

JARDEL DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS  
À PROLINA EM FEIJÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICOS**

Presidente Prudente - SP  
2025

**JARDEL DE OLIVEIRA**

**CARACTERIZAÇÃO *IN SILICO* E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À  
PROLINA EM FEIJÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICOS**

Tese de doutorado apresentada a  
Pró- Reitoria de Pesquisa e Pós-  
Graduação, Universidade do Oeste  
Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em  
Agronomia. — Área de concentração:  
Produção vegetal.

Orientador: Dr. Tiago Benedito dos Santos

Presidente Prudente - SP  
2025

### Catalogação Internacional de Publicação (CPI)

571.282

O48d

Oliveira, Jardel

Caracterização *in silico* e expressão de genes relacionados à prolina em feijão sob condições de estresse abiótico / Jardel de Oliveira. -- Presidente Prudente, 2025.

88 f.: il.

Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2025.

Bibliografia.

Orientador: Tiago Benedito dos Santos.

1. Feijão. 2. *In silico*. 3. RT-qPCR. 4. Expressão gênica. 5. Transportador de prolina. I. Título.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO: “CARACTERIZAÇÃO IN SILICO E EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS À PROLINA EM FEIJÃO SOB CONDIÇÕES DE ESTRESSE ABIÓTICO”**

**AUTOR(A): JARDEL DE OLIVEIRA**

**ORIENTADOR(A): Prof. Dr. TIAGO BENEDITO DOS SANTOS**

Aprovado(a) como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR(A) em  
AGRONOMIA

Área de Concentração PRODUÇÃO VEGETAL, pela Comissão Examinadora:

**Prof. Dr. TIAGO BENEDITO DOS SANTOS (Orientador)**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**Profa. Dra. ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**Profa. Dra. CAMILA BAPTISTÃO ZANIBONI**

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista / Presidente Prudente (SP)

**Profa. Dra. ALESSANDRA FERREIRA RIBAS**

UFPR – Universidade Federal do Paraná / Curitiba (PR)

**Profa. Dra. SILVIA GRACIELE HÜLSE DE SOUZA**

UNIPAR - Universidade Paranaense / Umuarama (PR)

Data da realização: Presidente Prudente, 30 de abril de 2025.

## Central de Assinaturas Eletrônicas

### Sobre o documento

Assunto: Documento eletrônico  
Status do documento: Concluído  
Data de criação do documento: 05/05/2025 10:44  
Fuso horário: (UTC-03:00) Brasília  
Número de assinaturas: 5  
Solicitante: KEID RIBEIRO KRUGER (#6115592)

### Signatários do documento

ANA CLAUDIA PACHECO SANTOS (PROFESSOR)

anaclau@unoeste.br  
Recebido em 05/05/2025 10:44  
Assinado em 05/05/2025 11:22  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 177.131.39.1  
ID da assinatura: 4785190

TIAGO BENEDITO DOS SANTOS (PROFESSOR)

dossantos@unoeste.br  
Recebido em 05/05/2025 10:44  
Assinado em 05/05/2025 10:45  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 177.131.39.1  
ID da assinatura: 4785189

CAMILA BAPTISTÃO ZANIBONI (FUNCIONÁRIO)

camilazaniboni@unoeste.br  
Recebido em 05/05/2025 10:44  
Assinado em 05/05/2025 10:45  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 2804:554:20d:ae00:edc0:c828:125:c97f  
ID da assinatura: 4785191

SILVIA GRACIELE HULSE DE SOUZA (SIGNATÁRIO EXTERNO)

silvia.hulse@gmail.com  
Recebido em 05/05/2025 10:44  
Assinado em 05/05/2025 11:24  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 170.247.193.8  
ID da assinatura: 4785193

ALESSANDRA FERREIRA RIBAS (SIGNATÁRIO EXTERNO)

alessandraribas@ufpr.br  
Recebido em 05/05/2025 10:44  
Assinado em 05/05/2025 11:36  
Assinatura Interna UNOESTE  
Usando endereço IP: 200.17.203.181  
ID da assinatura: 4785192

---

URL do documento: <https://www.unoeste.br/ca/cfe77508>

Assinatura digital do documento: 34b912ff1e5609b5008e3c1d7f4026ea8385db91d58f7a2ca7eff6f0a61823f7

UNOESTE - Universidade do Oeste Paulista

Mantida pela Associação Prudentina de Educação e Cultura - APEC

Utilize o QRCode abaixo para conferir a autenticidade deste documento:



## DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Santa Felix de Souza de Oliveira, e ao meu pai, Mauro de Oliveira, pelo amor incondicional, apoio e encorajamento constante durante esta jornada. Sem o carinho e dedicação, este trabalho não seria possível.*

*Aos meus colegas de pesquisa, Gustavo e Harumi, por compartilharem seus conhecimentos, insights e momentos de aprendizado ao longo desta investigação.*

*E, finalmente, ao meu orientador, Prof. Dr. Tiago Benedito dos Santos, por sua orientação sábia, paciência e por me inspirar a sempre buscar a excelência na pesquisa.*

*A todos vocês, que são pilares fundamentais em minha vida, dedico este trabalho com profunda gratidão.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus colegas de pesquisa, Gustavo e Harumi, por suas valiosas contribuições de conhecimento na área de genética para a produção vegetal. As discussões e trocas de experiências enriqueceram imensamente este trabalho.

Por fim, agradeço a todos os professores, pesquisadores e profissionais que, de alguma forma, contribuíram com seus conhecimentos e insights para o desenvolvimento desta tese. Seus esforços e colaborações foram fundamentais para a conclusão deste projeto.

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudo: “O presente estudo foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior — (Brasil) CAPES — Código de Financiamento 001”.

À Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE), pela infraestrutura.  
A todos, minha mais sincera gratidão.

*“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez.”*  
*(George Bernard Shaw).*

## RESUMO

### **Caracterização *in silico* e expressão de genes relacionados à prolina em feijão sob condições de estresse abióticos**

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) constitui uma cultura de expressiva relevância socioeconômica no Brasil, com produção distribuída em múltiplos estados e ciclos sazonais. Essa leguminosa enfrenta desafios significativos de solo e clima, com ênfase para os estresses abióticos de déficit hídrico e salinidade, fatores limitantes reduzem os índices de produtividade. Neste contexto, a investigação de genótipos contrastantes quanto à tolerância a estes estresses, como BAT 477 (tolerante) e Pérola (susceptível), representa uma estratégia fundamental para o desenvolvimento de cultivares adaptadas a condições ambientais adversas. O presente estudo objetivou identificar *in silico* e caracterizar molecularmente os genes codificadores da enzima  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (P5CS) e dos transportadores de prolina (ProT) em *P. vulgaris* L., componentes centrais na biossíntese e translocação de prolina, um osmólito compatível de função crucial nos mecanismos de osmorregulação e proteção celular sob condições de estresse. Através de análises genômicas comparativas, foram identificados quatro genes *P5CS* e dois genes *ProT* no genoma do feijoeiro. Os genes *PvP5CS* apresentam distribuição nos cromossomos 1, 8 (contém dois genes) e 10, evidenciando eventos de duplicação segmental ao longo da história evolutiva da espécie. Análises filogenéticas revelaram conservação genômica significativa entre os genes *P5CS* de *P. vulgaris* L., *A. thaliana* e *O. sativa*. Quanto ao perfil transcrecional, *PvP5CS3* demonstrou maior expressão em todos os tecidos desenvolvidos, com particular abundância em nódulos e raízes, enquanto *PvP5CS2* apresentou níveis transcrecionais reduzidos em todos os órgãos vegetais. Os transportadores ProT, localizados nos cromossomos 1 e 8, exibiram expressão preferencial em tecidos florais. Ensaios fisiológicos sob condições controladas revelaram padrões contrastantes de acúmulo de prolina entre os genótipos testados em resposta a diferentes estresses. Sob estresse salino (NaCl), a cultivar Pérola apresentou acúmulo de prolina significativamente superior ao apresentado em BAT 477, especialmente após exposição prolongada (12 dias) e concentrações elevadas de NaCl, atingindo aproximadamente 55  $\mu$ mol/g MF comparado a apenas 7  $\mu$ mol/g MF

em BAT 477. Em contrapartida, sob osmótico induzido por polietileno glicol (PEG 6000), observado-se comportamento inverso, com BAT 477 exibindo maior capacidade de acúmulo de prolina (8 µmol/g MF) em comparação com Pérola (3,5 µmol/g MF). Por meio de análises *in silico*, identificou-se os perfis de expressão desses genes em folhas de dois genótipos de feijão (BAT 477 e Pérola) sob estresse salino e hídrico. Os genes *PvP5CS1*, *PvP5CS3* e *PvP5CS4* mostraram expressão gênica significativas menores em diferentes tecidos vegetais (*in silico*). O estresse salino (osmótico), caracterizado por altas concentrações de sais, difere do estresse hídrico, que pode ocorrer tanto pela deficiência quanto pelo excesso de água. Estes resultados sugerem a existência de mecanismos regulatórios distintos e genótipos específicos na biossíntese e transporte de prolina em resposta a diferentes estresses abióticos em *P. vulgaris* L.. A elucidação desses mecanismos moleculares oferece perspectivas promissoras para o melhoramento genético envolvendo o desenvolvimento de cultivares com maior estabilidade produtiva sob condições ambientais adversas, contribuindo assim para a segurança alimentar e a sustentabilidade agrícola.

**Palavras-chave:** Feijão; *in silico*; RT-qPCR; expressão gênica; transportador de prolina.

## ABSTRACT

### ***In silico* characterization and expression of proline-related genes in beans under abiotic stress conditions**

The common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) is a crop of significant socioeconomic importance in Brazil, with production distributed across multiple states and seasonal cycles. This legume faces substantial soil and climate challenges, particularly abiotic stresses such as water deficit and salinity, which are limiting factors that reduce productivity. In this context, investigating contrasting genotypes for tolerance to these stresses, such as BAT 477 (tolerant) and Pérola (susceptible), represents a fundamental strategy for developing cultivars adapted to adverse environmental conditions. This study aimed to identify *in silico* and molecularly characterize the genes encoding the enzyme  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) and proline transporters (ProT) in *P. vulgaris* L., key components in the biosynthesis and translocation of proline, a compatible osmolyte with a crucial role in osmoregulation and cellular protection mechanisms under stress conditions. Through comparative genomic analyses, four *P5CS* genes and two *ProT* genes were identified in the common bean genome. The *PvP5CS* genes are distributed across chromosomes 1, 8 (containing two genes), and 10, indicating segmental duplication events throughout the species' evolutionary history. Phylogenetic analyses revealed significant genomic conservation among the *P5CS* genes of *P. vulgaris* L., *Arabidopsis thaliana*, and *Oryza sativa*. Regarding transcriptional profiles, *PvP5CS3* showed the highest expression in all developed tissues, with particular abundance in nodules and roots, while *PvP5CS2* exhibited reduced transcriptional levels in all vegetative organs. The ProT transporters, located on chromosomes 1 and 8, displayed preferential expression in floral tissues. Physiological assays under controlled conditions revealed contrasting patterns of proline accumulation between the tested genotypes in response to different stresses. Under saline stress (NaCl), the Pérola cultivar showed significantly higher proline accumulation compared to BAT 477, especially after prolonged exposure (12 days) and high NaCl concentrations, reaching approximately 55  $\mu$ mol/g FW compared to only 7  $\mu$ mol/g FW in BAT 477. Conversely, under osmotic stress induced by polyethylene glycol (PEG 6000), an opposite behavior was observed, with BAT 477 exhibiting greater proline accumulation

capacity (8  $\mu\text{mol/g FW}$ ) compared to Pérola (3.5  $\mu\text{mol/g FW}$ ). Through *in silico* analyses, the expression profiles of these genes were identified in leaves of two bean genotypes (BAT 477 and Pérola) under saline and water stress. The genes *PvP5CS1*, *PvP5CS3*, and *PvP5CS4* showed significantly lower gene expression in different vegetative tissues (*in silico*). Saline stress (osmotic), characterized by high salt concentrations, differs from water stress, which can result from both water deficiency and excess. These results suggest the existence of distinct regulatory mechanisms and genotype-specific responses in proline biosynthesis and transport under different abiotic stresses in *P. vulgaris* L.. The elucidation of these molecular mechanisms offers promising prospects for genetic improvement, supporting the development of cultivars with greater yield stability under adverse environmental conditions, thus contributing to food security and agricultural sustainability.

**Keywords:** Bean; *in silico*; RT-qPCR; gene expression; proline transporter.

## **LISTA DE SIGLAS**

P5CS	$\Delta^1$ -Pirrolina-5-Carboxilato Sintase
P5CR	$\Delta^1$ -Pirrolina-5-Carboxilato Redutase
ProT	Transportador de prolina
ATF	Transportadores de aminoácidos
APC	Transportadores de aminoácidos-poliamina-colina
LHT	Transportadores de lisina e histidina
GAT	Transportadores de ácido c-aminobutírico
ANT	Transportadores de aminoácidos neutros
<i>GRAVY</i>	Grande Média de Hidropaticidade
FPKM	Fragmentos por quilobase por milhão de leituras
BLAST	Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 —	Fenologia do feijoeiro.....	23
Figura 2 —	Fatores abióticos que podem afetar as plantas.....	26
Figura 3 —	Via de biossíntese da prolina em plantas.....	28
Figura 4 —	Cultivares de feijão BAT 477 (tolerante à seca) e Pérola (susceptível à seca) cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão.....	37
Figura 5 —	Representação do experimento de estresse osmótico com PEG em casa de vegetação.....	38
Figura 6 —	Representação do experimento de estresse salino com NaCl em casa de vegetação.....	40
Figura 7 —	Quantificação da prolina nas amostras controle e tratadas com três, seis, nove e 12 dias de estresse salino (A) e PEG (B).....	41
Figura 8 —	Estruturas gênica (éxon e ítron) dos genes PvP5CS em <i>P. vulgaris L.</i> .....	45
Figura 9 —	Distribuição de genes P5CS nos cromossomos de <i>P. vulgaris L.</i> O tamanho de cada cromossomo e sua distribuição correspondente foi obtido no genoma de <i>P. vulgaris L.</i> .....	45
Figura 10 —	Localização dos motifs conservados em proteínas PvP5CS de <i>P. vulgaris L.</i> .....	46
Figura 11 —	Perfil transcricional das respostas dos genes relacionados PvP5CSs.....	48
Figura 12 —	Análise de sintenia de genes PvP5CS entre <i>P. vulgaris L.</i> e duas espécies de plantas ( <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> ) representativas.....	49
Figura 13 —	Árvore filogenética de sequências de proteínas P5CS de <i>P. vulgaris L.</i> , <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> .....	50
Figura 14 —	Predição de estrutura de proteína PvP5CS. Para a predição foram usadas sequências de proteínas (PvP5CS).....	52
Figura 15 —	Elementos regulatórios cis em sequências genéticas.....	53
Figura 16 —	Estruturas de éxon e ítron dos genes PvProT em <i>P. vulgaris L.</i> Traços em verde são de regiões de éxon, as linhas são	

representadas pelos íntrons, regiões na cor azul são sequências downstream e upstream.....	54
Figura 17 — Distribuição de genes PvProT nos cromossomos de <i>P. vulgaris</i> L. O tamanho de cada cromossomo e sua distribuição correspondente foram obtidos no genoma de <i>P. vulgaris</i> L.....	55
Figura 18 — Representação da distribuição de motivos (motifs) conservados entre as sequências de ProT de <i>P. vulgaris</i> L. A altura geral de cada pilha (letra) representa a conservação da sequência naquela posição.....	56
Figura 19 — Perfil transcricional das respostas dos genes relacionados ProT em <i>P. vulgaris</i> L. O heatmap foi clusterizado com base no valor FPKM (fragments per kilobase of transcript per million reads) dos genes ProTs identificados no genoma de <i>P. vulgaris</i> L.....	59
Figura 20 — Análise de sintenia de genes PvProT entre <i>P. vulgaris</i> L. e duas espécies de plantas representativas.....	58
Figura 21 — Árvore filogenética de sequências de proteínas PvProT de <i>P. vulgaris</i> L., <i>A. thaliana</i> e <i>O. sativa</i> .....	59
Figura 22 — Predição de estrutura de proteína PvProT em <i>P. vulgaris</i> L. Para a predição foram usadas sequências de proteínas (PvProT).....	60
Figura 23 — Elementos regulatórios cis em sequências genéticas.....	61
Figura 24 — Acúmulo de prolina em duas cultivares de feijão (Pérola e BAT 477) sob estresse salino.....	62
Figura 25 — Acúmulo de prolina em duas cultivares de feijão (Pérola e BAT 477) sob estresse de PEG.....	63
Figura 26 — Expressão relativa de genes PvP5CS em folhas de cultivar BAT 477 submetidos a diferentes períodos e doses de NaCl..	64
Figura 27 — Expressão relativa de genes PvP5CS em folhas de cultivar BAT 477 submetidos a diferentes períodos e doses de PEG...	65
Figura 28 — Expressão relativa de genes PvP5CS em folhas da cultivar Pérola submetidos a diferentes períodos e doses de NaCl.....	66

Figura 29 — Perfil transcracional de PvP5CS em folhas da cultivar Pérola submetidos a diferentes períodos e doses de PEG..... 67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 —	Genes candidatos e sequências utilizadas para o RT-qPCR...	43
Tabela 2 —	Genes P5CS identificados em <i>P. vulgaris</i> L.....	44
Tabela 3 —	Análise funcional dos motifs identificados em proteínas PvP5CS de <i>P. vulgaris</i> L.....	47
Tabela 4 —	Pares de genes PvP5CS duplicados em segmentados no genoma de <i>P. vulgaris</i> L. com a data de suas respectivas duplicações.....	49
Tabela 5 —	Genes PvProT identificados em <i>P. vulgaris</i> L.....	53
Tabela 6 —	Pares de genes PvProT duplicados em tandem e segmentados no genoma de <i>P. vulgaris</i> L. com a data de suas respectivas duplicações.....	58

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Aspectos gerais do feijoeiro.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Estresses abióticos.....</b>	<b>25</b>
<b>2.3</b>	<b>Prolina.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4</b>	<b>Transportador de prolina (ProT).....</b>	<b>29</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO.....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Análises <i>in silico</i> para identificação de genes.....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Busca e identificação de sequências.....	33
4.1.2	Estratégia de busca para a revisão sistemática.....	33
4.1.2.1	Obtenção e preparação das sequências.....	33
4.1.2.2	Caracterização físico-química das proteínas.....	33
4.1.2.3	Predição de localização subcelular.....	33
4.1.2.4	Análise estrutural dos genes.....	34
4.1.2.5	Identificação de motivos proteicos conservados.....	34
4.1.2.6	Modelagem estrutural das proteínas.....	34
4.1.2.7	Mapeamento cromossômico.....	34
4.1.2.8	Análise filogenética.....	35
4.1.2.9	Análise de elementos regulatórios <i>cis</i> .....	35
4.1.3	Análises integradas.....	35
4.1.3.1	Análise de expressão ( <i>in silico</i> ).....	36
<b>4.2</b>	<b>Experimento de estresse abiótico.....</b>	<b>36</b>
4.2.1	Experimento de estresse osmótico (PEG- polietileno glicol).....	37
4.2.2	Experimento de estresse salino (NaCl).....	39
<b>4.3</b>	<b>Conteúdo de prolina.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4</b>	<b>Extração de RNA total, purificação e síntese de cDNA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Avaliação transcricional dos genes candidatos.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Identificação dos genes P5CS em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Estrutura gênica de P5CS em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>44</b>

<b>5.3</b>	<b>Mapeamento de genes P5CS nos cromossomos de <i>P. vulgaris</i> L..</b>	<b>45</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise dos motivos protéicos de PvP5CS em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>45</b>
<b>5.5</b>	<b>Perfil de expressão gênica P5CS em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>47</b>
<b>5.6</b>	<b>Evento de duplicação de genes P5CS em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>48</b>
<b>5.7</b>	<b>Análises de sintenia de genes P5CS em <i>P. vulgaris</i> L. <i>A. thaliana</i> e <i>O. Sativa</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>5.8</b>	<b>Árvore filogenética de <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>50</b>
<b>5.9</b>	<b>Proteínas PvP5CS em 3D em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>50</b>
<b>5.10</b>	<b>Elementos regulatórios <i>cis</i> de sequências genéticas em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>53</b>
<b>5.11</b>	<b>Identificação dos genes ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>53</b>
<b>5.12</b>	<b>Estrutura gênica de ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>54</b>
<b>5.13</b>	<b>Mapeamento de genes ProT nos cromossomos de <i>P. vulgaris</i> L...</b>	<b>54</b>
<b>5.14</b>	<b>Análise dos motivos protéicos ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>55</b>
<b>5.15</b>	<b>Expressão gênica ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>56</b>
<b>5.16</b>	<b>Evento de duplicação de genes ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>57</b>
<b>5.17</b>	<b>Análise de sintenia de genes ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>58</b>
<b>5.18</b>	<b>Árvore filogenética de <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>58</b>
<b>5.19</b>	<b>Proteínas PvProT em 3D em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>59</b>
<b>5.20</b>	<b>Elementos regulatórios <i>cis</i> de sequências genéticas ProT em <i>P. vulgaris</i> L.....</b>	<b>60</b>
<b>5.21</b>	<b>Determinação da quantidade de prolina em plantas tratadas com NaCl.....</b>	<b>61</b>
<b>5.22</b>	<b>Determinação da quantidade de prolina em plantas tratadas com PEG.....</b>	<b>62</b>
<b>5.23</b>	<b>Validação de RT-qPCR de genes diferencialmente expressos.....</b>	<b>63</b>
5.23.1	Perfil transcrional de PvP5CS em resposta ao estresse salino em folhas de feijão BAT 477.....	63
5.23.2	Perfil transcrional de PvP5CS em resposta ao estresse hídrico induzido por PEG em folhas de feijão da cultivar BAT 477.....	64
5.23.3	Perfil transcrional de PvP5CS em resposta ao estresse hídrico induzido por NaCl em folhas de feijão da cultivar Pérola.....	65
5.23.4	Perfil transcrional de PvP5CS em resposta ao estresse hídrico	

induzido por PEG em folhas de feijão da cultivar Pérola.....	66
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>6.1 Prolina (P5CS).....</b>	<b>68</b>
<b>6.2 Transportador de prolina (ProT).....</b>	<b>74</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>77</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As mudanças climáticas têm impactado significativamente todos os setores do agronegócio nos últimos anos (Grigorieva; Livenets; Stelmakh, 2023). A gravidade dos efeitos de ondas de calor e secas se intensificou drasticamente, saltando de 2,2% no período entre 1964 e 1990, para 7,3% entre 1991 e 2015 (FAO, 2023). Os registros demonstram que o aquecimento global já provoca impactos expressivos na agricultura. As crescentes evidências científicas indicam que a contínua tendência de aquecimento global, alterações nos padrões sazonais e maior intensidade das precipitações irão aumentar a vulnerabilidade dos sistemas agrícolas (Bibi; Rahman, 2023). Eventos catastróficos recorrentes relacionados às mudanças climáticas representam séria ameaça à segurança alimentar e à sustentabilidade do setor agrícola no longo prazo (FAO, 2023). Tais perturbações climáticas resultam em alterações ambientais, como ondas de calor, padrões irregulares de precipitação, aumento na concentração de CO<sub>2</sub> atmosférico e variações de temperatura (Santos *et al.*, 2022). Essas mudanças, por exemplo, levam ao surgimento de novas pragas, ervas daninhas e patógenos, impactando negativamente a produção agrícola. Com o crescimento populacional projetado para 9,1 bilhões em 2050, a segurança alimentar global enfrenta desafios críticos como terras limitadas, escassez de água e mudanças climáticas (Chaudhry; Sidhu, 2022). Para superar esses obstáculos, é necessário desenvolver uma estratégia abrangente que integre tecnologias avançadas, gestão eficiente de recursos e cooperação internacional, visando aumentar a produção alimentar em 70% e reduzir a fome que atinge mais de 820 milhões de pessoas atualmente (Tkemaladze, 2025).

O feijoeiro se destaca entre as muitas culturas em risco nos próximos anos devido a esse tipo de estresse. O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma cultura muito importante, sendo cultivada extensivamente em todos os continentes do globo como monocultura ou em sistemas consorciados, desde os trópicos de planície até regiões semiáridas em ambientes temperados, com ou sem irrigação (Blair *et al.*, 2025). Por ser uma leguminosa, é considerada a principal fonte de nutrientes para milhões de pessoas nos países em desenvolvimento e uma importante fonte de proteína total, energia e micronutrientes em todo o mundo (Karavidas *et al.*, 2022).

As plantas reagem à falta de água através de diversos mecanismos

adaptativos, incluindo mudanças físicas, ativação genética e produção de substâncias que as ajudam a tolerar condições de seca (Santos *et al.*, 2022). Melhorar a resistência das plantas à seca é essencial, especialmente na agricultura sustentável, devido às mudanças climáticas e à diminuição dos recursos hídricos (Şimşek *et al.*, 2024) e a salinização de solos e águas, ameaçando a agricultura e os ecossistemas no futuro próximo (Ondrasek *et al.*, 2022). O estresse hídrico afeta funções vitais das plantas, comprometendo o turgor celular e o potencial hídrico (Yang *et al.*, 2021b). Essa condição de estresse modifica características morfológicas, fisiológicas e moleculares das culturas (Santos *et al.*, 2022). O estresse salino causado pelo NaCl (cloreto de sódio) e o estresse osmótico provocado pelo polietileno glicol (PEG) induzem um estresse hídrico nas plantas, embora por mecanismos diferentes. Ao ser avaliado os efeitos de diferentes tratamentos NaCl, PEG-6000 e irrigação reduzida nas raízes, folhas e seiva do floema de plantas pode-se entender melhor a resposta a diferentes tipos de mimetizadores de déficit hídrico (Castañeda; González, 2021).

As plantas desenvolveram diversas adaptações para lidar com a seca, incluindo a produção de substâncias protetoras e mecanismos de recuperação. Essas estratégias abrangem mudanças morfológicas, fisiológicas, bioquímicas e moleculares que as ajudam a sobreviver em condições de baixa disponibilidade de água (Santos *et al.*, 2022; Hura, T.; Hura, K.; Ostrowska, 2022). O estresse salino pode ativar a expressão de genes envolvidos na tolerância a sal, como aqueles relacionados à homeostase iônica, osmorregulação e biossíntese de solutos compatíveis (Sinaga; Marpaung, 2024). Isso ajuda a planta a manter suas funções fisiológicas e reduzir os efeitos nocivos do NaCl. Em 2019, por exemplo, um estudo sobre culturas de *Brassica* demonstrou correlações entre várias características afetadas pelo estresse salino, como a taxa de crescimento radicular, o teor de prolina, a relação iônica potássio/sódio e os hormônios relacionados ao estresse (Sinaga; Marpaung, 2024). O estresse salino também pode levar à diminuição da regulação de genes envolvidos no crescimento e desenvolvimento vegetal, resultando em redução do crescimento e da produção de frutos (Sinaga; Marpaung, 2024). Além disso, esse tipo de estresse abiótico pode induzir a expressão de genes responsivos ao estresse, o que auxilia a planta a lidar com os múltiplos estressores e melhorar sua tolerância aos estresses abióticos.

