



**CAROLINE MARCELA DA SILVA DAMBROZ**

**ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CULTIVARES DE FEIJÃO COMUM DESAFIADAS PELA  
RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum* E ANÁLISE  
GENÔMICA AMPLA DA FAMÍLIA DE GENES PvRLK-LRR**

**LAVRAS – MG  
2023**

**CAROLINE MARCELA DA SILVA DAMBROZ**

**ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CULTIVARES DE FEIJÃO  
COMUM DESAFIADAS PELA RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum* E  
ANÁLISE GENÔMICA AMPLA DA FAMÍLIA DE GENES P<sub>v</sub>RLK-LRR**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca  
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Dambroz, Caroline Marcela da Silva.

Análise global da expressão gênica de cultivares de feijão  
comum desafiadas pela raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*  
e análise genômica ampla da família de genes PvRLK-LRR/  
Caroline Marcela da Silva Dambroz. - 2023.

116 p. : il.

Orientador(a): Welison Andrade Pereira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2023.  
Bibliografia.

1. antracnose. 2. feijão- comum. 3. genes diferencialmente  
expressos. I. Pereira, Welison Andrade. II. Título.

**CAROLINE MARCELA DA SILVA DAMBROZ**

**ANÁLISE GLOBAL DA EXPRESSÃO GÊNICA DE CULTIVARES DE FEIJÃO  
COMUM DESAFIADAS PELA RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum* E  
ANÁLISE GENÔMICA AMPLA DA FAMÍLIA DE GENES PvRLK-LRR**

**GLOBAL ANALYSIS OF GENE EXPRESSION OF COMMON BEAN CULTIVARS  
CHALLENGED BY *Colletotrichum lindemuthianum* BREED 65 AND GENE-WIDE  
ANALYSIS OF THE PvRLK-LRR GENE FAMILY**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para a obtenção do título de Doutor.

Aprovado em 28 de Abril de 2023.

Dra. Elaine Aparecida de Souza – UFLA

Dr. Luciano Vilela Paiva – UFLA

Dr. José Cleydson Ferreira da Silva – UW-Florida

Dra. Larissa Carvalho Costa – USDA-APHIS

Prof. Dr. Welison Andrade Pereira  
Orientador

**LAVRAS – MG  
2023**

*A Deus, por Sua presença divina no mais íntimo do meu ser, por ser a luz que ilumina  
meu caminho e a força que me sustenta.*

*Ofereço*

*Aos meus pais, Rita e Marcelino, meu bem mais precioso.  
Ao meu marido, minha fortaleza, Rafael.*

*Com todo meu amor.*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

À Deus, toda honra e toda glória! Agradeço a Ele pelo dom da vida; por ser a força e acalanto nos dias difíceis; pelas oportunidades e pessoas maravilhosas que colocou no meu caminho.

Agradeço aos meus pais, Rita e Marcelino, por fazerem dos meus sonhos, seus sonhos, e por não medirem esforços para a concretização deles. Por serem meu refúgio, meu aconchego, minha calmaria. Amo vocês até o infinito e além!

Ao Rafael, meu marido, meu fiel companheiro, meu amigo, meu amor... Obrigada por ser sempre tão dedicado e paciente, pelos abraços nos momentos difíceis, por todo o amor e carinho a mim dedicado. Você foi essencial para a conclusão de mais esse trabalho. Te amo!

Ao meu companheirinho Sebastião, por aliviar todos os problemas e dificuldades com seu amor incondicional.

À minha cunhada Joyce pela parceria, pelas oportunidades e por me ajudar enxergar o trabalho por um outro ângulo.

Aos meus irmãos, Eder e Choco, minha sogra, Míriam, e familiares, por todo suporte e apoio.

Às minhas amigas Lílian, Stephania, Helene, Júlia, Vanessa, e ao meu amigo Bruno, por sempre terem palavras de incentivo e apoio.

Ao meu professor e orientador, Welison Andrade Pereira, pela oportunidade e confiança. Pelos ensinamentos, pela amizade e por toda ajuda. Por me mostrar como pode ser bonito e empolgante o caminho da docência. Muito obrigada por tudo!

Aos meus colegas de turma, por tornarem o dia a dia mais leve e descontraído. Em especial, à Mariana, Tiago e Rafael, pela cumplicidade, amizade e carinho de sempre!

Às minhas meninas, Fernanda, Luciana e Laís por toda dedicação; por tornarem meus dias de trabalho mais fáceis e divertidos. Vocês são demais, obrigada!

Aos meus parceiros Alexandre e Édson, que tiveram paciência e se dedicaram a me ajudar sempre que preciso. Todas as oportunidades de intercâmbio de conhecimento foram essenciais para mim! Obrigada! Um agradecimento mais que especial à minha também parceira Larissa, uma vez que, sem ela e sua equipe do USDA-APHIS Plant Germplasm Quarantine Program, dificilmente esse trabalho teria sido possível. Larissinha, que Deus te abençoe grandemente e retribua o carinho e dedicação que você tem por todos que a cercam.

A todos os meus colegas de laboratório e grupo de estudos pela parceria.

Aos técnicos do Laboratório de Genética Molecular, Lamarthine e Rafael, meu muito obrigada, por toda ajuda, amizade e conselhos.

A todos os funcionários do DBI pela convivência e auxílio durante o curso.

Ao pessoal do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, em especial ao Miller, que sempre me ajudou no preparo e execução dos experimentos.

Aos professores Elaine A. Souza e Evandro Novaes por todo o conhecimento, boa vontade e dedicação no desenvolvimento dessa tese.

À Universidade Federal de Lavras e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas - PPGMP, pela oportunidade do doutorado.

A todos os professores do PPGMP, pelo conhecimento e experiência a nós oferecidos, seja durante as disciplinas, seja nas bancas de qualificação ou no dia a dia.

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

E, enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para a realização de mais essa conquista em minha vida!

**MUITO OBRIGADA!**

*“Caminhante, não há caminho, o caminho se faz ao caminhar” (Antônio Machado)*



## RESUMO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, é uma das principais doenças que acometem a cultura do feijoeiro, podendo reduzir drasticamente a produção, em condições adequadas ao desenvolvimento do patógeno. Sob a perspectiva do hospedeiro, o controle genético da doença apresenta o envolvimento de vários locos independentes, organizados em conjuntos complexos, conferindo resistência a raças específicas do patógeno. Entretanto, expandir o conhecimento dos genes encontrados nestes locos e entender seu modo de ação nas vias de resposta da planta hospedeira ao patógeno consiste em uma importante estratégia no estudo desse patossistema. Diante do exposto, os objetivos dessa pesquisa consistiram em: i) Obter e avaliar os perfis transcricionais de plantas de feijão, tanto em interação compatível, quanto incompatível com isolado da raça 65 de *C. lindemuthianum*, por meio de RNA-seq, em diferentes tempos de infecção; e ii) Identificar, classificar e caracterizar a família gênica RLK-LRR de *Phaseolus vulgaris*, avaliando também seu perfil de expressão em resposta à infecção por *C. lindemuthianum*, por meio de análises *in silico*. Para atingir o primeiro objetivo, 12 bibliotecas de RNA foram sequenciadas, e foi possível observar um rearranjo transcricional em ambas as cultivares após a infecção com o patógeno. Na resistente, ressalta-se o papel dos genes relacionados ao reconhecimento, como aqueles que codificam proteínas quinases e NB-LRRs; genes relacionados à defesa, como os genes de patogênese MLP; e, genes relacionados com a síntese de novos carboidratos, envolvidos com o remodelamento da parede celular. As vias de sinalização de glicerolípideos, fenilpropanóide e do ácido linoleico foram associadas com a resposta de resistência do genótipo resistente. Por outro lado, no genótipo suscetível, a sinalização mediada por auxina e a expressão de genes relacionados ao processamento e transporte de açúcares tiveram destaque. Pode-se verificar maior conexão entre os genes associados à resistência em redes de co-expressão gênica. Com isso, considerando a especificidade do controle genético da resistência em patossistemas envolvendo diferentes raças, este trabalho apresenta um panorama de resposta à raça 65, tão relevante no cenário econômico de produção da cultura do feijoeiro no Brasil. Quanto ao estudo da família PvRLK-LRR, foi analisado todo o genoma de *P. vulgaris*, permitindo a identificação e classificação de 230 PvRLK-LRRs em 15 subfamílias diferentes. As análises de estruturas gênicas, domínios conservados e motivos foram realizadas e sugeriram uma organização e composição estrutural consistente de proteínas de uma mesma subfamília. Os genes PvRLK-LRR encontraram-se distribuídos entre os 11 cromossomos da espécie, incluindo regiões de proximidade com marcadores de resistência à antracnose. Pode-se notar a importância dos eventos de duplicação na expansão dessa família gênica, resultante, principalmente, de seleção estabilizadora. Também foi realizada a análise das regiões promotoras, que deu destaque aos elementos cis associados à resposta da planta ao estresse biótico. Com relação ao padrão de expressão de PvRLK-LRRs em resposta à infecção por *C. lindemuthianum*, foi possível destacar vários genes diferencialmente expressos nesta subfamília. Nossas análises permitiram profunda caracterização estrutural e funcional do PvRLK-LRRs, e a sua participação direta nos mecanismos de resistência à antracnose.

