goff L, Pertea G, Kim D, Kelley DR, Pimentel H, Salzberg SL, Rinn JL e Pachter L (2012) Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. **Nat Protoc 7**: 562.
- Van Emon JM (2016) The Omics Revolution in Agricultural Research. **Journal of agricultural and food chemistry 64**: 36-44.
- Velasco R, Zharkikh A, Troggio M, Cartwright DA, Cestaro A, Pruss D, et al. (2007) A High Quality Draft Consensus Sequence of the Genome of a Heterozygous Grapevine Variety. **PLoS ONE 2 12**: e1326.
- Verli H (2014) Bioinformática da Biologia à Flexibilidade Molecular.
- Wang F, Zhu H, Chen D, Li Z, Peng R e Yao Q (2016) A grape bHLH transcription factor gene, VvbHLH1, increases the accumulation of flavonoids and enhances salt and drought tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture 125**: 387-398.
- Wang L, Xiang L, Hong J, Xie Z e Li B (2019) Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). **3 Biotech 9**: 1-12.
- Wang P, Su L, Gao H, Jiang X, Wu X, Li Y, Zhang Q, Wang Y e Ren F (2018) Genome-wide characterization of bhlh genes in grape and analysis of their potential relevance to abiotic stress tolerance and secondary metabolite biosynthesis. **Frontiers in Plant Science 9**: 64.
- Wang Z, Gerstein M e Snyder M (2009) RNA-Seq: A revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews genetics 10**: 57-63.
- Wang Z, Wang Y, Tong Q, Xu G, Xu M, Li H, Fan P, Li S e Liang Z (2021) Transcriptomic analysis of grapevine Dof transcription factor gene family in response to cold stress and functional analyses of the VaDof17d gene. **Planta 253**: 1-14.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico
- Yu YH, Bian L, Wan YT, Jiao ZL, Yu KK, Zhang GH e Guo DL (2019) Grape (*Vitis vinifera*) VvDOF3 functions as a transcription activator and enhances powdery mildew resistance. **Plant Physiology and Biochemistry** **143**: 183-189.
- Zendler D, Töpfer R e Zyprian E (2021) Confirmation and fine mapping of the resistance locus Ren9 from the grapevine cultivar 'regent'. **Plants** **10**: 24.
- Zhao Y, Zhang YY, Liu H, Zhang XS, Ni R, Wang PY, Gao S, Lou HX e Cheng AX (2019) Functional characterization of a liverworts bHLH transcription factor involved in the regulation of bisbibenzyls and flavonoids biosynthesis. **BMC Plant Biology** **19**: 1-13.
- Zhou L, Chen F, Pan H, Ye J, Dong X, Li C e Lin, F. (2016) Identifying virulence associated genes using transcriptomic and proteomic association analyses of the plant parasitic nematode *Bursaphelenchus mucronatus*. **International Journal of Molecular Sciences** **17**: 1492.
- Zucal MPM, Peixoto AR, Angelotti F, Da Paz CD, Pais AKL, Silva MSE, Gois A e Neta HBS (2016) Reaction of grapevine genotypes to bacterial canker. **Interciencia****41**:639-645.

Capítulo II

Artigo a ser submetido à Revista
Genetics and Molecular Biology

FATORES DE TRANSCRIÇÃO bHLH: CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL, FUNCIONAL E PERFILTRANSCRICIONAL EM VIDEIRA SOB INFECÇÃO DE *Xanthomonas citri*

Cíntia Carla Claudino Grangeiro¹, Reginaldo de Carvalho¹, Roberta Lane de Oliveira Silva², João Pacífico Bezerra-Neto³, Agnes Angélica Guedes de Barros¹, Nataniel Franklin de Melo², Ana Maria Benko-Iseppon³,

¹ Programa de Pós-graduação em Agronomia – Melhoramento Genético de Plantas, Laboratório de Citogenética Vegetal, Departamento de Biologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

² Laboratório de Microbiologia, Campus de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Vale do São Francisco.

³ Laboratório de Genética e Biotecnologia Vegetal, Depto. Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

Resumo

Fatores de Transcrição (FTs) bHLH representam a segunda maior família de FTs em vegetais e apresentam atuação reconhecida na regulação de diversos processos biológicos relevantes, incluindo resposta a estresses abióticos e bióticos. A videira é das frutas mais consumidas mundialmente, e no Brasil, seu cultivo é responsável por movimentar um grande volume de negócios anualmente, em especial na região do submédio do Vale do São Francisco (VSF), que é uma das maiores produtoras de uvas de mesa e vinhos. No entanto, apesar do sucesso alcançado em sua produção, a vitivinicultura vem sofrendo perdas significativas devido ao cancro bacteriano, doença ocasionada pela bactéria *Xanthomonas citri* pv. *viticola*, para a qual não existem cultivares resistentes disponíveis até o momento. Dessa forma, este trabalho buscou realizar a caracterização genômica estrutural e funcional de FTs bHLH em *Vitis vinifera*, bem como gerar um perfil transcricional de candidatos diferencialmente expressos frente a interação patogênica de *Vitis* spp. e *X. citri*. O ensaio experimental utilizado para geração das bibliotecas de RNA-Seq (Illumina HiSeq2500) envolveu clones de dois acessos (Red Globe e IAC-572) de videira contrastantes quanto à resistência a *X. citri*, os quais foram submetidos a quatro tempos distintos de estresse (90 minutos, 6, 24 e 48 horas), sendo o tempo precoce utilizado para o sequenciamento NGS. A mineração dos bHLH candidatos foi realizada através de análises de bioinformática (identificação de domínios e motivos conservados, caracterização físico-química, estrutural, funcional e perfil de expressão *in silico*). Foram identificados 102 FTs bHLH possuindo domínios completos e motivos conservados, com 96 genes distribuídos em 18 pseudocromossomos de videira, sendo o chr7 o mais representativo com 12 genes mapeados. As proteínas bHLH exibiram variação de peso molecular e pH, porém, todas apresentaram localização subcelular predita no núcleo. O fenograma apontou

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

a classificação dessas proteínas em 25 subgrupos e um grupo orfão, semelhantemente ao observado para essa família gênica em outras espécies vegetais. Foram identificados 22 genes bHLH duplicados em tandem no genoma de *V. vinifera*, presentes em seis cromossomos, o que indica que eventos de duplicação ocorreram ao longo do processo evolutivo da espécie e que esses provavelmente foram responsáveis pela sua diversificação. A análise de enriquecimento dos promotores demonstrou que as proteínas bHLH parecem exercer importante papel na sinalização celular, principalmente em vias mediadas por proteínas quinases e direcionadas ao reconhecimento de patógenos. Além disso, entre os processos biológicos enriquecidos sob controle dos bHLH, destacam-se vias hormonais, tais como ácido salicílico e ácido jasmônico, processos de reconhecimento e resposta a estímulos bióticos, além da ativação do sistema inato de defesa, o que evidencia a importante atuação dos FTs bHLH na regulação das respostas de defesa da videira. O perfil de expressão *in silico* indicou que dos 102 bHLH identificados no genoma de *Vitis vinifera*, 34 foram DEGs, com doze sendo induzidos do híbrido IAC-572, enquanto foram não significativos na cultivar Red Globe, comparativamente aos seus controles não inoculados. Os resultados sugerem que os FTs bHLH possuem um importante papel na resposta de defesa utilizada pela videira frente ao patógeno bacteriano e disponibilizam candidatos promissores para validação por qPCR e posterior aplicação em abordagens biotecnológicas ou programas de melhoramento genético da espécie.

Palavras-chave: Cancro bacteriano, Defesa vegetal, RNA-Seq, *Vitis vinifera*.

Introdução

Na natureza as plantas estão naturalmente propensas a sofrer diversos tipos de estresses, sejam bióticos ou abióticos, e para sobreviver a tais condições, utilizam mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares como estratégias de resposta aos diferentes estresses (Sun et al., 2015). Os FTs atuam como reguladores das principais vias de ativação e/ou repressão da expressão gênica, desempenhando papéis importantes no crescimento, desenvolvimento e resposta vegetal a condições estressantes (Tian et al., 2020), sendo a maior parte dos processos biológicos controlados transcricionalmente por FTs em nível celular (Wang et al., 2018).

Os fatores de transcrição *basic Helix-Loop-Helix* (bHLH) têm seu nome derivado do domínio HLH altamente conservado, o qual contém cerca de 60 aminoácidos, e é composto estruturalmente por uma região básica (*basic*) e uma hélice-alça-hélice (*Helix-Loop-Helix*) na região HLH (Feller et al., 2011). Os FTs bHLH são comumente envolvidos na resposta a estresses abióticos, como frio (Feng et al., 2012), salinidade (Yu et al., 2021), e sinais hormonais (Friedrichsen et al., 2002)

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

bem como na regulação da biossíntese de antocianina (Hu et al., 2016), entre outros processos. No entanto, pouco se conhece sobre a função dos bHLH em espécies vegetais sob estresses bióticos, e especialmente em videira, existem apenas dois estudos recentes, conduzidos por Gao et al. (2019) e Liu et al. (2020), que relataram a atuação dessa família gênica frente a infecções de fungos causadores do oídio e míldio (*Elsinoe ampelina* e *Plasmopora viticola*), respectivamente.