Esforços foram feitos para identificar o amplo conjunto de mecanismos

associados à maior tolerância à seca sob restrição hídrica em genótipos de feijão seco da Mesoamérica (Beebe *et al.*, 2008; Rosales *et al.*, 2012; Lanna *et al.*, 2018). Uma quantidade cada vez maior de dados genômicos do feijão comum estão se tornando disponível para a comunidade científica, permitindo pesquisas mais precisas e preditivas baseadas em informações genômicas.

A prolina é um subaminoácido cílico que desempenha um papel crucial na adaptação das plantas ao estresse hídrico. Sob condições de seca, seu acúmulo não é passivo, mas uma estratégia ativa para estabilizar estruturas subcelulares, manter o equilíbrio osmótico e neutralizar espécies reativas de oxigênio (ERO), contribuindo significativamente para a tolerância das plantas à seca (Luan *et al.*, 2024). Os estudos dos genes *P5CS* e *ProT* representam dois aspectos cruciais do metabolismo da prolina: sua biossíntese (via *P5CS*) e seu transporte e distribuição (via *ProT*). O entendimento da regulação e expressão destes genes pode revelar: como ocorre o controle dos níveis de prolina em diferentes tecidos, sua mobilização durante o desenvolvimento, quais sinais regulam sua síntese e transporte, e como este aminoácido influência os processos de desenvolvimento e reprodução das plantas.

Através das ferramentas de bioinformática é possível identificar isoformas, que são variantes da mesma proteína codificada por um único gene. Essas variantes são produzidas devido ao processamento alternativo do RNA mensageiro (RNAm) ou modificações pós-traducionais (Joaquim; El-Hani, 2010). As isoformas podem ter funções, localizações celulares ou padrões de expressão diferentes (Joaquim; El-Hani, 2010). Apesar dos esforços globais, devido à resposta altamente complexa das plantas à seca, a correlação precisa entre os genes e a tolerância à seca ainda precisa ser mais bem explorada. Assim, para lidar com o estresse hídrico no futuro, é crucial determinar os mecanismos fisiológicos e as vias de sinalização moleculares responsáveis pelo aumento da tolerância à seca. Diante o exposto, buscou-se identificar *in silico* os genes *P5CS* e *ProT* em *P. vulgaris* L. e avaliar sua expressão nas cultivares BAT 477 e Pérola.

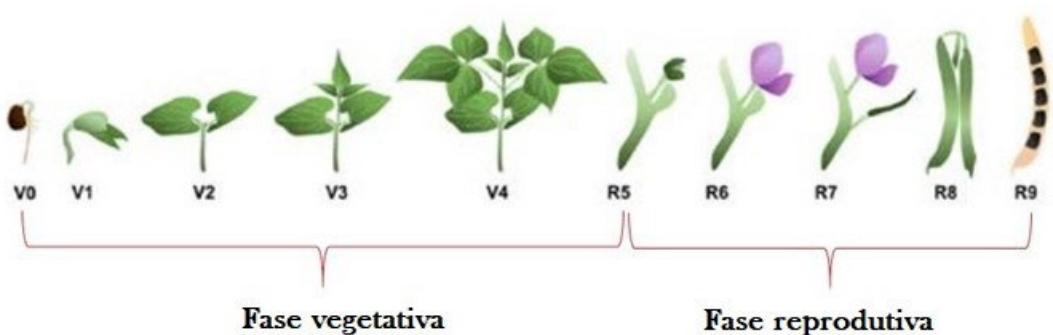
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais do feijoeiro

O feijão comum (*Phaseolus vulgaris* L.) é uma leguminosa de extrema importância utilizada como base alimentar em diversos países (Karavidas *et al.*, 2022). É uma planta autógama, dicotiledônea, pertence ao gênero *Phaseolus* da família das Fabaceae. Anteriormente através de estudos filogenéticos e da avaliação de genótipos de feijão comum amplamente coletados em diferentes regiões, variando das Américas, África (Rodriguez *et al.*, 2016; Blair *et al.*, 2025) e Europa (Angioi *et al.*, 2010; Maras *et al.*, 2013), confirmaram eventos de domesticação independentes específicos para cada um dos *pools* gênicos geográficos (Sedlar *et al.*, 2020). Botanicamente, *Phaseolus* é classificada como planta diploide e apresenta um conjunto de cromossomos igual a 22 ( $2n = 22$ ) (Ramalho; Santos, 1992). O amido é o principal carboidrato presente nas sementes de feijão, representando entre 25% e 45% da matéria seca e representa a principal fonte de carboidratos disponíveis na dieta humana (Punia, *et al.*, 2020).

Pode-se dividir o desenvolvimento da planta de feijão em duas grandes fases, sendo elas: **1º** - A fase vegetativa que se inicia a germinação da semente e vai até o aparecimento dos primeiros botões florais (R5). **2º** - Fase reprodutiva, que se inicia no florescimento sendo finalizada com a maturação fisiológica dos grãos (R9) (Portes; Kluthcouski; Oliveira, 2009). Oliveira *et al.* (2018), definiram e classificaram detalhadamente os estádios fenológicos do feijoeiro em: germinação (**V0**); emergência (**V1**); folhas primárias (**V2**); folha trifoliolada (primeira folha composta aberta) (**V3**); terceira folha trifoliolada (**V4**); primeiro botão floral (**R5**); abertura da flor (**R6**); primeira vagem (**R7**); enchimento das vagens (**R8**); e maturação fisiológica (**R9**) (Figura 1).

Figura 1 — Fenologia do feijoeiro.



Fonte: Adaptada de Debouck; Hidalgo (1985).

O cultivo de feijão comum no Brasil concentra-se principalmente nos estados do Paraná, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e São Paulo, sendo que os maiores índices de produtividade são observados nos estados do Brasil Central (São Paulo, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso), além de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná (Wander; Silva, 2023). A cultura do feijão é distribuída em três épocas de plantio, onde no período de 2020-2022, a primeira safra correspondeu a 36%, a segunda safra a 39% e a terceira safra a 25% da produção nacional (Wander; Silva, 2023).

Na análise comparativa entre as safras 2023/24 e 2024/25, observa-se uma tendência positiva nos indicadores produtivos (CONAB, 2025). A área cultivada apresentou incremento de 1,7%, evoluindo de 2.859,5 para 2.908,1 mil hectares, conjuntamente com o aumento de 3,1% na produtividade, que passou de 1.135 para 1.170 kg/ha. Como resultado dessa evolução, a produção total registrou crescimento expressivo de 4,9%, alcançando 3.401,7 mil toneladas, comparado às 3.244,3 mil toneladas da safra anterior, representando um acréscimo de 157,4 mil toneladas (CONAB, 2025). Este desempenho positivo é atribuído tanto à expansão das áreas de cultivo quanto ao incremento da eficiência produtiva, tendo este último fator contribuído de forma mais significativa para os resultados alcançados.

Em condições de irrigação, a cultivar de feijão *P. vulgaris* L. (Pérola), por exemplo, pode atingir uma produtividade de 3.000 kg por hectare (EMBRAPA, 1994), e alguns genótipos como IAC-Carioca e CNFC 8010 apresentam produtividade acima de 3.500 kg hectare em períodos chuvosos (Lemos *et al.*, 2004). Em contraste, sob condições de cultivo de sequeiro, sua produtividade pode alcançar até 2.400 kg/ha. Além disso, a cultivar Pérola supera a

variedade Carioquinha, a mais amplamente cultivada no Brasil, com uma produção adicional de 15% a 20% (EMBRAPA, 1994). Por ser uma planta de metabolismo C3, o feijoeiro tem uma alta demanda hídrica. Na ausência de água suficiente, a planta entra em um processo de fotorrespiração, o que resulta em uma produção reduzida de matéria seca e para garantir uma produção otimizada, é crucial manter um fornecimento adequado de água (Pereira; Ferreira, 2024).

No entanto, a expansão da produção de feijão irrigado no Cerrado pode enfrentar desafios devido à escassez de recursos hídricos. Fatores como urbanização e desmatamento de áreas de recarga de lençol freático, aliados às mudanças climáticas, como o aumento das temperaturas mínimas e a redução da precipitação, são causas significativas das alterações no regime hídrico (Carvalho, 2022). Essas mudanças podem ter implicações diretas na produção de feijão, exigindo estratégias de manejo eficazes para garantir a sustentabilidade da produção.

Todavia, a salinidade do solo, comum em regiões áridas e semiáridas, prejudica a estrutura do solo e o desenvolvimento vegetal. Os sais afetam as plantas de duas maneiras: osmótica e iônica (Santos *et al.*, 2022). Quando a concentração de sal ultrapassa o nível normal, o potencial hídrico do solo diminui, resultando em menor absorção de água pelas raízes das plantas (Ibrahimova, *et al.*, 2021). A sobrevivência vegetal em ambientes com alta concentração salina está diretamente condicionada à intensidade da salinização e às características adaptativas de cada espécie.

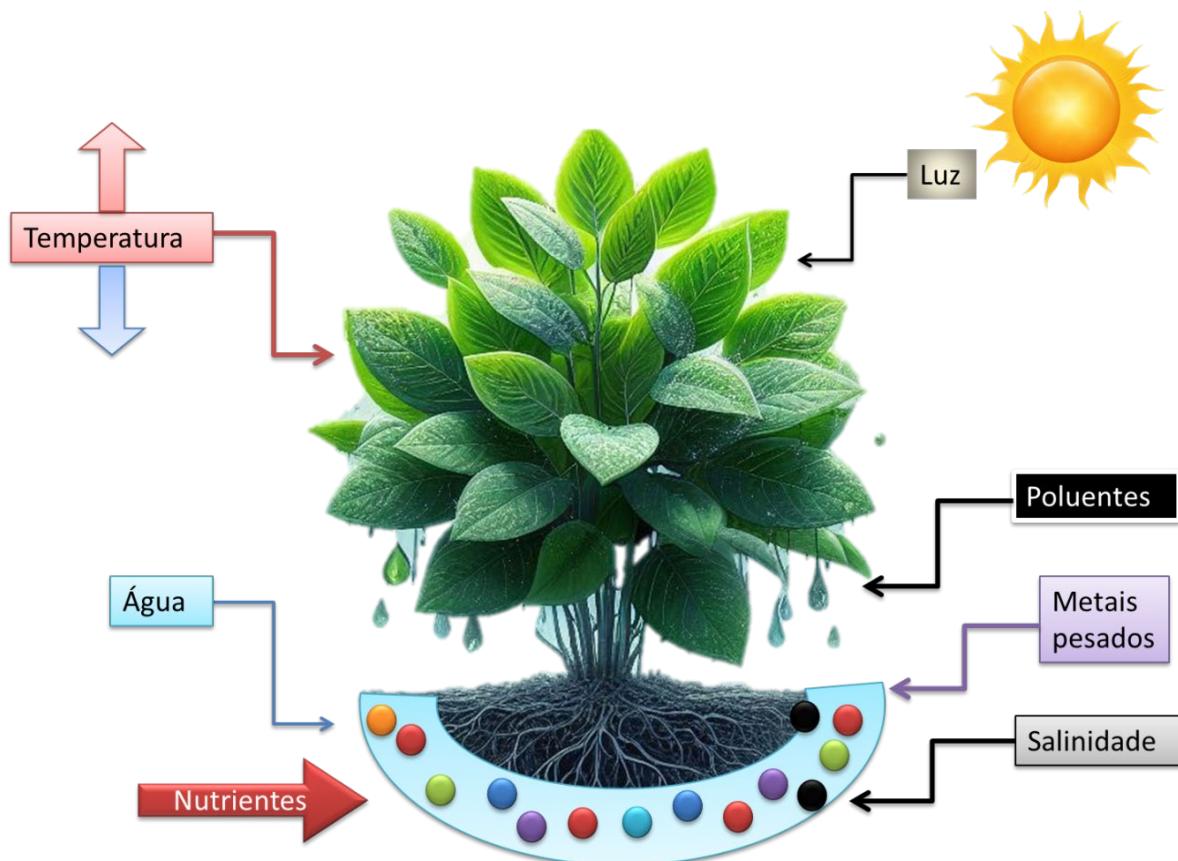
No caso específico do feijoeiro, pesquisas recentes demonstram que sua produtividade sofre significativa redução quando submetido ao estresse salino, condição que, quando associada à competição com plantas invasoras, compromete severamente suas respostas morfofisiológicas e mecanismos adaptativos (Feletti *et al.*, 2024). Porém, as plantas reagem aos sinais de estresse salino ativando rapidamente as vias de sinalização, a fim de restabelecer a homeostase celular e ajustar o crescimento e o metabolismo celular (Santos *et al.*, 2022; Zhou, *et al.*, 2024). Portanto, a gestão adequada da salinidade do solo é crucial para a produção de feijão. O feijão BAT 477 é uma cultivar de *P. vulgaris* L. conhecida por sua tolerância a condições de seca (Lanna *et al.*, 2018). Este genótipo tem sido objeto de estudos que visam compreender suas características fisiológicas e mecanismos de tolerância à seca. Estudos da Embrapa Arroz e Feijão demonstram que a cultivar

BAT 477 de feijão comum apresenta superior tolerância ao déficit hídrico, com menor redução no rendimento de grãos e maior capacidade de ajuste osmótico (Lanna *et al.*, 2018). Desenvolvido pelo Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), este genótipo exibe adaptações bioquímicas e morfoagronômicas eficientes sob estresse hídrico (Arruda *et al.*, 2018). Este genótipo pode ativar genes específicos relacionados à tolerância à seca em suas raízes, o que o torna particularmente adequado para cultivo em regiões propensas a estiagem. A cultivar Pérola, lançada em 1994 pela Embrapa Arroz e Feijão, representa um importante genótipo do grupo comercial carioca. Caracteriza- se por um ciclo de crescimento normal de 85 a 95 dias, porte semiereto e grãos de alto padrão comercial (EMBRAPA, 1994). Estudos comparativos com cultivares similares, como a BRS FC402, demonstram potencial produtivo significativo, com rendimento médio de 2462 kg/ha em condições adequadas de cultivo (Melo *et al.*, 2017).

## 2.2 Estresses abióticos

Os estresses abióticos em plantas tais como, temperaturas extremas, alagamento, seca, salinidade, dentre outros, tem um sério efeito sobre a produção agrícola mundial, pois pode comprometer o crescimento das plantas, afetando o metabolismo e, portanto, reduzindo o rendimento das culturas em até 70% (Arun-Chinnappa; Ranawake; Seneweera, 2017; Chaudhry; Sidhu, 2022). A deficiência hídrica, um dos principais estresses ambientais, reduz o potencial hídrico das plantas, comprometendo a condutância estomática e a transpiração foliar. Isso eleva a temperatura foliar e diminui a produção de fotoassimilados, impactando negativamente o crescimento e a produtividade das culturas (Souza *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2022).

Figura 2 — Fatores abióticos que podem afetar as plantas.



Fonte: Imagem criada por *Microsoft Designer* com edição. Disponibilizada em 26 de abril de 2024, através de interação com inteligência artificial (IA) de design gráfico.

Adicionalmente, os estresses abióticos desencadeiam uma ampla gama de respostas fisiológicas e morfológicas através de alterações da expressão gênica, níveis hormonais, biossíntese de metabólitos e atividade antioxidante (Santos *et al.*, 2022). Contudo, a resposta fisiológica para estresses abióticos é acompanhada de mudanças no padrão da expressão gênica, onde inúmeros genes podem ser induzidos, e consequentemente outros tipos de estresses abióticos podem desencadear uma comunicação cruzada (*cross-talk*; uma ocorrência comum no campo), entre essas vias de sinalização (Bowne *et al.*, 2018; Dwivedi, 2023).

As plantas ao longo da evolução também desenvolveram inúmeros mecanismos para manter o crescimento e a sobrevivência diante dos estresses abióticos. No contexto agrícola, a ênfase está na manutenção do crescimento e da produtividade, mas a predisposição evolutiva das plantas é mais para a sobrevivência do que para a produtividade em si (Salse *et al.*, 2024). Essa distinção deve ser lembrada ao interpretar qualquer conjunto de dados “ômicos” (Bowne *et al.*, 2018). Os avanços recentes em tecnologias ômicas (genômica,

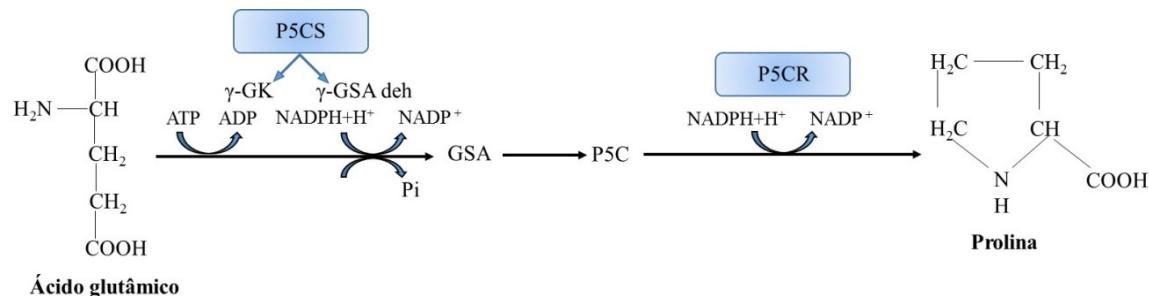
transcriptômica, proteômica e metabolômica) têm acelerado o melhoramento de plantas para enfrentar mudanças climáticas e aumentar a produção alimentar. A integração destas plataformas com estudos de plasticidade fenotípica, potencializada por algoritmos de aprendizado de máquina em evolução, promete aprimorar a interpretação biológica de características complexas nas culturas agrícolas (Mahmood *et al.*, 2022). Muitas abordagens biotecnológicas envolvendo genes relacionados à osmoproteção (por exemplo, ao gene *P5CS*) abrem novas perspectivas para a análise e incorporação desses genes em espécies vegetais cultivadas. Esses genótipos podem representar potenciais repositórios de conhecimento (epi) genômico essencial para compreender e desenvolver estratégias de adaptação agrícola frente às mudanças climáticas emergentes e desafios agroecológicos (Salse *et al.*, 2024).

### 2.3 Prolina

A prolina, aminoácido que se acumula em elevadas concentrações nas plantas sob estresse, desempenha múltiplas funções críticas nos processos celulares, incluindo regulação da pressão osmótica, manutenção do estado energético, metabolismo de nutrientes, equilíbrio redox e mecanismos de defesa contra patógenos (Alvarez; Savouré; Szabados, 2022). A via biossintética da prolina, que utiliza glutamato como substrato, é conservada em todos os organismos vivos e ocorre por meio de três reações enzimáticas irreversíveis (Filgueiras; Zamocky; Turchetto-Zolet, 2024). O acúmulo do aminoácido prolina é uma das respostas em plantas para muitos estresses bióticos e abióticos (Alvarez; Savouré; Szabados, 2022; Signorelli; Monza, 2017). A prolina nas plantas desempenha um importante papel adaptativo na tolerância aos estresses abióticos, principalmente devido à sua propriedade osmoprotetora (Hosseiniifard *et al.*, 2022). Nas plantas superiores a biossíntese da prolina é desencadeada principalmente pela via do glutamato, que inclui duas reações enzimáticas e uma não enzimática (Alvarez; Savouré; Szabados, 2022). As reações enzimáticas ocorrem no citoplasma ou cloroplasto e são catalisadas pela  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase (*P5CS*; EC 2.7.2.11) e  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase (*P5CR*; EC 1.5.1.2) (Figura 3). No processo de interconversão do glutamato semialdeído (GSA), ocorre uma transformação química natural e espontânea, sem catálise enzimática, onde o GSA se converte em  $\Delta^1$ -

pirrolina-5-carboxilato (P5C) através de uma reação de ciclização (Filgueiras, 2021). Neste equilíbrio químico, há uma tendência termodinâmica favorável à formação de P5C.

Figura 3 — Via de biossíntese da prolina em plantas.



Fonte: Adaptado de Bandurska *et al.* (2017).

Na literatura, encontramos diversos estudos que envolvem a caracterização do gene *P5CS* em várias espécies, incluindo *Carica papaya* (Zhu *et al.*, 2012), *Morus alba* (Zhou *et al.*, 2016), *Lilium regale* (Wei *et al.*, 2016), *Saccharum* (Li *et al.*, 2018), *Triticum aestivum* L. (Lima *et al.*, 2019), *Eugenia uniflora* L. (Anton, 2015). Estudos sugerem que os genes *P5CS* surgiram de um evento único de fusão entre parálogos dos genes *ProA*, que codifica a enzima gama-glutamil fosfato redutase (responsável pelo primeiro passo da via biossintética da prolina), e *ProB*, que codifica a enzima glutamato semialdeído desidrogenase (responsável pelo segundo passo desta via) (Filgueiras; Zamocky; Turchetto-Zolet, 2024). Este evento de fusão peculiar ocorreu em um ancestral eucariótico e se disseminou para outras linhagens por meio da transferência horizontal de genes (Filgueiras; Zamocky; Turchetto-Zolet, 2024).

No que se refere à diversificação desta família gênica, a filogenia do gene *P5CS* em plantas revela que ocorreram múltiplos processos independentes de duplicação e perda deste gene, sendo as duplicações relacionadas a eventos antigos de poliploidização (Filgueiras; Zamocky; Turchetto-Zolet, 2024). Há evidências de que o *P5CS* pode ter se originado de um evento de fusão gênica entre dois genes ancestrais: um gene responsável pela codificação de uma enzima da via de biossíntese da prolina e outro gene que codifica uma proteína de ligação ao DNA. Essas evidências foram apresentadas por Filgueiras (2021). A fusão desses dois genes resultou na formação do gene *P5CS*, que codifica uma

enzima que catalisa a síntese da prolina. Durante a evolução de monocotiledôneas e dicotiledôneas, o gene *P5CS* foi duplicado várias vezes (Turchetto-Zolet *et al.*, 2009; Rai; Penna, 2013). No entanto, a maioria das plantas possui dois genes *P5CS*: um constitutivo e outro indutível pelo estresse, denominados *P5CS1* e *P5CS2*, respectivamente (Alvarez; Savouré; Szabados, 2022).

Algumas espécies, no entanto, podem apresentar apenas um gene, como observado em *P. ostii* (Luan *et al.*, 2024). Além disso, um terceiro gene *P5CS* (*P5CS3*) foi encontrado em *Medicago truncatula* (Kim; Nam, 2013) e em *L. regale* (Wei *et al.*, 2016). Segundo esses autores, os genes identificados também contribuem para o acúmulo de prolina e a tolerância ao estresse abiótico. No entanto, a função do gene *P5CS* em respostas aos estresses abióticos no feijoeiro ainda precisa ser esclarecida. Existem dois estudos de Chen *et al.* (2009; 2010), que se basearam na clonagem do gene *P5CS* em *P. vulgaris* L.. Hoje, com ferramentas mais avançadas do que as disponíveis na época de Chen *et al.* (2009; 2010), além do livre acesso ao genoma do feijoeiro, é necessário realizar esforços para investigar os mecanismos moleculares de adaptação ao estresse e maior tolerância em uma cultura importante como o feijoeiro.

## 2.4 Transportador de Prolina (ProT)

As proteínas transportadoras de aminoácidos nas plantas constituem um sistema complexo e especializado para a translocação de aminoácidos através das membranas celulares. Funcionando como proteínas integrais de membrana, a família transportadora de aminoácidos (ATF) desempenha papel fundamental na mediação deste transporte em plantas superiores (Yang *et al.*, 2020). Estas estruturas, também conhecidas como proteínas transportadoras de aminoácidos (AATs), não apenas regulam o transporte intercelular de aminoácidos, mas também participamativamente no metabolismo de carbono e na dinâmica de translocação através do xilema e floema, componentes essenciais do sistema vascular vegetal (Dong *et al.*, 2024). Adicionalmente, estes transportadores exercem funções cruciais nas respostas adaptativas das plantas a estresses patogênicos e abióticos (Akbudak; Filiz, 2020).

O sistema de transportadores de aminoácidos nas plantas é extenso e diversificado, compreendendo principalmente três grandes famílias: a família de

transportadores de aminoácidos (ATF), também denominada família de aminoácidos/auxina-permease (AAAP); a família de transportadores de aminoácidos-poliamina-colina (APC); e a família de transportadores geralmente associados à entrada e saída de múltiplos aminoácidos (UMAMIT) (Akbudak; Filiz, 2020; Yang *et al.*, 2020). A família UMAMIT, especificamente, codifica exportadores que compreendem 63 e 44 genes em *Arabidopsis*, localizados no tonoplasto ou na membrana plasmática. A maioria destes transportadores UMAMIT possui capacidade de exportar aminoácidos do citosol, evidenciando sua função no transporte intra e intercelular destas moléculas (Zhao *et al.*, 2021). A família ATF é a mais estudada e compreende oito subfamílias especializadas: transportadores gerais de aminoácidos (AAP), transportadores de lisina e histidina (LHT), transportadores de prolina (ProT), transportadores de ácido c-aminobutírico (GAT), transportadores de aminoácidos aromáticos neutros (ANT), transportadores de auxina (AUX), transportador de aminoácidos semelhante (ATL) e transportadores vesiculares associados a aminérgicos (VAAT) (Yang *et al.*, 2020). Esses transportadores transportam diversos tipos de aminoácidos e compostos relacionados, desempenhando funções cruciais no metabolismo, regulação e sinalização necessários para o crescimento, desenvolvimento e adaptação das plantas em diferentes condições ambientais (Yang *et al.*, 2020).

A distribuição de prolina entre os diferentes compartimentos da célula não é uniforme. Esse aminoácido é distribuído dentro da planta por transporte de longa distância ao longo de feixes vasculares e localmente por transporte através da membrana plasmática ou dos plasmodesmas (Per *et al.*, 2017; Alvarez; Savouré; Szabados, 2022). ProT, transportador específico de prolina, pertence à superfamília de transportadores de aminoácidos, encontra-se na membrana plasmática e provavelmente está envolvido no transporte desse soluto intracelular e de longa distância (Yang *et al.*, 2020).