**Palavras-chave:** Antracnose. Feijão comum. Genes diferencialmente expressos. Resistência.

## ABSTRACT

Anthracnose, caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is one of the main diseases that affect the common bean crop, which can drastically reduce production, under conditions suitable for the development of the pathogen. From the perspective of the host, the genetic control of the disease involves the involvement of several independent loci, organized in complex sets, conferring resistance to specific races of the pathogen. However, expanding the knowledge of the genes found at these loci and understanding their mode of action in the response pathways of the host plant to the pathogen is an important strategy in the study of this pathosystem. In view of the above, the objectives of this research consisted of: i) Obtaining and evaluating the transcriptional profiles of bean plants, both in compatible and incompatible interaction with isolate of race 65 of *C. lindemuthianum*, by means of RNA-seq, in different infection times; and ii) Identify, classify and characterize the RLK-LRR gene family of *Phaseolus vulgaris*, also evaluating its expression profile in response to infection by *C. lindemuthianum*, through in silico analyses. To achieve the first objective, 12 RNA libraries were sequenced, and it was possible to observe a transcriptional rearrangement in both cultivars after infection with the pathogen. In resistant, the role of genes related to recognition is highlighted, such as those that encode protein kinases and NB-LRRs; defense-related genes such as MLP pathogenesis genes; and, genes related to the synthesis of new carbohydrates, involved in cell wall remodeling. Glycerolipid, phenylpropanoid and linoleic acid signaling pathways were associated with the resistance response of the resistant genotype. On the other hand, in the susceptible genotype, auxin-mediated signaling and the expression of genes related to the processing and transport of sugars were highlighted. A greater connection between resistance-associated genes can be seen in gene co-expression networks. Therefore, considering the specificity of the genetic control of resistance in pathosystems involving different races, this work presents an overview of the response to race 65, which is so relevant in the economic scenario of bean crop production in Brazil. As for the study of the PvRLK-LRR family, the entire genome of *P. vulgaris* was analyzed, allowing the identification and classification of 230 PvRLK-LRRs in 15 different subfamilies. Analyses of gene structures, conserved domains and motifs were performed and suggested a consistent structural organization and composition of proteins from the same subfamily. The PvRLK-LRR genes were distributed among the 11 chromosomes of the species, including regions close to anthracnose resistance markers. One can note the importance of duplication events in the expansion of this gene family, mainly resulting from stabilizing selection. An analysis of the promoter regions was also carried out, which highlighted the cis elements associated with the plant's response to biotic stress. Regarding the expression pattern of PvRLK-LRRs in response to *C. lindemuthianum* infection, it was possible to highlight several differentially expressed genes in this subfamily. Our analyzes allowed deep structural and functional characterization of PvRLK-LRRs, and their direct participation in the mechanisms of resistance to anthracnose.

**Keywords:** Anthracnose. Common bean. Differentially expressed genes. Resistance.

## SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	15
2.1 A cultura do feijoeiro.....	15
2.2 Antracnose no feijoeiro .....	16
2.3 Variabilidade patogênica de <i>C. lindemuthianum</i> .....	18
2.3.1 Variabilidade patogênica dentro da raça 65 de <i>C. lindemuthianum</i> .....	20
2.4 Controle genético da resistência a antracnose no feijoeiro.....	22
2.4.1 Controle genético da resistência a antracnose no feijoeiro, raça 65 .....	26
2.5 Genes putativos do feijoeiro à resistência a antracnose.....	27
2.6 Resistência de plantas a patógenos .....	30
2.6.1 Interação molecular planta-patógeno .....	30
2.6.2 Genes R codificando proteínas R.....	31
2.6.2.1 Receptores de membrana - PRR .....	33
2.6.2.2 Receptores intracelular - NBS-LRR .....	34
2.6.3 Mecanismos pré e pós formados.....	35
2.7 Análise de expressão gênica .....	36
2.7.1 Análise de transcrito por RNA-Seq .....	37
2.7.2 RT- qPCR .....	39
3. CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS .....	41
SEGUNDA PARTE - ARTIGOS .....	51
Artigo 1- Comparative transcriptome provides new insights into the common bean response to <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> infection, race 65.....	52
Artigo 2- Genome-wide analysis and characterization of the LRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bean.....	96

## **PRIMEIRA PARTE**

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado um dos maiores produtores mundiais de feijão (CONAB-Companhia Nacional de Abastecimento e Pecuária, 2022). Apesar de seu destaque na produção da cultura, o país apresenta condições climáticas características de regiões tropicais e subtropicais, que favorecem o desenvolvimento de fitopatógenos, causadores de doenças que resultam em danos expressivos na produção, como a antracnose. Causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, a doença afeta a qualidade dos grãos e vagens, e pode causar, sob as condições adequadas ao desenvolvimento do patógeno, perdas de até 100% em lavouras plantadas com cultivares suscetíveis (MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017).

O controle da antracnose pode ser feito de modo integrado, e com caráter preventivo, aliando práticas culturais, químicas e genéticas, sendo esta última, realizada a partir do uso de cultivares resistentes. Destaca-se por ser um método eficiente e econômico, embora desafiador, dada a grande variabilidade de virulência do patógeno, o que torna a resistência uma característica efêmera (RAVA; SARTORATO, 1994). Além da variabilidade identificada em diferentes raças fisiológicas, estudos sugerem alta variabilidade patogênica dentro dos isolados de uma mesma raça. A raça 65, por exemplo, se destaca por ser uma das mais frequentes no Brasil, por sua ampla distribuição, alta patogenicidade, e elevado número de isolados diferentes, o que caracteriza sua variabilidade (COÊLHO et al., 2016; DAVIDE; DE SOUZA, 2009; ISHIKAWA; DE SOUZA; DAVIDE, 2008).

Sabe-se que a resistência do feijoeiro ao *C. lindemuthianum* é predominantemente vertical, sendo descrita pelo modelo gene-a-gene (FLOR, 1971). Neste contexto, mais de 20 locos *Co*, mapeados em 10 de seus cromossomos e de efeitos independentes, já foram identificados em diferentes cultivares (VIDIGAL FILHO et al., 2020). O mapeamento de alguns desses locos revelou a presença de genes independentes e de genes ligados, organizados em conjuntos complexos, conferindo resistência a raças específicas (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013). Em adição ao caráter qualitativo, já foram mapeados alguns locos quantitativos para resistência a antracnose (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MUNGALU et al., 2020; PERSEGUINI et al., 2016; SHI et al., 2011; ZUIDERVEEN et al., 2016).

A especificidade dos locos não se restringe somente a diferentes raças, mas também a isolados de uma mesma raça. Nesse sentido, doze genes independentes, de efeito duplicado, foram relacionados ao controle genético da antracnose para seis isolados da raça 65 (Cl 1614, Cl 1532, Cl 1610, Cl 1740, Lv 134, Lv 238 e Lv 145) (COSTA et al., 2017). Vieira et al. (2018), utilizando marcadores do tipo SCAR, associaram os locos *Co-4*, *Co-5* e *Co-6* à resistência a

essa raça. Costa et al. (2021) identificaram diferentes locos controlando a resistência a diferentes isolados da raça 65 no grupo de ligação Pv04. Além desse cromossomo, estudos de mapeamento associativo identificaram locos de resistência à raça 65 nos cromossomos Pv01, Pv05, Pv10 e Pv11 (COSTA, 2021; OBLESSUC; FRANCISCO; MELOTTO, 2015; VIDIGAL FILHO et al., 2020).

Embora já se tenha informação de vários locos associados à resistência do feijoeiro à antracnose, conhecer os genes presentes nesses locos e seus respectivos modos de ação nas vias de resposta da planta hospedeira ao patógeno torna-se essencial para o entendimento do processo de resistência. Nesse sentido, genes que codificam proteínas quinases (PK) e proteínas com domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NB-LRR) têm sido associadas, por marcadores moleculares, aos locos de resistência a antracnose (BISNETA; GONÇALVES-VIDIGAL, 2020; CHEN et al., 2017). Proteínas dessas duas classes, PK e NB-LRR, são caracterizadas por atuarem, respectivamente, no reconhecimento de padrões moleculares e de efetores dos patógenos, dando início à sinalização que precede uma série de mecanismos de defesa que irão agir em prol da planta (ANDERSEN et al., 2018).

A validação de genes putativos *in vivo* é de extrema importância, uma vez que elucidada os mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência/suscetibilidade do patossistema feijoeiro-antracnose. Com essa finalidade, estudos transcricionais têm sido desenvolvidos para diferentes raças de *C. lindemuthianum*. Borges et al. (2012), Oblessuc et al. (2012), Padder et al. (2016), desvendaram perfis transcricionais da planta em resposta a raça 73. Alvarez-Diaz et al. (2022) realizaram análise de amplo espectro para as raças 100 e C531. Fontenelle et al. (2017) concentraram esforços em estudos sobre a raça 89. Silva et al. (2021) deram início aos estudos de expressão gênica para a raça 65, avaliando o padrão de dez genes previamente relatados na literatura para outras raças.

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com os seguintes objetivos: i) Obter e avaliar, em diferentes tempos de infecção, os perfis transcricionais de plantas de feijão em interação compatível e incompatível com a raça 65 de *C. lindemuthianum*, por meio de RNA-seq; e ii) Identificar, classificar, e caracterizar a família gênica RLK-LRR de *P. Vulgaris*, avaliando também seu perfil de expressão em resposta à infecção por *C. lindemuthianum*.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 A cultura do feijoeiro

O feijão-comum (*Phaseolus vulgaris* L.) consiste em um dos principais alimentos consumidos em todo mundo, sobretudo em países em desenvolvimento da América do Sul, América Central e Sudoeste da África. Tal consumo pode ser associado ao fato do feijão ser um alimento que não requer processamento industrial, e por seus grãos fornecerem boas quantidades de proteínas e carboidratos, além de minerais, fibras, tiamina, folato e fitoquímicos, com propriedades analgésicas e neuroprotetoras (BLAIR et al., 2013; CASTRO-GUERREIRO et al., 2016; DE RON et al., 2016; JHA et al., 2015).

A domesticação da cultura aconteceu há aproximadamente 8.000 anos no México Central e América do Sul, independentemente. Esses eventos individuais culminaram em dois grandes pools gênicos resultantes de dois centros de origem, o Mesoamericano, que se estendia do Norte do México à Colômbia, e o Andino, propagado principalmente do Peru à Argentina. Há cerca de 500 anos, o feijão de ambos os pools gênicos, foi trazido aos países Íbero-americanos e, em seguida, distribuído aos outros continentes (GEPTS, 1998; RODRIGUEZ et al., 2016; SANTALLA; DE RON; DE LA FUENTE, 2010).