A videira é uma das culturas agrícolas mais importantes do mundo, sendo cultivada na maior parte do globo terrestre. No Brasil, sua produção ocorre principalmente nas regiões Sul e Nordeste, destacando-se a região do submédio do VSF (Pernambuco e Bahia), onde sua produção pode resultar em mais de duas safras por ano. No entanto, com o surgimento do cancro bacteriano, causado pela bactéria *X. citri* pv. *viticola*, o cultivo da videira ficou bastante comprometido nessa região, uma vez que a doença tem sido responsável por dizimar parreirais inteiros de uvas de mesa (Gama et al., 2018). Até o momento não se tem conhecimento de fontes de resistência para *X. citri* e os métodos de controle utilizados rotineiramente apenas minimizam as perdas severas ocasionadas pelo patógeno. Nesse sentido, o desenvolvimento de cultivares resistentes representa uma alternativa promissora para o controle efetivo da doença e os avanços recentes nas abordagens biotecnológicas e de melhoramento genético devem acelerar esse processo.

Dessa forma, o presente trabalho buscou selecionar e caracterizar FTs bHLH no genoma de *Vitis vinifera*, além de identificar genes diferencialmente expressos (DEGs) no transcriptoma de *Vitis* spp. sob inoculação de *X. citri*, afim de selecionar genes candidatos que possam conferir resistência à doença visando aplicação em abordagens biotecnológicas de edição gênica via CRISPR-Cas9.

Material e Métodos

Material vegetal e imposição do estresse

O experimento visando à geração das bibliotecas de RNA-Seq foi conduzido nos telados da Embrapa Semiárido – Petrolina/PE usando clones do cultivar Red Globe (considerada susceptível ao cancro bacteriano) e do híbrido IAC-572 (resultante do cruzamento entre o porta-enxerto 101-14 MGT [*Vitis riparia* X *Vitis rupestris*] e *Vitis caribaea*), considerado moderadamente resistente ao cancro bacteriano. As plantas foram propagadas por estaquia, sendo cultivadas em potes

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

plásticos de 5 L, com substrato composto por proporções iguais de solo do tipo argiloso e vermiculita, sob condições controladas [25°C ± 2°C; 60 % ± 5% de umidade relativa; e com 12 h/dia de luz natural [*Photosynthetic Photon Flux Density* (PPFD) = 1.5 × 10³ µmoles].

Após 30 dias de cultivo, as plantas sadias de ambos os acessos foram selecionadas e divididas em dois grupos: (1) Controle – plantas inoculadas com água destilada esterilizada; (2) Tratamento - plantas inoculadas com a bactéria *X. citri* (isolado Xcv117), A inoculação bacteriana foi realizada utilizando seringas hipodérmicas sem agulhas, na parte abaxial das primeiras três folhas, injetando aproximadamente 20 µL de suspensão bacteriana em três pontos de infiltração por folha, conforme metodologia descrita por Gama et al., (2011). As coletas foram realizadas em quatro tempos distintos: (1) 90 minutos, (2) 6 horas, (3) 24 horas e (4) 48 horas após a inoculação. Os tecidos foliares foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80° C.

O desenho experimental adotado foi em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em arranjo fatorial de 2x4 (acessos x tratamentos - período de inoculação) com três réplicas biológicas para cada grupo (controles e tratamentos), totalizando 48 unidades experimentais. Cada réplica biológica foi composta por duas plantas por vaso.

Extração de RNA, construção das bibliotecas de RNA-Seq, sequenciamento e síntese de cDNA

A extração do RNA total foi realizada a partir da associação do protocolo CTAB-Acetato (Zhao et al., 2012) e do Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) utilizando aproximadamente 200 mg de tecido foliar e tratamento de DNase pararemoção de contaminação genômica. As amostras foram analisadas quanto a sua pureza, concentração e integridade em espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoFisher Scientific), fluorímetro Qubit (Life Technologies) e Bioanalyser (Agilent Technologies), respectivamente. Parte do RNA total extraído (5 µg) foi enviado para a construção das bibliotecas de RNA-Seq e sequenciamento no Centro de Genômica Funcional ESALQ/USP utilizando a plataforma HiSeq2500 (Illumina), *paired end* (2 x 100 bp), empregando-se os seguintes kits: TruSeq Stranded mRNA Library Prep (20020594; Illumina), TruSeq RNA Indexes Set A e B (20020492 e

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

20020493; Illumina) e HiSeq Rapid PE Cluster Kit v2 (PE-402-4002; Illumina). O restante do RNA total (5 µg) foi utilizado para a construção de bibliotecas de cDNA, com volume final de 100 µL. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o GoScript Reverse Transcription System (Promega) seguindo as instruções do fabricante.

Análise de qualidade do sequenciamento e montagem das bibliotecas

O controle de qualidade das amostras sequenciadas foi feito pelo FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>). O software STAR (Dobin et al., 2013), versão 2.4.0, foi utilizado para as etapas de alinhamento e montagem do transcriptoma. A anotação primária dos transcritos foi realizada em vários bancos de dados, como NCBI, UniProt, InterPro e Gene Ontology. A análise estatística dos genes diferencialmente expressos foi feita através do pacote DESeq2 (Love et al., 2014) do software R.

Identificação e caracterização de genes bHLH

As sequências sondas (*seed sequence*) correspondentes aos genes de interesse foram localizadas em bancos de dados públicos (NCBI e Uniprot), sendo conduzido posteriormente um alinhamento via tBLASTn contra o genoma de *Vitis vinifera* 12X disponível no Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/>). Foram considerados válidos, os alinhamentos com *e-value* menor ou igual a e^{-5} . Para verificar a integridade das sequências quanto à presença de domínio funcional, uma busca foi realizada com auxílio do *Batch* CD-search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>). Adicionalmente, foram realizadas predições do peso molecular a partir do software JVirGel 2.0 (Hiller et al., 2006), ponto isoelétrico utilizando o *Isoelectric Point Calculator* (<http://isoelectric.org>), e por fim, a localização subcelular identificada por meio do Cell-PLoc 2.0 (Chou e Shen, 2010).

Identificação de motivos e análise fenética

Para identificar os motivos conservados nas sequências de bHLH foi utilizada a ferramenta online *Multiple EM for Motif Elicitation* - MEME, versão 5.3.3 (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>). As sequências proteicas foram inseridas, adotando-se os seguintes parâmetros: *Any number of repetitions, find*

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

three motifs and Maximum width 70, com demais parâmetros *default*. Além disso, foi realizado um alinhamento múltiplo das sequências no MEGA 7.0 (Kumar et al., 2016), com visualização dos resíduos conservados pelo programa Jalview. Árvores fenéticas foram geradas visando compreender a organização dos diferentes bHLH identificados, por meio do alinhamento de sequências de *V. vinifera* e *V. davidii* (Li et al., 2021) no MEGA 7.0, utilizando o método de Neighbor-Joining adotando os seguintes parâmetros: *pairwise deletion*, 1000 replicatas de *bootstrap* e *p-distance*.

Localização cromossômica e análise de duplicação

A localização dos genes VvbHLH nos 19 cromossomos da videira foi obtida a partir das informações disponíveis para o genoma de *V. vinifera* no banco de dados Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov>). Para a identificação de duplicação em tandem foi utilizada a definição de Riechman et al. (2000) que considera como repetição em tandem os genes que estejam entre uma distância de 50 kb.

Análise de promotores e anotação GO

Inicialmente, foi realizada uma busca no genoma de *V. vinifera* por todas as regiões promotoras reconhecidas para bHLH. Para isso, os 1000 nucleotídeos que antecedem cada um dos 26.346 genes de *V. vinifera* foram utilizados para uma busca de promotores, por meio do uso de 54 diferentes PFMs (*Position Frequency Matrix*) relacionados a bHLH de plantas, as quais foram selecionadas no banco de dados JASPAR (<http://jaspar.genereg.net/>). As matrizes relacionadas as PFMs foram então confrontadas contra o genoma de *V. vinifera* por meio do algoritmo MOODS, disponível no github (<https://github.com/jhkorhonen/MOODS>). Os genes que apresentaram região promotora regulada pelos bHLH foram submetidos a análises de enriquecimento (*Enrichment analysis tool*) no GO Consortium, com distribuição via *Panther Classification System* (<http://pantherdb.org/>), com o objetivo de determinar quais processos são majoritariamente regulados pelos FTs bHLH em videira.

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

Análise de expressão *in silico*

As sequências VvbHLH caracterizadas no genoma de *V. vinifera* foram alinhadas via BLAST contra o transcriptoma da *Vitis* spp. para identificação do perfil de expressão *in silico*. Mapas de calor (*Heatmaps*) foram construídos com base nos valores de modulação (Log2FC) obtidos na comparação das bibliotecas de RNA-Seq, por meio do software Cluster 3.0, com visualização gerada no TreeView (Page, 1996). Foram considerados como DEGs os transcritos que possuíam Log2FC >0.5 ou <-0.5 e *p-value* ≤ 0.05).