Sob condições de estresse, a transferência de solutos através de membranas é mediada e controlada por proteínas específicas. Os transportadores de prolina (ProTs) facilitam o acúmulo deste aminoácido, contribuindo significativamente para a tolerância da planta ao estresse (Smith, 2024). Em condições normais, eles também estão envolvidos na alocação de prolina para o crescimento e desenvolvimento de órgãos (Alvarez; Savouré; Szabados, 2022). O

transporte de prolina é de suma importância para combater diversos estresses abióticos, sendo sua regulação dependente de sinais ambientais. Os principais transportadores de prolina (ProTs) foram isolados de *A. thaliana* e demonstraram ser extremamente seletivos para prolina (Meena *et al.*, 2019). Em resposta a condições de estresse, plantas de *A. thaliana* aumenta a expressão dos transportadores *ProT1* e *ProT2*, que desempenham funções específicas: o *ProT1* é ativado principalmente durante o estresse salino, enquanto o *ProT2* atua no transporte de nitrogênio em condições de estresse hídrico (Meena *et al.*, 2019).

### 3 OBJETIVO

Identificação e caracterização *in silico* de genes candidatos (*P5CS*) e *ProT* em *P. Vulgaris* L. Envolvidos na biossíntese e transporte da prolina.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Análises *in silico* para identificação de genes

#### 4.1.1 Busca e identificação de sequências

A busca e identificação de sequências no estudo foram realizadas utilizando o banco de dados *Phytozome* (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>) para acessar o genoma de *P. vulgaris* L., seguido por uma análise *BLAST* local com sequências de aminoácidos relacionados ao *P5CS* (AT2G39800.1) e *ProT* (AT2G39890.2) em *A. thaliana* como referência, respectivamente. Essa abordagem permitiu identificar homólogos em *P. vulgaris* L. com alta similaridade. Posteriormente, foram identificados membros das famílias gênicas *P5CS* e *ProT* com base em domínios estruturais conservados, confirmando suas funções no metabolismo da prolina, essencial para o estresse hídrico, assegurando precisão e relevância para o estudo.

#### 4.1.2 Estratégia de busca para a revisão sistemática

##### 4.1.2.1 Obtenção e preparação das sequências

Sequências dos genes *P5CS* ( $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintase) e *ProT* (transportadores de prolina) de *P. vulgaris* L. foram obtidas do banco de dados genômico *Phytozome*. As sequências de nucleotídeos e aminoácidos foram extraídas no formato FASTA para análises subsequentes.

##### 4.1.2.2 Caracterização físico-química das proteínas

As propriedades físico-químicas das proteínas codificadas pelos genes *P5CS* e *ProT* foram determinadas utilizando a ferramenta *ExPASy*. O ponto isoelétrico (pI) foi calculado identificando o pH onde a carga líquida da proteína é zero, considerando a contribuição de cada aminoácido (aa) e grupos terminais. O peso molecular (kDa) foi determinado pela soma dos pesos de cada resíduo, incluindo grupos terminais e possíveis modificações pós-traducionais.

##### 4.1.2.3 Predição de localização subcelular

A localização subcelular das proteínas foi predita utilizando programa o *Plant-mPLoc*, ferramenta específica para proteínas vegetais. A análise integrou informações de ontologia gênica, domínios funcionais e dados evolutivos para realizar as predições de compartimentalização celular.

#### 4.1.2.4 Análise estrutural dos genes

A estrutura dos genes (distribuição de éxons e íntrons) foi analisada utilizando o *Gene Structure Display Server* (GSDS 2.0). Os dados genômicos e sequência CDS (sequência codificadora) foram submetidos à plataforma (<http://gsds.gao-lab.org/>) para geração de representações gráficas das estruturas gênicas, destacando elementos conservados essenciais para o metabolismo da prolina.

#### 4.1.2.5 Identificação de motivos proteicos conservados

Motivos conservados nas sequências proteicas foram identificados utilizando o MEME v.5.5.7 (*Multiple Em for Motif Elicitation*) (<https://meme-suite.org/meme/>). Os parâmetros foram configurados para buscar até 10 motivos conservados nas sequências não alinhadas. A análise gerou *logos* de sequência representando a frequência relativa de cada aminoácido e informações sobre sítios específicos onde os motivos foram localizados.

#### 4.1.2.6 Modelagem estrutural das proteínas

A modelagem tridimensional (3D) das proteínas foi realizada utilizando a ferramenta *Phyre2* (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2>). As sequências de aminoácidos foram submetidas à plataforma para predição estrutural e análise funcional baseada em homologia.

#### 4.1.2.7 Mapeamento cromossômico

A distribuição cromossômica dos genes foi visualizada utilizando o MG2C. As informações de localização genômica, incluindo coordenadas dos genes e comprimento dos cromossomos, foram organizadas conforme o *template* da

ferramenta para geração de representações gráficas da disposição dos genes.

#### 4.1.2.8 Análise filogenética

Relações evolutivas entre os genes foram inferidas utilizando o programa MEGA7. As sequências foram alinhadas pelo algoritmo ClustalW. Árvores filogenéticas foram construídas pelo método *Neighbor-Joining* (NJ), com os comprimentos dos ramos representando distâncias genéticas (substituições por sítio).

#### 4.1.2.9 Análise de elementos regulatórios *cis*

Elementos regulatórios *cis* foram identificados nas regiões promotoras (1500 pares de base — pb do sítio de início da transcrição) utilizando o *PlantCARE* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Os resultados foram organizados em planilhas *Excel* e visualizados através da plataforma *Tbtools* para interpretação dos padrões regulatórios associados à resposta ao estresse hídrico.

### 4.1.3 Análises integradas

O *TBtools*, uma plataforma bioinformática de interface amigável, foi utilizada como uma solução integrativa para diversas análises genômicas, incluindo: resultados do *PlantCARE*, processamento de dados genômicos do *Phytozome*; análise de sintenia entre genes e o cálculo de taxas Ka/Ks (substituições não sinônimas e sinônimas). Para a visualização de resultados do *PlantCARE*, o *TBtools* permitiu a integração e exibição interativa de elementos *cis*-regulatórios identificados nas regiões promotoras de genes como *PvP5CS* e *PvProT* em *P. vulgaris* L., gerando gráficos personalizáveis. O processamento de dados genômicos do *Phytozome* foi facilitado com ferramentas como o *Basic Biosequence View*, que permitiu a pré-visualização e edição de sequências genômicas obtidas, garantindo a preparação eficiente para análises posteriores.

Na análise de sintenia entre genes, o *TBtools* integrou funções específicas, como o *One Step MCScanX*, que automatizou a detecção de blocos colineares usando o algoritmo *MCScanX*, e o *Text Merge for MCScanX*, que unificou resultados de múltiplos arquivos para simplificar a visualização. O *Multiple Synteny Plot* foi

empregado para criar representações gráficas interativas, como plots duais ou circulares, mostrando relações de sintenia entre *P. vulgaris* L., *A. thaliana*, e *O. sativa*, com ajustes rápidos para personalização. Para o cálculo de Ka/Ks, o *Simple Ka/Ks calculator* do *TBtools* foi utilizado para estimar as taxas de substituição não sinônima e sinônima em pares de genes duplicados ou ortólogos de *PvP5CS* e *PvProT*.

#### 4.1.3.1 Análise de expressão (*in silico*)

A geração de mapas de calor (*heatmaps*) para análise de expressão gênica foi realizada usando o *CIMMiner*. Esta análise utilizou valores de *FPKM* (do inglês *Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*) depositados no banco de dados *Phytozome*. Foram analisados os perfis de expressão dos genes *PvP5CS* e *PvProT* em *P. vulgaris* L.. Os valores numéricos, normalizados (como *log2 fold change* ou *z-scores*), foram preparados no formato tabular para serem compatíveis com a entrada exigida pelo *CIMMiner*. O *CIMMiner* gerou mapas de calor coloridos, onde cores intensas (vermelho para alta expressão e verde para baixa expressão, com graduações intermediárias) indicaram os níveis de expressão das sequências nos diferentes tecidos da planta, proporcionando uma visualização intuitiva dos dados.

## 4.2 Experimento de estresse abiótico

Os experimentos de estresses abióticos foram realizados em casa de vegetação climatizada, localizada a 22°06'59"S, 51°27'02"W em altitude de 475 m, Área Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias da UNOESTE (Universidade do Oeste Paulista), Campus II em Presidente Prudente-SP. As cultivares de feijoeiro comum BAT 477 (tolerante à seca) e Pérola (susceptível à seca), foram utilizados nos experimentos de estresse abiótico (seca e salinidade). Esse material foi gentilmente cedido pela Embrapa Arroz e Feijão através da pesquisadora e curadora do Banco Ativo de Germoplasma de Feijão (Figura 4).

Figura 4 — Cultivares de feijão BAT 477 (tolerante à seca) e Pérola (susceptível à seca) cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão.



Fonte: O autor.

#### 4.2.1 Experimento de estresse osmótico (PEG- polietileno glicol)

Foi realizado o plantio de sementes de feijão cultivares BAT 477 e Pérola em copos descartáveis contendo substrato vegetal. Após a emergência das plântulas no estádio fenológico V2 (segunda folha trifoliada expandida), as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 1,8 L, preenchidos com terra vegetal (Bioterra). Neste estudo, optou-se pela terra vegetal como substrato, diferindo do substrato artificial (mistura de perlita e vermiculita, 1:3) utilizado em experimentos com mudas de *M. truncatula* (Castañeda; González, 2021). Ao atingirem o estádio V3 (primeira folha trifoliada expandida), as plantas foram submetidas ao início da imposição do estresse hídrico. O estresse osmótico foi induzido pela aplicação de polietilenoglicol (PEG 6000) em cinco tratamentos: controle (sem PEG), 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias de exposição ao estresse. Cada tratamento foi composto por cinco repetições para cada cultivar (BAT 477 e Pérola), totalizando 50 unidades experimentais (5 tratamentos × 5 repetições × 2 cultivares). As plantas sob tratamento de estresse receberam 100 mL diários de solução de PEG 6000 a 98,56 g/L em água deionizada, enquanto as plantas controle receberam 100 mL de água deionizada diariamente. O potencial osmótico das soluções de PEG 6000 foi calculado utilizando a equação proposta por Michel e Kaufmann (1973), conforme ajustada em Michel (1983):

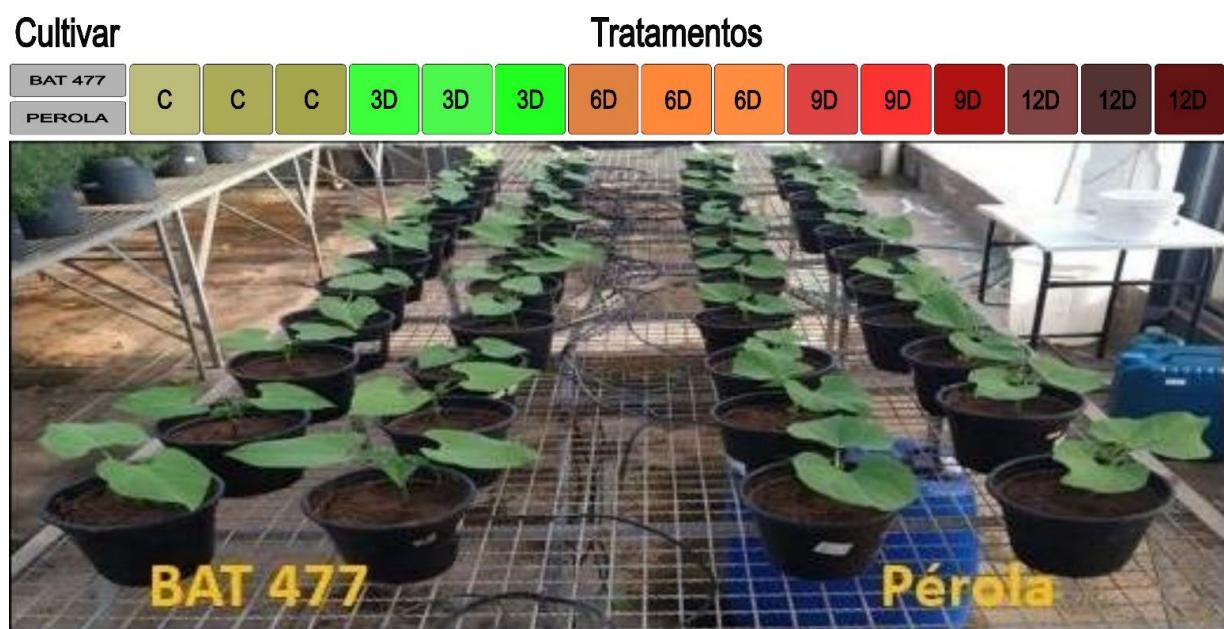
$$\Psi_s = -[1,18 \times 10^{-2} C - 1,18 \times 10^{-4} C^2 + 2,67 \times 10^{-4} CT + 8,39 \times 10^{-7} C^2 T] \times 10^{-2}$$

onde:

- $\Psi_s$  = potencial osmótico da solução (MPa)
- C = concentração de PEG 6000 (g kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O)
- T = temperatura (°C)

A concentração de 98,56 g/L de PEG 6000, equivalente a aproximadamente 109,34 g kg<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>O (considerando densidade da solução próxima de 1,0 g/mL, com 98,56 g de PEG em 901,44 g de H<sub>2</sub>O por litro), foi aplicada em 100 mL diários por vaso, totalizando 9,856 g de PEG por dia. Para o tratamento de 12 dias, o acúmulo foi de 118,272 g de PEG por vaso (9,856 g/dia × 12 dias).

Figura 5 — Representação do experimento de estresse osmótico com PEG em casa de vegetação.



Fonte: O autor.

Amostras de folhas de cada tratamento (controle, 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias) foram coletadas ao final de cada período de exposição ao estresse hídrico induzido por PEG 6000, com aplicação de 100 mL da solução diariamente (Figura 5). As réplicas biológicas foram representadas por *pools* de folhas de cada tratamento, com cinco repetições por tratamento para cada cultivar (BAT 477 e Pérola), totalizando 50 unidades experimentais. As coletas foram realizadas no estádio V4, garantindo uniformidade no desenvolvimento das plantas. Após cada coleta, o material vegetal foi imediatamente submerso em nitrogênio líquido e

armazenado em freezer a -80°C até sua utilização para análises fisiológicas ou bioquímicas. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com temperatura, umidade relativa e fotoperíodo controlados para atender às exigências do feijão. O delineamento experimental seguiu um esquema de blocos casualizados, com os 50 vasos (5 tratamentos × 5 repetições × 2 cultivares) dispostos de forma a minimizar variações ambientais. A escolha da terra vegetal Bioterra como substrato, em vez de misturas artificiais como perlita e vermiculita, reflete condições mais próximas de sistemas agrícolas reais, mas influenciou a atenuação do estresse hídrico inicial, com o acúmulo de PEG intensificando o estresse até -1,0 atm no tratamento de 12 dias. A interação do PEG com o substrato sólido, incluindo a retenção em partículas do solo e a evaporação entre irrigações, contribuiu para a intensificação gradual do estresse ao longo dos períodos de exposição.

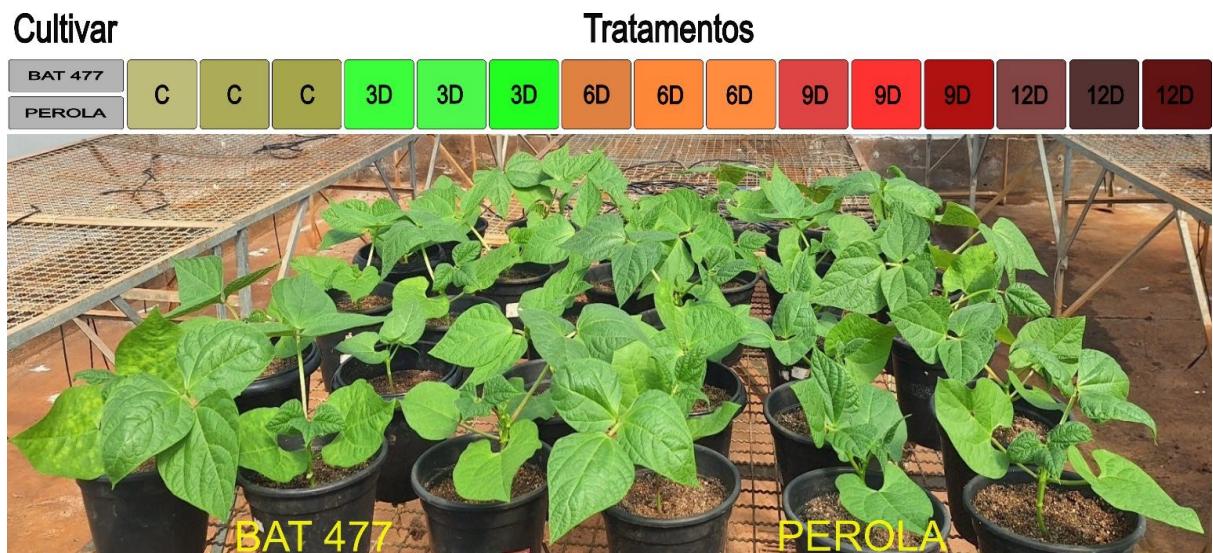
#### 4.2.2 Experimento de estresse salino (NaCl)

Foi realizado o plantio de sementes de feijão cultivares BAT 477 e Pérola em copos descartáveis contendo substrato vegetal. Após a emergência das plântulas no estádio fenológico V2 (segunda folha trifoliada expandida), as plantas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade de 1,8 L, preenchidos com terra vegetal (Bioterra).

Neste estudo, optou-se pela terra vegetal como substrato, diferindo do substrato artificial (mistura de perlita e vermiculita, 1:3), utilizado em experimentos com mudas de *M. truncatula* (Castañeda; González, 2021). Ao atingirem o estádio V3 (primeira folha trifoliada expandida), as plantas foram submetidas ao início da imposição do estresse salino. O estresse salino foi induzido pela aplicação de cloreto de sódio (NaCl) em cinco tratamentos: controle (sem NaCl), 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias de exposição ao estresse. Cada tratamento foi composto por cinco repetições para cada cultivar (BAT 477 e Pérola), totalizando 50 unidades experimentais (5 tratamentos × 5 repetições × 2 cultivares). As plantas sob tratamento de estresse receberam 100 mL diários de solução de NaCl a 150 mM (8,766 g/L), preparada em água deionizada, enquanto as plantas controle receberam 100 mL de água deionizada diariamente. Com base na literatura (Al Hassan *et al.*, 2016), a concentração de 150 mM de NaCl foi selecionada para induzir estresse salino moderado a severo, adequado para avaliar respostas fisiológicas e

bioquímicas do feijão.

Figura 6 — Representação do experimento de estresse salino com NaCl em casa de vegetação.



Fonte: O autor.

Amostras de folhas de cada tratamento (controle, 3 dias, 6 dias, 9 dias e 12 dias) foram coletadas ao final de cada período de exposição ao estresse salino induzido por NaCl, com aplicação de 100 mL da solução diariamente. As réplicas biológicas foram representadas por *pool*s de folhas de cada tratamento, com cinco repetições por tratamento para cada cultivar (BAT 477 e Pérola), totalizando 50 unidades experimentais.

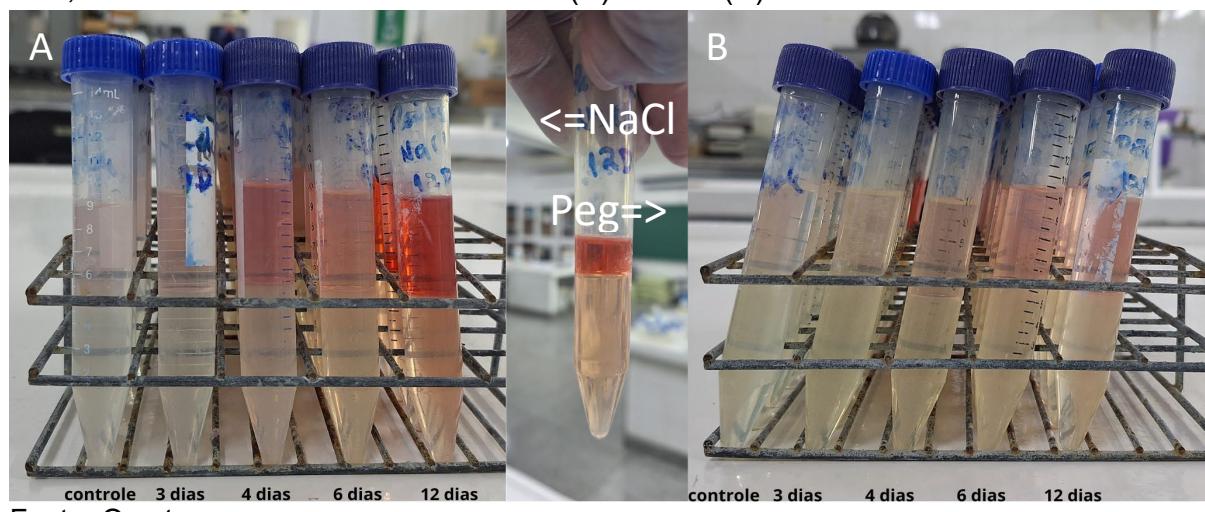
As coletas foram realizadas no estádio V3, garantindo uniformidade no desenvolvimento das plantas. Após cada coleta, o material vegetal foi imediatamente submerso em nitrogênio líquido e armazenado em freezer a -80°C até sua utilização para análises fisiológicas ou bioquímicas, como acúmulo de íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ), prolina, ou atividade de enzimas antioxidantes. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, com temperatura, umidade relativa e fotoperíodo controlados para atender às exigências do feijão. O delineamento experimental seguiu um esquema de blocos casualizados, com os 50 vasos (5 tratamentos  $\times$  5 repetições  $\times$  2 cultivares) dispostos de forma a minimizar variações ambientais. A escolha da terra vegetal Bioterra como substrato, em vez de misturas artificiais como perlita e vermiculita, reflete condições mais próximas de sistemas agrícolas reais, mas influenciou a atenuação do estresse salino inicial, com o acúmulo de NaCl

intensificando o estresse ao longo dos períodos de exposição.

#### 4.3 Conteúdo de Prolina

A determinação de prolina nas folhas e raízes foi feita de acordo com a metodologia descrita por Bates, Waldren e Teare (1973). Foram macerados 50 mg de tecido vegetal em nitrogênio líquido, adicionados 5 mL de ácido sulfossilícico (3%), agitados vigorosamente em vórtex e permaneceram 15 min em repouso. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 7500 rpm por 3 min. Foram retirados 2 mL do sobrenadante e acrescendados 2 mL de ninidrina ácida e 2 mL de ácido acético glacial. As amostras foram então incubadas a 100°C em banho-maria por 1 h, e, em seguida, transferidas para gelo. Após o resfriamento, foram acrescendados 4 mL de tolueno e agitados em vórtex por 20 s. As amostras permaneceram em repouso por 5 min para separação das fases (Figura 7) e o cromóforo contendo tolueno foi retirado da fase aquosa e realizada a leitura por espectrofotometria a 520 nm. As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de prolina foi determinada usando curva padrão (0 — 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e expressa em micromol de prolina por grama de massa fresca ( $\mu\text{mol gMF}^{-1}$ ).

Figura 7 — Quantificação da prolina nas amostras controle e tratadas com três, seis, nove e 12 dias de estresse salino (A) e PEG (B).



Fonte: O autor.

#### 4.4 Extração de RNA total, purificação e síntese de cDNA

Foram realizadas as extrações de RNA total de folhas de *P. vulgaris* L. para

os experimentos de estresse descritos anteriormente. As extrações foram conduzidas usando Trizol (*Invitrogen*), de acordo com as recomendações do fabricante. Posteriormente, as amostras de RNA passaram por processo de purificação utilizando o kit *PureLink Micro to Midi Total RNA Purification System* (*Invitrogen*) e sua integridade foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para remoção de possível contaminação por DNA genômico. Após a síntese de cDNA por transcrição reversa, as amostras foram tratadas com RNase para remoção do RNA template. As concentrações do RNA e sua pureza foram determinadas usando *NanoDrop® ND-100* (*Thermo Scientific*), espectrometria a 260 e 280 nm e as razões 260/280 e 260/230. Foram utilizadas apenas amostras que apresentaram razão acima de 1,8. Por meio do PCR convencional, utilizando *primers* específicos, foi determinada a ausência de contaminação com DNA genômico. Para síntese do DNA complementar (cDNA) a enzima *SuperScript IV Transcriptase Reversa* (*Invitrogen*) foi utilizada, conforme as recomendações do fabricante. Para um volume final de 20  $\mu$ L, foi utilizado 2  $\mu$ g de RNA total: para cada 1  $\mu$ g do RNA total extraído foram adicionados 500 ng de Oligo (dT)12-18 e 1 mM de dNTP mix. Posteriormente, realizou-se a remoção do RNA original por meio de incubação dessa reação a 37°C por 20 min com RNase H (*Invitrogen*), respectivamente.

#### **4.5 Avaliação transcripcional dos genes candidatos**

Os desenhos dos *primers* para os genes putativos *P5CS* foram delineados com o software *Primer Express 3.0* (*Applied Biosystems*) de maneira que o *amplicon* obtido ficasse entre 85-120 (pb) (Tabela 1). Visando obter *amplicons* específicos, as sequências dos *primers* e dos *amplicons* resultantes foram confrontados com as sequências depositadas no *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*) para confirmar sua especificidade. A eficiência de amplificação dos genes candidatos deste estudo foi avaliada conforme os valores de amplificação apresentados por cada um deles e estes plotados e analisados *in silico* pelo programa *LinRegPCR* (Ramakers *et al.*, 2003). Os cDNAs de cada experimento de estresse abiótico foram diluídos 1:10 antes de serem utilizados em RT-qPCR e as reações foram feitas em triplicatas. Nestas análises foi utilizado o reagente *PowerUp SYBR® Green Master Mix* (*Applied Biosystems*) e analisadas no

equipamento *StepOnePlusTM Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Posterior às análises de expressão relativa dos genes, empregou-se o cálculo pela utilização do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak; Schmittgen, 2001). Cabe mencionar que em todas as análises deste estudo, os níveis de transcrição dos genes alvo foram normalizados contra genes de referência (*PvAct11*) (Borges *et al.*, 2012).

Tabela 1 — Genes candidatos e sequências utilizadas para o RT-qPCR.

Gene Eficiência	Primer forward	Primer reverse	Amplícon (pb- pares de base) (%)	
<i>PvP5CS1</i>	CCAAAAGCTCTGGCATTGGA	TTGCAGCCCTGCGACTTATT	102	99
<i>PvP5CS2</i>	TCACTCGGCCATGGAACTTTTTCCCTCTCCAGTCGCC		97	99,5
<i>PvP5CS3</i>	AGCTCGATTGGCCTTGGT	GGATATTGAGAGGAAGCGGGGA	98	97
<i>PvP5CS4</i>	CGCCGTTGGACAGAACAGTACATCGGCTCAGCTTGTG		100	99
<i>PvAct11</i>	TGCATACGTTGGTATGAGG	AATGTGAAGTCCAGCGTGTG	190	97,5

Fonte: Gene *PvAct11* foi baseado em Borges *et al.* (2012).