No Brasil, além da importância nutricional, a cultura do feijoeiro apresenta também importância socioeconômica. Historicamente, a espécie era cultivada por um vasto contingente de pequenos produtores, com o foco em agricultura de subsistência. Com o passar dos anos e com o crescimento tecnológico, passou a ser interessante também para grandes produtores, sendo atualmente um pilar crítico da economia do país (CARNEIRO; PAULA JÚNIOR; BORÉM, 2015; GANASCINI et al., 2019).

Atualmente, o Brasil se destaca por ser um dos maiores produtores mundiais de feijão, com estimativa de produção de cerca de 3.046,8 mil toneladas em uma área de 2.854,9 mil hectares no período de 2021/2022 (CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento e Pecuária, 2022). A cultura está presente em praticamente todos os Estados brasileiros, sendo o Paraná, Minas Gerais, Goiás, Bahia e São Paulo, os maiores produtores (em mil toneladas), respondendo por 68,7 % do total produzido no país (LSPA/IBGE- Levantamento sistemático da produção agrícola: Prognóstico da produção agrícola, 2020). Embora o Brasil tenha lugar de destaque na produção dessa leguminosa, o país ainda depende de importação para suprir sua demanda interna de consumo, principalmente de feijão preto comum. Essa importação é feita a partir de países como Argentina, China e Bolívia (GANASCINI et al., 2019).

O ciclo de desenvolvimento curto do feijão, assim como a demanda contínua que essa leguminosa possui no hábito alimentar da população brasileira, viabilizam o seu cultivo em três safras ao longo do ano, com três épocas distintas de plantio. A primeira, popularmente conhecida como “safra das águas”, tem sua janela de semeadura entre os meses de agosto a dezembro; na segunda, denominada “safra da seca”, os grãos podem ser semeados entre janeiro e abril, dependendo da região; e a terceira, correspondente à “safra de inverno”, tem o seu plantio entre os meses de maio a julho (CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento e Pecuária, 2022). Nesta última safra, por tratar-se de uma época de precipitação desfavorável, faz-se necessário o uso de irrigação. Tal prática, aliada às tecnologias avançadas e ao uso de sementes de cultivares melhoradas, têm possibilitado a obtenção dos maiores índices de produtividade do país, principalmente na região do Cerrado Brasileiro (SILVA; WANDER, 2013).

Como exposto, o feijoeiro pode ser cultivado durante o ano inteiro, sob diferentes sistemas de produção e por todo o território brasileiro, por sua vez, caracterizado por ampla diversidade de ecossistemas. Sendo assim, é natural que a cultura seja exposta a diversos fatores que causam instabilidade à sua produção, incluindo a ocorrência de doenças fúngicas (CARNEIRO; JÚNIOR; BORÉM, 2015; GOUVEIA et al., 2017; KARAVIDAS et al., 2022). Dessa forma, torna-se imprescindível o investimento em pesquisas que contribuam para prevenção e tratamento, visando evitar perdas no cultivo desse grão.

## **2.2 Antracnose no feijoeiro**

A antracnose é uma doença economicamente relevante para a cultura do feijoeiro, visto que pode levar à depreciação do produto final, e até mesmo, a perdas significativas da lavoura, quando combinadas sementes contaminadas para o plantio, genótipos suscetíveis, e condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017). Essas condições, por sua vez, incluem alta umidade (92-100%) e temperaturas amenas, variando de 18 a 22°C (KIMATI et al., 1997).

Devido ao seu caráter cosmopolita, a doença pode ser observada em praticamente todas as regiões onde o feijoeiro seja cultivado. Sobretudo, maiores índices de ocorrência são relatados em regiões tropicais e subtropicais da América Latina, África Central e Oriental, muito em função das condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento (MIKLAS et al., 2006). No Brasil, a antracnose ocorre na maioria dos Estados produtores, prevalecendo em Minas Gerais, Paraná, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (VIERA, 2005). Embora



o patógeno tenha o potencial de infectar a lavoura durante as três épocas de cultivo, estudos de análise temporal mostram maior ocorrência na safra das águas, pela formação de um microclima favorável (LOBO-JUNIOR, 2014).

O patógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib, agente etiológico da doença, é caracterizado por ser um fungo hemibiotrófico intracelular, que se reproduz assexuadamente, produzindo conídios hialinos, unicelulares e cilíndricos (KIMATI et al., 1997). O processo infeccioso inicia-se a partir da aderência e germinação dos conídios na superfície da planta. A germinação inicia-se com a emissão de um tubo germinativo que, posteriormente, diferencia-se em apressório. Destas estruturas, exteriorizam-se as hifas de penetração, as quais conduzem a invasão direta da cutícula e epiderme (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985) e após a invasão das hifas primárias, as células penetradas se mantêm, inicialmente, vivas. Nesse período, também conhecido como fase biotrófica, a membrana plasmática e o protoplasma da célula vegetal se expandem e invaginam em torno da vesícula infectiva e da hifa. Na medida em que as hifas do patógeno se ramificam intra e extracelularmente nos tecidos do hospedeiro, a membrana plasmática perde a integridade, ocorrendo o rompimento das células vegetais, caracterizando-se, assim, a fase necrotrófica (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Células necróticas aparecem em folhas de feijão 72-96 horas após a infecção quando em interação compatível com a raça do fungo (OBLESSUC et al., 2012; SKIPP; DEVERALL, 1972). Nessa última fase, os sintomas macroscópicos da doença começam a ser visualizados.

Os sintomas podem aparecer em todos os estádios de crescimento da planta, podendo ser observados, em geral, a partir do sexto dia após a infecção, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes (CHAVES, 1980). Os primeiros sinais da infecção aparecem na superfície inferior das folhas, ao longo das nervuras, com coloração variando do vermelho-alaranjado à púrpura, espalhando-se, posteriormente, para a superfície superior. No pecíolo e nas vagens é comum o desenvolvimento de lesões na forma de cancrios, de tamanhos variados, delimitadas por um anel preto, com borda laranja-avermelhada (MOHAMMED, 2013; PAULA JÚNIOR; ZAMBOLIN, 2006). A partir das vagens, o fungo pode atingir os cotilédones e o tegumento da semente em desenvolvimento. As sementes infectadas caracterizam-se, frequentemente, por serem descoloridas e com lesões na forma de cancrios (MOHAN; BIANCHINI; MENEZES, 1989).

Duas fontes principais caracterizam os mecanismos de propagação da doença. A fonte primária de inóculo, do ponto de vista epidemiológico, consiste nas sementes contaminadas. Essas são responsáveis pela disseminação a longas distâncias, podendo o fungo sobreviver entre

safras por meio de micélio dormente, no interior do tegumento de sementes, ou ser transportado por regiões ou países diferentes. Já a fonte secundária caracteriza a propagação da doença a curtas distâncias, a partir da disseminação de esporos por respingo de chuva, insetos, animais, ação humana, ou por implementos agrícolas que entram em contato com plantas infectadas (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; PADDER et al., 2017; RAVA; SARTORATO, 1994).

O controle da doença deve ser feito de modo preventivo e integrado, aliando controle químico, como a aplicação de fungicidas, boas práticas culturais, como rotação e eliminação de restos de cultura, e controle genético, a partir do uso de cultivares resistentes. A utilização de fungicidas, como controle químico, por sua vez, encarece a produção, além de ser nocivo à saúde e ao meio ambiente. O uso de cultivares resistentes consiste em um método eficiente, por ser econômico e seguro. Entretanto, a complexidade que envolve a variabilidade patogênica desses fungos dificulta tanto a obtenção quanto a duração de tais cultivares na condição de resistência (MOHAMMED, 2013; PADDER et al., 2017; RAVA; SARTORATO, 1994).

### **2.3 Variabilidade patogênica de *C. lindemuthianum***

O fungo *C. lindemuthianum* apresenta ampla variabilidade genética e patogênica, o que implica em sua capacidade de causar doença em diferentes cultivares. Essa variabilidade reflete as diferentes raças fisiológicas do patógeno (PADDER et al., 2017).

Barrus (1911) realizou o primeiro estudo a respeito dessa variabilidade. Na ocasião, ele observou o comportamento diferencial de cultivares de feijão quando inoculadas com dois isolados provenientes de diferentes regiões produtoras, posteriormente, denominados como alfa e beta. A partir de então, várias raças patogênicas começaram a ser relatadas, independentemente, em todo mundo, sendo classificadas por códigos locais, dificultando por muito tempo a troca de informações (MELOTTO; KELLY, 2000).

Para facilitar o intercâmbio de informações e permitir a comparação dos resultados de estudos realizados por diferentes pesquisadores, foi proposta por Pastor-Corrales (1991), e aprovada na Primeira Reunião Latino-Americana da Antracnose do Feijoeiro, realizada no CIAT (Cali, Colômbia), uma metodologia padronizada para classificar as raças do patógeno quanto à sua virulência, a qual é utilizada até os dias atuais. A classificação se dá pela aplicação de um sistema binário (HABGOOD, 1970), sob um conjunto de 12 cultivares diferenciadoras de feijão, que inclui representantes do pool gênico mesoamericano e andino (TABELA 1), de modo que a designação de uma raça seja obtida pela soma dos valores numéricos de cada cultivar diferenciadora que é suscetível a essa raça (RAVA; PURCHIO; SARTORATO, 1994).

Por exemplo, a raça 65 é assim designada por sua reação de virulência às cultivares Michelite e México, que apresentam o sistema binário  $2^0$  e  $2^6$ , respectivamente.

Tabela 1- Cultivares, principal alelo de resistência, sistema binário e valor de cada cultivar utilizada na identificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. MA, corresponde ao pool gênico Mesoamericano e A, ao Andino.

Cultivares em ordem de utilização	Pool gênico	Alelos de Resistência	Sistema Binário	Nome (Número) da Raça
Michelite	MA	Co-11	$2^0$	1
Dark Red Kidney	A	Co-1	$2^1$	2
Perry Marrow	A	Co-1 <sup>3</sup>	$2^2$	4
Cornell 49-242	MA	Co-2	$2^3$	8
Widusa	A	Co-1 <sup>5</sup>	$2^4$	16
Kaboon	A	Co-1 <sup>2</sup>	$2^5$	32
México	MA	Co-3	$2^6$	64
PI 207262	MA	Co-4 <sup>3</sup> , Co-9/Co-3 <sup>3</sup>	$2^7$	128
TO	MA	Co-4	$2^8$	256
TU	MA	Co-5	$2^9$	512
AB 136	MA	Co-6, co-8	$2^{10}$	1024
G 2333	MA	Co-4 <sup>2</sup> , Co-5 <sup>2</sup> , Co-7/Co-3 <sup>5</sup>	$2^{11}$	2048

Fonte: Adaptado de CIAT (1990).