Resultados

Mineração e caracterização dos FTs bHLH

Foram identificados 221 bHLH candidatos no genoma de *Vitis vinifera*, com similaridade as sondas utilizadas, os quais tiveram seus domínios analisados para confirmação da presença e integridade do domínio bHLH. Após a remoção de candidatos com domínio bHLH ausentes ou incompletos, restaram 102 FTs VvbHLH com o domínio característico conservado. Os genes foram então mapeados nos 19 pseudocromossomos de *V. vinifera* e renomeados para VvbHLH01 a VvbHLH102 de acordo com a sua posição.

Propriedades físico-químicas e localização subcelular

O ponto isoelétrico predito para as proteínas bHLH apresentou grande variação de pH (4.5 a 9.8), com 56% dos genes demonstrando afinidade ácida e os demais variando entre pH neutro e alcalino (19% e 25%), respectivamente. O peso molecular observado também foi diversificado, com proteínas variando de 10,19 kDa a 69,30 kDa (Figura 1). Todas as proteínas apresentaram localização predita no núcleo celular, como esperado para FTs.

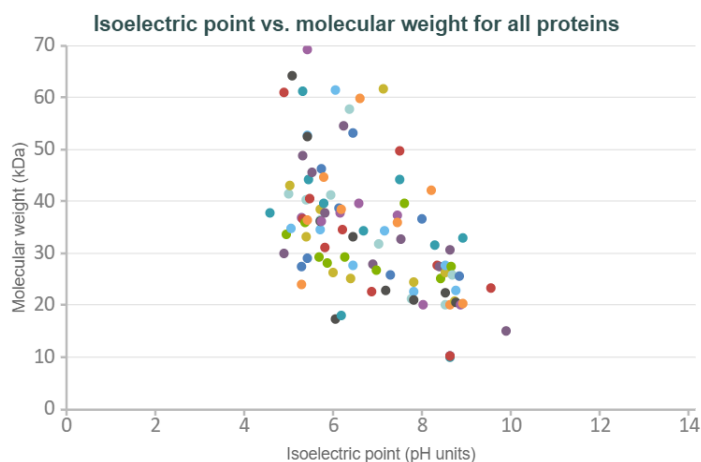


Figura 4. Ponto isoelétrico e peso molecular preditos para as proteínas bHLH de videira. Cada ponto observado no gráfico representa uma sequência candidata.

Análise de motivos conservados, fenograma e perfil de expressão *in silico*

Foram identificados três motivos conservados nas sequências de VvbHLH, com os motivos um e dois correspondentes ao padrão característico da família gênica bHLH, representado por uma região básica, e similar ao padrão estrutural hélice-alça-hélice da família (Figura 2A). Além disso, foi possível observar a presença de 20 resíduos de aminoácidos conservados na maioria das sequências analisadas, com exceção das proteínas VvbHLH10, VvbHLH11, VvbHLH36, VvbHLH37, VvbHLH62 e VvbHLH64, que possuem uma menor conservação de resíduos quando comparadas as demais (Figura 2B), corroborando ao verificado em estudos anteriores com FTs bHLH de outras espécies vegetais.

Na região básica, destacam-se a Histidina (H-1), Ácido Glutâmico (E-5) e três Argininas (R) nos sítios seis, oito e nove, já na primeira hélice, Isoleucina ou Leucina (I ou L-12), Asparagina (N-13), Leucina (L-22), Valina (V-23) e Prolina (P-24). Por sua vez, na região da alça foram observados dois resíduos conservados, Lisina (K-28) e Ácido aspártico (D-30), presentes na maioria das proteínas. A segunda hélice agrupou a maior parte dos resíduos de aminoácidos conservados, incluindo Lisina (K-31), Alanina (A-32), Serina (S-33), Leucina (L-35), Tirosina (Y-41), Lisina (K-43) e Leucina (L-45) (Figura 2A).

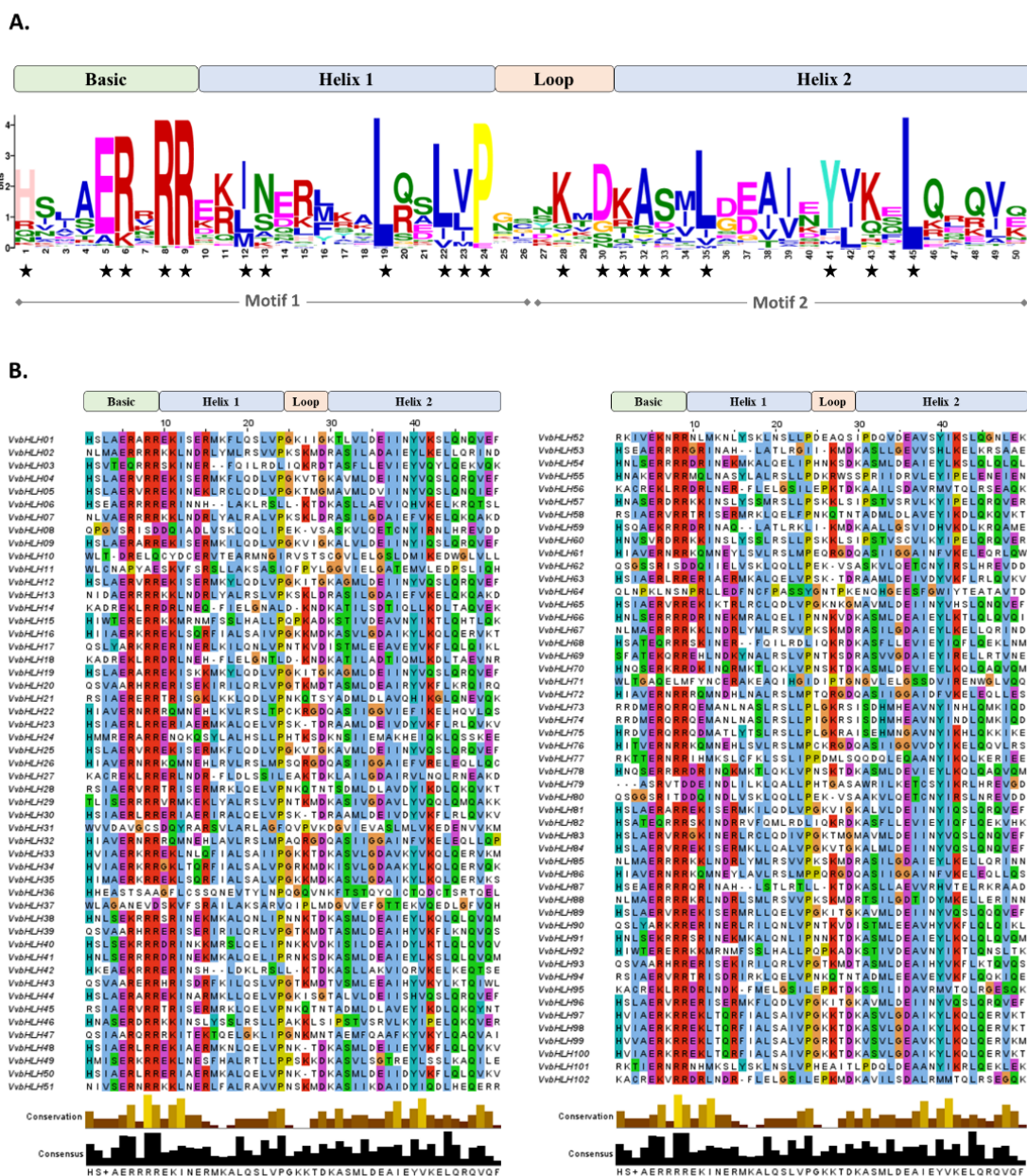


Figura 5. Alinhamento de seqüências proteicas dos FTs bHLH de *V. vinifera*. (A) Aminoácidos conservados. (B) Domínios conservados. As estrelas indicam resíduos altamente conservados identificados previamente na literatura.

A árvore fenética foi construída utilizando como parâmetro de identificação seqüências alinhadas de *V. davidii* (VdbHLH) e VvbHLH. Baseado na classificação de *V. davidii* foram identificados 25 subgrupos e um grupo órfão (seqüências que não agruparam em nenhum dos subgrupos). O subgrupo XII agrupou 14 membros VvbHLH, enquanto que o XV, VIIa, II e IVd apenas um. Por sua vez, o subgrupo IVa agrupou oito seqüências de ambas as espécies (Figura 3).