#### 4.6 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises, exceto de RT-qPCR, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo teste F, e, quando significativas, as médias foram comparadas pelo teste *Scott-Knott* a 5% de probabilidade ( $p<0,05$ ). Os dados de RT-qPCR foram submetidos à análise estatística utilizando o teste t para comparar as médias entre os genótipos (tolerante e suscetível) dentro de cada regime hídrico e salino (PEG e NaCl), com nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ). Para o gene *PvP5CS*, os dados foram analisados por meio do teste t para comparação das médias entre os regimes hídricos e salinos (0 e 150 mM), também com nível de significância de 5% ( $p<0,05$ ).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Identificação dos genes *P5CS* em *P. vulgaris* L.

Análise *BLAST* local identificou quatro membros das famílias de genes do metabolismo da prolina que conservam domínios estruturais no genoma do *P. vulgaris* L. (Tabela 1). As proteínas codificadas por estes genes demonstram heterogeneidade significativa em suas propriedades físico-químicas. A análise *in silico* revela uma variação no comprimento das sequências PvP5CS de 322 a 751 aa, pontos *pI* entre 5,64 e 6,64, o peso molecular das proteínas em quilodaltons (kDa) de 81,4 a 36,031 e índices *GRAVY* de -0,411 a -0,025. A análise de predição de localização subcelular indicou que a maioria das proteínas em estudo apresenta distribuição citoplasmática.

Tabela 2 — Genes *P5CS* identificados em *P. vulgaris* L.

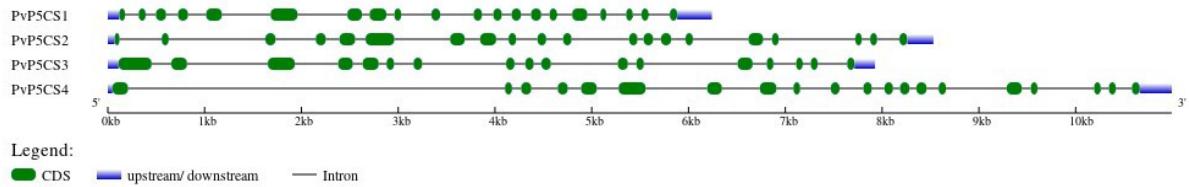
Gene	Gene ID	Localização cromossômica	Proteína (aa)	pI	kDa	GRAVY	Localização subcelular	Homólogo
<i>PvP5CS1</i>	Phvul.001G236900.1	Chr01:49000920..49007161	715	6.21	77.76	-0.045	Citoplasma	AT2G39800.4 - P5CS1
<i>PvP5CS2</i>	Phvul.008G115100.1	Chr08:13619710..13628240	720	6.11	78.12	-0.030	Citoplasma	AT3G55610.1 - P5CS2
<i>PvP5CS3</i>	Phvul.008G230300.1	Chr08:58168468..58176395	716	6.16	77.80	-0.025	Citoplasma	AT3G55610.1 - P5CS2
<i>PvP5CS4</i>	Phvul.010G015400.1	Chr10:2305855..2316848	751	6.64	81.40	-0.049	Citoplasma	AT2G39800.4 - P5CS1

Fonte: O autor.

### 5.2 Estrutura gênica de *P5CS* em *P. vulgaris* L.

A Figura 8, gerada pelo *Gene Structure Display Server* (*GSDS* 2.0), apresenta a estrutura gênica de quatro genes *P5CS* ( $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase) em *P. vulgaris* L.. O número de exons e íntrons em cada gene *P5CS* foram: ***PvPCS1*** (20 exons e 19 íntrons); ***PvPCS2*** (20 exons e 19 íntrons); ***PvPCS3*** (17 exons e 16 íntrons), e ***PvPCS4*** (20 exons e 19 íntrons).

Figura 8 — Estruturas gênica (éxon e ítron) dos genes *PvP5CS* em *P. vulgaris* L.



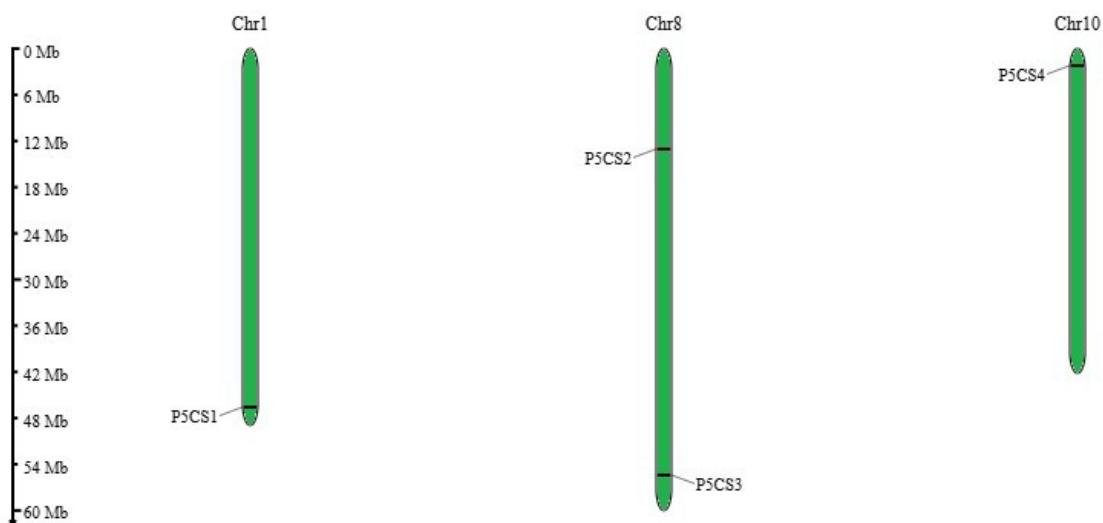
Fonte: O autor.

Legenda: Traços em verde são de regiões de exônons, as linhas são representadas pelos ítrons, regiões na cor azul são sequências downstream e upstream.

### 5.3 Mapeamento de genes *P5CS* nos cromossomos de *P. vulgaris* L.

Os quatro genes em estudo encontram-se distribuídos de forma desigual entre quatro cromossomos do feijão comum, conforme ilustrado na Figura 9. O gene *PvP5CS1* está localizado no cromossomo Chr01. Já no cromossomo Chr08, estão presentes os genes *PvP5CS2* e *PvP5CS3*. Por fim, o cromossomo Chr10 abriga o gene *PvP5CS4*.

Figura 9 — Distribuição de genes *P5CS* nos cromossomos de *P. vulgaris* L.



Fonte: O autor.

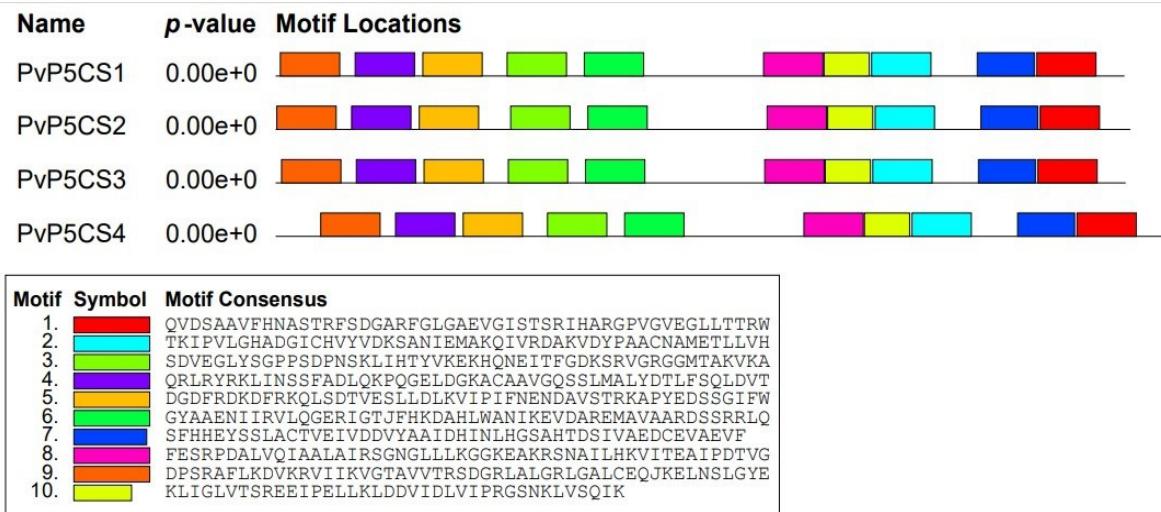
Legenda: O tamanho de cada cromossomo e sua distribuição correspondente foi obtido no genoma de *P. vulgaris* L.

### 5.4 Análise dos motivos protéicos de *PvP5CS* em *P. vulgaris* L.

Na figura 10, encontra-se a busca dos 10 *motifs* representados por um bloco de cor distinta e o seu *p-value*. Cada motivo possui legenda localizada na parte

inferior da figura. A ocorrência do mesmo bloco de cor em diferentes sequências proteicas indica a conservação de um determinado motivo entre essas sequências.

Figura 10 — Localização dos *motifs* conservados em proteínas P5CS de *P. vulgaris* L..



Fonte: O autor.

Legenda: O *p-value* indica a significância estatística dos *motifs* identificados. Na parte superior, as barras coloridas representam a posição de cada motif na sequência proteica. Na parte inferior, o quadro apresenta a sequência consenso correspondente a cada *motif*, identificados por cores distintas.

A análise dos *motifs* identificados revela uma organização funcional nas proteínas estudadas (Tabela 2), com destaque para a atividade glutamato-5-semialdeído desidrogenase (GO:0004350), que se manifesta como elemento central em todos os *motifs* analisados. Esta conservação universal sugere um papel fundamental desta enzima no metabolismo do glutamato e na biossíntese de prolina. Observa-se uma variação interessante na complexidade funcional entre os diferentes *motifs* (Tabela 2). Enquanto alguns (3, 6 e 9) apresentam exclusivamente a função glutamato-5- semialdeído desidrogenase, outros exibem uma diversidade maior de atividades oxidorredutase (Tabela 2).

Esta distribuição heterogênea sugere uma evolução modular das funções proteicas, onde diferentes combinações de atividades podem ter sido selecionadas para otimizar processos metabólicos específicos. Particularmente notável é a frequente co-ocorrência da atividade oxidorredutase GO:0016491 com a glutamato-5-semialdeído desidrogenase, especialmente nos *motifs* 2 e 7, que apresentam a maior complexidade funcional (Tabela 2). Esta associação pode indicar uma

cooperação funcional importante entre estas atividades enzimáticas, possivelmente relacionada à eficiência do processo de biossíntese de prolina ou à regulação do estado redox celular.

Tabela 3 — Análise funcional dos motifs identificados em proteínas PvP5CS de *P. vulgaris* L.

MotifGO ID	Função molecular
1 GO:0016491, GO:0004350	Oxidorreductase, Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
2 GO:0016620, GO:0016491, GO:0004350	Oxidorreductase (aldeído/oxo, NAD/NADP), Oxidorreductase, Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
3 GO:0004350	Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
4 GO:0004350	Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
5 GO:0004350	Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
6 GO:0004350	Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
7 GO:0016620, GO:0016491, GO:0004350,	Oxidorreductase (aldeído/oxo, NAD/NADP), Oxidorreductase, Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
8 GO:0016491, GO:0004350	Oxidorreductase, Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
9 GO:0004350	Glutamato-5-semialdeído desidrogenase
10 GO:0016491, GO:0004350	Oxidorreductase, Glutamato-5-semialdeído desidrogenase

Fonte: Meme Suite

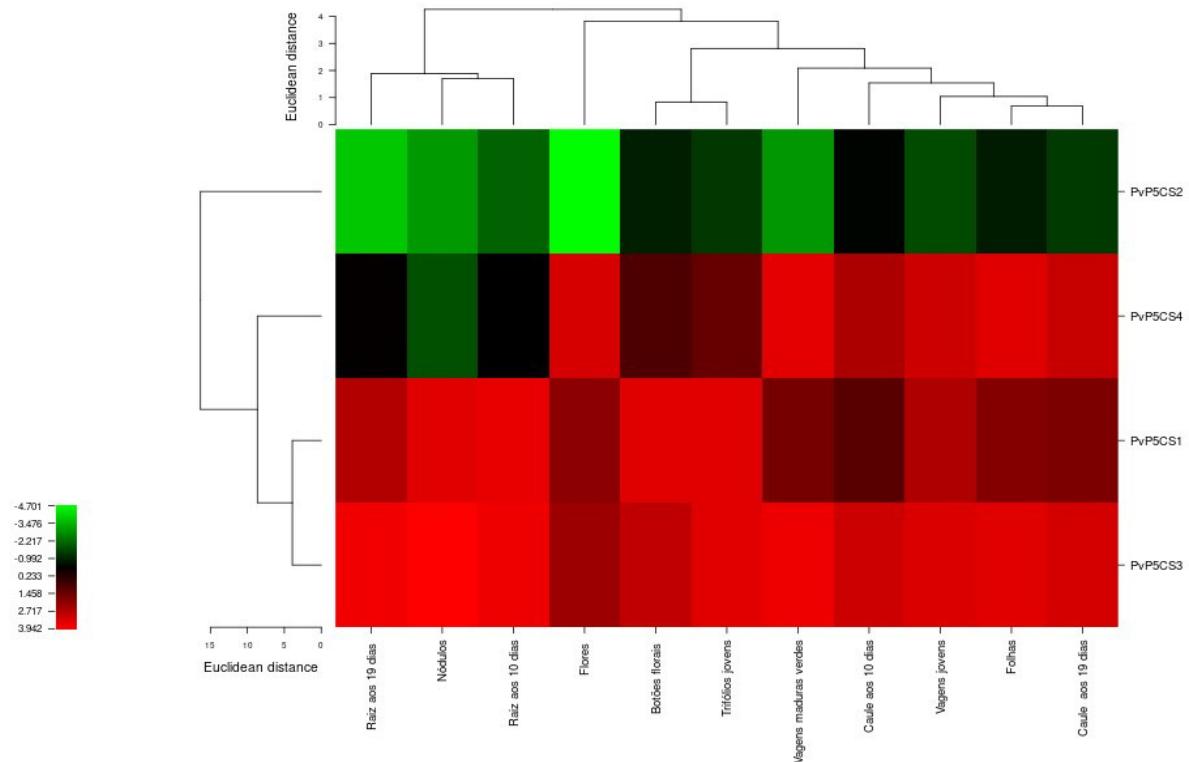
Legenda: Identificação dos *motifs*, números de acesso do Gene Ontology (GO ID) e suas respectivas funções moleculares associadas à atividade enzimática.

### 5.5 Perfil de expressão gênica P5CS em *P. vulgaris* L.

A análise do perfil transcrional (*in silico*) dos genes P5CS em *P. vulgaris* L. revelou padrões distintos de expressão nos diferentes tecidos vegetais avaliados (Figura 11). O gene PvP5CS3 apresentou os maiores níveis de expressão entre os genes analisados, exibindo expressão constitutiva elevada em todos os tecidos, com destaque para nódulos e raízes. O PvP5CS1 demonstrou o segundo maior nível de expressão, com expressão acentuada em tecidos específicos, notadamente em nódulos, raízes aos 10 dias após germinação, botões florais e trifólios jovens (Figura 11). Já o gene PvP5CS4 exibiu um padrão de expressão intermediário e variável, com níveis elevados em flores, vagens verdes maduras e folhas, contrastando com expressão reduzida em nódulos e raízes (Figura 11). Por fim o PvP5CS2 caracterizou-se pelos menores níveis de expressão dentre os genes avaliados, apresentando expressão basal reduzida em todos os tecidos analisados, com níveis particularmente baixos em flores e tecidos radiculares (Figura 11). A análise

hierárquica demonstrou que *PvP5CS2* possui um perfil transcracional distintamente divergente dos demais genes, corroborando sua expressão constitutivamente baixa nos tecidos avaliados (Figura 11).

Figura 11 — Perfil transcracional das respostas dos genes relacionados *P5CSs*.



Fonte: O autor.

Legenda: O *heatmap* foi clusterizado com base no valor FPKM (*Fragments per kilobase of exon per million fragments mapped*) dos *P5CSs* identificados no genoma de *P. vulgaris* L.. As cores na escala abaixo representam as alterações nos níveis de expressão gênica em diferentes tecidos e órgãos.

## 5.6 Evento de duplicação de genes *P5CS* em *P. vulgaris* L.

A tabela 3 apresenta os resultados de uma análise de duplicação de genes para quatro pares de sequências de genes *PvP5CS* em *P. vulgaris* L.. Os resultados indicam a ocorrência de eventos de duplicação segmental ao longo da história evolutiva do gene *PvP5CS*, com estimativas de datas variando entre 36,45 e 98,76 milhões de anos (Tabela 3).

Tabela 4 — Pares de genes *PvP5CS* duplicados em segmentados no genoma de *P. vulgaris* L. com a data de suas respectivas duplicações.

Seq_1	Seq_2	Localização cromossômica	Evento de duplicação	Ka	Ks	Ka/Ks	Data (mi)
<i>PvP5CS3</i>	<i>PvP5CS1</i>	Chr08/Chr01	Segmental	0.08	0.63	0.13	37.25
<i>PvP5CS3</i>	<i>PvP5CS2</i>	Chr08/Chr08	Segmental	0.18	1.67	0.11	98.76
<i>PvP5CS2</i>	<i>PvP5CS4</i>	Chr08/Chr10	Segmental	0.09	0.62	0.14	36.45
<i>PvP5CS2</i>	<i>PvP5CS1</i>	Chr08/Chr01	Segmental	0.19	1.53	0.12	90.44
<i>PvP5CS3</i>	<i>PvP5CS4</i>	Chr08/Chr10	Segmental	0.18	1.49	0.12	88.13
<i>PvP5CS4</i>	<i>PvP5CS1</i>	Chr10/Chr01	Segmental	0.19	1.34	0.14	79.17

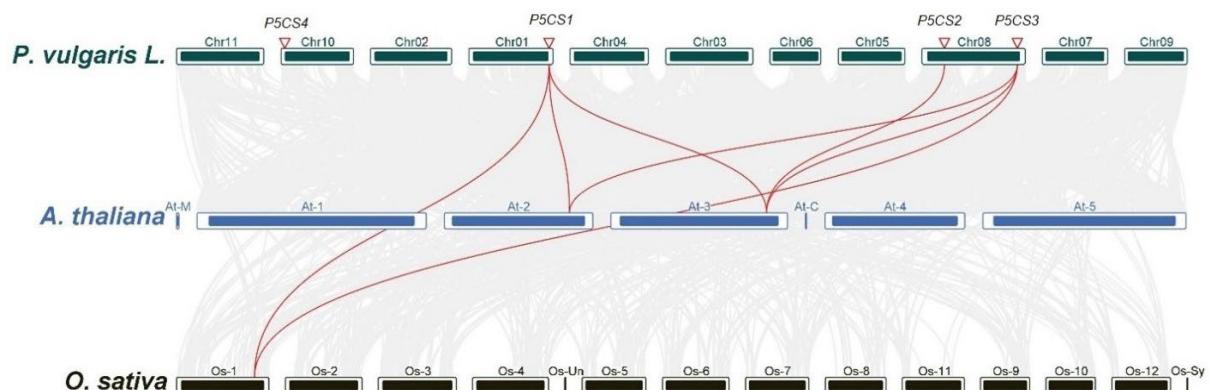
Fonte: O autor.

As razões Ka (taxa de substituição não-sinônima), Ks (taxa de substituição sinônima) e Ka/Ks foram calculadas para cada par. A razão Ka/Ks representa diferentes categorias de seleção para genes duplicados, onde Ka/Ks >1 indica seleção positiva, Ka/Ks = 1 indica evolução neutra, e Ka/Ks <1 indica seleção negativa.

## 5.7 Análises de sintenia de genes P5CS em *P. vulgaris* L. *A. thaliana* e *O. Sativa*

A sintenia entre espécies é evidenciada pela conservação de padrões na organização e sequência gênica. A Figura 12 ilustra este fenômeno, focando nos genes da família P5CS em três espécies vegetais distintas.

Figura 12 — Análise de sintenia de genes P5CS entre *P. vulgaris* L. e duas espécies de plantas (*A. thaliana* e *O. sativa*) representativas.



Fonte: O autor.

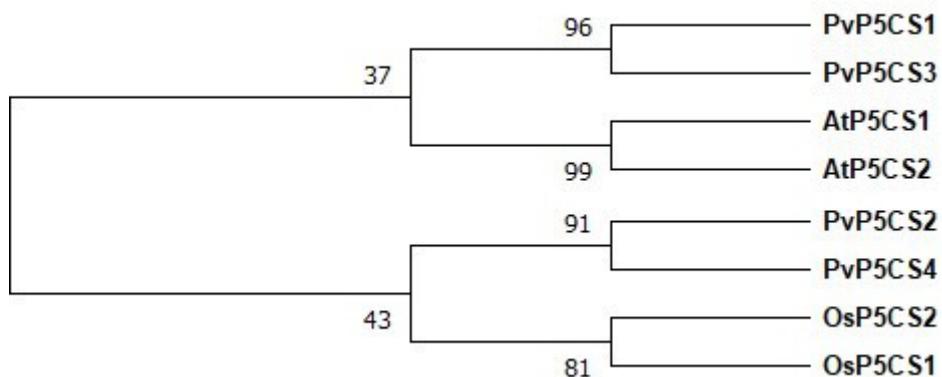
Legenda: As linhas cinzas no fundo indicam os blocos colineares dentro do genoma do *P. vulgaris* L. e de outros genomas de plantas, enquanto as linhas vermelhas indicam os pares de genes P5CS sintênicos.

O gene *P5CS1*, localizado no cromossomo Ch01 de *P. vulgaris* L., exibe arranjos genômicos similares nos cromossomos At-2 e At-3 de *A. thaliana* e Os-1 de *O. sativa*. Esta conservação se estende a outros membros da família gênica: o gene *P5CS2*, presente no cromossomo Chr08 de *P. vulgaris* L., encontra correspondência no cromossomo At-3 de *A. thaliana*, enquanto o gene *P5CS3* mostra sintenia com regiões nos cromossomos At-2 de *A. thaliana* e Os-1 de *O. sativa*. Já o *P5CS4* não apresentou correspondência.

### 5.8 Árvore filogenética de *P. vulgaris* L.

Na figura 13, PvP5CS1 e PvP5CS3 formam um clado bem suportado (*bootstrap* 96), estreitamente relacionado às proteínas AtP5CS1 e AtP5CS2 de *A. thaliana*, sugerindo uma possível conservação funcional entre estas espécies. Já PvP5CS2 e PvP5CS4 formam um clado distinto (*bootstrap* 91) mais próximo às proteínas OsP5CS1 e OsP5CS2 de *O. sativa*, indicando uma potencial conservação de função ancestral ou convergência funcional com esta monocotiledônea (Figura 13). Esta distribuição sugere uma história evolutiva complexa das proteínas P5CS em *P. vulgaris* L., com possíveis implicações para sua diversificação funcional e adaptativa.

Figura 13 — Árvore filogenética de sequências de proteínas P5CS de *P. vulgaris* L., *A. thaliana* e *O. sativa*.



Fonte: O autor.

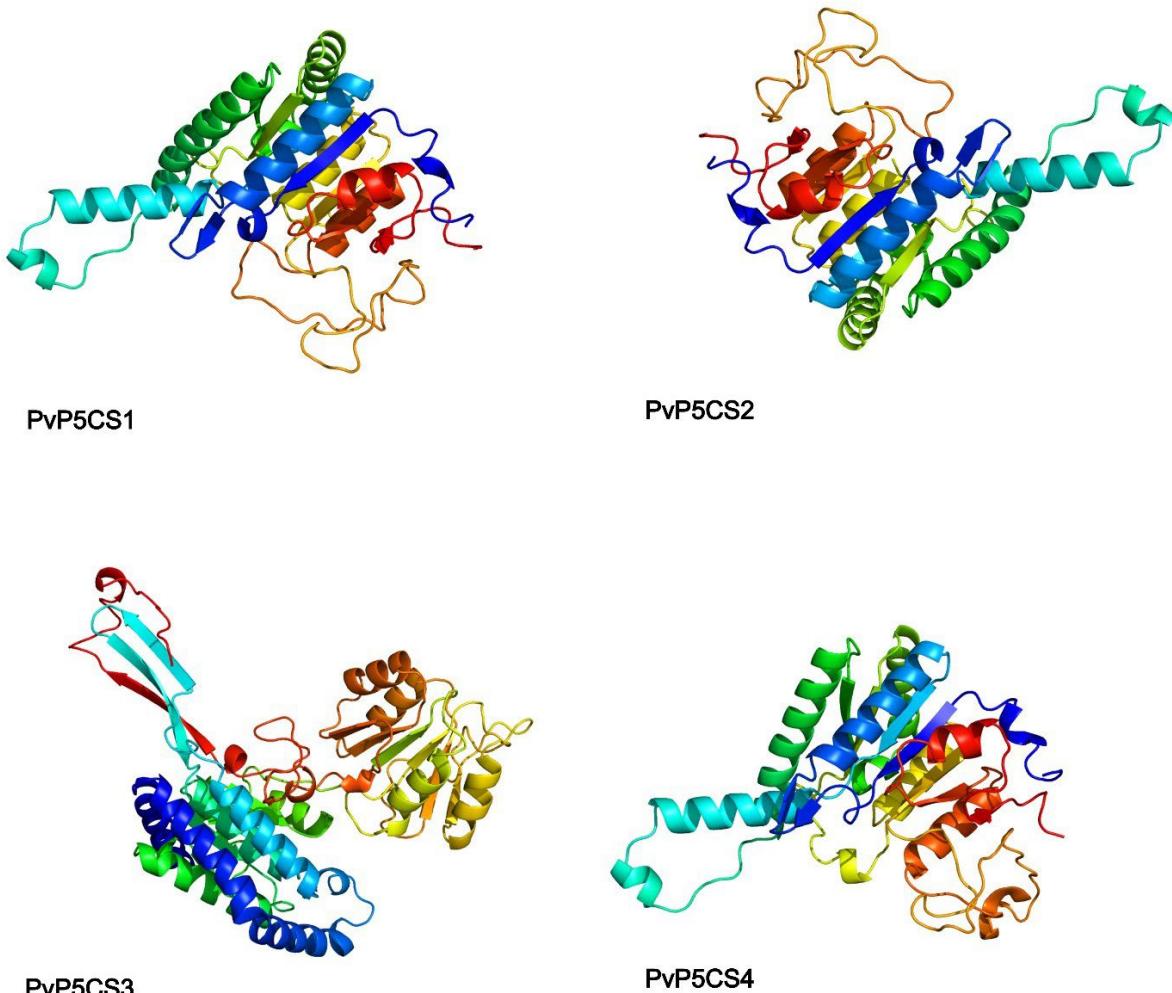
Nota: Uma árvore filogenética foi construída usando o software MEGA7.0 com método *Neighbor Joining* (NJ) de 1.000 réplicas de *bootstrap*.