Ainda utilizando o conjunto de cultivares diferenciadoras é possível calcular o índice de resistência para cada uma das cultivares e o índice de virulência para cada raça identificada, expressos em porcentagem (VIDIGAL FILHO et al., 2007), pelas seguintes fórmulas:

$$RI = \frac{R \times 100}{T}$$

Onde:

RI= índice de resistência;

R= número total de raças que cada cultivar diferencial foi resistente;

T= número total de raças avaliadas.

$$VI = \frac{S \times 100}{C}$$

Onde:

VI= índice de virulência;

S= número total de cultivares diferenciadoras que foram suscetível a raça avaliada;

C= número total de cultivares diferenciadoras.

Como exemplo, toma-se a raça 2. Essa raça supera a resistência somente da cultivar Michigan Dark Red Kidney. Portanto, seu índice de virulência é 8,3% ( $VI= 1 \times 100 / 12$ ) (PAULINO et al., 2021).

Diversos estudos sobre levantamento de raças vêm sendo realizados desde então. Atualmente, já foram identificadas 182 raças em todo o mundo a partir da inoculação de 1.590 isolados de *C. lindemuthianum* nas cultivares diferenciadoras (PADDER et al., 2017). No Brasil, já foram identificadas cerca de 89 raças (PAULINO et al., 2021), e estudos de levantamento nas regiões produtoras de feijoeiro demonstram que as raças 65, 73, 81 e 89 têm sido as mais frequentes (SILVA; DE SOUZA; ISHIKAWA, 2007; FERREIRA et al., 2008; PINTO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2016). A raça 65 apresenta ampla distribuição, estabilidade e variabilidade patogênica.

A variabilidade existente pode ser explicada tanto por mecanismos que criam variabilidade, como mutação, quanto por mecanismos que ampliam a variabilidade, como recombinação sexual, heterocariose, parassexualidade, elementos transponíveis, fatores citoplasmáticos, polimorfismo cromossômico, anastomose entre hifas e anastomose entre conídios (RAVA; SARTORATO, 1994). A partir destes fenômenos genéticos, surgem novas combinações alélicas nas populações, as quais sofrem seleção e dispersão com migrações de indivíduos de um local ao outro.

### **2.3.1 Variabilidade patogênica dentro da raça 65 de *C. lindemuthianum***

Além da variabilidade identificada em diferentes raças fisiológicas, estudos sugerem alta variabilidade patogênica dentro dos isolados de uma mesma raça (PADDER et al., 2017). No Brasil, a raça 65 destaca-se nesse aspecto (COELHO et al., 2016; DAVIDE; DE SOUZA, 2009; RIBEIRO et al., 2016; VIDIGAL FILHO et al., 2020), e devido à sua importância e ampla distribuição, tem sido foco de pesquisa em programas de melhoramento com o objetivo de monitorar a antracnose.

A variabilidade patogênica entre isolados de uma mesma raça foi observada em diferentes estudos ao longo do tempo. Rodriguez-Suarez et al. (2005) verificaram que alguns isolados da raça 65, coletados no Brasil, eram mais virulentos quando inoculados nas linhagens AB321 e A493, tomando por referência outros isolados da mesma raça, pertencentes à micoteca da Michigan State University, EUA. Davide e Souza (2009), inoculando seis diferentes isolados

da raça 65 em sete cultivares comerciais de feijão, observaram que houve diferença significativa na agressividade dos isolados utilizados.

Nesse sentido, os estudos de Gonçalves-Vidigal e Kelly (2006) e Alzate-Marin et al. (2007) demonstraram o comportamento diferencial da cultivar BAT93 diante da inoculação com dois isolados da raça 65, sendo resistente a um e suscetível a outro, indicando que diferenças dentro da raça não podem ser detectadas com eficiência pelo conjunto internacional de cultivares diferenciadoras atual. E isso ocorre porque, embora eficiente e de muita utilidade, o conjunto de cultivares diferenciadoras utilizadas no sistema atual de determinação de raças, não representa todos os alelos de resistência a antracnose do hospedeiro, impossibilitando a identificação da real variabilidade patogênica entre isolados de *C. lindemuthianum* (DAVIDE; SOUZA, 2009; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; RODRIGUEZ-SUAREZ et al., 2005).

Para uma cultivar de feijão ser descrita como resistente a uma determinada raça de *C. lindemuthianum*, espera-se que ela seja resistente ao maior número de isolados pertencentes a esta raça. Caso contrário, isso poderá comprometer a credibilidade dos programas de melhoramento, além de gerar prejuízos econômicos (ISHIKAWA; RAMALHO; SOUZA, 2011; SOUZA; CAMARGO; PINTO, 2010). Para auxiliar nessa distinção, foi proposto por Ishikawa; Ramalho e Souza (2011) um novo conjunto de cultivares diferenciadoras, capaz de discriminar a variabilidade existente dentro da raça 65 (TABELA 2). Esse conjunto pode ser utilizado de modo complementar ao conjunto internacional de cultivares diferenciadoras proposto por Pastor-Corrales (1991), permitindo uma melhor caracterização da raça.

Tabela 2- Cultivares e sistema binário, pertencentes ao conjunto de cultivares diferenciadoras para detectar variabilidade existente dentro da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

<b>Cultivares</b>	<b>Sistema binário</b>
BRS Estilo	2 <sup>0</sup>
Majestoso	2 <sup>1</sup>
Supremo	2 <sup>2</sup>
União	2 <sup>3</sup>
Valente	2 <sup>4</sup>
Ouro Vermelho	2 <sup>5</sup>
Madrepérola	2 <sup>6</sup>
Talismã	2 <sup>7</sup>

Fonte: Conjunto proposto por Ishikawa; Ramalho; Souza, 2011.

A classificação das raças por meio deste novo conjunto de cultivares é feita de modo semelhante ao sistema internacional de classificação de raças, adicionando aos valores numéricos de cada cultivar suscetível a designação feita de acordo com a nomenclatura da raça. Por exemplo, o isolado Lv 117, foi classificado como raça 65.9, pois causou reação de suscetibilidade nas cultivares Estilo e União ( $2^0$  e  $2^3=9$ ). Conhecer e entender sobre a variabilidade entre e dentro raças é crucial para o entendimento das relações evolutivas do patossistema, assim como, para o desenvolvimento de cultivares resistentes em programas de melhoramento.

## 2.4 Controle genético da resistência a antracnose no feijoeiro

A resistência do feijoeiro a antracnose é predominantemente qualitativa, descrita pelo modelo gene-a-gene (FLOR, 1971), o qual propõe especificidade dos genes de resistência do hospedeiro às raças do patógeno. Os fenótipos, por esse tipo de resistência, apresentam suas reações claramente diferenciadas (CAMPA et al., 2014; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013).

O primeiro estudo sobre a herança da resistência do feijoeiro à *C. lindemuthianum* foi realizado em 1918 por Bulkholder e permitiu, a partir de análises genéticas clássicas, a identificação do alelo dominante *Co-1*, na cultivar White Marrow, resistente à raça Alpha. A partir de então, diferentes locos multi-alélicos, chamados *Co*, de efeitos independentes, têm sido identificados e relacionados a esse patossistema.

Até o momento 23 locos independentes *Co* já foram identificados em diferentes cultivares. Estudos recentes mapearam estes locos em todos os 11 cromossomos do feijoeiro (MEZIADI et al., 2016; PERSEGUINI et al., 2016; VIDIGAL FILHO et al., 2020; ZUIDERVEEN et al., 2016). As informações a respeito destes locos, como localização, cultivar e origem, são mostrados na Tabela 3. Com exceção do alelo *co-8* (ALZATE-MARIN et al., 1997), o alelo dominante é descrito como responsável pela resistência para todos os outros locos (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013).

Alelismo múltiplo foi identificado nos locos *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* e *Co-5*. O loco *Co-1* apresenta série alélica formada por seis alelos, sendo eles, *Co-1<sup>2</sup>*, *Co-1<sup>3</sup>*, *Co-1<sup>4</sup>*, *Co-1<sup>5</sup>*, *Co-1<sup>HY</sup>* e *Co-1<sup>65-X</sup>* (ALZATE-MARIN et al., 2003; CHEN et al., 2017; GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY, 2006; MELOTTO; KELLY, 2000; MURUBE; CAMPA; FERREIRA, 2019). Já o loco *Co-3* possui o alelo *Co-3<sup>2</sup>* (FOUILLOUX, 1979). Os locos *Co-7*, *Co-9* e *Co-10*, por sua vez, foram renomeados como alelos *Co-3<sup>5</sup>*, *Co-3<sup>3</sup>* e *Co-3<sup>4</sup>*, respectivamente, do loco *Co-3* (LIMA; DOS SANTOS; RAMALHO, 2008; GEFFROY et al., 2008; VALENTINI et al.,

2017). O loco *Co-4* apresenta dois alelos, o *Co-4*<sup>2</sup> (YOUNG et al., 1998) e o *Co-4*<sup>3</sup> (ALZATE-MARIN et al., 2007). O loco *Co-5* apresenta o alelo *Co-5*<sup>2</sup> (VALLEJO; KELLY, 2009).