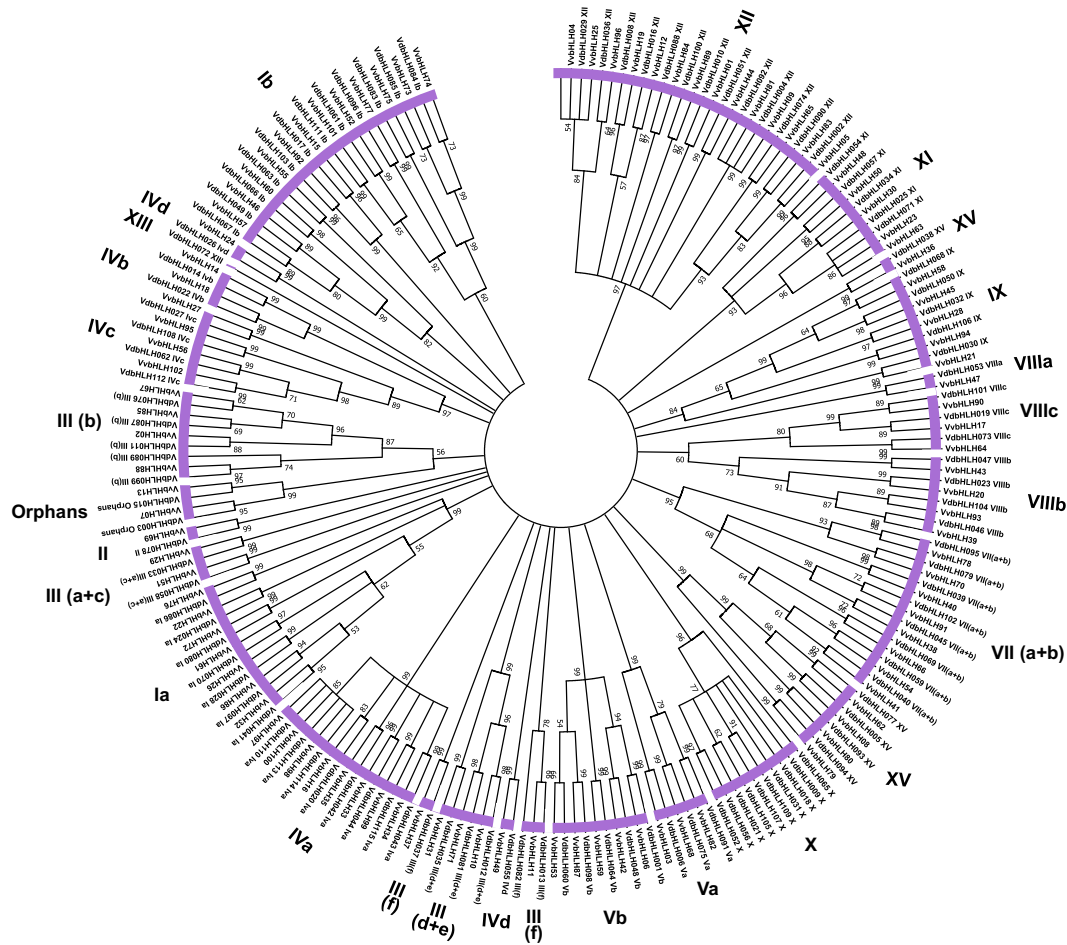


Figura 6. Árvore fenética construída com seqüências de proteínas de VvbHLH e *V. davidii*.

Dos 25 subgrupos identificados, o XII destacou-se como o mais representativo, e ao analisar a estrutura dos motivos, observou-se que todos os membros desse subgrupo possuem os três motivos característicos da família bHLH bem conservados (Figura 4).

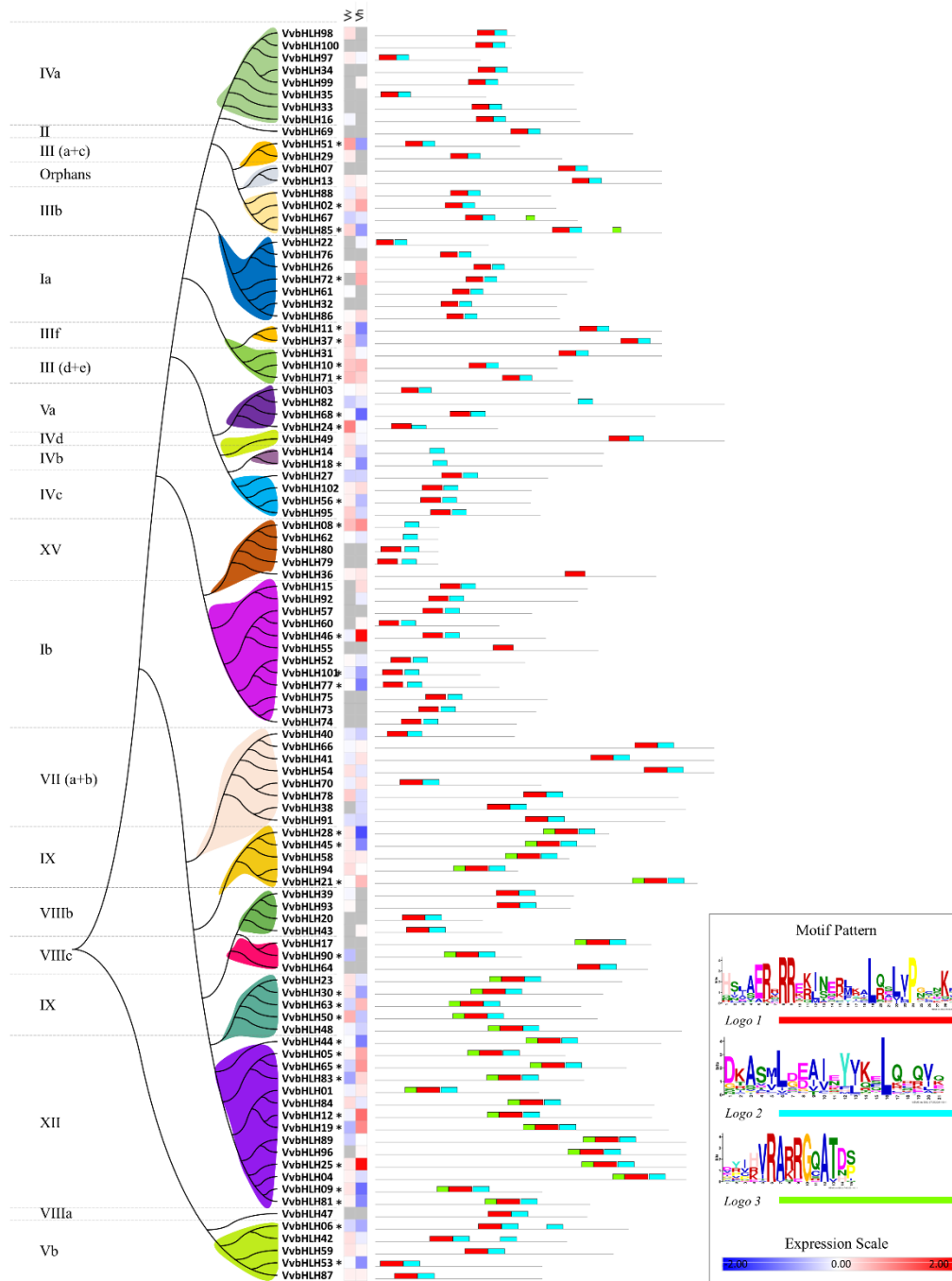


Figura 7. Árvore fenética, análise de motivos e perfil de expressão de FTs bHLH de *Vitis* spp. sob inoculação por *X. citri*. Cada ramo colorido representa um grupo distinto e as sequências que possuem asterisco apresentam $\text{Log}_2\text{FC} > 0.50$ e < -0.50 . Os blocos de motivos conservados em vermelho, azul e verde representam a Logo 1, 2 e 3, respectivamente.

O subgrupo Ib foi o segundo mais representativo da análise, com 12 membros VvbHLH, e dois motivos conservados foram identificados em 11 membros, com o membro restante apresentando apenas 1 motivo conservado em sua sequência, o

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

que aponta para uma discreta diversificação entre os membros dessa família gênica e sugere que os mesmos podem ter sofrido eventos evolutivos. No entanto, em sua maioria, os VvbHLH demonstraram características estruturais bem conservadas.

A análise de expressão *in silico* indicou que dos 102 bHLH identificados no genoma de *Vitis vinifera*, 34 mostraram-se diferencialmente expressos ($\text{Log}_2\text{FC} > 0.50$ e < -0.50) após 90 minutos de inoculação com *X. citri* (Figura 4). Desses, 12 estavam induzidos no híbrido IAC-572 (resistente) e apresentaram expressão constitutiva ou foram reprimidos na cultivar Red Globe (susceptível). Além disso, cinco apresentaram indução no acesso susceptível e foram não significativos ou reprimidos no resistente. Por fim, um DEG bHLH foi induzido em ambos os acessos (Figura 4).

Quando adotado o valor padrão de modulação ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ e < -1), o painel de candidatos se torna mais restrito (com apenas oito DEGs), porém, com expressão diferencial exclusiva no híbrido IAC-572, sendo três induzidos (VvbHLH25, VvbHLH12 e VvbHLH46) e cinco reprimidos (VvbHLH09, VvbHLH28, VvbHLH44, VvbHLH68 e VvbHLH77) (Figura 5).

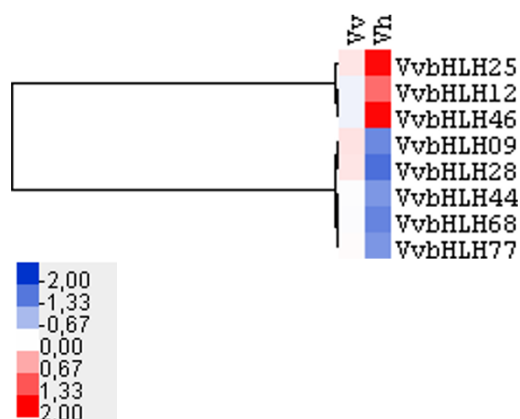


Figura 8. Perfil de expressão *in silico* ($\text{Log}_2\text{FC} > 1$ e < -1) dos FTs bHLH de *Vitis* spp. sob inoculação por *X. citri*.