### 5.9 Proteínas PvP5CS em 3D em *P. vulgaris* L.

Os resultados da análise estrutural das isoformas da  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintase utilizando o software *Phyre2* (Figura 14) demonstram variações significativas na modelagem e na confiança dos modelos gerados. Para a PvP5CS1, o modelo baseado no template c8j0eC\_ cobriu 269 resíduos, o que corresponde a 38% da sequência total da proteína, com uma confiança de 100% no modelo principal (Figura 14).

Adicionalmente, 703 resíduos, ou 98% da sequência, puderam ser modelados com mais de 90% de confiança utilizando múltiplos modelos, sugerindo um complexo de monômero gk com um intermediário catalítico (Figura 14). Similarmente, a PvP5CS2 também foi modelada com o template c8j0eC\_, mas com uma leve diferença na cobertura de resíduos, cobrindo 269 resíduos (37% da sequência total), ainda com 100% de confiança no modelo principal (Figura 14). A modelagem adicional alcançou 705 resíduos (98% da sequência) com alta confiança, também descrevendo complexos de monômero gk com intermediário catalítico, indicando uma estrutura funcional semelhante à PvP5CS1 (Figura 14). A análise da PvP5CS3 apresentou um cenário diferente, onde o template c2b5gB\_ foi utilizado. Esta isoforma alcançou a modelagem de 405 resíduos (57% da sequência total), com 100% de confiança no modelo principal (Figura 14). Adicionalmente, 707 resíduos (99% da sequência) foram modelados com alta confiança, representando uma estrutura de oxidoreduktase específica para a  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato sintase humana, o que sugere uma função mais oxidativa. Por fim, para a PvP5CS4, o template c8y2hA\_ permitiu a modelagem de 267 resíduos (36% da sequência total) com 100% de confiança (Figura 14). A modelagem adicionou 706 resíduos com mais de 90% de confiança, descrevendo uma proteína vegetal específica, um tetrâmero gk de atp5cs1 com ganchos adjacentes em estado de reação, indicando uma adaptação estrutural única para funções biológicas distintas nas plantas.

Figura 14 — Predição de estrutura de proteína *PvP5CS*.



Fonte: O autor.

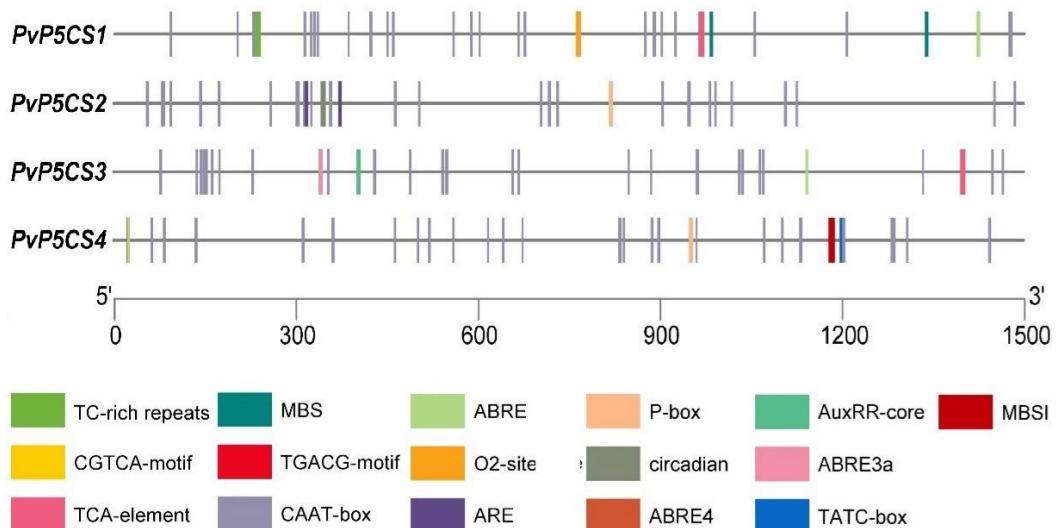
Nota: Para a predição foram usadas sequências de proteínas (PvP5CS).

### 5.10 Elementos regulatórios *cis* de sequências genéticas em *P. vulgaris* L.

Os dados apresentados (Figura 15) são elementos regulatórios *cis* que desempenham papéis cruciais na expressão gênica em resposta a vários estímulos ambientais e hormonais identificados pela ferramenta *PlantCare*. Dentre os *cis*-elementos identificados, pode-se citar: TC-rich repeats, que está envolvido na defesa e na resposta ao estresse; CGTCA-motif e o TGACG-motif, que estão envolvidos na resposta ao metil jasmonato (MeJA); o TCA-element, que está envolvido na resposta ao ácido salicílico; MBS, que é um local de ligação MYB envolvido na resposta à seca (Figura 15). A CAAT-box é um elemento comum em regiões promotoras e intensificadoras. O ABRE, O2-site, AuxRR-core, ABRE3a, TATC-box e P-box estão envolvidos na resposta ao ácido abscísico, na regulação do

metabolismo da zeína, na resposta à auxina, na resposta ao ácido abscísico, na resposta à giberelina e são responsivos à giberelina, respectivamente. A compreensão desses elementos é crucial para a pesquisa em biologia e genética vegetal.

Figura 15 — Elementos regulatórios *cis* em sequências genéticas.



Fonte: O autor.

Legenda: Nas linhas horizontais apresenta diferentes sequências de genes (*PvP5SCS1* a *PvP5SCS4*). Acima dessas linhas, há barras verticais coloridas em várias posições, cada cor representando um elemento diferente conforme indicado na legenda abaixo do diagrama.

### 5.11 Identificação dos genes *ProT* em *P. vulgaris* L.

A análise *BLAST* local identificou dois membros da família de transportadores (Tabela 4) que estão localizados na membrana celular. A análise *in silico* revela uma variação no comprimento das sequências de 442 a 338 aa, pI entre 9,67 e 9,14, o peso molecular das proteínas em (kDa) de 48,67 a 42,15 e índices GRAVY de 0,679 a 0,565. A análise de predição de localização subcelular indicou que a maioria das proteínas em estudo apresenta distribuição membrana plasmática (Tabela 5).

Tabela 5 — Genes *PvProT* identificados em *P. vulgaris* L.

Gene	Gene ID	Localização cromossômica	Proteína (aa)	pI	kDa	GRAVY	Localização subcelular	Homólogo
<i>PvProt1</i>	Phvul.001G239300.1	Chr01: 49251641..49256931	442	9.14	48.67	0.565	Membrana celular	AT2G39890.2
<i>PvProt2</i>	Phvul.	Chr08:	338	9.67	42.15	0.679	Membrana	AT2G39890.2

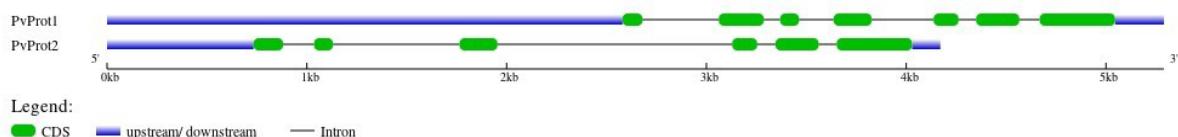
008G227600.1 57747887..57752058  
Fonte: O autor.

celular

### 5.12 Estrutura gênica de *ProT* em *P. vulgaris* L.

Na representação gráfica da estrutura gênica gerada por *GSDS 2.0 (Gene Structure Display Server)* (Figura 16), os éxons (sequências codificantes), são ilustrados em verde. Os íntrons (sequências não codificantes) que são removidas durante o processo de *splicing* do RNA, estão representados pela linha cinza. Adicionalmente, os sítios de início e término da transcrição, que são pontos críticos onde moléculas como as proteínas de ligação ao DNA podem interagir com o gene, são representados em azul. Na Figura 16, o gene *PvProT1* exibe uma estrutura genômica composta por sete éxons e seis íntrons, enquanto o gene *PvProT2* possui seis éxons e cinco íntrons.

Figura 16 — Estruturas de éxon e íntron dos genes *PvProT* em *P. vulgaris* L..



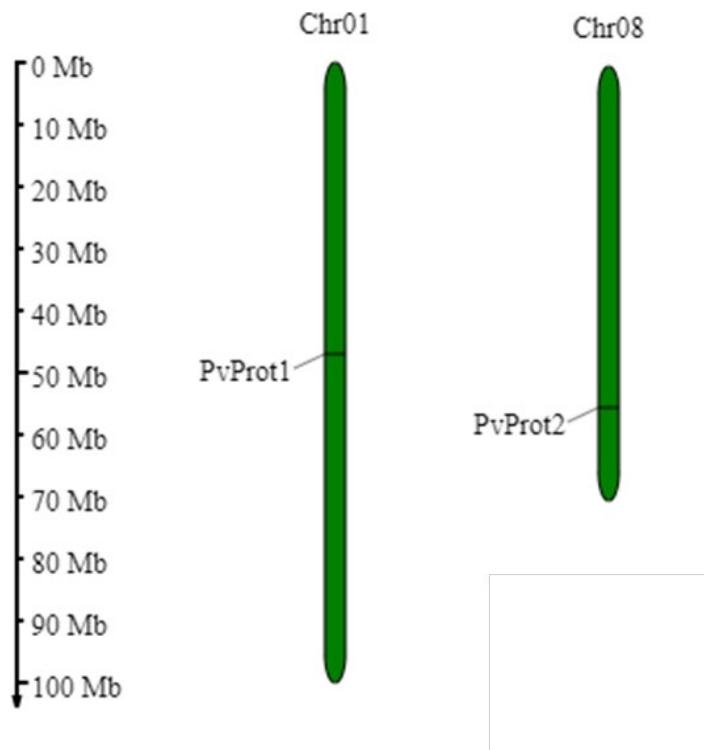
Fonte: O autor.

Legenda: Traços em verde são de regiões de éxon, as linhas são representadas pelos íntrons, regiões na cor azul são sequências *downstream* e *upstream*.

### 5.13 Mapeamento de genes *ProT* nos cromossomos de *P. vulgaris* L.

Os resultados do mapeamento genético utilizando a ferramenta *online MG2C (MapGene2Chrom; [http://mg2c.iask.in/mg2c\\_v2.0/](http://mg2c.iask.in/mg2c_v2.0/))* revelaram que os dois genes codificadores de proteínas transportadoras, *PvProT1* e *PvProT2*, no feijão comum, estão localizados nos cromossomos Chr01 e Chr08, respectivamente, conforme ilustrado na Figura 17.

Figura 17 — Distribuição de genes *PvProt* nos cromossomos de *P. vulgaris* L.



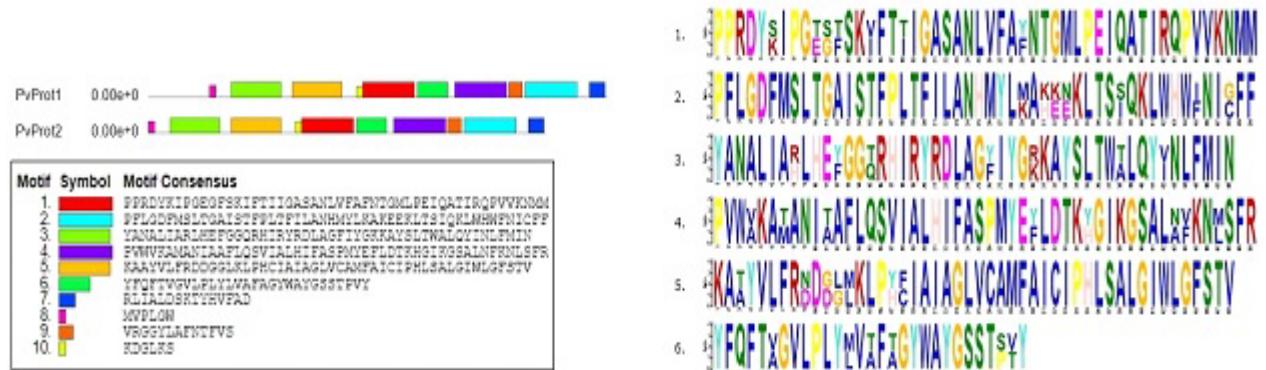
Fonte: O autor.

Legenda: O tamanho de cada cromossomo e sua distribuição correspondente foram obtidos no genoma de *P. vulgaris* L.

#### 5.14 Análise dos motivos protéicos *ProT* em *P. vulgaris* L.

Os motivos dos genes *PvProTs* (Figura 18), se observa a presença de seis motivos conservados. A análise das sequências de aminoácidos (Figura 18) revelou que, embora a maioria dos motivos identificados sejam conservados entre *PvProT1* e *PvProT2*, algumas diferenças pontuais foram observadas. Especificamente, no motivo 1, foram encontradas quatro substituições de aminoácidos, onde **PPRD** foi substituído por **RDYS**, **G** por **T**, **F** por **Y**, e **M** por **K** (Figura 18). Além disso, o motivo 3 apresentou uma substituição de **Q** por **V**, enquanto o motivo 5 exibiu uma substituição de **D** por **N** (Figura 18). Essas diferenças nos aminoácidos dos motivos podem indicar pequenas variações nas propriedades estruturais ou funcionais dessas regiões entre as duas proteínas, apesar da conservação geral dos motivos.

Figura 18 — Representação da distribuição de motivos (*motifs*) conservados entre as sequências de *PvProT* de *P. vulgaris* L.. A altura geral de cada pilha (letra) representa a conservação da sequência naquela posição.



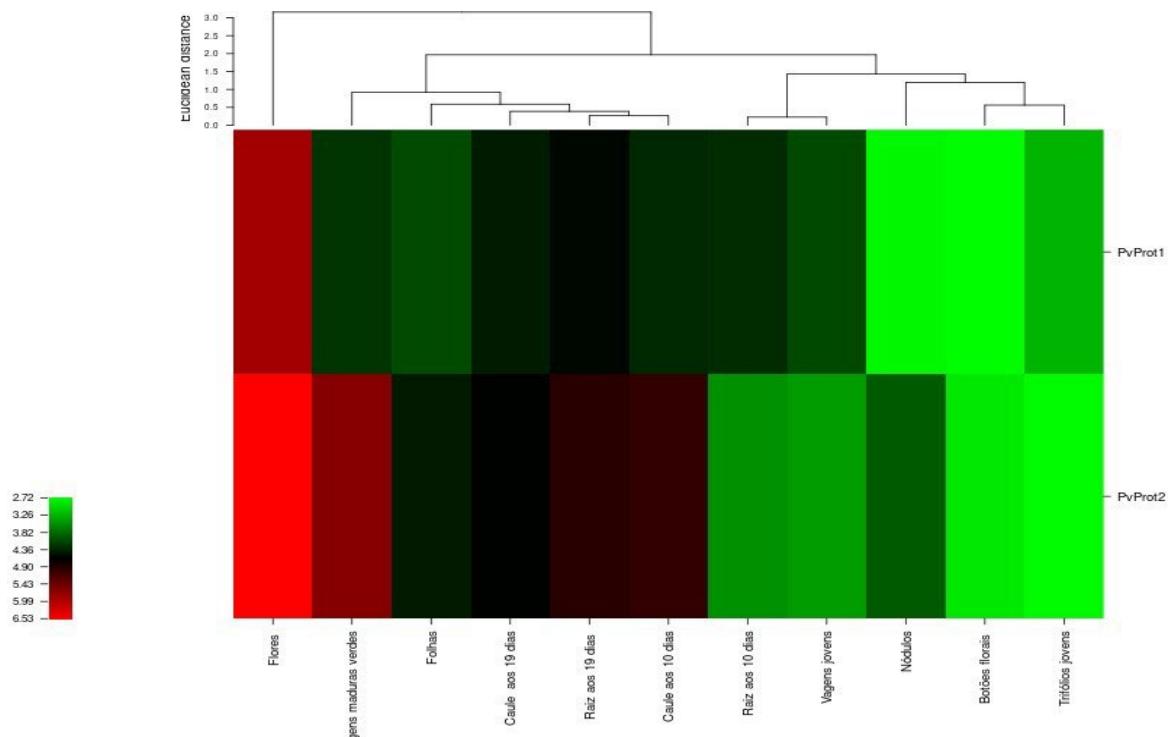
Fonte: O autor.

Legenda: A altura geral de cada pilha (letra) representa a conservação da sequência naquela posição.

### 5.15 Expressão gênica *ProT* em *P. vulgaris* L.

Para identificar os genes potenciais em resposta ao estresse abiótico, foram analisados o perfil dos padrões de expressão em dois genes *PvProTs* de feijão e os valores estão demonstrados na Figura 19. O gene *PvProT* que apresentou o maior perfil de expressão foi *PvProT2*. As cores no *heatmap* correspondem aos valores de FPKM. Os genes com valores de FPKM mais altos aparecerão em tons de vermelho, indicando maior expressão, enquanto os valores mais baixos apresentam tons de verde (Figura 19).

Figura 19 — Perfil transcrional das respostas dos genes relacionados *ProT* em *P. vulgaris* L.



Fonte: O autor.

Legenda: As cores na escala a baixo representam as alterações nos níveis de expressão gênica em diferentes tecidos e órgãos.

Nota: O *heatmap* foi clusterizado com base no valor FPKM (*fragments per kilobase of transcript per million reads*) dos genes *ProT*s identificados no genoma de *P. vulgaris* L..

### 5.16 Evento de duplicação de genes *ProT* em *P. vulgaris* L.

A tabela 5 mostra informações sobre eventos de duplicação gênica envolvendo genes denominadas *PvProT1* e *PvProT2* em *P. vulgaris* L.. Há três pares de sequências analisadas (*PvProT1* com *PvProT1*, *PvProT1* com *PvProT2* e *PvProT2* com *PvProT2*). A duplicação segmental entre *PvProT1* e *PvProT2* ocorreu há aproximadamente 39,02 milhões de anos. Esta duplicação apresenta uma taxa de substituição não-sinônima (Ka) de 0,12 e uma taxa de substituição sinônica (Ks) de 0,66. A razão Ka/Ks de 0,19 indica que este par de genes está sob seleção purificadora, sugerindo que a maioria das mutações que alteram a sequência são desvantajosas e, portanto, tendem a ser eliminadas ao longo do tempo evolutivo.

Tabela 6 — Pares de genes *PvProT* duplicados em tandem e segmentados no genoma de *P. vulgaris* L. com a data de suas respectivas duplicações.

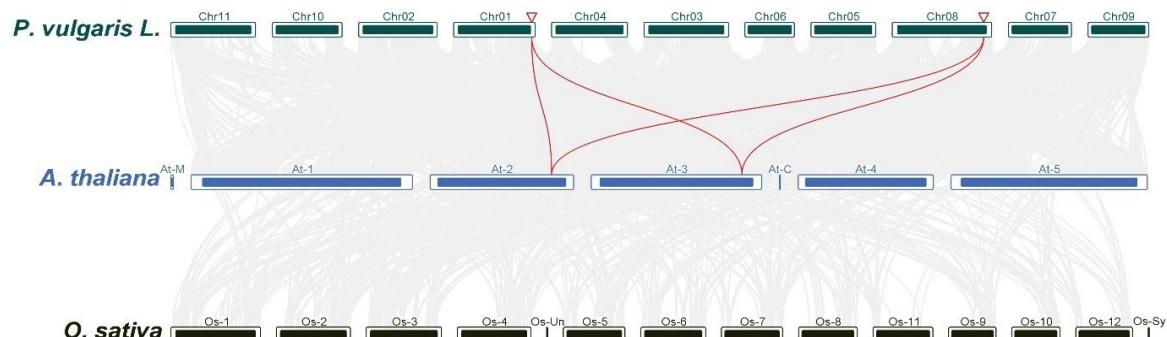
Seq1	Seq2	Localização cromossômica	Ka	Ks	Ka/Ks	Evento de duplicação (mi)
PvProt1	PvProt2	Chr01/Chr08	0.12	0.66	0,19	Segmental 39.02

Fonte: O autor.

### 5.17 Análise de sintenia de genes *ProT* em *P. vulgaris* L.

Na figura 20, é apresentada a comparação de sintenia entre três espécies de plantas: *P. vulgaris* L., *A. thaliana* e *O. sativa*. As linhas conectam regiões nos cromossomos dessas espécies, indicando áreas de similaridade genética ou sequências compartilhadas (Figura 20). Notavelmente, os genes *PvProT1* no cromossomo Chr01 e *PvProT2* no cromossomo Chr08 demonstram similaridade com os cromossomos At-2 e At-3 de *A. thaliana* (Figura 20). Porém nenhuma similaridade foi encontrada em *P. vulgaris* L. e *O. sativa* (Figura 20).

Figura 20 — Análise de sintenia de genes *ProT* entre *P. vulgaris* L. e duas espécies de plantas representativas.



Fonte: O autor.

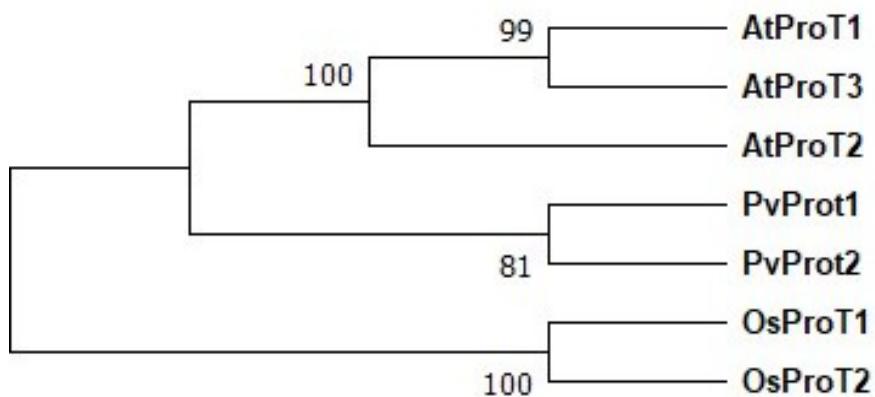
Legenda: As linhas cinzas no fundo indicam os blocos colineares dentro do genoma do *P. vulgaris* L. e de outros genomas de plantas, enquanto as linhas vermelhas indicam os pares de genes *PvProT* sintênicos.

### 5.18 Árvore filogenética de *P. vulgaris* L.

De acordo com os resultados obtidos, *OsProT1* e *OsProT2* de *O. sativa* compartilham um ancestral comum recente, evidenciado pelo valor de *bootstrap* de

100%, representando alta confiança na relação (Figura 21). O mesmo ocorre com *PvProT1* e *PvProT2* de *P. vulgaris* L., também com *bootstrap* de 100% (Figura 21).

Figura 21 — Árvore filogenética de sequências de proteínas PvProT de *P. vulgaris* L., *A. thaliana* e *O. sativa*.



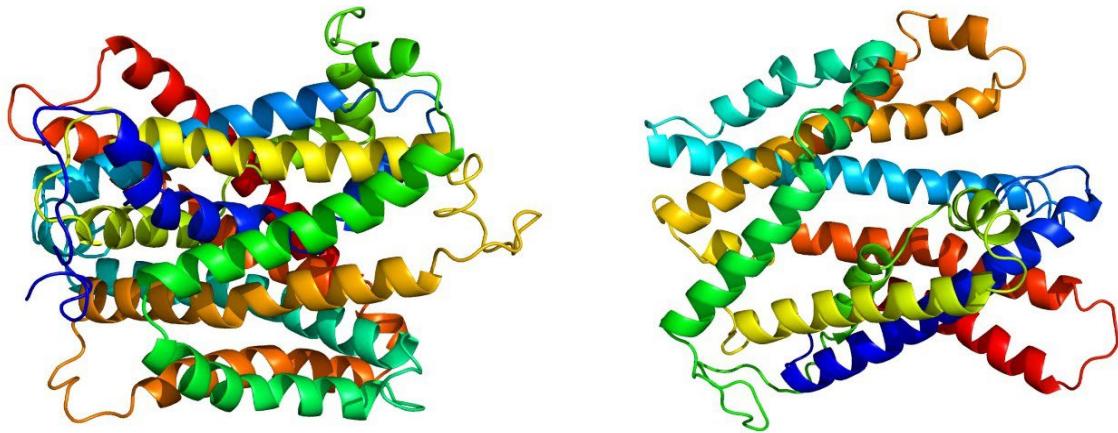
Fonte: O autor.

Nota: Uma árvore filogenética foi construída usando o software MEGA7.0 com método *Neighbor Joining* (NJ) de 1.000 réplicas de *bootstrap*.

### 5.19 Proteínas PvProT em 3D em *P. vulgaris* L.

Os transportadores de prolina PvProT1 e PvProT2, presentes em *P. vulgaris* L., foram submetidos a um processo de modelagem estrutural utilizando o software *Phyre2* (Figura 22). Para o PvProT1, 411 resíduos, correspondendo a 93% da sequência total, foram modelados com uma confiança de 98,6% (Figura 22). Em contraste, para o PvProT2, 339 resíduos, que representam 89% da sequência total, foram modelados com uma confiança de 100% (Figura 22).

Figura 22 — Predição de estrutura de proteína *PvProT* em *P. vulgaris* L..



**PvProT1**

Fonte: O autor.