O mapeamento de alguns desses locos revelou que eles estão organizados em conjuntos complexos, onde se encontram intimamente ligados, conferindo resistência a raças específicas (FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; VALLEJO; KELLY, 2009). Os locos *Co-1*, *Co-x*, *Co-w*, *Co-14*, *Co-Pa*, *Co-AC* e *CoPv01*<sup>CDKR</sup> (DE LIMA CASTRO et al., 2017; GEFFROY et al., 2008; GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2012; NANAMI et al., 2017; VIDIGAL FILHO et al., 2020) estão associados no grupo de ligação Pv01, sendo a maioria destes, mapeada na porção final do cromossomo, formando o Cluster 1.1 (BISNETA; GONÇALVES-VIDIGAL, 2020). Outros grupos de ligação são conhecidos no Pv02, abrigando os locos *Co-u* e *CoPv02C*<sup>x</sup> (CAMPA et al., 2014; GEFFROY et al., 2008); no Pv03, os locos *Co-13* e *Co-17* (DE LIMA CASTRO et al., 2017; LACANALLO; GONÇALVES-VIDIGAL, 2015); já no Pv04, encontra-se um importante cluster de resistência a antracnose, reunindo o loco *Co-03* e seus alelos, além dos locos *Co-y*, *Co-z*, *Co-15* e *Co-16* (COIMBRA-GONÇALVES et al., 2016; GEFFROY et al., 1999; SOUSA et al., 2015). No Pv07, encontram-se os locos *Co-5*, *Co-6* e *Co-v*, e no Pv11, o loco *Co-2* (CAMPA; TRABANCO; FERREIRA, 2017). O mapeamento fino do loco *Co-4* (COK-4) mostrou que sua organização contém 18 cópias suas em um segmento de 325 kb do Pv08 (OBLESSUC; FRANCISCO; MELOTTO, 2015).

Apesar da resistência a antracnose ser tipicamente qualitativa, alguns locos quantitativos (*Quantitative Trait Loci*- QTLs), conferindo resistência parcial, também têm sido identificados no patossistema *P. vulgaris* – *C. lindemuthianum* (CHOUDHARY et al., 2018; FERREIRA; CAMPA; KELLY, 2013; MUNGALU et al., 2020; OBLESSUC et al., 2014; PERSEGUINI et al., 2016; ZUIDERVEEN et al., 2016). Ao contrário da resistência qualitativa, a resistência quantitativa ou resistência horizontal, é governada por muitos genes de pequeno efeito, não específicos a raças do patógeno, podendo propiciar, nesses casos, resistência mais duradoura (POLAND et al., 2009). Interações epistáticas envolvendo esses locos quantitativos também já foram relatadas no controle genético do patossistema (GONZÁLEZ et al., 2015), evidenciando que a resistência a antracnose no feijoeiro também envolve relações gênicas mais complexas.

Tabela 3- Locos de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*, cultivar em que o alelo foi identificado, sua localização e respectiva referência.  
CONTINUA.

<b>Loco</b>	<b>Origem</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Referência</b>
<i>Co-1</i>	And	MDRK	Pv01	MCROSTIE, 1919
<i>Co-1</i> <sup>2</sup>	And	Kaboon	Pv01	MELOTTO; KELLY, 2000
<i>Co-1</i> <sup>3</sup>	And	Perry Marrow	Pv01	MELOTTO; KELLY, 2000
<i>Co-1</i> <sup>4</sup>	And	Widusa	Pv01	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2011
<i>Co-1</i> <sup>5</sup>	And	Widusa	Pv01	GONÇALVES-VIDIGAL; KELLY, 2006
<i>Co-1</i> <sup>HY</sup>	And	Hongyundou	Pv01	CHEN et al., 2017
<i>Co-1</i> <sup>65-X</sup>	And	Xana	PV01	MURUMBE, CAMPA; FERREIRA, 2019
<i>Co-2</i>	Mes	Cornel 49-242	Pv11	MASTENBROEK, 1960
<i>Co-3</i>	Mes	México 222	Pv04	BANNEROT, 1965
<i>Co-3</i> <sup>2</sup>	Mes	México 226	Pv04	FOUILLOUX, 1976, 1979
<i>Co-3</i> <sup>3</sup> ( <i>Co-9</i> )	Mes	BAT 93	Pv04	GEFFROY et al. 2008
<i>Co-3</i> <sup>4</sup> ( <i>Co-10</i> )	Mes	Ouro Negro	Pv04	VALENTINI et al., 2017
<i>Co-3</i> <sup>5</sup> ( <i>Co-7</i> )	Mes	G2333	Pv04	LIMA et al., 2008.
<i>Co-4</i>	Mes	TO	Pv08	FOUILLOUX, 1976, 1979
<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Mes	G2333	Pv08	YOUNG et al., 1998
<i>Co-4</i> <sup>3</sup>	Mes	PI 207.262	Pv08	ALZATE-MARIN et al., 2007
<i>Co-5</i>	Mes	TU	Pv07	ALZATE-MARIN et al., 2007
<i>Co-5</i> <sup>2</sup>	Mes	G2333	Pv07	VALLEJO; KELLY, 2009
<i>Co-6</i>	Mes	AB 136	Pv07	KELLY, J.D.; YOUNG, 1996
<i>co-8</i>	Mes	AB 136	ND	ALZATE-MARIN et al., 1997
<i>Co-11</i>	Mes	Michelite	ND	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2007
<i>Co-12</i>	And	Jalo Vermelho	ND	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2008



Tabela 3- Locos de resistência a *Colletotrichum lindemuthianum*, cultivar em que o alelo foi identificado, sua localização e respectiva referência.  
CONCLUSÃO.

	<b>Origem</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Referência</b>
Co-13	And	Jalo Listras Pretas	Pv03	LACANALLO; GONÇALVES-VIDIGAL, 2015
Co-14	And	Pitanga	Pv01	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2012
Co-15	And	Corinthiano	Pv04	SOUSA et al., 2015
Co-16	Mes	Crioulo 159	Pv04	COIMBRA-GONÇALVES et al., 2016
Co- 17	Mes	Paloma	Pv01	CASTRO et al., 2017
Co-u	Mes	BAT 93	Pv02	GEFFROY et al., 2008
Co-v	Mes	BAT 93	Pv07	GEFFROY, 1997
Co-x	And	Jalo EEP 558	Pv01	RICHARD et al., 2014
Co-w	And	Jalo EEP 558	Pv01	GEFFROY et al., 2008
Co-y	And	Jalo EEP 558	Pv04	GEFFROY et al., 1999
Co-z	And	Jalo EEP 558	Pv04	GEFFROY et al., 1999
Co-Pa	And	Paloma	Pv01	DE LIMA CASTRO et al., 2017
Co-AC	And	Amendoin Cavalo	Pv01	NANAMI et al., 2017;
CoPv01 <sup>CDRK</sup>	And	California Dark Red	Pv01	GONÇALVES-VIDIGAL et al., 2020
		Kidney		
CoPv02C <sup>X</sup>	And	Xana	Pv02	CAMPA et al. 2014

And- Andino; Mes- Mesoamericano. ND- informação não disponível.

Fonte: Da autora (2020).

### 2.4.1 Controle genético da resistência a antracnose no feijoeiro, raça 65

A especificidade dos genes de resistência não se limita apenas às raças do patógeno, mas também aos isolados pertencentes a uma mesma raça. Nesse sentido, Costa et al. (2017) encontraram 12 genes de efeitos independentes conferindo resistência a sete isolados (CI 1614, CI 1532, CI 1610, CI 1740, Lv 134, Lv 238 e Lv 145) da raça 65 de *C. lindemuthianum*, sendo dois genes por cepa, sugerindo que o controle da doença para as cepas utilizadas seja decorrente de genes duplicados.

Vieira et al. (2018) realizaram a caracterização fenotípica e molecular de cultivares e linhagens elite de feijoeiro-comum quanto a resistência a antracnose, com o uso de marcadores do tipo SCAR, verificando a especificidade de alguns marcadores com locos de resistência à raça 65 do patógeno, e obtiveram, assim como Sartorato e Alzate-Marin (2004), a associação dos locos *Co-4*, *Co-5* e *Co-6* com a resistência a essa raça. Quanto ao loco *Co-4*, estudos de GWAS reforçam sua associação com a resistência a esta raça, a partir da presença de um marcador mapeado a 775.556 kb de distância da região deste loco, na região telomérica do Pv08 (OBLESSUC; FRANCISCO; MELOTTO, 2015; VIDIGAL FILHO et al., 2020). Locos de resistência putativa para essa raça também foram detectados em regiões genômicas dos cromossomos Pv01, Pv04 e Pv11 (BISNETA et al., 2020; VIDIGAL FILHO et al., 2020).

A análise de ligação usando população F2, derivada do cruzamento BRS Estilo x Ouro Vermelho, revelou dois genes principais em Pv04 associados à resistência a dois isolados da raça 65, o Lv 134 e o Lv 238 (COSTA et al., 2021). Além disso, Costa (2021), a partir do mapeamento de associação, utilizando um painel de 189 acessos de feijão comum do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras, e cinco cepas diferentes da raça 65, também revelaram QTLs principais em diferentes posições do Pv04 e também em Pv01, Pv05, Pv10 e Pv11, indicando que as regiões genômicas que controlam a resistência do feijoeiro ao *C. lindemuthianum*, raça 65, variam de acordo com o isolado.

Estudos de associação genômica ampla (GWAS) têm permitido associar vários genes com os locos de resistência do feijoeiro à antracnose. Estes estudos computacionais a nível de genoma requerem meios de validações que permitam a avaliação dos genes putativos *in vivo* (SILVA et al., 2021). A validação pode acontecer a partir de análises de expressão gênica e de proteínas associadas ao fenótipo final.