Levando em consideração o conjunto de dados apresentado, podemos afirmar que os FTs bHLH possivelmente estão envolvidos na resposta precoce da videira ao estresse causado pela bactéria *X. citri*, e que após a validação por qPCR, podem ser considerados alvos promissores para aplicação em programas de melhoramento genético visando resistência ao cancro bacteriano.

Localização cromossômica e duplicação gênica

A ancoragem dos FTs bHLH no genoma de *V. vinifera* demonstrou que 96 genes foram mapeados em 18 dos 19 pseudocromossomos, com alguns formando *clusters*, enquanto seis genes (VvbHLH97 – VvbHLH102) não foram mapeados em nenhum cromossomo (Figura 6). A quantidade de genes por cromossomo variou de zero a 12.

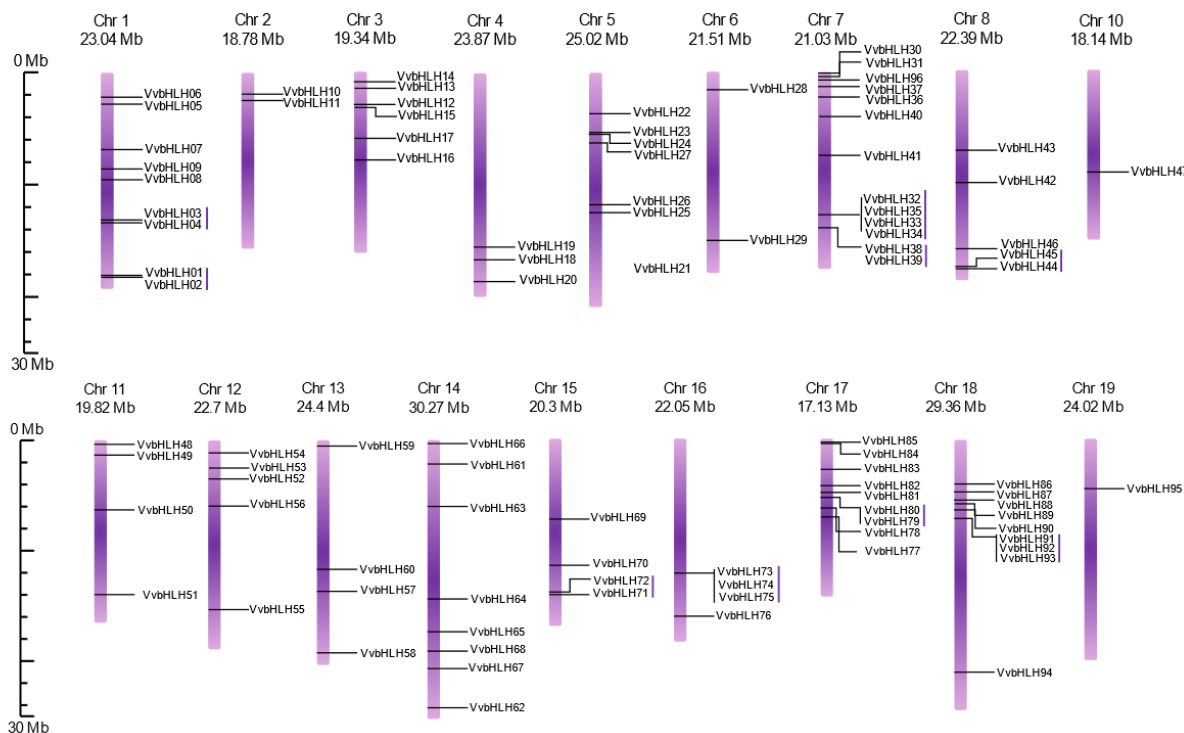


Figura 9. Representação esquemática dos 19 pseudocromossomos de videira com a localização de 96 genes bHLH. Os genes que formaram clusters estão identificados com uma barra ao lado.

Doze genes foram mapeados no pseudocromossomo sete, o mais representativo, seguido do chr1, chr17 e chr18 com nove genes em cada. Um gene foi mapeado nos chr10 e chr19, enquanto que o chr9 não ancorou nenhum gene. Pôde-se observar que os pseudocromossomos que possuem uma quantidade maior de genes demonstram uma leve tendência de localização em regiões terminais, como verificado nos chr7, chr17 e chr18 (Figura 6).

De acordo com o critério utilizado para a identificação de duplicação em tandem, foram mapeados 22 genes em tandem presentes nos cromossomos 1, chr7, chr15, chr16, chr17 e chr18. Os 22 genes duplicados formaram nove *clusters* que

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

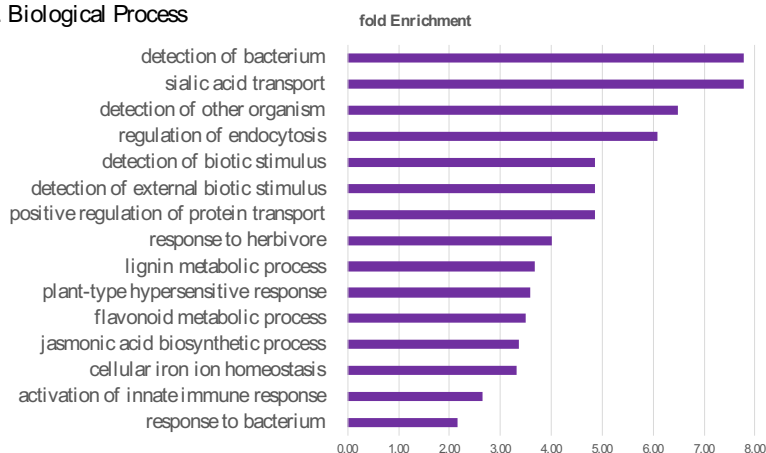
estão identificados com barras roxas na figura 6. Uma vez que a duplicação em tandem é considerada um dos mecanismos responsáveis pela expansão de famílias gênicas, os dados sugerem que estes genes possivelmente sofreram duplicação em algum momento da evolução da espécie.

Ontologia Gênica (GO) de proteínas VvbHLH

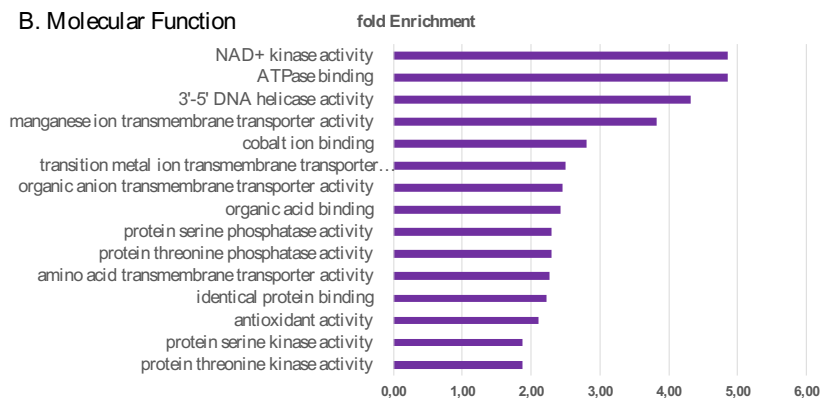
Para melhor compreender a função dos bHLH na regulação da expressão gênica, foi realizada a identificação de regiões promotoras reconhecidas por esta família gênica, observando os processos enriquecidos e conseqüentemente mais regulados pelos VvbHLH. Foi identificado um total de 5019 genes regulados pelos genes VvbHLH, que a partir da análise de enriquecimento, foi possível determinar que o processo biológico mais enriquecido corresponde a detecção de bactéria, bem como a atividade de proteínas quinases, evidenciando que membros bHLH parecem exercer importante papel na sinalização celular, principalmente em vias mediadas por proteínas quinases e direcionadas ao reconhecimento de patógenos (Figura 7).

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

A. Biological Process



B. Molecular Function



C. Protein Class

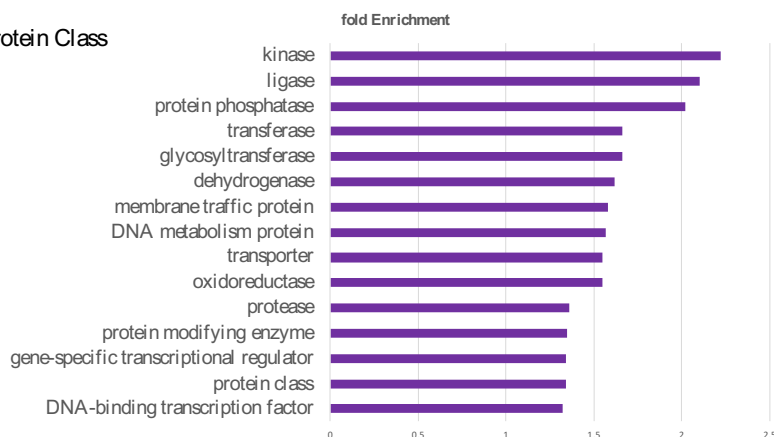


Figura 10. Anotação funcional via Ontologia Gênica (GO) de genes VvbHLH e análise de enriquecimento de promotores (A) Processos biológicos. (B.) Função Molecular. (C) Classe proteica.