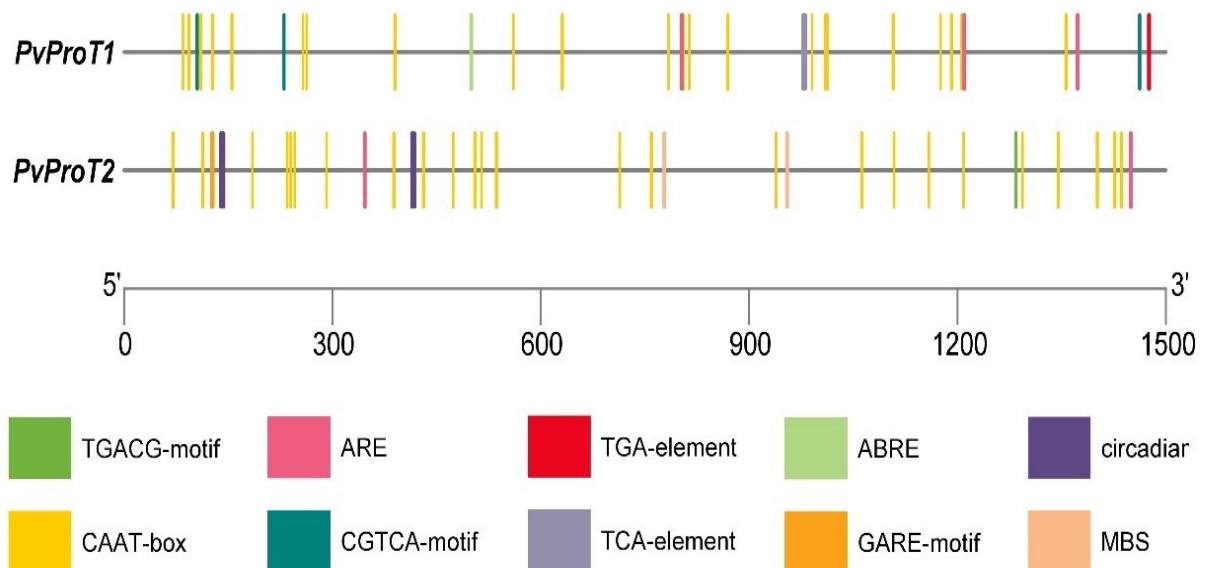
Nota: Para a predição foram usadas sequências de proteínas (PvProT).

**PvProT2**

## 5.20 Elementos regulatórios *cis* de sequências genéticas *ProT* em *P. vulgaris* L.

As potenciais regiões promotoras (1500 pb) dos genes *PvProT* foram analisadas quanto à presença de elementos *cis*-regulatórios. Os dados apresentados (Figura 23) de elementos regulatórios *cis* que desempenham papéis cruciais na expressão gênica em resposta a vários estímulos ambientais e hormonais. O TGACG-*motif*, CGTCA-*motif* e ARE, por exemplo, estão envolvidos na resposta ao metil jasmonato e na indução anaeróbica, respectivamente. O TGA-*element* e TCA-*element* são responsivos à auxina e ao ácido salicílico, respectivamente. O ABRE está envolvido na resposta ao ácido abscísico, enquanto o GARE-*motif* é um elemento responsável à giberelina. O elemento *circadian* está envolvido no controle circadiano e o MBS é um local de ligação MYB envolvido na inducibilidade à seca. A CAAT-*box* é um elemento comum em regiões promotoras e intensificadoras. Cada um desses elementos desempenha um papel específico na regulação da expressão gênica, permitindo que as plantas respondam adequadamente a vários estímulos ambientais e hormonais (Figura 23).

Figura 23 — Elementos regulatórios cis em sequências genéticas.



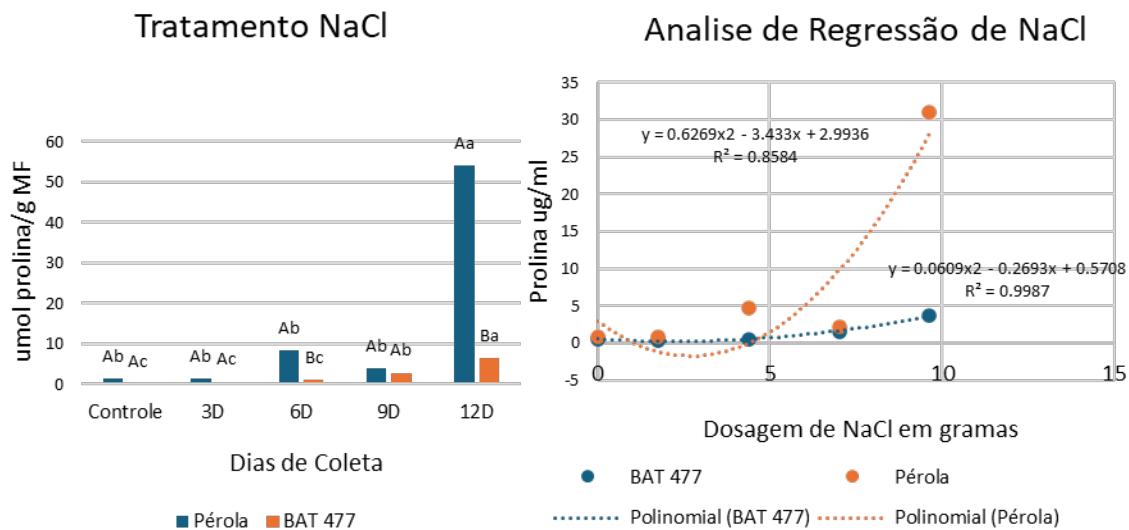
Fonte: O autor.

Legenda: As duas linhas horizontais estão identificadas com as sequências de genes *PvProT1* e *PvProT2*. Acima dessas linhas, há barras verticais coloridas em várias posições, cada cor representando um elemento diferente conforme indicado na legenda.

## 5.21 Determinação da quantidade de prolina em plantas tratadas com NaCl

No gráfico tratamento por NaCl (Figura 24) a cultivar Pérola manteve níveis baixos de prolina até o 9 dia, seguido de um aumento expressivo no 12 dia com uma diferença de 50  $\mu$ mol prolina/g MF. Já a BAT 477 manteve uma aumento gradual durante o período experimental com diferença do 3 ao 9 dia de aproximados 6  $\mu$ mol prolina/g MF (Figura 24). Esta resposta é corroborada pelo gráfico de regressão, que mostra como as variedades respondem a diferentes doses de NaCl: Pérola apresenta uma resposta exponencial ( $R^2 = 0,8584$ ), com forte aumento na produção de prolina em doses mais altas BAT 477 mostra uma resposta muito mais moderada ( $R^2 = 0,9987$ ), mantendo níveis baixos de prolina mesmo com o aumento da concentração de NaCl (Figura 24). Estes resultados sugerem que as duas variedades têm estratégias diferentes de resposta ao estresse salino. Com a Pérola apresentando uma resposta mais intensa em termos de acúmulo de prolina após 12 dias, enquanto a cultivar BAT 477 começa a apresentar acúmulos de prolina após 6 dias com aumento constante após 12 dias (Figura 24).

Figura 24 — Acúmulo de prolina em duas cultivares de feijão (Pérola e BAT 477) sob estresse salino.



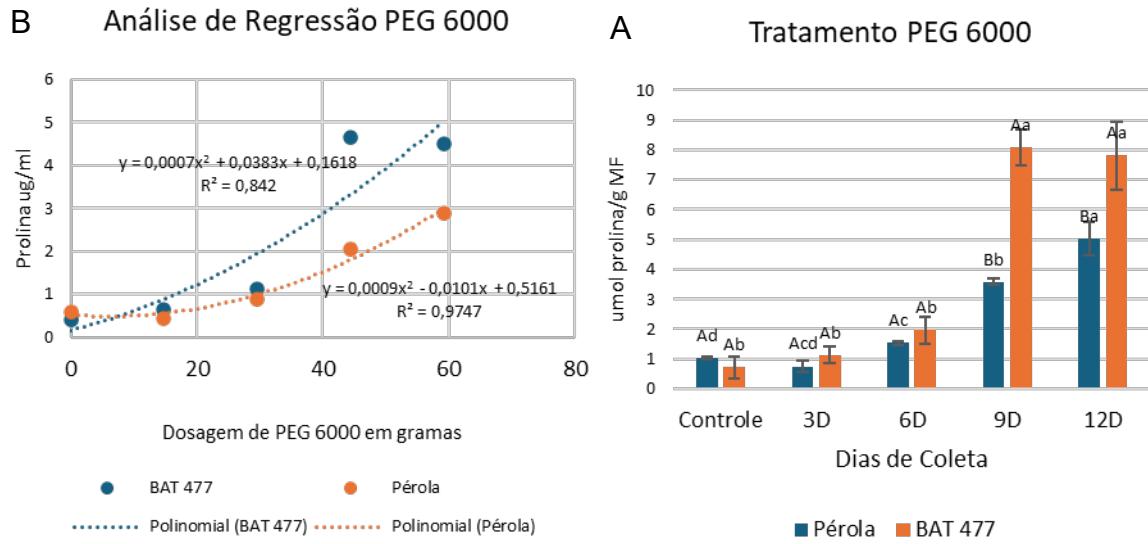
Fonte: O autor.

Legenda: A) Variação temporal da concentração de prolina ( $\mu\text{mol/g MF}$ ) ao longo de 12 dias de tratamento com NaCl. B) Análise de regressão polinomial da concentração de prolina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função da dosagem de NaCl (g). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre variedades e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da mesma variedade ao longo do tempo ( $p \leq 0,05$ ).

## 5.22 Determinação da quantidade de prolina em plantas tratadas com PEG

Os resultados (Figura 25) demonstram o efeito do tratamento com PEG 6000 sobre o acúmulo de prolina em duas cultivares: Pérola e BAT 477. A análise temporal revela que ambos os genótipos mantiveram concentrações basais similares de prolina nos estágios iniciais (Controle, 3D e 6D) (Figura 25). Esses períodos foram seguidos por aumentos significativos nos dias 9 e 12 (Figura 25). BAT 477 exibiu resposta mais pronunciada, com picos de aproximadamente 8  $\mu\text{mol/g MF}$  no 9 dia e 7  $\mu\text{mol/g MF}$  no 12 dia. Enquanto a cultivar Pérola apresentou valores máximos de 3,5 e 5  $\mu\text{mol/g MF}$ , respectivamente (Figura 25). A análise de regressão confirmou esta tendência diferencial, com BAT 477 demonstrando comportamento quadrático positivo ( $y = 0.0007x^2 + 0.0383x + 0.1618$ ;  $R^2 = 0.842$ ) e alcançando concentrações superiores (4,5  $\mu\text{g/ml}$ ) em comparação à Pérola (3  $\mu\text{g/ml}$ ), que também apresentou resposta polinomial ( $y = 0.0009x^2 - 0.0101x + 0.5161$ ;  $R^2 = 0.9747$ ) (Figura 25). Estes dados sugerem mecanismos adaptativos distintos entre os genótipos estudados com BAT 477 exibindo maior capacidade osmorregulatória frente ao estresse osmótico induzido pelo PEG 6000.

Figura 25 — Acúmulo de prolina em duas cultivares de feijão (Pérola e BAT 477) sob estresse de PEG.



Fonte: O autor.

Legenda: A) Variação temporal da concentração de prolina ( $\mu\text{mol/g MF}$ ) ao longo de 12 dias de tratamento com PEG. B) Análise de regressão polinomial da concentração de prolina ( $\mu\text{g/mL}$ ) em função da dosagem de PEG (g). Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre variedades e letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa dentro da mesma variedade ao longo do tempo ( $p \leq 0,05$ ).

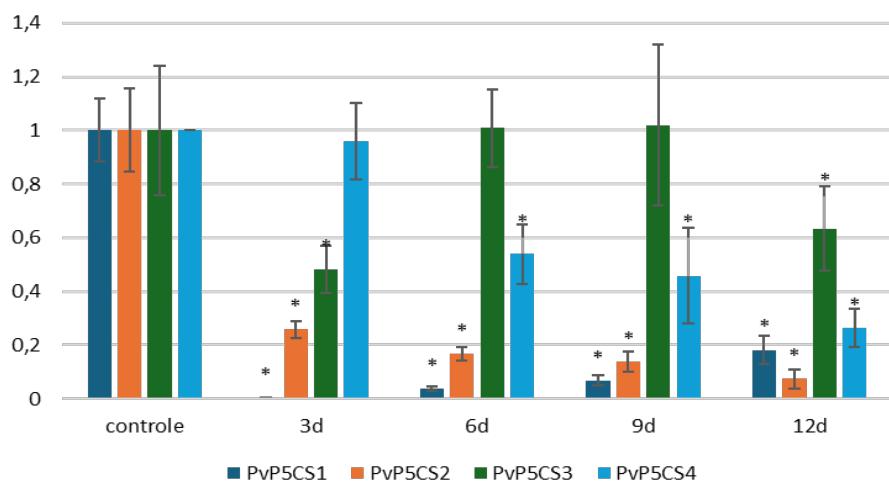
## 5.23 Validação de RT-qPCR de genes diferencialmente expressos

### 5.23.1 Perfil transcrional de *PvP5CS* em resposta ao estresse salino em folhas de feijão BAT 477

A expressão relativa dos genes *PvP5CS* em genótipos de feijão BAT 477 sob estresse salino induzido por NaCl, conforme a Figura 26, evidenciou respostas variadas à salinidade. O experimento demonstrou que todos os genes da família *P5CS* (*P5CS1*, *P5CS2*, *P5CS3* e *P5CS4*) sofreram redução significativa na expressão após o tratamento, com diferentes graus de sensibilidade. *P5CS1* foi o mais afetado (95% de supressão), seguido por *P5CS2* (75% de redução), enquanto *P5CS3* e *P5CS4* apresentaram reduções intermediárias. A análise temporal revelou padrões distintos de recuperação: *P5CS1* e *P5CS2* mantiveram supressão sustentada durante todo o período de 12 dias, *P5CS3* mostrou recuperação transitória entre os dias 6-9, e *P5CS4* apresentou declínio progressivo. Esses resultados indicam que o tratamento causou *down-regulation* diferencial dos genes

*P5CS*, sugerindo funções biológicas específicas e mecanismos regulatórios distintos para cada membro da família gênica (Figura 26).

Figura 26 — Expressão relativa de genes *PvP5CS* em folhas de cultivar BAT 477 submetidos a diferentes períodos e doses de NaCl.



Fonte: autor.

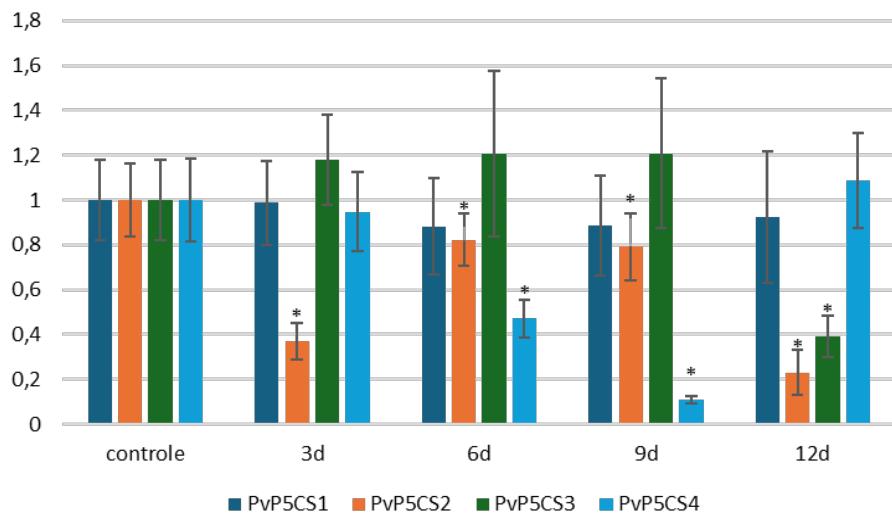
Legenda: Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos e o controle pelo teste t ( $p<0,05$ ). Barra de erros indica o desvio padrão ( $n=9$ ).

Nota: Valores apresentados como média através do método  $(2^{-\Delta\Delta Ct})$  (Livak; Schmittgen, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador (*PvAct11*).

### 5.23.2 Perfil transcracional de *PvP5CS* em resposta ao estresse hídrico induzido por PEG em folhas de feijão da cultivar BAT 477

A expressão relativa dos genes *PvP5CS* em genótipos de feijão BAT 477 sob estresse hídrico induzido por PEG, conforme a Figura 27, revela estratégias divergentes de adaptação. *PvP5CS1* mantém níveis constantes, indicando robustez na regulação da biossíntese de prolina, essencial para osmoproteção (Figura 27). *PvP5CS2* exibe oscilações, sugerindo uma resposta adaptativa transitória, possivelmente modulada por retroalimentação metabólica (Figura 27). Já *PvP5CS3* e *PvP5CS4* mostram declínios progressivos, com *PvP5CS4* destacando-se pela sensibilidade em 12 dias, o que pode refletir exaustão de mecanismos de tolerância ou acúmulo de danos celulares (Figura 27).

Figura 27 — Expressão relativa de genes *PvP5CS* em folhas de cultivar BAT 477 submetidos a diferentes períodos e doses de PEG.



Fonte: autor.

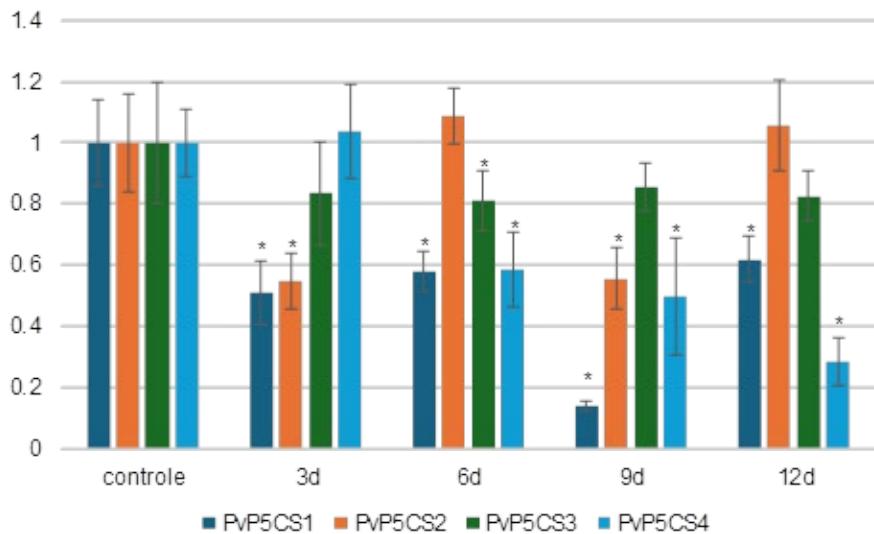
Legenda: Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos e o controle pelo teste t ( $p<0,05$ ). Barra de erros indica o desvio padrão ( $n=9$ ).

Nota: Valores apresentados como média através do método  $(2^{-\Delta\Delta Ct})$  (Livak; Schmittgen, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador (*PvAct11*).

### 5.23.3 Perfil transcracional de *PvP5CS* em resposta ao estresse hídrico induzido por NaCl em folhas de feijão da cultivar Pérola

A análise da expressão relativa dos genes *PvP5CS* (*PvP5CS1*, *PvP5CS2*, *PvP5CS3* e *PvP5CS4*) em folhas de cultivar de feijão Pérola sob estresse salino induzido por NaCl, conforme a Figura 28, revela padrões diferenciados de regulação gênica frente a diferentes períodos de exposição. O experimento revelou que todos os genes da família *P5CS* responderam de forma diferencial ao tratamento ao longo do tempo. *P5CS1* mostrou supressão moderada e consistente, com redução de aproximadamente 50% nos primeiros dias, seguida de recuperação parcial até o dia 12. *P5CS2* (laranja) apresentou o padrão mais estável, mantendo níveis próximos ao controle durante todo o período experimental, com apenas pequenas flutuações não significativas. *P5CS3* demonstrou menor sensibilidade ao tratamento, com redução inicial de cerca de 20% no dia 3, seguida de recuperação gradual até retornar próximo aos níveis basais no final do experimento. Em contraste, *P5CS4* foi o gene mais severamente afetado, com redução de aproximadamente 75% no dia 12.

Figura 28 — Expressão relativa de genes *PvP5CS* em folhas da cultivar Pérola submetidos a diferentes períodos e doses de NaCl.



Fonte: autor.

Legenda: Asterisco (\*) indicam diferença significativa entre os tratamentos e o controle pelo teste t ( $p<0,05$ ). Barra de erros indica o desvio padrão ( $n=9$ ).

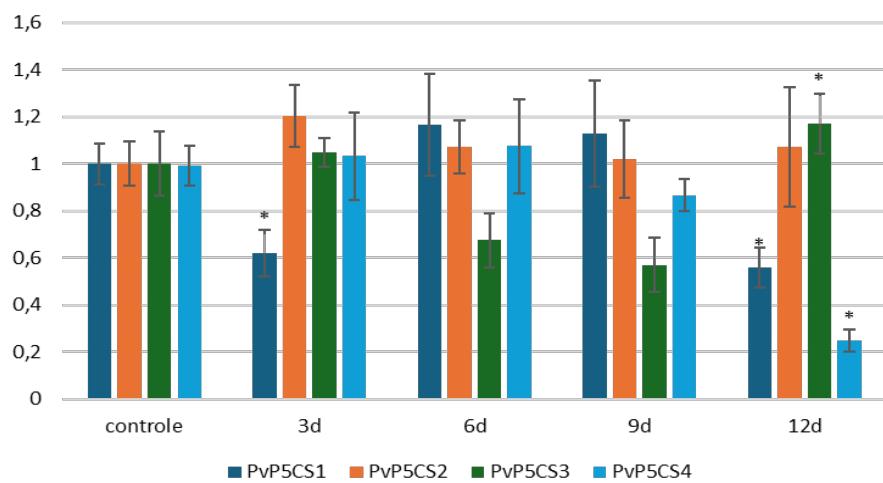
Nota: Valores apresentados como média através do método ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak; Schmittgen, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador (*PvAct11*).

#### 5.23.4 Perfil transcracional de *PvP5CS* em resposta ao estresse hídrico induzido por PEG em folhas de feijão da cultivar Pérola

A análise da expressão relativa dos genes *PvP5CS* (*PvP5CS1*, *PvP5CS2*, *PvP5CS3* e *PvP5CS4*) em folhas de feijão Pérola sob estresse hídrico simulado por PEG, conforme a Figura 29, destaca padrões diferenciados de resposta temporal. A exposição ao PEG provoca reduções progressivas na expressão, mais evidentes após 9 e 12 dias, sugerindo um efeito cumulativo do estresse (Figura 29). *PvP5CS1* mostra supressão inicial em três dias, recuperação parcial em seis e nove dias (possível adaptação transitória) e declínio em 12 dias, indicando esgotamento (Figura 29). O gene *PvP5CS2* apresenta queda inicial, mas estabiliza-se, sugerindo resiliência (Figura 29). Enquanto *PvP5CS3* e *PvP5CS4* mantêm estabilidade inicial, seguido por declínios acentuados após nove dias, apontando maior sensibilidade prolongada (Figura 29). As letras (a, ab, b, c) confirmam significância estatística ( $p<0,05$ ), enfatizando o papel do tempo como modulador. Esses achados corroboram a associação dos genes *P5CS* com tolerância ao estresse via prolina,

mas a redução em períodos longos sugere limites adaptativos no cultivar Pérola, justificando estudos adicionais sobre a interação entre duração do estresse e regulação gênica.

Figura 29 — Perfil transcrional de *PvP5CS* em folhas da cultivar Pérola submetidos a diferentes períodos e doses de PEG.



Fonte: autor.

Legenda: As letras indicam diferença significativa entre os dias de tratamento pelo teste t ( $p<0,05$ ). Barra de erros indica o desvio padrão ( $n=9$ ).

Nota: Valores apresentados como média através do método ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) (Livak; Schmittgen, 2001). Para os cálculos foi utilizado o gene normalizador (*PvAct11*).

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Prolina (P5CS)

Quatro genes relacionados ao metabolismo da prolina foram identificados no genoma do *P. vulgaris* L. usando a *A. thaliana* como referência (Tabela 1). Possivelmente, o número de genes entre as espécies pode variar, por exemplo, já identificaram 11 *P5CSs* putativos de *Pyrus betulifolia* (Ma *et al.*, 2022) e dois genes *P5CS* em *Solanum lycopersicum* (Maghraby; Alzalaty, 2024). As proteínas codificadas por esses genes em feijão variam significativamente em suas propriedades físico-químicas, com comprimentos de sequência de 322 a 751 aa, pl entre 5,64 e 6,64, pesos moleculares de 81,4 a 36,031 kDa e índices GRAVY (hidropatia) de -0,411 a -0,025. A maioria das proteínas está localizada no citoplasma, exceto a isoforma *PvP5CS*, que está localizada no núcleo. Essa variabilidade nas propriedades físico-químicas pode refletir adaptações funcionais, como observado em estudos com outras leguminosas (Armengaud *et al.*, 2004).

Os genes *P5CS* desempenham papéis importantes em processos bioquímicos e fisiológicos em resposta a vários estresses em plantas (Yang *et al.*, 2021a). Portanto, estudar as funções das famílias de genes *P5CS* em ambientes estressantes pode fornecer informações valiosas sobre os mecanismos subjacentes à adaptação das plantas. A diversidade na localização subcelular é consistente com observações em outras espécies, onde diferentes isoformas de *P5CS* podem ter funções especializadas (Verslues; Sharma, 2010). A compartimentalização subcelular do metabolismo da prolina é predominantemente observada em três organelas distintas: cloroplastos, mitocôndrias e citoplasma. Esta distribuição espacial específica tem implicações significativas para a homeostase celular, particularmente no que diz respeito à concentração e utilização de equivalentes redutores (Kavi Kishor *et al.*, 2022).

Os genes *P5CS*: *PvPCS1*, *PvPCS2*, *PvPCS3* e *PvPCS4* possuem estruturas exônicas e intrônicas distintas (Figura 4). *PvPCS1* e *PvPCS2* têm 20 éxons e 19 íntrons, *PvPCS3* tem 17 éxons e 16 íntrons, e *PvPCS4* tem 20 éxons e 19 íntrons, respectivamente. Essas diferenças refletem a complexidade da arquitetura genética dos genes *P5CS*. De acordo com outros estudos, *M. sativa* apresenta uma estrutura gênica *MsP5CS* (*M. sativa*) de 20 éxons e 19 íntrons, semelhante ao encontrado nesse estudo (Min *et al.*, 2023). Já em *P. betuliferal* os éxons variaram de 20 a 6 e

os íntrons 19 a 5, respectivamente (Ma *et al.*, 2022). Os genes *PvP5CS1* a *PvP5CS4* estão distribuídos em diferentes cromossomos (Figura 9). Como observado, o gene *PvP5CS1* está localizado no cromossomo Chr01, enquanto o gene *PvP5CS2* foi mapeado no cromossomo Chr02 (Figura 9). Os genes *PvP5CS2* e *PvP5CS3* estão ambos alojados no cromossomo Chr08. Finalmente, o gene *PvP5CS4* encontra-se no cromossomo Chr10 (Figura 9). Já em tomate os genes *P5CS* se encontram nos cromossomos 6 e 8 (Maghraby; Alzalaty, 2024). Esta disposição dos genes nos cromossomos reflete a complexidade e diversidade da organização genômica do organismo. A diversidade estrutural e funcional observada, juntamente com a expansão da família gênica em comparação com *A. thaliana*, sugere uma complexidade maior na regulação da biossíntese de prolina em *P. vulgaris* L. Isso pode refletir adaptações específicas às condições ambientais enfrentadas por essa espécie, como observado em estudos comparativos de famílias gênicas em diferentes plantas (Magalhães *et al.*, 2016).