## 2.5 Genes putativos do feijoeiro à resistência a antracnose

Bisneta et al. (2020) avaliaram 456 genes candidatos localizados em regiões de 500 kb acima e abaixo dos locos associados com a resistência a antracnose. Desses, 256 genes codificam proteínas com domínios de ligação de nucleotídeos e repetições ricas em leucinas (Nucleotide-binding site and Leucine-rich repeats - NBS-LRR), enquanto o restante (200 genes) codifica proteínas receptoras do tipo quinases (Receptor like-kinase - RLK). Os genes encontrados nos locos variaram de acordo com diferentes cultivares e os locos de resistência que elas carregam. Por exemplo, no cromossomo Pv01, o gene Phvul.001G245300, que codifica uma proteína putativa contendo um zíper de leucina de carga básica (Basic leucine zipper domain - bZIP), encontra-se associado ao loco *Co-1*, localizado na cultivar AND 277. Da mesma forma, oito genes candidatos, que codificam fatores de transcrição do tipo dedo de zinco (zinc finger protein – ZFP) e RLKs, foram associados ao loco *Co-X* na cultivar Jalo EEP558. Associados ao loco *Co-Pa*, estão os genes que codificam fosfolipase-C específica de fosfoinosítídeo (Phosphoinositide-specific phospholipase- C - PI-PLC), proteína serina-treonina quinase (Serine-threonine protein kinase - SKT) e proteína com domínio tirosina quinase (Protein with tyrosine kinase domain - PKT) (BISNETA; GONÇALVES-VIDIGAL, 2020; DE LIMA CASTRO et al., 2017). O mesmo acontece para outros cromossomos. Alguns genes localizados próximos aos locos de resistência por Bisneta e Gonçalves-Vidigal (2020) são mostrados na tabela 4.

Costa et al. (2021) verificaram, com base no genoma de referência do feijoeiro, alguns marcadores de polimorfismos de nucleotídeo único (Single nucleotide polymorphism - SNP) significativos associados à resistência a diferentes isolados da raça 65 de *C. lindemuthianum*, localizados dentro ou próximos a genes candidatos. O SNP ss715649771, identificado como associado à resistência ao isolado Lv 134 de *C. lindemuthianum*, foi localizado dentro de um éxon do gene Phvul.004G001500, que codifica um fator de alongamento. O SNP ss715648093, encontrado no Pv11, associado à resistência ao isolado CI-1532, foi localizado próximo ao gene Phvul.011G200300, que codifica uma proteína hipotética, membro de uma família de proteínas de resistência.

Tabela 4- Cromossomos, locos associados a antracnose encontrados em diferentes cultivares e alguns genes putativos localizados próximos a esses locos. CONTINUA.

<b>Cromossomos</b>	<b>Locos</b>	<b>Genes putativos</b>
Pv01	<i>Co-1</i>	Phvul.001G243700; Phvul.001G243800
	<i>Co-1</i> <sup>3</sup>	Phvul.001G243700; Phvul.001G243800
	<i>Co-1</i> <sup>5</sup>	Phvul.001G243700; Phvul.001G243800
	<i>Co-1</i> <sup>2</sup>	Phvul.001G243700; Phvul.001G243800
	<i>Co-x</i>	Phvul.001G243500; Phvul.001G243600
	<i>Co-1</i> <sup>HY</sup>	Phvul.001G243600; Phvul.001G243700
	<i>Co-AC</i>	Phvul.001G244300; Phvul.001G244500
	<i>CoPv01</i> <sup>CDRK</sup>	Phvul.001G245300, Phvul.001G246800
	<i>Co-1</i> <sup>4</sup>	Phvul.001G243800; Phvul.001G243900
	<i>Co-Pa</i>	Phvul.001G243500; Phvul.001G24530
	<i>Co-1</i> <sup>x</sup>	Phvul.001G243500; Phvul.001G243800
Pv02	<i>CoPv02c</i> <sup>x</sup>	Phvul.002G232700; Phvul.002G238900
	<i>Co-u</i>	Phvul.002G318300; Phvul.002G323000
Pv03	<i>Co-17</i>	Phvul.003G002700; Phvul.003G002600
Pv04	<i>Co-3</i> <sup>M</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-3</i> <sup>W</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-3</i> <sup>k</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-3</i>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-3</i> <sup>3</sup>	Phvul.004G010400; Phvul.004G012900
	<i>Co-3</i> <sup>5</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-3c</i> <sup>x</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-3</i> <sup>1</sup>	Phvul.004G010400; Phvul.004G012900
	<i>Co-3</i> <sup>2</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
<i>Co-3</i> <sup>4</sup>	Phvul.004G028900; Phvul.004G032200	

Tabela 4- Cromossomos, locos associados a antracnose encontrados em diferentes cultivares e genes putativos localizados próximos a esses locos. CONCLUSÃO.

<b>Cromossomos</b>	<b>Locos</b>	<b>Genes putativos</b>
	<i>Co-3</i> <sup>A252</sup>	Phvul.004G006600; Phvul.004G007900
	<i>Co-16</i>	Phvul.004G013300; Phvul.004G015600
	<i>Co-15Co-5</i>	Phvul.004G064800; Phvul.004G073450
Pv07	<i>Co-6</i>	Phvul.007G089301; Phvul.007G167800
	<i>Co-5</i> <sup>2</sup>	Phvul.007G089301; Phvul.007G167800 Phvul.007G074000; Phvul.007G077300 Phvul.007G074000; Phvul.007G077300 Phvul.007G074000; Phvul.007G077300
Pv08	<i>Co-4</i> <sup>3</sup>	Phvul.008G028300; Phvul.008G028400
	<i>Co-4</i>	Phvul.008G028300; Phvul.008G028400
	<i>Co-4</i> <sup>2</sup>	Phvul.008G028300; Phvul.008G028400 Phvul.008G028300; Phvul.008G028400
Pv09	<i>CoPv09c</i> <sup>C</sup>	Phvul.009G180700; Phvul.009G184500
Pv11	<i>Co-2</i>	Phvul.011G195200; Phvul.011G195300
	<i>Co-2</i> <sup>AB136</sup>	Phvul.011G182300; Phvul.011G185500
	<i>Co-2</i> <sup>A252</sup>	Phvul.011G195200; Phvul.011G195300

Fonte: Adaptado de Bisnetta e Gonçalves-Vidigal et al. (2020).

Os genes Phvul.001G128200.1 (Pv01), Phvul.002G166400.1 (Pv03), Phvul.004G135100.1, cluster 8 (Pv04), Phvul.005G020300.1 (Pv05), Phvul.006G066800.1 (Pv06), cluster 17 (Pv10) e clusters 19 e 21 (Pv11), codificam proteínas NBS-LRR, e foram associados a locos de resistência a antracnose por marcadores microssatélites (CHEN et al., 2017).

Apesar do conhecimento estabelecido sobre os locos associados à resistência e de genes putativos mapeados em tais locos do feijoeiro às diferentes raças do patógeno, a validação molecular desses genes e suas respectivas proteínas, ainda se faz necessária de modo a permitir um melhor entendimento das vias de resposta da planta hospedeira ao patógeno. Acredita-se que, com o aumento no número de estudos referentes a expressão diferencial entre cultivares contrastantes, no que se refere à resistência a antracnose, os mecanismos moleculares responsáveis por esta característica sejam cada vez mais elucidados.

## 2.6 Resistência de plantas a patógenos

### 2.6.1 Interação molecular planta-patógeno

As plantas dependem da imunidade inata de cada célula e dos sinais sistêmicos que emanam dos canais de infecção para reconhecer e responder a infecções por patógenos, uma vez que não apresentam células imunológicas móveis e sistema imunológico adaptativo, como os vertebrados (JONES; DANGL, 2006). O sistema imune das plantas, por sua vez, pode ser ativado por dois mecanismos principais. O primeiro utiliza receptores de reconhecimento de padrões transmembranares (Pattern Recognition Receptors - PRRs), que reconhecem e respondem a padrões moleculares associados a microrganismos ou patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns - PAMPs; Microbe-Associated Molecular Patterns - MAMPs). Nesse caso, o reconhecimento ocorre de modo não específico e antes mesmo do patógeno se adentrar na célula, sendo caracterizado assim por ser de amplo espectro (BOUTROT; ZIPFEL, 2017). Outro grupo de receptores compreende as quinases associadas à parede (Wall-associated kinases - WAKs), que atuam na detecção de padrões moleculares associados a danos celulares durante a infecção (Damage-associated molecular pattern- DAMPs) (BOYD et al., 2013). A reação desencadeada por esse reconhecimento é conhecida por imunidade desencadeada por PAMP (PAMP Triggered Immunity - PTI), e ativa uma série de reações, como explosão oxidativa, aumento no fluxo de íons, aumento na expressão de genes, fortalecimento de barreiras físicas e químicas, que impedem o estabelecimento do patógeno (NELSON et al., 2018).

Já o segundo mecanismo do sistema imune das plantas, corresponde ao reconhecimento específico do efector do patógeno por uma proteína de resistência do hospedeiro dentro da célula, levando a uma resposta de hipersensibilidade (JONES; DANGL, 2006). A resposta de hipersensibilidade local pode imunizar plantas contra novas infecções por meio da resistência adquirida (Systemic Acquired Resistance - SAR) mediada pelo acúmulo de ácido salicílico (BALINT-KURTI, 2019). A imunidade desencadeada por efector (Effector-Triggered Immunity - ETI) pode ocorrer em resposta a patógenos que vencem a imunidade desencadeada por PAMP, conseguindo introduzir seus efetores na célula (JONES; DANGL, 2006).

Quanto à ETI, o reconhecimento do efetor por proteínas do hospedeiro é explicado pelo modelo gene-a-gene proposto por Flor (1971), o qual propõe uma relação entre os sistemas gênicos do hospedeiro e do patógeno, de forma que cada gene de reação do hospedeiro, através de um alelo de dominância, interage com um gene de patogenicidade correspondente no patógeno, a partir de seu alelo dominante de avirulência (ANDERSEN et al., 2018; DE WIT, 2002; GOUVEIA et al., 2017). As proteínas de resistência R que atuam nesse ramo do sistema imune apresentam em comum domínios NBS-LRR (GURURANI et al., 2012; WANG; CHAI, 2020). A distinção entre PTI e ETI tem sido uma estratégia útil para explicar o sistema imunológico da planta. No entanto, evidências acumuladas mostram que elas compartilham vários componentes de sinalização e estão interligadas (LU; TSUDA, 2021).

Dessa forma, a interação planta-patógeno consiste em uma relação evolutiva bidirecional, permitindo a seleção de combinações gênicas em ambos os lados. A planta deve ser capaz de reconhecer e se defender de um potencial patógeno, enquanto o patógeno, por sua vez, deve manipular a biologia da planta para criar um ambiente propício ao seu crescimento e reprodução (BOYD et al., 2013; HAN, 2019; TAMBORSKI; KRASILEVA, 2020). O patossistema feijoeiro-antracnose consiste em um ótimo exemplo dessa interação, considerando sua resistência qualitativa típica.