Ao analisar os processos biológicos mais enriquecidos sob controle dos bHLH, notou-se que além de vias hormonais, tais como ácido salicílico e ácido jasmônico, os processos de reconhecimento e resposta a estímulos bióticos, o reconhecimento de outros organismos, resposta a herbivoria, além da ativação do sistema inato de defesa foram os mais representados. Este dados apontam para uma importante regulação de FTs bHLH em processos de defesa e sinalizadores

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

celulares, como as proteínas quinases, bem como evidenciam o envolvimento dessa família gênica na resposta inicial da videira frente ao patógeno bacteriano.

Discussão

Identificação de genes bHLH

Fatores de transcrição são proteínas responsáveis por regular a expressão gênica, como também direcionar funções essenciais na planta, como resposta a fatores ambientais e hormonais, diferenciação celular e desenvolvimento de órgãos (Nath et al., 2019). bHLH representa uma das maiores famílias de FTs entre os vegetais, e neste trabalho foram identificados 102 genes bHLH no genoma de *V. vinifera*. Resultados similares foram obtidos por Wang et al., (2018), que identificaram e caracterizaram funcionalmente 94 FTs bHLH em videira, avaliando o potencial de atuação dessa família gênica frente a estresses abióticos (seca e frio) e na biossíntese de metabólitos secundários (antocianinas e flavonoides). Recentemente, Gao et al. (2019), identificaram 126 FTs bHLH e os classificaram em 24 subfamílias com base em análises filogenéticas, incluindo homólogos de outras espécies vegetais (*A. thaliana*, *Oryza sativa* e *Populus trichocarpa*).

Por outro lado, observa-se que o número de bHLH identificados em outros vegetais é bastante variável, sendo superior ao verificado em nosso estudo em espécies como tomate (Sun et al., 2015), maçã (Mao et al., 2017), batata (Wang et al., 2018) e melão (Bai et al., 2020), e inferior em pera, *Ginkgo biloba* e cereja doce, que possuem 95, 85 e 66 FTs bHLH, respectivamente (Zhang et al., 2018b; Zhou et al., 2020; Shen et al., 2021), variação provavelmente relacionada a diferenças no tamanho do genoma ou ocasionadas por eventos evolutivos, como a duplicação genômica.

Resíduos de aminoácidos conservados no domínio bHLH e sua capacidade de ligação ao DNA

As proteínas bHLH são caracterizadas pela presença de um domínio bHLH altamente conservado que confere a função de ligação ao DNA, interação proteína-proteína e regulação transcricional em vias de desenvolvimento (Murre et al., 1994). O domínio bHLH possui cerca de 60 aminoácidos e é composto por uma região básica e uma hélice-loop-hélice, a região básica é bem conservada e tem como

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

função a ligação específica do DNA a sequencias com determinados aminoácidos conservados, facilitando a ligação das proteínas ao *cis* elemento conhecido como E-box (5'-CANNTG-3') (Gao et al., 2019).

Ao analisar o domínio conservado das VvbHLH identificamos a região básica e a hélice-alça-hélice bem definidas, e uma composição de 50 aminoácidos, similarmente ao encontrado em *Dendrobium officinale* e beringela, com 55 e 54 aminoácidos, respectivamente (Wang e Liu, 2020; Tian et al., 2019), e menor que em milho e banana (63 e 79 aminoácidos) (Zhang et al., 2018a; Wang et al., 2020). Em nosso estudo, foram identificados 23 resíduos conservados com identidade superior a 50%, além de cinco resíduos presentes na região básica e 18 na hélice-alça-hélice. Três resíduos (Arg-8, Arg-9 e Leu-45) se destacaram como altamente conservados, apresentando 89, 89 e 93% de identidade, respectivamente, corroborando ao observado em *D. officinale*, que apresentou identidade de 89% para Arg-16 e de 91% para Leu-55 (Wang e Liu, 2020).

Foram verificados três resíduos de Arginina (R) altamente conservados em nosso trabalho, os quais segundo Atchley et al. (1999) ocorrem em uma frequência superior a 90%. Além disso, identificamos um motivo HER bem conservado, como observado em proteínas bHLH de banana (Wang et al., 2020), milho (Zhang et al., 2018a), pera (Zhang et al., 2018b) e *Ginkgo biloba* (Zhou et al., 2020). O motivo HER (His-Glu-Arg) é bem conservado na região básica do domínio bHLH e está presente em mais de 50% dos vegetais, e o mesmo está relacionado a capacidade de ligação ao DNA (Atchley e Fitch, 1997; Massari e Murre, 2000; Toledo-Ortiz et al., 2003). Por fim, observamos resíduos de Leucina (L) na hélice um e dois altamente conservados, os quais de acordo com Simionato et al. (2007) foram fundamentais para a formação de dímeros em proteínas PAR1 de *Arabidopsis*. Motivos que possuem a proteína HLH naturalmente formam homo ou heterodímeros com outras proteínas bHLH, o que é essencial para o reconhecimento e especificidade da ligação ao DNA (Brownlie et al., 1997; Carretero-Paulet et al., 2010).

Localização cromossômica

A videira é uma das culturas agrícolas mais antigas já registradas pelo homem, e desde então suas espécies têm sofrido eventos evolutivos naturais, principalmente devido à polinização cruzada, o que acarreta em mudanças em nível gênico de indivíduos, e conseqüentemente na espécie ao longo do tempo. Estudos

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

genéticos sugerem que a duplicação gênica seja uma das principais causas da expansão de famílias gênicas, sendo a duplicação em tandem e segmentar as mais comuns (Cannon et al., 2004). Eventos de duplicação que originam genes presentes em um mesmo cromossomo são identificados como duplicação em tandem, por sua vez, as duplicações segmentares ocorrem quando genes são identificados em cromossomos diferentes (Li et al., 2017).

Riechmann et al. (2000) propuseram a definição de que um evento de duplicação em tandem ocorre quando em uma região cromossômica com menos de 50 kb dois ou mais genes são mapeados. Nesse sentido, ao analisar os VvbHLH identificamos um total de 22 eventos, presentes nos cromossomos um, sete, oito, 15, 16, 17 e 18. Curiosamente, no chr16 e 18 foi observada uma repetição em tandem contendo três genes bHLH (Chr16 – VvbHLH73, VvbHLH74 e VvbHLH75; Chr18 – VvbHLH91, VvbHLH92 e VvbHLH93). Além disso, observamos que apenas os genes em tandem presentes nos cromossomos 16 e 17 estão agrupados no mesmo subgrupo Ib de acordo com a árvore fenética (Figura 3), com os demais *clusters* de repetições mapeados em grupos distintos. Resultados semelhantes foram relatados por Wang et al. (2015), que avaliaram a distribuição genômica de FTs bHLH em tomate, e Li et al. (2017), analisando FTs Homeobox de videira, sugerindo que a duplicação gênica possivelmente causou uma alteração estrutural significativa na sequência dessas proteínas, a ponto de as agrupar em cromossomos distintos, e que podem, inclusive, ter conferido novas funções a esses membros bHLH.

Classificação das proteínas VvbHLH baseada na similaridade fenética e análise de motivos

A família bHLH está presente em diversos organismos, e em vegetais, há aproximadamente 26 subfamílias descritas. Em nosso estudo foram identificados 25 subgrupos, com exceção do subgrupo XIV, similarmente ao encontrado em tomate e *A. thaliana* (Wang et al., 2015; Pires e Dolan, 2010). Em todos os subgrupos observou-se uma quantidade variada de membros. Levando em consideração a alta conservação das proteínas bHLH, dois motivos específicos foram foco da nossa investigação, o domínio bHLH, que foi identificado na junção dos logos um e dois, e o terceiro motivo conhecido como *non-bHLH*, rotineiramente relatado nessa família gênica.

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

Estudos sugerem que as proteínas bHLH datem de mais de 1 bilhão de anos, o que resultou em subgrupos bem conservados, como o IVc, que agrupa uma proteína oriunda de uma alga clorófito milenar (Pires e Dolan, 2010). Ainda podemos observar que o domínio bHLH encontra-se conservado na maioria de seus membros. Aproximadamente 28 motivos *non-bHLH* já foram relatados para vegetais, e em nosso estudo, os mesmos foram agrupados em *clusters* distintos, como observado para os grupos IX, XI e XII. O subgrupo IVb agrupou apenas quatro proteínas VvbHLH, com duas destas presentes no mesmo ramo (logo 2 – hélice-alça-hélice), sendo o mesmo não identificado em *Arabidopsis* (Pires e Dolan, 2010). Em videira, Gao et al., (2019) identificaram 3 proteínas neste subgrupo.