A presença de motivos conservados em proteínas é frequentemente associada a domínios funcionais específicos, essenciais para a atividade enzimática ou regulatória da proteína (Mitchell *et al.*, 2019). No caso da P5CS ( $\Delta^1$ -pirrolina- 5-carboxilato sintetase), esses motivos podem estar relacionados aos domínios catalíticos envolvidos na biossíntese de prolina, um processo crucial para a resposta ao estresse em plantas (Sharma *et al.*, 2011). Essa diversidade pode fornecer uma base molecular para a adaptação da planta a diferentes condições ambientais e tipos de estresse.

A análise do perfil de expressão dos genes da família *PvP5CS* em diferentes tecidos e estágios de desenvolvimento revelou padrões distintos que sugerem funções especializadas para cada membro da família. A expressão diferencial observada entre os genes *PvP5CS* em feijão corrobora com estudos anteriores que demonstram que diferentes isoformas de *P5CS* podem desempenhar papéis específicos na regulação da biossíntese de prolina em resposta a condições ambientais distintas. Em *Arabidopsis*, essas isoformas diferem em seus padrões de expressão espacial e temporal, sugerindo subfuncionalização (Funck *et al.*, 2020). A alta expressão de *PvP5CS1* em tecidos radiculares (raiz\_10 e raiz\_19) e nódulos sugere um papel importante deste gene na resposta ao estresse em órgãos subterrâneos, onde a absorção de água e nutrientes é crítica. Esta localização

preferencial em raízes é consistente com o papel da prolina como osmorregulador, especialmente importante em condições de estresse hídrico ou salino que afetam diretamente o sistema radicular. O padrão de expressão amplo de *PvP5CS3* em diversos tecidos (nódulos, raízes, vagens, folhas, trifólios jovens, caule e botões florais) indica uma função constitutiva ou de manutenção homeostática, sugerindo que este gene pode estar envolvido no metabolismo basal da prolina necessário para o desenvolvimento normal da planta. Esta expressão ubíqua é característica de genes *housekeeping* envolvidos em processos metabólicos fundamentais. A expressão preferencial de *PvP5CS5* em órgãos reprodutivos e partes aéreas (vagens verdes maduras, flores, vagens jovens) e estruturas fotossintéticas (folhas, caule) pode indicar um papel específico na proteção desses tecidos contra estresses oxidativos, uma vez que a prolina também atua como antioxidante além de sua função osmoprotetora. A baixa expressão de *PvP5CS2* e *PvP5CS4* pode sugerir que estes genes são ativados em condições específicas não contempladas neste estudo, ou que possuem funções redundantes com outros membros da família. Alternativamente, estes genes podem ter sofrido pseudogenização ou especialização funcional muito restrita. Estudos em arroz (*O. sativa*) demonstraram que a expressão de genes relacionados ao estresse é altamente dependente do tipo celular e do tecido específico, com diferentes genes sendo ativados em resposta ao mesmo estressor em diferentes tipos celulares (Wang *et al.*, 2021). Esta especificidade tecidual também foi observada em nosso estudo com os genes *PvP5CS*, reforçando a importância da compartimentalização da resposta ao estresse em plantas.

A resposta ao estresse salino compartilha vias moleculares com outros estresses abióticos, especialmente o estresse hídrico, uma vez que ambos resultam em desidratação celular e necessidade de ajuste osmótico. Em milheto, estudos dos padrões de expressão dos genes *DREB1A* (elemento de resposta à desidratação B1A) e *P5CS* mostraram que a tolerância ao estresse hídrico está associada à alta expressão de *DREB1A* e baixa expressão de *P5CS* (Animasaun *et al.*, 2024). Esta observação sugere que a regulação da biossíntese de prolina pode variar entre espécies e tipos de estresse, indicando a necessidade de estudos específicos para cada sistema biológico.

Os padrões de expressão diferencial dos genes *PvP5CS* observados neste

estudo fornecem uma base importante para a seleção de genes candidatos para estudos funcionais futuros, especialmente na caracterização da resposta do feijão ao estresse salino. A identificação de *PvP5CS1* e *PvP5CS3* como os genes mais expressos sugere que estes podem ser alvos prioritários para análises de expressão sob condições de estresse abiótico. A variação nos tempos estimados para as duplicações segmentais (36-98 milhões de anos atrás) sugere que a expansão da família gênica *P5CS* em *P. vulgaris* L. ocorreu em múltiplos estágios ao longo da evolução (Tabela 2). Isso pode estar relacionado a eventos evolutivos importantes na história das leguminosas, como adaptações a novos nichos ecológicos ou mudanças climáticas globais (Cannon *et al.*, 2015). A expansão dos membros da família de genes é impulsionada por eventos de duplicação de genes, duplicações segmentares ou em tandem, durante a evolução da planta (Wang *et al.*, 2022).

A distribuição cromossômica sugere possíveis eventos de duplicação gênica, um fenômeno comum em plantas e frequentemente associado à evolução de novas funções (Hanada *et al.*, 2008). A predominância de seleção negativa ( $Ka/Ks < 1$ ) nos pares de genes duplicados segmentalmente indica uma forte pressão evolutiva para manter a função desses genes. Isso é consistente com o papel crucial da *P5CS* na biossíntese de prolina e na resposta ao estresse em plantas. A seleção purificadora elimina mutações prejudiciais que alteram a função das proteínas (Yang; Bielawski, 2000). Genes sob forte seleção purificadora são mantidos em estados epigenômicos que reduzem suas taxas de mutação (Monroe *et al.*, 2023). Isso demonstra como a seleção natural interage com mecanismos genéticos e epigenéticos para preservar a integridade genômica dos organismos.

A análise de sintenia dos genes *P5CS* tem sido um tópico de interesse em várias pesquisas recentes em *S. lycopersicum* (Maghraby; Alzalaty, 2024), *P. betulifolia* (Ma *et al.*, 2022). A sintenia, que se refere à conservação da ordem dos genes ao longo dos cromossomos entre diferentes espécies, é um fenômeno importante para entender a evolução e a função dos genes. De acordo com relatos, diferentes isoformas de genes *P5CS* são induzidas por diferentes estresses. Em estudo com *Stipa purpurea*, a expressão de *P5CS* foi regulada positivamente sob seca do solo, frio e estresse salino (Yang *et al.*, 2021c). Quase todos os genes foram regulados negativamente, exceto *PvP5CS3* tratados com PEG (12 dias) onde foi observado regulação positiva no cultivar Pérola (Figura 29).

Os genes *PvP5CS1* e *PvP5CS4* formam um clado fortemente suportado e estão intimamente relacionados às proteínas de *A. thaliana*, sugerindo conservação funcional (Figura 9). Os genes *PvP5CS2* e *PvP5CS4* formam um clado distinto, mais próximo das proteínas de *O. sativa*, indicando uma possível conservação de função ancestral. Isso sugere uma história evolutiva complexa das proteínas P5CS em *P. vulgaris* L.

A manipulação do gene *P5CS* pode ser usada para melhorar a resistência de culturas importantes a estresses abióticos, o que pode resultar em rendimentos mais estáveis sob condições climáticas adversas. A introdução do gene *P5CS* em plantas pode melhorar a resistência a estresses abióticos. Por exemplo, a introdução do gene *PgP5CS* do milheto pérola (*Pennisetum glaucum*) no tabaco resultou em plantas transgênicas com maior resistência ao estresse por calor e seca (Sellamuthu *et al.*, 2024).

A avaliação da expressão relativa dos genes *PvP5CS* (*PvP5CS1*, *PvP5CS2*, *PvP5CS3* e *PvP5CS4*) em cultivares de feijão (BAT 477 e Pérola) submetidos a estresses abióticos, conforme as Figuras 26, 27, 28 e 29, oferece uma análise detalhada das respostas moleculares à salinidade (induzida por NaCl) e ao estresse hídrico (induzido por PEG). Os mecanismos de adaptação de plantas a estresses abióticos são processos complexos influenciados por diversos fatores. No genótipo BAT 477, sob estresse salino, a expressão do gene *PvP5CS1* mostrou redução imediata e sustentada, indicando sensibilidade inicial possivelmente relacionada a limitações na ativação precoce da biossíntese de prolina, mecanismo fundamental para osmoproteção (Tikhomirova; Krutovsky; Shestibratov, 2023). Em contraste, o declínio gradual do gene *PvP5CS2* sugere uma resposta cumulativa ao estresse salino prolongado, consistente com evidências de modulação temporal da expressão gênica associada a danos celulares ou exaustão metabólica (Guan *et al.*, 2020). A estabilidade inicial de *PvP5CS3* e *PvP5CS4* até o 9 dia, seguida por quedas significativas no 12 dia, reflete restrições adaptativas, alinhando-se a estudos que documentam a manutenção transitória de níveis de genes em genótipos tolerantes à seca, como BAT 477, antes de um declínio induzido por limitações fisiológicas (Tikhomirova; Krutovsky; Shestibratov, 2023). Esses achados corroboram o papel dos genes *P5CS* na osmoproteção via prolina, mas a redução observada em exposições prolongadas sugere uma tolerância limitada do genótipo BAT 477 a estresses

salinos crônicos, desafiando a suposição de resiliência universal em leguminosas e demandando investigações adicionais sobre regulação transcripcional e dinâmica de osmóticos (Molinari *et al.*, 2007; Sapakhova *et al.*, 2023).

No contexto do estresse hídrico induzido por PEG, a estabilidade da expressão de *PvP5CS1* ao longo de 12 dias no genótipo BAT 477 (Figura 27A) evidencia uma robusta regulação da biossíntese de prolina, um mecanismo osmoprotetor amplamente reconhecido em leguminosas (Verslues *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2022). A oscilação de *PvP5CS2*, com pico em 3 dias e declínio em 9-12 dias (Figura 27B), sugere uma adaptação transitória potencialmente mediada por retroalimentação metabólica, em consonância com estudos que destacam a regulação dinâmica de P5CS sob estresse hídrico prolongado (Molinari *et al.*, 2007; Jacinto Junior *et al.*, 2022). As quedas acentuadas de *PvP5CS3* e *PvP5CS4* em 12 dias (Figuras 27C e 27D) indicam limites adaptativos, possivelmente ligados à depleção de recursos metabólicos sob estresse crônico, uma tendência observada em genótipos sob condições adversas (Chen *et al.*, 2009).

Em contraste com os dados obtidos neste estudo para o genótipo Pérola sob NaCl (Figura 28), nos quais se observa a redução de *PvP5CS1* após 9 dias (Figura 28A), indicando sensibilidade precoce, e a recuperação parcial de *PvP5CS2* em 12 dias (Figura 28B), sugerindo plasticidade adaptativa, estudos anteriores também apontam para uma modulação temporal da expressão gênica associada a danos celulares ou exaustão metabólica (Guan *et al.*, 2020). A estabilidade inicial de *PvP5CS3* e *PvP5CS4*, seguida por declínios tardios (Figuras 28C e 28D), aponta para uma tolerância limitada a estresse salino prolongado. Sob tratamento com PEG (Figura 29), as oscilações de *PvP5CS1* (Figura 23A) e as quedas progressivas de *PvP5CS2* e *PvP5CS4* (Figuras 29B e 29D) corroboram a sensibilidade ao estresse hídrico prolongado. Além disso, a baixa transcrição de alguns genes pode ser atribuída ao fato de que eles desempenham outras funções durante o processo de desenvolvimento desta espécie (Szabados; Savouré, 2010; Quadros *et al.*, 2023). Essas observações reforçam o papel central dos genes P5CS na osmoproteção, mas as reduções em exposições prolongadas sugerem exaustão metabólica ou danos celulares, indicando uma tolerância em ambos os genótipos.

O nível de expressão relativa do gene *P5CS3* em ambas as espécies e tratamentos sob condições de controle se mantiveram acima de 0,5 (*down-*

*regulatated*). Isso sugere que as plantas mantêm um nível basal de expressão genética contra seu estado saudável e estressado (Georgieva; Vassileva, 2023). Alguns genes apresentam uma rápida redução após o tratamento com uma recuperação gradual, como no caso do gene *PvP5CS1* em BAT 477, tratado com NaCl. No geral, as plantas aumentam a produção de prolina por meio do gene *P5CS* em resposta a condições de estresse, e esse mecanismo varia entre as espécies vegetais. Estudos recentes demonstram que a produção de prolina tende a aumentar conforme o tempo de exposição ao estresse, reforçando seu papel osmoprotetor (Luan *et al.*, 2024). Os resultados demostram aumento de produção de prolina conforme o tempo de estresse.

## 6.2 Transportador de prolina (ProT)

Os transportadores de prolina (ProTs) fazem parte de uma estrutura mais ampla de transportadores de aminoácidos (AATs) nas plantas. Os AATs são proteínas fundamentais para o funcionamento das plantas, desempenhando papéis cruciais no crescimento, desenvolvimento e nas respostas a estresses bióticos e abióticos (Wang *et al.*, 2024). Estudos têm se concentrado na evolução funcional e na regulação da expressão dos genes *P5CS* em várias plantas modelo, como *Glycine max*, especialmente em contextos de estresse hídrico (Vaishnav *et al.*, 2018), *C. sinensis* (Dai *et al.*, 2020), e *S. lycopersicum* (Akbudak; Filiz, 2020). No presente estudo, identificou-se duas sequências *ProTs* na espécie de feijão, já em outras espécies como a do genoma do repolho foram identificados seis genes *ProT* (Tian *et al.*, 2023). Estas proteínas apresentam uma sequência de aa que varia entre 338 e 442 (Tabela 3).

O gene *PvProT1* (Figura 16) apresenta uma estrutura genômica complexa, composta por sete éxons e seis íntrons. Por outro lado, o gene *PvProT2* (Figura 16) é constituído por seis éxons e cinco íntrons. Essas estruturas de éxon/ítron revelam diferenças, tanto no número de éxons quanto em suas posições relativas, destacando a diversidade estrutural dentro desta família de genes. É importante notar que a complexa organização genômica, caracterizada pela presença intercalada de éxons e íntrons, resulta em um fenômeno notável: a produção de diferentes variantes de *splicing*. Por meio deste mecanismo molecular, um único gene pode dar origem a múltiplas formas de RNAm (RNA mensageiro) maduro, o

que consequentemente enriquece tanto o transcriptoma quanto o proteoma celular (Petrillo, 2023).

Os genes *PvProT1* e *PvProT2*, que codificam proteínas transportadoras no feijão comum, estão localizados nos cromossomos Chr01 e Chr08 (Figura 13), respectivamente. A análise comparativa das sequências de aminoácidos das proteínas *PvProT1* e *PvProT2* revelou uma conservação significativa dos motivos entre as duas, embora existam algumas diferenças notáveis. Identificamos substituições de aminoácidos, o que sugere que, apesar da predominância da conservação dos motivos entre *PvProT1* e *PvProT2*, essas alterações pontuais podem resultar em variações sutis nas propriedades estruturais ou funcionais dessas regiões proteicas. As sequências genéticas estão sujeitas a alterações constantes devido a diversos tipos de mutações naturais, que desempenham um papel crucial na evolução genética. Essas mutações podem ocorrer de várias formas, como substituições de nucleotídeos, inserções, deleções ou rearranjos cromossômicos (Akbudak; Filiz, 2020).

Dentre os genes *ProTs* analisados, o *ProT2* se sobressaiu por apresentar o perfil de expressão mais elevado. Este gene demonstrou uma presença marcante nas flores e nas vagens verdes maduras, indicando que é benéfico para o processo de absorção de aminoácidos (Figura 19). Da mesma forma que os membros da subfamília AAP em milheto foram expressos em vários tecidos, indicando que eles podem estar participando de diferentes processos biológicos em diferentes tecidos de plantas (Wang *et al.*, 2024).

Eventos de duplicação dos pares de sequências (Tabela 4) foram analisados neste estudo: *PvProT1* com *PvProT2*. Foi identificada duplicação segmental entre *PvProT1* e *PvProT2* que ocorreu há cerca de 39,02 milhões de anos. A razão entre as taxas de substituição não-sinônima e sinônima (Ka/Ks) é de 0,19, indicando que esses genes estão sob seleção purificadora, o que sugere que a maioria das mutações é desvantajosa e tende a ser eliminada ao longo do tempo evolutivo.

A análise de sintenia entre *P. vulgaris* L., *A. thaliana* e *O. sativa* revelou similaridades genômicas entre *P. vulgaris* L. e *A. thaliana*. Os genes *PvProT1* (Chr01) e *PvProT2* (Chr08) de *P. vulgaris* L. (Figura 20) mostraram correspondência com os cromossomos At-2 e At-3 de *A. thaliana*. Entretanto, não foram observadas similaridades significativas entre *P. vulgaris* L. e *O. sativa* para esses genes,

sugerindo uma maior distância evolutiva entre essas espécies nesse aspecto específico. A família de genes *ProT*, que apresenta propriedades físico-químicas similares em várias espécies vegetais, como tomate e *Arabidopsis*, é altamente conservada. No arroz, três genes *ProT* foram identificados: *OsProT1* (LOC\_Os01g68050), *OsProT2* (LOC\_Os03g44230) e *OsProT3* (LOC\_Os07g01090). Essas características sublinham a conservação da família *ProT* entre diferentes espécies de plantas, ressaltando sua importância evolutiva (Zhao, 2012; Akbudak; Filiz, 2020).

Os resultados sugerem que as proteínas *OsProT1* e *OsProT2* de *O. sativa* e *PvProT1* e *PvProT2* de *P. vulgaris* L. compartilham um ancestral comum recente (Figura 17). Além disso, as proteínas de *A. thaliana* e *P. vulgaris* L. parecem ter uma relação evolutiva mais próxima em comparação com *O. sativa*. Já em outros estudos com *M. sativa* que apresenta o gene *MsProT* (*M. sativa* - *ProT*) contém sete a nove exons (Min *et al.*, 2023).

O agrupamento de *AtProT1*, *AtProT2* e *AtProT3* com as proteínas de *P. vulgaris* L. sugere uma relação evolutiva mais próxima entre essas duas espécies em comparação com *O. sativa* (Figura 21). A ramificação inicial de *O. sativa* sugere que as proteínas *OsProT1* e *OsProT2* divergiram primeiro do ancestral comum a todas as proteínas analisadas (Figura 21).

Os ProTs são transportadores de prolina que também transportam glicina betaína, auxiliando na tolerância das plantas ao estresse e na eliminação de EROs. Eles também transportam o ácido gama-aminobutírico, aumentando a atividade antioxidante das plantas (Yuan *et al.*, 2024). A expressão adequada do gene *ProT* é crucial para a funcionalidade desejada. No entanto, a expressão gênica pode ser influenciada por vários fatores, incluindo a posição de inserção do gene e o ambiente de crescimento da planta. O gene *PvProT2* apresenta o maior nível de expressão em flores e vargens maduras verdes, enquanto o *PvProT1* tem sua expressão máxima em flores. Ambos os genes mostram os menores níveis de expressão em nódulos, botões florais e trifólios jovens. A expressão de *ProT2* é regulada positivamente sob estresse hídrico e salino, indicando seu papel importante nas respostas das plantas aos estresses abióticos (Min *et al.*, 2023).

## 7 CONCLUSÃO

Em suma, identificou-se quatro genes *PvP5CS* e dois genes *PvProT* do feijoeiro e um estudo sistemático usando ferramentas de bioinformática. Englobou-se algumas análises, dentre elas: estruturas gênicas, localizações cromossômicas, análises dos motivos proteicos, padrões de expressão, duplicações genéticas, análise de sintenia, relações filogenéticas, além de proteína em 3D e elementos de ação *cis* e RT-qPCR. Havia vários elementos de ação *cis* nas sequências promotoras de *PvP5CS* e *ProT*, sugerindo que atuam em redes complexas regulando o desenvolvimento da planta e as respostas ao estresse. Os genes *PvP5CS1*, *PvP5CS3* e *PvP5CS4* apresentaram maior expressão em diversos tecidos em análises *in silico*. Os perfis transcricionais mostraram respostas variadas dos genes à salinidade e estresse hídrico nos genótipos BAT 477 e Pérola em amostras de folhas. A maioria dos genes *P5CS* demonstrou redução de expressão em exposições prolongadas a estresses, sugerindo limitação na tolerância a condições adversas crônicas. As informações desde estudo são contribuições para a compreensão molecular das principalmente isoformas *P5CS* de uma cultura importante sob condição de estresse por PEG e salino.

## REFERÊNCIAS

AKBUDAK, M. A.; FILIZ, E. Genome-wide investigation of proline transporter (*ProT*) gene family in tomato: bioinformatics and expression analyses in response to drought stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 157, p. 13-22, 2020. DOI: 10.1016/j.plaphy.2020.10.004.

AL HASSAN, M.; MOROSAN, M.; LÓPEZ-GRESA, M. D. P.; PROHENS, J.; VICENTE, O.; BOSCAIU, M. Salinity-induced variation in biochemical markers provides insight into the mechanisms of salt tolerance in common (*Phaseolus vulgaris*) and runner (*P. coccineus*) beans. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, p. 1582, 2016. DOI: 10.3390/ijms17091582.

ALVAREZ, M. E.; SAVOURÉ, A.; SZABADOS, L. Proline metabolism as regulatory hub. **Trends in Plant Science**, v. 27, n. 1, p. 39-55, 2022. DOI: 10.1016/j.tplants.2021.07.009.

ANGIOI, S. A., RAU, D., ATTENE, G., NANNI, L., BELLUCCI, E., LOGOZZO, G., NEGRI, V., SPAGNOLETTI ZEULI, P. L., & PAPA, R. Beans in Europe: origin and structure of the European landraces of *Phaseolus vulgaris* L. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 121, n. 5, p. 829-843, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1353-2>.

ANIMASAUN, D. A.; MUSTAPHA, K. A.; AKINBOBOLA, A. M.; BAKARE, A. T.; OGUNJOBI, J. T.; ADEDOYIN, K. A.; AWUJOOLA, K. F. Morphological screening and expression of drought-related genes P5SC1 and DREB1A in water-stressed pearl millet (*Pennisetum glaucum*) at the pre-fruiting stage. **Bragantia**, v. 83, e20230270, 2024. DOI: 10.1590/1678-4499.20230270.

ANTON, D. B. Identificação e caracterização in silico do gene P5CS (delta 1-pyrrolina-5-carboxilato sintase) em *Eugenia uniflora*. [Resumo]. In: SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 27., 2015, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/135849>. Acesso em: 13 ago. 2025.

ARMENGAUD, P.; THIERY, L.; BUHOT, N.; GRENIER-DE MARCH, G.; SAVOURÉ, A. Transcriptional regulation of proline biosynthesis in *Medicago truncatula* reveals developmental and environmental specific features. **Physiologia Plantarum**, v. 120, n. 3, p. 442-450, 2004. DOI: 10.1111/j.0031-9317.2004.00251.x.

ARRUDA, I. M.; MODA-CIRINO, V.; KOLTUN, A.; SANTOS, O. J. A. P.; MOREIRA, R. S.; MOREIRA, A. F. P.; GONÇALVES, L. S. A.. Physiological, biochemical and morphoagronomic characterization of drought-tolerant and drought-sensitive bean genotypes under water stress. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v. 24, n. 6, p. 1059-1067, 2018. DOI: 10.1007/s12298-018-0555-y.

ARUN-CHINNAPPA, K. S.; RANAWAKE, L.; SENEWEERA, S. Impacts and management of temperature and water stress in crop plants. In: MINHAS, P.; RANE, J.; PASALA, R. (ed.). **Abiotic stress management for resilient agriculture**. Singapore: Springer, 2017. DOI: 10.1007/978-981-10-5744-1\_9.

ASFAW, A. et al. Farmers common bean variety and seed management in the face of drought and climate instability in southern Ethiopia. *Scientific research and essays*, v. 8, n. 22, p. 1022-1037, 2013.  
DOI:10.5897/SRE12.732

BATES, L. S.; WALDREN, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil*, v. 39, p. 205–207, 1973.  
DOI: 10.1007/BF00018060.

BEEBE, S. E.; RAO, I. M.; CAJIAO, C.; GRAJALES, M. Selection for drought resistance in common bean also improves yield in phosphorus limited and favorable environments. *Crop Science*, v. 48, n. 2, p. 582–592, 2008. DOI: 10.2135/cropsci2007.07.0404.

BIBI, F.; RAHMAN, A. An overview of climate change impacts on agriculture and their mitigation strategies. *Agriculture*, v. 13, n. 8, p. 1508, 2023. DOI: 10.3390/agriculture13081508.

BLAIR, M. W.; AMBACHEW, D. D.; MILLER, M. C.; LI, H.; NAKKALAPUDI, L.; CORTÉS, A. J. Allele mining in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KOLE, Chittaranjan; BHARADWAJ, C.; SARKAR, Abhimanyu (eds.). **Allele mining for genomic designing of grain legume crops**. Boca Raton: CRC Press, 2025. p. 1–32.

BORGES, A.; FONSECA, M.; CALSAVARA, N.; SANTOS, R.; RODRIGUES, G.; FERREIRA, R.; YAMAGISHI, A. Identification of suitable reference genes for real-time PCR analysis in *Phaseolus vulgaris* under drought stress. *Plant Molecular Biology Reporter*, v. 30, n. 3, p. 741–748, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11105-011-0380-3>.

BOWNE, J.; BACIC, A.; TESTER, M.; ROESSNER, U. Abiotic stress and metabolomics. In: HALL, R. D. (ed.). **Annual plant reviews: biology of plant metabolomics**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2018. v. 43, p. 61-85. DOI: 10.1002/9781119312994.apr0463.

CANNON, S. B.; McKAIN, M. R.; HARKESS, A.; NELSON, M. N.; DASH, S.; DEYHOLOS, M. K.; PENG, Y.; JOYCE, B.; STEWART JUNIOR, C. N.; ROLF, M.; KUTCHAN, T.; TAN, X.; CHEN, C.; ZHANG, Y.; CARPENTER, E.; WONG, G. K.-S.; DOYLE, J. J.; LEEBENS-MACK, J. Multiple polyploidy events in the early radiation of nodulating and nonnodulating legumes. *Molecular Biology and Evolution*, Cary, v. 32, n. 1, p. 193-210, 2015. DOI: 10.1093/molbev/msu296.

CARVALHO, L. M.; MELO, E. O. L.; SILVA FILHO, F. S.; SOBRAL, L. F.; ANJOS, J. L.; BORGES, A. L.; CARVALHO, H. W. L. **Acúmulo de prolina na laranjeira Pera sobre três porta-enxertos e sua interrelação com as doses de N no solo**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2022. 27 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 175).