### **2.6.2 Genes de resistência codificando proteínas R**

Nas plantas, os genes R desempenham papel fundamental durante o processo de resposta imunológica, e são expressos na forma de uma gama de proteínas R, capazes de reconhecer grande número de patógenos (KOURELIS; VAN DER HOORN, 2018).

A classificação dessas proteínas em subclasses é realizada com base na presença de diferentes domínios, que permite, em alguns casos, determinar sua localização em células vegetais e o papel que desempenham na transdução de sinais durante a resposta de resistência (GŁOWACKI; MACIOSZEK; KONONOWICZ, 2011). Quanto à classificação, oito classes já são conhecidas e diferenciadas com base na organização de aminoácidos e seus domínios de membrana (BOYD et al., 2013; GURURANI et al., 2012), como mostra a Tabela 5.

As proteínas R podem reconhecer patógenos e desencadear a resistência de plantas a doenças através de nove mecanismos moleculares, sendo eles, (1) percepção direta, (2) ou indireta, nas quais moléculas derivadas de patógenos são identificadas na superfície celular por

proteínas PRR; (3) detecção intracelular direta, (4) ou indireta de moléculas derivadas de patógenos por proteínas NB-LRR; (5) detecção por domínios integrados; (6) percepção de efetores semelhantes a ativadores de transcrição por meio da ativação de genes executores; (7) perda de suscetibilidade ativa; (8) passiva, ou (9) mediada pela reprogramação do hospedeiro (KOURELIS; VAN DER HOORN, 2018).

Tabela 5- Classificação das proteínas R de acordo com seus domínios.

<b>Classe</b>	<b>Domínios</b>
I	NBS- LRR-TIR
II	NBS- LRR- CC
III	LRR- TrD
IV	LRR- TrD- KINASE
V	TrD- CC
VI	LRR- TrD- PEST- ECS
VII	TIR- NBS- LRR- NLS- WRKY
VIII	KINASE KINASE-KINASE HM1

\*LRR- Leucine rich repeats; NBS- Nucleotide-binding site; CC- Coiled coil; TrD- Transmembrane domain; TIR- Toll-Interleukin receptor; NLS- Nuclear localization signal; HM1- Helminthosporium carbonum toxin reductase enzyme; PEST- Protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine); ECS- Endocytosis cell signaling domain; WRKY- Amino acid domain.

Fonte: Da autora (2020).

A resistência a doenças foi relatada por algum tempo como a única função dessas proteínas (DANGL; JONES, 2001; MEYERS; KAUSHIK; NANDETY, 2005). Entretanto, estudos mostram que, além da sua função na percepção dos patógenos na célula, as proteínas R também estão envolvidas na sinalização de importantes cascatas para processos celulares adicionais, tais como tolerância à seca, desenvolvimento, e fotomorfogênese (TAMELING; JOOSTEN, 2007).

As proteínas R explicam interações verticais em diversos patossistemas, incluindo feijoeiro-antracnose. Esse fato estimula os melhoristas e fitopatologistas a investirem cada vez mais em pesquisas que busquem elucidar interações complexas de genes responsáveis por resistência a fitopatógenos (FERNANDES et al., 2009).



### 2.6.2.1 Receptores de superfície - PRR

Os receptores localizados na superfície da célula vegetal podem ser ainda classificados em dois tipos principais, proteínas da superfamília RLK e proteínas semelhantes a receptores (RLP). As RLKs contêm um domínio extracelular N-terminal variável (ECD), um segmento transmembranar (TM) e um domínio quinase citoplasmático conservado (KD), enquanto que proteínas semelhantes a receptor (Receptor-like protein - RLP) possuem estruturas de domínio semelhantes a RLKs, exceto por uma cauda citoplasmática curta em vez de um domínio quinase (LU; TSUDA, 2021; WANG; CHAI, 2020) .

Para RLKs e RLPs, a especificidade de ligação ao ligante é predominantemente determinada por diferentes tipos de ectodomínios (ECD), que incluem domínios de repetição rica em leucina (Leucine rich repeat - LRR) para ligantes proteínáceos, domínios compostos por motivos de lisina (Lysin motif - LysM) para glicanos, domínios de lectina para carboidratos e fatores de crescimento epidérmico (LU; TSUDA, 2021). O domínio ECD permite então a classificação dessas superfamílias em famílias distintas. Essas proteínas atuam formando receptores centrais heteroméricos dinâmicos com co-receptores de maneira dependente de ligante. Por exemplo, receptor quinase 1 associado a bri1/receptor de embriogênese somática quinase 3 (Br1-associated kinase 1 receptor/somatic embryogenesis receptor kinase 3 - BAK1/SERK3) funciona como co-receptor para PRRs do tipo quinases semelhantes a receptores, dotadas de repetições ricas em leucina (RLK-LRR), como a proteína de detecção da flagelina (Flagellin sensing 2 - FLS2) (CHINCHILLA et al., 2007). A formação deste receptor central para o reconhecimento de flagelina resulta na transfosforilação de ambas as proteínas, o que é crucial para mediar a sinalização a jusante (MACHO; ZIPFEL, 2014).

A família RLK-LRR constitui uma das maiores famílias gênicas, dentro das RLKs, tanto do reino animal quanto vegetal (FISCHER et al., 2016). E tal fato pode ser relacionado com a atuação crítica dessas proteínas em diferentes processos biológicos fundamentais, como na transdução de sinal, imunidade inata da célula, crescimento e desenvolvimento, diferenciação e padronização celular, nodulação, e mecanismos de autoincompatibilidade (HE et al., 2018). Identificar, entender e caracterizar famílias gênicas como essa permite, além de esclarecimento de processos de detecção de patógenos, a compreensão da sua história evolutiva (ANDOLFO et al., 2014; WU et al., 2016). Ademais, ao se expandir os estudos nesse contexto, ampliam-se as informações que fornecem base teórica para aplicações práticas, como por

exemplo, a piramidação de diferentes alelos de resistência (NELSON et al., 2018) e otimização do processo de seleção por meio da identificação de novos marcadores ou vias relacionadas à resistência a doenças (FRITSCHÉ-NETO et al., 2019).

### 2.6.2.2 Receptores intracelulares - NBS-LRR

As proteínas NBS-LRR de plantas podem detectar efetores de patógenos secretados no citoplasma do hospedeiro de maneira direta ou indireta, através do monitoramento da homeostase da célula ou através da modificação de proteínas do hospedeiro ocasionada pela presença do efector. O reconhecimento pode levar à transdução de sinais de defesa, que muitas vezes resultam em resposta de hipersensibilidade ou outras alterações bioquímicas que limitam o crescimento dos patógenos (MCHALE et al., 2006).

Estruturalmente, essas proteínas consistem em um domínio LRR variável na região N-terminal, um domínio central de ligação ao nucleotídeo (NB) Apaf1-resistência-CED4 (ARC) e um domínio C-terminal. O domínio central (NB-ARC) é composto por motivos conservados, estritamente ordenados, são necessários para a ligação e hidrólise de ATP e GTP. Já o domínio LRR conhecido por fornecer especificidade de reconhecimento para moléculas efectoras de patógenos (SAGI; DEOKAR; TAR'AN, 2017). Por seu domínio C-terminal, as proteínas NBS-LRR podem ser subdivididas em duas subfamílias, sendo a primeira portadora de um motivo Toll/receptor de interleucina-1 (Toll/interleukin-1 receptor - TIR), e a segunda apresentando o motivo bobina enrolada (Coiled-coil – CC), funcionalmente distinta da primeira (MCHALE et al., 2006).

Quanto a organização, esta família é composta por centenas de genes que se encontram frequentemente agrupados no genoma, como resultado de duplicações segmentares ou *em tandem*. Em *P. vulgaris*, 178 genes NBS-LRR foram identificados e localizados em seus 11 cromossomos, sendo nove genes associados a locos de resistência à antracnose (CHEN et al., 2017).

A coevolução das proteínas relacionadas à resistência em plantas, como as PRR e NBS-LRR, e das proteínas de avirulência do patógeno, constitui um importante evento para estudos moleculares associados à resistência de patossistemas, principalmente porque a compreensão dessas mudanças genéticas e forças seletivas podem levar a estratégias para gerar plantas com resistência mais duradoura a doenças.

### 2.6.3 Mecanismos pré e pós formados

As proteínas envolvidas com o reconhecimento de PAMPs e MAMPs (PRR), de DAMPs (WAKs) e efetores (NB-LRRs) iniciam a sinalização para uma série de mecanismos que vão agir em prol da planta, em sua defesa (ANDERSEN et al., 2018).

Tais mecanismos são classificados como (1) passivos / pré-formados ou (2) ativos / pós-formados. Em ambos os casos, eles são subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os mecanismos estruturais compreendem os mecanismos relacionados à barreira física que a planta apresenta à penetração e/ou colonização dos patógenos. Já os mecanismos bioquímicos se referem a substâncias capazes de inibir ou gerar condições adversas para o desenvolvimento do patógeno (PASCHOLATI; LEITE, 1994).

Os mecanismos pré-formados estruturais abrangem estruturas como cutículas, tricomas, estômatos e vasos condutores. Os mecanismos pré-formados bioquímicos incluem os fenóis, alcaloides glicosídicos, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos e cianogênicos, inibidores proteicos, quitinases e  $\beta$ -1,3-glucanases. Já para as classes dos mecanismos pós-formados, papilas, halos, lignificação, glicoproteínas ricas nos aminoácidos hidroxiprolina (HRGP) e glicina (GRP), camadas de cortiça, camadas de abscisão, e tiloses, são classificados como mecanismos estruturais, enquanto as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies ativas de oxigênio enquadram-se na classe dos mecanismos pós-formados bioquímicos (PASCHOLATI; LEITE, 1994; STANGARLIN et al., 2011).