O grupo XII foi o mais representativo com 14 VvbHLH, seguido pelo Ib com 12 membros, semelhantemente ao identificado por Gao et al. (2019), em videira (16 e 14). Ainda identificamos cinco subgrupos (III a+c, IIIb, IVc, Va e XV) com número de membros semelhantes entre *V. vinifera*, *V. davidii*, *O. sativa* e *A. thaliana* –, indicando que não ocorreu uma grande expansão nos genes destes grupos (Gao et al., 2019) Em contrapartida, os subgrupos XIII e X não agruparam nenhum membro VvbHLH, mas em *A. thaliana* estes mesmos subgrupos possuem quatro sequências (Heim et al., 2003).

Ao analisar os cinco membros VvbHLH do grupo XV notamos que quatro deles constituíam-se das menores ORF's (90, 90, 91 e 92 aa), o que pode sugerir que não houve uma grande expansão nas proteínas desse subgrupo ao longo do tempo. Em contraste, notou-se que o quinto membro VvbHLH36 possui apenas a logo correspondente a região básica, e uma ORF de 403 aminoácidos, indicando que o mesmo pode ter sofrido duplicação segmentar, semelhantemente ao relatado em *A. thaliana* (Toledo-Ortiz et al., 2003) e arroz (Li et al., 2006).

Análise *in silico* de transcritos VvbHLH diferencialmente expressos e anotação GO

FTs bHLH são responsáveis por regular diversos processos nos vegetais, como o de desenvolvimento da planta, incluindo carpelo, antera, célula epidérmica e estômatos (Pires e Dolan, 2010), processos metabólicos como a biossíntese de alcaloides (Zhang et al., 2012) e de hormônios, como o ácido abscísico (ABA) (Abe et al., 2003), etileno, giberelina e ácido jasmônico (Fernandez-calvo et al., 2011), como também na resposta a estresses abióticos como seca, salinidade,

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

luminosidade e deficiência em ferro (Wang e Lan, 2016; Castelain et al., 2012). No entanto, estudos que reportem sua atuação sob estresses bióticos ainda são escassos, com relatos recentes de investigações envolvendo sua participação na resposta de defesa da banana contra o fungo *Fusarium oxysporum* f.sp cubense (Wang et al., 2020), e em trigo, contra os fungos *Fusarium pseudograminearum* e *Zymoseptoria tritici* (Wang et al., 2019). Em videira, a maioria das análises transcriptômicas desenvolvidas com FTs bHLH visaram investigar processos que regulam a biossíntese de antocianinas e flavonoides (Wang et al., 2018), estresses abióticos como hídrico (catacchio et al., 2019) ou salinos (Upadhyay et al., 2018), trabalhos envolvendo estresses bióticos são restritos a infecção por fungos (Gonçalves et al., 2019; Liu et al., 2020).

Em nosso estudo, foram identificados 34 DEGs bHLH ($\text{Log}_2\text{FC} > 0.50$ e < -0.50), com a maioria desses candidatos apresentando indução exclusiva no acesso moderadamente resistente a *X. citri*. FTs bHLH foram identificados como uma das famílias mais representativas em DEGs na videira em resposta a infecção ao fungo *Plasmopora viticola*, causador do míldio na videira (Liu et al., 2020). Gao et al. (2019) avaliaram via qPCR 26 genes bHLH associados ao ataque dos fungos causadores do míldio e oídio (*Elsinoe ampelina*) em videira e relataram a expressão diferencial de vários deles em diferentes órgãos (caule, folha, gavinha, raiz, flor e fruto) e sob estresse hormonal (ácido abscísico e metil jasmonato). Recentemente, Liu et al. (2020) identificaram 1.091 e 849 DEGs em cultivares resistentes e suscetíveis ao míldio, respectivamente, a partir de bibliotecas de RNA-Seq.

A análise de ontologia gênica é dividida em três principais categorias, função molecular, processos biológicos e componentes celulares. A função molecular descreve a atividade bioquímica de um produto gênico, incluindo ligações específicas (Ashburner et al., 2000). No enriquecimento da função molecular, como esperado, as proteínas VvbHLH estavam relacionadas a atividades de ligação ao DNA e proteínas específicas, similarmente ao observado por Mao et al. (2017) avaliando FTs bHLH em maçã sob estresse hídrico e salino. Com relação aos processos biológicos, o termo mais enriquecido para os FTs bHLH de videira foi a detecção de bactéria e resposta a estímulos bióticos externos, confirmando a atuação dessas proteínas frente ao estresse estudado. Wang et al., (2019) relataram que os processos mais enriquecidos observados para bHLH em trigo sob estresse abiótico (calor, seca, frio e salino) e biótico (*Fusarium pseudograminearum*

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

e *Zymoseptoria tritici*) foram processos celulares e metabólicos. Por sua vez, Wang et al. (2018) reportaram o termo “processos biossintéticos” como o mais enriquecido para FTs bHLH avaliados em batata sob estresse causado por calor, sal e seca.

Considerações Finais

Neste estudo, FTs bHLH foram caracterizados estruturalmente e funcionalmente através de ferramentas de bioinformática objetivando identificar candidatos promissores para aplicação em programas de melhoramento genético visando resistência ao cancro bacteriano da videira. Bibliotecas de RNA-Seq geradas a partir de duas cultivares de videira submetidas a inoculação com *X. citri* em tempo precoce (90 minutos) foram utilizadas para selecionar genes alvos envolvidos no processo de defesa da planta ao patógeno bacteriano. Do ponto de vista genômico, em sua maioria, os VvbHLH demonstraram características estruturais bem conservadas, apresentando domínios íntegros e motivos característicos da família gênica. A avaliação de eventos de duplicação gênica demonstrou que essa família provavelmente teve uma expansão no decorrer de sua evolução. As análises funcionais forneceram evidências da atuação dos FTs bHLH na interação entre a videira e *X. citri*, com enriquecimento de promotores relacionados a sinalização celular, em vias mediadas por proteínas quinases e direcionadas ao reconhecimento de patógenos. Entre os processos biológicos enriquecidos sob controle dos bHLH, destacaram-se as vias dos fitohormônios SA e JA, percepção e resposta a estímulos bióticos, e ativação do sistema inato de defesa, apontando que as principais vias reguladas por FTs bHLH relacionam-se diretamente com respostas imunológicas da videira a condição estressante. O perfil de expressão demonstrou a modulação de vários candidatos bHLH na resposta precoce da planta frente a infecção bacteriana, especialmente no acesso moderadamente resistente, reforçando o potencial desses FTs como alvos biotecnológicos para manipulação genética em acessos de videira susceptíveis ao cancro bacteriano ou em outras espécies importantes agronomicamente acometidas pela doença. Os resultados aqui apresentados ampliam o conhecimento acerca dos mecanismos de defesa da espécie contra *X. citri* e confirmam a participação de FTs bHLH nas condições analisadas, sendo de grande importância para aplicação em programas de melhoramento da videira.

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

REFERÊNCIAS

- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K e Yamaguchi-Shinozaki K (2003) Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 15:63-78.
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, ... e Sherlock G (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. *Nature genetics*, 25:25-29.
- Atchley WR e Fitch WM (1997) A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc. Natl Acad. Sci.* 94:5172–5176.
- Atchley WR, Terhalle W e Dress A (1999) Positional dependence, cliques, and predictive motifs in the bHLH protein domain. *Journal of molecular evolution* 48:501-516.
- Bai S, Tan C, Tian Y, Ma M e Hasi A (2020) Genome-wide identification and characterization of melon bHLH transcription factors in regulation of fruit development.
- Brownlie P, Ceska T, Lamers M, Romier C, Stier G, Teo H e Suck D (1997) The crystal structure of an intact human Max-DNA complex: new insights into mechanisms of transcriptional control. *Structure* 5:509–520.
- Cannon SB, Mitra A, Baumgarten A, Young ND e May G (2004) The roles of segmental and tandem gene duplication in the evolution of large gene families in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 4:10.
- Carretero-Paulet L, Galstyan A, Roig-Villanova I, Martinez-Garcia JF, Bilbao-Castro JR e Robertson DL (2010) Genome-wide classification and evolutionary analysis of the bHLH family of transcription factors in *Arabidopsis*, poplar, rice, moss, and algae. *Plant Physiol* 153:1398–1412.
- Castelain M, Le Hir R e Bellini C (2012) The non-DNA-binding bHLH transcription factor PRE3/bHLH135/ATBS1/TMO7 is involved in the regulation of light signaling pathway in *Arabidopsis*. *Physiologia plantarum* 145:450-460.
- Catacchio CR, Alagna F, Perniola R, Bergamini C, Rotunno S, Calabrese FM, Crupi P, Antonacci D, Ventura M e Cardone MF (2019) Transcriptomic and genomic

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

structural variation analyses on grape cultivars reveal new insights into the genotype-dependent responses to water stress. *Scientific Reports* 9: 1-15.

Chou KC e Shen HB (2010) Cell-PLoc 2.0: An improved package of web servers for predicting subcellular localization of proteins in various organisms. *Natural Science* 2010:1090–1103

Da Gama MAS, Mariano RLR, Silva Júnior WJ, Farias ARG, Barbosa MAG, Ferreira MASV, Costa Júnior CRL, Santos LA, Souza EB (2018) Taxonomic repositioning of *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 as *Xanthomonas citri* pv. *viticola* (Nayudu 1972) Dye 1978 comb. nov. and emendation of the description of *Xanthomonas citri* pv. *anacardii* to include pigmented isolates pathogenic to cashew plant. *Phytopathology* 108:1143–1153

Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M e Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15-21.