CASTAÑEDA, V.; GONZÁLEZ, E. M. Strategies to apply water-deficit stress:

similarities and disparities at the whole plant metabolism level in *Medicago truncatula*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 6, p. 2813, 2021. DOI: 10.3390/ijms22062813.

CHAUDHRY, S.; SIDHU, G. P. S. Climate change regulated abiotic stress mechanisms in plants: A comprehensive review. **Plant Cell Reports**, v. 41, n. 1, p. 1-31, 2022. DOI: 10.1007/s00299-021-02759-5.

CHEN, J. B.; WANG, S.-M.; JING, R.-L.; MAO, X.-G. Cloning the PvP5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris*) and its expression patterns under abiotic stresses. **Journal of Plant Physiology**, v. 166, n. 1, p. 12-19, 2009. DOI: 10.1016/j.jplph.2008.02.010.

CHEN, J. B.; ZHANG, X.; JING, R.; BLAIR, M. W.; MAO, X.; WANG, S. Cloning and genetic diversity analysis of a new P5CS gene from common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 7, p. 1393-1404, 2010. DOI: 10.1007/s00122-010-1263-.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v.12, safra 2024/25, n.4, Quarto levantamento, Brasília, p. 1-102, 2025. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos>. Acesso em: 7 de fevereiro de 2025.

DAI, H.; ZHOU, Y.; ZHENG, S.; TONG, H.; YUAN, L. Genome identification and expression analysis of the proline transporter (CsProTs) gene family in tea plant (*Camellia sinensis*). **Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica**, v. 40, n. 6, p. 937-948, 2020.

DEBOUCK, D.G; HIDALGO, R.. 1985. Morfología de la planta de frijol comun . In: López Genes, Marceliano; Fernández O., Fernando O.; Schoonhoven, Aart van (ed.). **Frijol: Investigación y producción** . Programa de las Naciones Unidas (PNUD); Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 7-41.

DONG, K.; YE, Z.; HU, F.; SHAN, C.; WEN, D.; CAO, J. Improvement of plant quality by amino acid transporters: a comprehensive review. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 215, p. 109084, 2024. DOI: 10.1016/j.plaphy.2024.109084.

DWIVEDI, P.; SOPORY, S. K. Unravelling the mechanism of stress responses in crop plants. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 42, n. 10, p. 5961-5964, 2023. DOI: 10.1007/s00344-023-11104-x

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Feijão – Pérola**. 1994. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-solucoes-tecnologicas-/produto-servico/520/feijao---perola>. Acesso em: 27 Abr. 2024

FAO - Food Agriculture Organization. **The impact of disasters on agriculture and food security**. Roma: FAO, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.4060/cc7900en>. Acesso em: 26 fev. 2024.

FELETTI, M. A. P.; SILVA, I. B. dos S.; ANDRADE, M. A.; BORGES, B. de S.; LIMA,

P. A. M. de; POSSE, S. C. P.; FERREIRA, A.; MENGARDA, L. H. G. Tolerância de cultivares de feijão ao estresse salino com base no desempenho germinativo. **Revista Delos**, v. 17, n. 60, e2369, 2024. DOI: 10.55905/rdelosv17.n60-126.

FILGUEIRAS, J. P. C. **Origem e diversificação da família gênica P5CS. 2021.** Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10183/250270>. Acesso em: 15 ago. 2025.

FILGUEIRAS, J. P. C.; ZAMOCKY, M.; TURCHETTO ZOLET, A. C. Unraveling the evolutionary origin of the P5CS gene: a story of gene fusion and horizontal transfer. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 11, p. 1341684, 2024. DOI: 10.3389/fmolb.2024.1341684.

FUNCK, D.; BAUMGARTEN, L.; STIFT, M.; VON WIRÉN, N.; SCHÖNEMANN, L. Differential contribution of P5CS isoforms to stress tolerance in *Arabidopsis*. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 565134, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.565134/full>. Acesso em: 16 ago. 2025.

GEORGIEVA, M.; VASSILEVA, V. Stress management in plants: examining provisional and unique dose-dependent responses. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5105, 2023. DOI: 10.3390/ijms24065105.

GRIGORIEVA, E.; LIVENETS, A.; STELMAKH, E. Adaptation of agriculture to climate change: A scoping review. **Climate**, v. 11, n. 10, p. 202, 2023. DOI: 10.3390/cli11100202.

GUAN, C.; CUI, X.; LIU, H.; LI, X.; LI, M.; ZHANG, Y. Proline biosynthesis enzyme genes confer salt tolerance to switchgrass (*Panicum virgatum L.*) in cooperation with polyamines metabolism. **Frontiers in Plant Science**, v. 11, p. 46, 2020. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2020.00046/full>. Acesso em: 16 ago. 2025.

HANADA, K.; ZOU, C.; LEHTI-SHIU, M. D.; SHINOZAKI, K.; SHIU, S.-H. Importance of lineage-specific expansion of plant tandem duplicates in the adaptive response to environmental stimuli. **Plant Physiology**, v. 148, n. 2, p. 993-1003, 2008. DOI: 10.1104/pp.108.122457.

HOSSEINFAR, M.; STEFANIAK, S.; GHORBANI JAVID, M.; SOLTANI, E.; WOJTYLA, Ł.; GARNCZARSKA, M. Contribution of exogenous proline to abiotic stresses tolerance in plants: a review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 5186, 2022. DOI: 10.3390/ijms23095186.

HURA, T.; HURA, K.; OSTROWSKA, A. Drought-stress induced physiological and molecular changes in plants. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. 4698, 2022. DOI: 10.3390/ijms23094698.

IBRAHIMOVA, U.; KUMARI, P.; YADAV, S.; RASTOGI, A.; ANTALA, M.; SULEYMANOVA, Z.; ZIVCAK, M.; TAHJIB-UL-ARIF, M.; HUSSAIN, S.;

ABDELHAMID, M.; HAJIHASHEMI, S.; YANG, X.; BRESTIC, M. Progress in understanding salt stress response in plants using biotechnological tools. **Journal of Biotechnology**, v. 329, p. 180–191, 2021. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2021.02.007.

JACINTO JUNIOR, E. A.; SILVA, J. V.; CAETANO, L. C.; ANDRADE, T. G.; ALMEIDA, C. C. S. **Análise de expressão gênica diferencial em genótipo de cana-de-açúcar tolerante ao estresse hídrico, usando real-time RT-PCR.** *Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias)* – Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2022. Disponível em: Repositório UFAL. Acesso em: 12 set. 2025.

JOAQUIM, L. M.; EL-HANI, C. N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **Scientiae studia**, v.8, p. 93-128, 2010.

KARAVIDAS, I.; NTATSI, G.; VOUGELEKA, V.; KARKANIS, A.; NTANASI, T.; SAITANIS, C.; AGATHOKLEOUS, E.; ROPOKIS, A.; SABATINO, L.; TRAN, F.; IANNETTA, P. P. M.; SAVVAS, D. Agronomic practices to increase the yield and quality of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.): a systematic review. **Agronomy**, v. 12, n. 2, p. 271, 2022. DOI: 10.3390/agronomy12020271.

KAJI KISHOR, P. B.; SURAJAJHALA, P.; RATHNAGIRI, P.; SREENIVASULU, N. Intriguing role of proline in redox potential conferring high temperature stress tolerance. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 867531, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.867531.

KIM, G. B.; NAM, Y. W. Physiological and metabolomic analysis of a knockout mutant suggests a critical role of MtP5CS3 gene in osmotic stress tolerance of *Medicago truncatula*. **Euphytica**, v. 193, p. 39–57, 2013.  
<https://doi.org/10.1007/s10681-013-0957-4>.

LANNA, A. C.; SILVA, R. A.; FERRARESI, T. M.; MENDONÇA, J. A.; COELHO, G. R. C.; MOREIRA, A. S.; VALDISSER, P. A. M. R.; BRONDANI, C.; VIANELLO, R. P. Physiological characterization of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under abiotic stresses for breeding purposes. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 25, n. 31, p. 31149–31164, 2018. DOI: 10.1007/s11356-018-3012-0.

LEMOS, L. B.; OLIVEIRA, R. S.; PALOMINO, E. C.; SILVA, T. R. B. Características agronômicas e tecnológicas de genótipos de feijão do grupo comercial Carioca. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 4, p. 319–326, 2004. DOI: 10.1590/S0100-204X2004000400004.

LI, J.; ZHANG, Y.; ZHANG, G.; ZHANG, S.; LIU, Y.; WANG, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, J. Isolation, transformation and overexpression of sugarcane SoP5CS gene for drought tolerance improvement. **Sugar Tech**, v. 20, n. 4, p. 464–473, 2018.

LIMA, L. A. D. C.; SCHUSTER, I.; COSTA, A. C. T.; VENDRUSCOLO, E. C. G. Avaliação de eventos de trigo transformados com o gene p5cs e submetidos à seca. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 446–455, 2019. DOI: 10.19084/rca.17268.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

LUAN, M.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, J.; WANG, X.; LI, H. Functional characterization of the *Paeonia ostii* P5CS gene under drought stress. **Plants**, v. 13, n. 15, p. 2145, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/13/15/2145>. Acesso em: 16 ago. 2025.

LUAN, Y.; AN, H.; CHEN, Z.; ZHAO, D.; TAO, J. Functional characterization of the *Paeonia ostii* P5CS gene under drought stress. **Plants**, v. 13, n. 15, p. 2145, 2024. DOI: 10.3390/plants13152145.

LUAN, Y.; AN, H.; CHEN, Z.; ZHAO, D.; TAO, J. Functional characterization of the *Paeonia ostii* P5CS gene under drought stress. **Plants**, v. 13, n. 15, p. 2145, 2024. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2223-7747/13/15/2145>. Acesso em: 16 ago. 2025.

MA, C.; WANG, M.; ZHAO, M.; YU, M.; ZHENG, X.; TIAN, Y.; SUN, Z.; LIU, X.; WANG, C. The  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase family performs diverse physiological functions in stress responses in pear (*Pyrus betulifolia*). **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 1066765, 2022. DOI: 10.3389/fpls.2022.1066765.

MAGALHÃES, A. P.; VERDE, N.; REIS, F.; MARTINS, I.; COSTA, D.; LINO-NETO, T.; CASTRO, P. H.; TAVARES, R. M.; AZEVEDO, H. RNA-Seq and gene network analysis uncover activation of an ABA-dependent signalosome during the cork oak root response to drought. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, p. 1195, 2016. DOI: 10.3389/fpls.2015.01195.

MAGHRABY, A.; ALZALATY, M. Genome-wide identification, characterization and evolutionary analysis of the pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH) and dehydrin (DHN) genes in *Solanum lycopersicum* under drought stress. **Research Square**, 2024. DOI: 10.1186/s12870-025-07057-w.

MAHMOOD, T.; ZHANG, J.; WANG, Y.; LI, C.; ZHANG, X.; WANG, X. Machine learning applications in plant phenotyping for crop improvement: A review. **Frontiers in Plant Science**, v. 13, p. 879984, 2022. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.879984>.

MARAS, M., ŠUŠTAR-VOZLIČ, J., KAINZ, W., & MEGLIČ, V. Genetic diversity and dissemination pathways of common bean in Central Europe. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 138, n. 4, p. 297-305, 2013. <https://doi.org/10.21273/JASHS.138.4.297>.

MEENA, M.; DIVYANSHU, K.; KUMAR, S.; SWAPNIL, P.; ZEHRA, A.; SHUKLA, V.; YADAV, M.; UPADHYAY, R. S. Regulation of L-proline biosynthesis, signal transduction, transport, accumulation and its vital role in plants during variable environmental conditions. **Helion**, v. 5, n. 12, p. e02952, 2019. DOI: 10.1016/j.heliyon.2019.e02952.

MELO, L. C.; PEREIRA, H. S.; FARIA, L. C.; SOUZA, T. L. P. O.; WENDLAND, A.; DÍAZ, J. L. C.; CARVALHO, H. W. L.; MELO, C. L. P.; COSTA, A. F.; MAGALDI, M. C. S.; COSTA, J. G. C. BRS FC402: high-yielding common bean cultivar with carioca grain, resistance to anthracnose and fusarium wilt. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 67–71, 2017. DOI: 10.1590/1984-70332017v17n1c11.

MICHEL, B. E. Evaluation of the water potentials of solutions of polyethylene glycol 8000. **Plant Physiology**, v. 72, n. 1, p. 66–70, 1983. DOI: 10.1104/pp.72.1.66.

MICHEL, B. E.; KAUFMANN, M. R. The osmotic potential of polyethylene glycol 6000. **Plant Physiology**, v. 51, n. 5, p. 914–916, 1973. DOI: 10.1104/pp.51.5.914.

MIN, Y.; YU, D.; YANG, J.; ZHAO, W.; ZHANG, L.; BAI, Y.; GUO, C. Bioinformatics and expression analysis of proline metabolism-related gene families in alfalfa under saline-alkali stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 205, p. 108182, dez. 2023. DOI: 10.1016/j.plaphy.2023.108182.

MITCHELL, A. L. et al. InterPro in 2019: improving coverage, classification and access to protein sequence annotations. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D351–D360, 2019. DOI: 10.1093/nar/gky1100.

MOLINARI, H. B. C.; MARUR, C. J.; DAROS, E.; CAMPOS, M. K. F.; PORTELA CARVALHO, J. F. R.; BESPALHOK FILHO, J. C.; PEREIRA, L. F. P.; VIEIRA, L. G. E. Evaluation of the stress-inducible production of proline in transgenic sugarcane (*Saccharum* spp.): osmotic adjustment, chlorophyll fluorescence and oxidative stress. **Physiologia Plantarum**, 2007. DOI: 10.1111/j.1399-3054.2007.00909.x.

MONROE, J. G.; SRIKANT, T.; CARBONELL-BEJERANO, P.; BECKER, C.; LENSSINK, M.; EXPOSITO-ALONSO, M.; KLEIN, M.; HILDEBRANDT, J.; NEUMANN, M.; KLIEBENSTEIN, D.; WENG, M.-L.; IMBERT, E.; ÅGREN, J.; RUTTER, M. T.; FENSTER, C. B.; WEIGEL, D. Author Correction: Mutation bias reflects natural selection in *Arabidopsis thaliana*. **Nature**, v. 620, p. E13, 2023. DOI: 10.1038/s41586-023-06387-9.

OLIVEIRA, L. F. C., OLIVEIRA, M. D. C., WENDLAND, A., HEINEMANN, A. B., GUIMARÃES, C. M., FERREIRA, E. D. B., SILVA, S. C. **Conhecendo a fenologia do feijoeiro e seus aspectos fitotécnicos**. 2018.

ONDRAŠEK, G.; RATHOD, S.; MANOHARA, K. K.; GIREESH, C.; ANANTHA, M. S.; SAKHARE, A. S.; PARMAR, B.; YADAV, B. K.; BANDUMULA, N.; RAIHAN, F.; ZIELIŃSKA-CHMIELEWSKA, A.; MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; REYES-DÍAZ, M.; KHAN, A.; PANFILOVA, O.; SEGUEL FUENTEALBA, A.; ROMERO, S. M.; NABIL, B.; WAN, C.; HORVATINEC, J. Salt stress in plants and mitigation approaches. **Plants**, v. 11, n. 6, p. 717, 2022. DOI: 10.3390/plants11060717.

PER, T. S.; KHAN, N. A.; REDDY, P. S.; MASOOD, A.; HASANUZZAMAN, M.; KHAN, M. I. R.; ANJUM, N. A. Approaches in modulating proline metabolism in plants for salt and drought stress tolerance: Phytohormones, mineral nutrients and transgenics. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 115, p. 126–140, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.03.018>.

PEREIRA, R. M.; FERREIRA, C. S. Métodos alternativos no controle do Zabrotes subfaciatus (Bohemann, 1833) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) armazenado. **Revista Agroveterinária do Sul de Minas**, v. 6, n. 1, p. 123-137, 2024. Disponível em: <https://periodicos.unis.edu.br/agrovetsulminas/article/view/890>. Acesso em: 16 ago. 2025.

PETRILLO, E. Do not panic: An intron-centric guide to alternative splicing. **The Plant Cell**, v. 35, n. 6, p. 1752-1761, 2023. DOI: 10.1093/plcell/koad009.

PORTE, T. A.; KLUTHCOUSKI, J.; OLIVEIRA, P. Aspectos fenológicos do feijoeiro comum como ferramenta para tomada de decisões fitotécnicas. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. (org.). **Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. p. 45-63.

QUADROS, L. H. B.; LOBO, L. G. G.; BARBOSA, E. M.; SANTOS, H. L.; SANTOS, D. L.; SOUZA, S. G. H.; SANTOS, T. B. In silico analysis of superoxide dismutase family genes in *Ipomoea trifida* L. **Revista Delos**, v. 16, n. 48, p. 3223-3239, 2023. DOI: 10.55905/rdelosv16.n48-017.

RAI, A. N.; PENNA, S. Molecular evolution of plant P5CS gene involved in proline biosynthesis. **Molecular Biology Reports**, v. 40, p. 6429–6435, 2013. DOI: 10.1007/s11033-013-2757-2

RAMAKERS, C.; RUITER, J. M.; DEKKER, J. M.; HOFF, M. J. B.; MOORMAN, A. F. J. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003. DOI: 10.1016/S0304-3940(02)01423-4.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B. DOS. **Genética na agropecuária**. Lavras: UFLA, 1992.

RODRIGUEZ, M.; RAU, D.; BITOCCHI E.; BELLUCCI E.; BIAGETTI E.; CARBONI A.; GEPTS P.; NANNI L.; PAPA R.; ATTENE G. Landscape genetics, adaptive diversity and population structure in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1781–1794, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13713>.

ROSALES, M. A.; CUELLAR-ORTIZ, S. M.; ARRIETA-MONTIEL, M. P.; ACOSTA-GALLEGOS, J.; COVARRUBIAS, A. A. Physiological traits related to terminal drought resistance in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2012. DOI: 10.1002/jsfa.5761.

SALSE, J.; BARNARD, R. L.; VENEAULT-FOURREY, C.; ROUACHED, H. Strategies for breeding crops for future environments. **Trends in Plant Science**, v. 29, n. 3, p. 303-318, 2024. DOI: 10.1016/j.tplants.2023.08.007.

SANTOS, T. B.; RIBAS, A. F.; SOUZA, S. G. H.; BUDZINSKI, I. G. F.; DOMINGUES, D. S. Physiological responses to drought, salinity, and heat stress in plants: a review.

**Stresses**, v. 2, n. 1, p. 113-135, 2022. DOI: 10.3390/stresses2010009.

SAPAKHOVA, Z.; RAISSOVA, N.; DAUROV, D.; ZHAPAR, K.; DAUROVA, A.; ZHIGAILOV, A.; ZHAMBAKIN, K.; SHAMEKOVA, M. Sweet potato as a key crop for food security under the conditions of global climate change: a review. **Plants**, v. 12, n. 13, p. 2516, 2023. DOI: 10.3390/plants12132516.

SEDLAR, A.; KIDRIČ, M.; ŠUŠTAR-VOZLIČ, J.; PIPAN, B.; ZADRAŽNIK, T.; MEGLIČ, V. Drought stress response in agricultural plants: a case study of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *In: ONDRASEK, G. (ed.). Drought - Detection and Solutions*. London: IntechOpen, 2020. DOI: 10.5772/intechopen.86526.

SELLAMUTHU, G.; TARAFDAR, A.; JASROTA, R. S.; CHAUDHARY, M.; VISHWAKARMA, H.; PADARIA, J. C. Introgression of  $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (PgP5CS) confers enhanced resistance to abiotic stresses in transgenic tobacco. **Transgenic Research**, v. 33, n. 3, p. 131-147, 2024. DOI: 10.1007/s11248-024-00385-x.

SHARMA, S.; VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. K. Role of proline and pyrroline-5-carboxylate metabolism in plant abiotic stress tolerance. **Current Science**, v. 100, n. 6, p. 915–921, 2011. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24076511>. Acesso em: 22 set. 2024.

SIGNORELLI, S.; MONZA, J. Identification of  $\Delta 1$ -pyrroline 5-carboxylate synthase (P5CS) genes involved in the synthesis of proline in *Lotus japonicus*. **Plant Signaling & Behavior**, v. 12, n. 11, p. e1367464, 2017. DOI: 10.1080/15592324.2017.1367464.

SINAGA, A. O. Y.; MARPAUNG, D. S. S. Abiotic stress-induced gene expression in pineapple as a potential genetic marker. **Advanced Agrochem**, 2024. DOI: 10.1016/j.aac.2024.01.005.

SMITH, F. W. Molecular biology of nutrient transporters in plant membranes. *In: RENGEL, Z. (ed.). Mineral Nutrition of Crops*. Boca Raton: CRC Press, 2024. p. 67-89.

SOUZA, P. J. D. O. P. D.; FERREIRA, D. P.; SOUSA, D. D. P.; NUNES, H. G. G. C.; BARBOSA, A. V. C. Trocas gasosas do feijão-caupi cultivado no Nordeste Paraense em resposta à deficiência hídrica forçada durante a fase reprodutiva. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 35, p. 13-22, 2020. DOI: 10.1590/0102-7786351029.

SZABADOS, L.; SAVOURÉ, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends in Plant Science**, v. 15, n. 2, p. 89-97, 2010. DOI: 10.1016/j.tplants.2009.11.009.

TIAN, J.; CHANG, K.; LEI, Y.; LI, S.; WANG, J.; HUANG, C.; ZHONG, F. Genome-wide identification of proline transporter gene family in non-heading Chinese cabbage and functional analysis of BchProT1 under heat stress. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 99, 2023. DOI: 10.3390/ijms25010099.

TIKHOMIROVA, T. S.; KRUTOVSKY, K. V.; SHESTIBRATOV, K. A. Molecular traits

for adaptation to drought and salt stress in birch, oak and poplar species. **Forests**, v. 14, n. 1, p. 7, 2023. DOI: 10.3390/f14010007.

TKEMALADZE, J. Concept to the food security. **Longevity Horizon**, v. 1, n. 1, p. 2-14, 2025. DOI: 10.5281/zenodo.14642407.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 281, p. 87–97, 2009. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0396-4>

VAISHNAV, A.; CHOUDHARY, D. K. Regulation of drought-responsive gene expression in Glycine max L. Merrill is mediated through *Pseudomonas simiae* strain AU. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 37, p. 1341–1355, 2018. DOI: 10.1007/s00344-018-9846-3.

VERSLUES, P. E.; AGARWAL, M.; KATIYAR-AGARWAL, S.; ZHU, J.; ZHU, J. K. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. **Plant Journal**, v. 45, n. 4, p. 523-539, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x

VERSLUES, P. E.; SHARMA, S. Proline metabolism and its implications for plant-environment interaction. **The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists**, v. 8, 2010. DOI: 10.1199/tab.0140.

WANDER, A. E.; SILVA, O. **Estatística da produção**. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, 2023. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/cultivos/feijao/pre-producao/socioeconomia/estatistica-da-producao>. Acesso em: 03 mar. 2024.

WANG, P.; WANG, Z.; GUAN, L.; HAIDER, M. S.; NASIM, M.; YUAN, Y.; LIU, G.; LENG, X. Versatile physiological functions of the nudix hydrolase family in berry development and stress response in grapevine. **Journal of Integrative Agriculture**, v. 21, p. 91–112, 2022. DOI: 10.1016/S2095-3119(20)63490-6.

WANG, Y.; HUAN, Q.; LI, K.; QIAN, W. Single-cell transcriptome atlas of the leaf and root of rice seedlings. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 48, n. 10, p. 881-898, 2021. DOI: 10.1016/j.jgg.2021.06.001.

WEI, C.; CUI, Q.; ZHANG, X.-Q.; ZHAO, Y.-Q.; JIA, G.-X. Three P5CS genes including a novel one from *Lilium regale* play distinct roles in osmotic, drought and salt stress tolerance. **Journal of Plant Biology**, v. 59, p. 456–466, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12374-016-0189-y>.

YANG, D.; NI, R.; YANG, S.; PU, Y.; QIAN, M.; YANG, Y.; YANG, Y. Functional characterization of the *Stipa purpurea* P5CS gene under drought stress conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, p. 9599, 2021b. DOI: 10.3390/ijms22179599.

YANG, G.; WEI, Q.; HUANG, H.; XIA, J. Amino acid transporters in plant cells: a brief

review. **Plants**, v. 9, n. 8, p. 967, 2020. DOI: 10.3390/plants9080967.

YANG, X.; LU, M.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, Z.; CHEN, S. Response mechanism of plants to drought stress. **Horticulturae**, v. 7, p. 50, 2021a. DOI: 10.3390/horticulturae7030050.

YANG, Y.; ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; LIU, B.; LI, W.; ZHANG, J.; ZHANG, X. Genome-wide identification and expression analysis of P5CS gene family in *Stipa purpurea* under abiotic stress. **Genes**, v. 12, n. 9, p. 1412, 2021c. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/genes12091412>

YUAN, D.; WU, X.; JIANG, X.; GONG, B.; GAO, H. Types of membrane transporters and the mechanisms of interaction between them and reactive oxygen species in plants. **Antioxidants**, v. 13, p. 221, 2024. DOI: 10.3390/antiox13020221.

ZHAO, C.; PRATELLI, R.; YU, S.; SHELLEY, B.; COLLAKOVA, E.; PILOT, G. Detailed characterization of the UMAMIT proteins provides insight into their evolution, amino acid transport properties, and role in the plant. **Journal of Experimental Botany**, v. 72, n. 18, p. 6400–6417, 2021. DOI: 10.1093/jxb/erab288.

ZHAO, H.; MA, H.; YU, L.; WANG, X.; ZHAO, J. Genome-wide survey and expression analysis of amino acid transporter gene family in rice (*Oryza sativa* L.). **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49210, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0049210.

ZHOU, H.; JIAO, Q.; ZHAO, M.-D.; LI, F.; TONG, W.; LI, L.; FANG, R.-J.; ZHAO, W.-G.; KIM, H.-J. Cloning and sequence analysis of the  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase gene (MP5CS) from mulberry (*Morus alba*) and patterns of MP5CS gene expression under abiotic stress conditions. **The Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 91, n. 1, p. 100–108, 2016. DOI: 10.1080/14620316.2015.1110999.

ZHOU, H.; SHI, H.; YANG, Y.; FENG, X.; CHEN, X.; XIAO, F.; LIN, H.; GUO, Y. Insights into plant salt stress signaling and tolerance. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 51, n. 1, p. 16–34, 2024. DOI: 10.1016/j.jgg.2023.08.007.

ZHU, X.; CHEN, H.; FAN, Y.; WANG, L.; ZHANG, Y.; LI, Y.; ZHAO, H. Cloning, characterization and expression analysis of  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) gene in harvested papaya (*Carica papaya*) fruit under temperature stress. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 272–279, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.030>.