Feller A, Machemer K, Braun EL e Grotewold E (2011) Evolutionary and comparative analysis of MYB and bHLH plant transcription factors. *Plant J.* 66:94-116

Feng XM, Zhao Q, Zhao LL, Qiao Y, Xie XB, Li HF, Yao YX, You CX e Hao YJ (2012) The cold-induced basic helix-loop-helix transcription factor gene MdCibHLH1 encodes an ICE-like protein in apple. *BMC Plant Biol* 12:22.

Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico JM, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J ... e Solano R (2011) The *Arabidopsis* bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *The Plant Cell* 23:701-715.

Friedrichsen DM, Nemhauser J, Muramitsu T, Maloof JN, Alonso J, Ecker JR, Furuya M e Chory J (2002) Three redundant brassinosteroid early response genes encode putative bHLH transcription factors required for normal growth. *Genetics* 162:1445-1456.

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

Gao M, Zhu Y, Yang J, Zhang H, Cheng C, Zhang Y ... e Wang X (2019) Identification of the grape basic helix–loop–helix transcription factor family and

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

characterization of expression patterns in response to different stresses. *Plant Growth Regulation* 88:19-39.

Gonçalves MFM, Nunes RB, Tilleman L, Van De Peer Y, Deforce D, Nieuwerburgh F Van, Esteves AC e Alves A (2019) Dual RNA sequencing of *Vitis vinifera* during *Lasiodiplodia theobromae* infection unveils host–pathogen interactions. *International Journal of Molecular Sciences* 20:6083.

Heim MA, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B e Bailey PC (2003) The basic helix–loop–helix transcription factor family in plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular biology and evolution* 20:735-747.

Hiller K, Grote A, Maneck M, Münch R e Jahn D (2006) JVirGel 2.0: computational prediction of proteomes separated via two-dimensional gel electrophoresis under consideration of membrane and secreted proteins. *Bioinformatics* 22:2441–2443.

Hu DG, Sun CH, Zhang QY, An JP, You CX e Hao YJ (2016) Glucose Sensor MdHXK1 Phosphorylates and Stabilizes MdbHLH3 to Promote Anthocyanin Biosynthesis in Apple. *PLoS Genet* 12:e1006273.

Kumar S, Stecher G e Tamura K (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 33:1870–1874.

Li M, Sun L, Gu H, Cheng D, Guo X, Chen R ... e Chen J (2021) Genome-wide characterization and analysis of bHLH transcription factors related to anthocyanin biosynthesis in spine grapes (*Vitis davidii*). *Scientific reports* 11:1-13.

Li X, Duan X, Jiang H, Sun Y, Tang Y, Yuan Z, Guo J, Liang W, Chen L e Yin J (2006) Genome-wide analysis of basic/helix-loop-helix transcription factor family in rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141:1167–1184

Li Y, Zhu Y, Yao J, Zhang S, Wang L, Guo C, van S Nocker, Wang X (2017) Genome-wide identification and expression analyses of the homeobox transcription factor family during ovule development in seedless and seeded grapes. *Sci Rep* 7:12638

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.
- Liu L, Zhang B, Wang H, Yu SY, Guan TS, Huang YF e Liu CY (2020) Candidate resistance genes selection and transcriptome analysis for the early responses to *Plasmopara viticola* infection in grape cultivars. *Journal of Plant Pathology* 102:857-869.
- Love MI, Huber W e Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15:550.
- Mao K, Dong Q, Li C, Liu C e Ma F (2017) Genome wide identification and characterization of apple bHLH transcription factors and expression analysis in response to drought and salt stress. *Frontiers in plant science* 8:480.
- Massari ME e Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20:429–440.
- Murre C, Bain G, van Dijk MA, Engel I, Furnari BA, Massari ME ... e Stuver MH (1994) Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1218:129–135
- Nath VS, Mishra AK, Kumar A, Matousek J e Jakse J (2019) Revisiting the role of transcription factor in coordinating the defense response against Citrus Bark Cracking Viroid infection in commercial hop (*Humulus lupulus* L.). *Viruses J.* 11:419.
- Page RDM (1996) Tree View: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Bioinformatics* 12: 357-358.
- Pires N e Dolan L (2010) Origin and diversification of basic-helix-loop-helix proteins in plants. *Molecular biology and evolution* 27:862-874.
- Riechmann JL, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang CZ, Keddie J ... e Yu GL (2000) Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* 290:2105-2110.
- Shen T, Wen X, Wen Z, Qiu Z, Hou Q, Li Z ... e Qiao G (2021) Genome-wide identification and expression analysis of bHLH transcription factor family in response to cold stress in sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae* 279:109905.
- Simionato E, Ledent V, Richards G, Thomas-Chollier M, Kerner P, Coornaert D, Degnan BM e Vervoort M (2007) Origin and diversification of the basic helix-

GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.

loop-helix gene family in metazoans: insights from comparative genomics. *BMC Evolutionary Biology* 7:118.

Sun H, Fan HJ, e Ling HQ (2015) Genome-wide identification and characterization of the bHLH gene family in tomato. *BMC genomics* 16:1-12.

Tian F, Yang DC, Meng YQ, Jin J e Gao G (2020) PlantRegMap: charting functional regulatory maps in plants. *Nucleic Acids Res.* 48:1104–1113.

Tian S, Li L, Wei M e Yang F (2019) Genome-wide analysis of basic helix–loop–Helix superfamily members related to anthocyanin biosynthesis in eggplant (*Solanum melongena* L.). *PeerJ* 7:e7768.

Toledo-Ortiz G, Huq E e Quail PH (2003) The Arabidopsis basic/helixloop-helix transcription factor family. *Plant Cell*, 15:1749–1770.

Upadhyay A, Gaonkar T, Upadhyay AK, Jogaiah S, Shinde MP, Kadoo NY e Gupta VS (2018) Global transcriptome analysis of grapevine (*Vitis vinifera* L.) leaves under salt stress reveals differential response at early and late stages of stress in table grape cv. Thompson Seedless. *Plant Physiology and Biochemistry* 129:168-179.

Wang C e Lan HY (2016) Research progresses on functions of plant bHLH transcription factors involved in abiotic stresses. *Life Science Research* 20:358-364.

Wang J, Hu Z, Zhao T, Yang Y, Chen T, Yang M ... e Zhang B (2015) Genome-wide analysis of bHLH transcription factor and involvement in the infection by yellow leaf curl virus in tomato (*Solanum lycopersicum*). *BMC Genomics* 16:1-14.

Wang L, Xiang L, Hong J, Xie Z e Li B (2019) Genome-wide analysis of bHLH transcription factor family reveals their involvement in biotic and abiotic stress responses in wheat (*Triticum aestivum* L.). *3 Biotech* 9:1-12.

Wang R, Zhao P, Kong N, Lu R, Pei Y, Huang C, ... e Chen Q (2018) Genome-wide identification and characterization of the potato bHLH transcription factor family. *Genes* 9:54.

Wang Y e Liu A (2020) Genomic Characterization and Expression Analysis of Basic Helix-Loop-Helix (bHLH) Family Genes in Traditional Chinese Herb *Dendrobium officinale*. *Plants* 9:1044.

- GRANGEIRO, C.C.C. (2021) Caracterização molecular e perfil transcricional de fatores de transcrição bHLH em videira sob estresse biótico.
- Wang Z, Jia C, Wang JY, Miao HX, Liu JH, Chen C, ... e Jin Z (2020) Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix transcription factors to elucidate candidate genes related to fruit ripening and stress in Banana (*Musa acuminata* L. AAA Group, cv. Cavendish). *Frontiers in Plant Science* 11:650.
- Yu C, Yan M, Dong H, Luo J, Ke Y, Guo A, Chen Y, Zhang J e Huang X (2021) Maize bHLH55 functions positively in salt tolerance through modulation of AsA biosynthesis by directly regulating GDP-mannose pathway genes. *Plant Sci* 302:110676.
- Zhang C, Feng R, Ma R, Shen Z, Cai Z, Song Z ... e Yu M (2018b) Genome-wide analysis of basic helix-loop-helix superfamily members in peach. *PLoS One* 13:e0195974.
- Zhang HB, Bokowiec MT, Rushton PJ, Han SC e Timko MP (2012) Tobacco transcription factors NtMYC2a and NtMYC2b form nuclear complexes with the NtJAZ1 repressor and regulate multiple jasmonate-inducible steps in nicotine biosynthesis. *Molecular plant* 5:73-84.
- Zhang T, Lv W, Zhang H, Ma L, Li P, Ge L e Li G (2018a). Genome-wide analysis of the basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor family in maize. *BMC plant biology* 18:1-14.
- Zhao L, Ding Q, Zeng J, Wang FR, Zhang J, Fan SJ e He XQ (2012) An improved CTAB–ammonium acetate method for total RNA isolation from cotton. *Phytochemical Analysis* 23:647-650.
- Zhou X, Liao Y, Kim SU, Chen Z, Nie G, Cheng S ... e Xu F (2020) Genome-wide identification and characterization of bHLH family genes from *Ginkgo biloba*. *Scientific reports* 10:1-15.