A reação de hipersensibilidade em plantas é um dos principais eventos de resposta de defesa, que ocorre de forma rápida e localizada no sítio de infecção do patógeno (BALINT-KURTI, 2019). De modo geral, constitui-se na primeira etapa da resposta da planta, sendo seguida pela produção de oxigênio reativo (*Reactive Oxygen Species* - ROS), modificação da parede celular, fechamento de estômatos ou produção de várias proteínas relacionadas à patogênese (PR), destacando-se as peroxidases, quitinases e  $\beta$ -1,3- glucanases (ANDERSEN et al., 2018). Tais reações levam o tecido vegetal ao colapso, principalmente ao redor do sítio de infecção, ocasionado pela liberação de compostos tóxicos, os quais também atuam, em alguns casos, diretamente sobre o patógeno, ocasionando sua morte (FERNANDES et al., 2009).

Em interações com patógenos biotróficos obrigatórios, os quais formam associações haustoriais íntimas com as células hospedeiras, a reação de hipersensibilidade causa a morte celular no sítio de infecção e, conseqüentemente, impedem que estes tenham acesso a

nutrientes, o que poderia leva-los à morte, enquanto que para interações envolvendo patógenos hemibiotróficos ou necrotróficos, o papel dessa resposta ainda não está totalmente esclarecido, visto que estes patógenos podem obter nutrientes a partir de células mortas (BALINT-KURTI, 2019). Portanto, estudos com modelos de interação envolvendo diferentes tipos de patógenos, sejam eles biotróficos, hemibiotróficos ou necrotróficos, versus plantas suscetíveis e resistentes podem contribuir para a elucidação do real mecanismo de defesa de plantas, e suas peculiaridades para cada caso.

## 2.7 Análise de expressão gênica

A expressão gênica consiste no processo pelo qual a informação contida em um gene é transcrita em estruturas intermediárias de diferentes tipos conhecidas como RNA. Uma das classes de RNA transcritas, o RNA mensageiro (mRNA), é posteriormente traduzido em proteínas, as quais vão permitir a expressão de determinado fenótipo. O processo de transcrição, dessa forma, é o início da expressão gênica celular.

Estudos envolvendo a análise do transcrito correspondem à identificação de todos os RNAs expressos em um dado organismo, permitindo a comparação do perfil de expressão gênica em diferentes condições ambientais, estados patológicos, fisiológicos ou de desenvolvimento. As informações adquiridas por esse tipo de análise permitem a identificação de genes e vias moleculares envolvidas em processos biológicos, além da obtenção de marcadores moleculares (YILMAZ et al., 2012).

A análise de expressão gênica acontece utilizando como material genético, DNA complementar (cDNA). Tal molécula é sintetizada a partir de moléculas de mRNA, já processadas após o processo de transcrição, e selecionadas ou a partir de sua cauda poli-A por primers do tipo Oligo-dT, ou a partir da depleção de RNA ribossomal. A enzima *Transcriptase reversa* sintetiza uma fita única de DNA a partir do molde de mRNA, gerando um híbrido complementar de DNA-mRNA. O mRNA do híbrido é posteriormente degradado e uma fita complementar ao DNA sintetizada, permitindo, desse modo, a estabilização da molécula (LOVÉN et al., 2012).

Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para deduzir e quantificar o transcrito. Essas metodologias incluem técnicas baseadas em hibridações ou abordagens baseadas em sequências. As abordagens baseadas em hibridação incluem técnicas como microarranjos, hibridização subtrativa por supressão (Suppression Subtractive Hybridization - SSH), exibição

diferencial (Differential Display - DD), utilização de marcadores em cDNA, como os polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (Amplified Fragment Length Polymorphism – AFLP) e os polimorfismos de DNA amplificados aleatoriamente (Random Amplified Polymorphic DNA – RAPD), pelas técnicas cDNA-AFLP e cDNA-RAPD, respectivamente. Outra importante abordagem baseada em hibridação é a PCR quantitativa em tempo real (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Quantitative Real Time - RT-qPCR) (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009). Para os microarranjos, somente sequências conhecidas podem ser analisadas. A SSH tem a desvantagem de requerer grande quantidade de material biológico. Os métodos DD, cDNA-AFLP e cDNA-RAPD requerem menor quantidade de material biológico, não necessitam de dados prévios da sequência e possibilitam a identificação visual de transcritos diferencialmente expressos (SHI et al., 2011). A RT-qPCR, por sua vez, é uma técnica sensível e de baixo custo, para se quantificar transcritos (SCHEFE et al., 2006). Já as abordagens baseadas em sequências determinam diretamente a sequência de cDNA. Incluem técnicas como análise em série da expressão gênica (SAGE), análise de cap de expressão gênica (CAGE), e sequenciamento de RNA (RNA-Seq). Embora SAGE seja mais comumente utilizada para traçar perfis transcricionais globais, o RNA-Seq oferece maior precisão de níveis de transcrições. Esta última consiste em uma tecnologia estabelecida e, ao mesmo tempo, em ativo desenvolvimento, que vem ganhando espaço nos estudos de expressão gênica diferencial (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

O acúmulo exponencial de sequências gênicas e genomas depositados em bancos de dados públicos mundiais têm aumentado consideravelmente a demanda por metodologias que permitam sua identificação funcional, além da elucidação dos padrões de expressão (SILVA et al., 2021).

### **2.7.1 Análise de transcrito por RNA-Seq**

O transcrito é o conjunto completo de transcritos de uma célula, e sua quantidade e regulação, vão depender da condição fisiológica específica que o organismo apresenta em determinado momento. Essa condição fisiológica, por sua vez, depende da interação com estímulos ambientais, como temperatura, luminosidade, umidade, interação com patógenos, entre outros. O seu entendimento é importante, uma vez que, a análise de bioinformática e interpretação de seus resultados permitem capturar a função dos elementos do genoma, e

também, avaliar os constituintes moleculares das células e tecidos (WANG; GERSTEIN; SNYDER, 2009).

Nos últimos anos, o desenvolvimento de plataformas e protocolos de sequenciamento de última geração (NGS) vêm permitindo o sequenciamento de centenas de milhares de fragmentos DNA, e trouxe uma nova perspectiva para estudos genômicos, de transcrito e de interação DNA-proteína, a partir de diferentes técnicas. Entre elas, o RNA-Seq é caracterizado por sua complexidade, podendo capturar com precisão níveis de expressão de genes, *splicing* alternativos, expressão alelo-específica de transcritos, entre outras aplicações (COSTA et al., 2010).

Para a aplicação da técnica RNA-Seq, o fluxo de trabalho padrão, em geral, inicia-se com a extração de RNA, seguida por um processo de enriquecimento de mRNA ou depleção do RNA ribossomal (rRNA), síntese de cDNA e preparação da biblioteca de sequenciamento com adaptadores. A partir de então, a biblioteca é sequenciada em uma plataforma de alto rendimento. As etapas finais são computacionais e compreendem o alinhamento e/ou montagem dos *reads* de sequenciamento em um transcrito ou genoma de referência, a quantificação dos *reads* mapeados nos genes (ou transcritos), e por último, a filtragem e normalização entre as amostras e modelagem estatística para os testes de expressão diferencial de genes entre diferentes tecidos, fases ontogenéticas ou condições ambientais (STARK; GRZELAK; HADFIELD, 2019).

Para a cultura do feijoeiro, a técnica do RNA-Seq vem sendo empregada na obtenção de expressão diferencial para diferentes características, como por exemplo, desenvolvimento inicial de plântulas em acessos selvagem e domesticados (SINGH; ZHAO; VALLEJOS, 2018), resistência aos nematóides *Meloidogyne spp.* e *Heterodera glycines* Ichinohe (JAIN et al., 2016; SANTOS et al., 2018), estresse da seca em raízes e folhas (RECCHIA et al., 2018; SANTOS et al., 2018), fixação simbiótica de nitrogênio (KAMFWA et al., 2017), eficiência do uso de fósforo (DA SILVA et al., 2019), resistência ao *Fusarium oxysporum* (CHEN et al., 2019), resposta ao ataque de *Tetranychus urticae* (HOSEINZADEH et al., 2020), e resposta de determinados genótipos à salinidade (İLHAN; BÜYÜK; İNAL, 2018).

Quanto a resistência à antracnose, o padrão de expressão diferencial, a partir de RNA-seq, já foi obtido para as raças 73, 100 e C 531 de *C. lindemuthianum* (ALVAREZ-DIAZ et al., 2022; PADDER et al., 2016). Padder et al. (2016) analisaram duas linhas quase isogênicas (NILs) que diferem entre si pela presença do loco *Co-1* no cromossomo Pv01 durante um curso de tempo, incluindo 0, 24, 72 e 96 horas após a infecção (hpi) com a raça 73 de *C.*

*lindemuthianum*. Nesse estudo, foram identificados 3.250 genes diferencialmente expressos (DEGs) dentro e entre os NILs ao longo do tempo de infecção. Vários genes relacionados à defesa, como aqueles que codificam proteínas PR, peroxidases, lipoxigenases foram regulados no NIL resistente. A respeito do loco *Co-1*, genes localizados próximos foram expressos de modo diferente nos tratamentos analisados, sugerindo reprogramação global da expressão gênica dentro e ao redor deste loco (PADDER et al., 2016). Em interação compatível e incompatível com as raças 100 e C531, a linhagem BAT93, que apresenta o loco *Co-9*, foi analisada e caracterizada nos tempos de 48 e 72 hpi. Os resultados destacaram o papel importante dos genes PR da família PR10/Bet vI, bem como uma interação complexa de diferentes vias de hormônios vegetais, incluindo as vias de etileno, ácido salicílico (SA) e ácido jasmônico (ALVAREZ-DIAZ et al., 2022). Os autores sugerem que a diferença entre a reação compatível e incompatível é mais uma questão de tempo e força, do que uma diferença significativa em genes diferencialmente expressos nos dois contextos.

Considerando a importância da raça 65 de *C. lindemuthianum* para a cultura do feijoeiro, assim como a especificidade do controle genético para diferentes raças e isolados, torna-se importante identificar e caracterizar os eventos moleculares que ocorrem durante essa interação patógeno-hospedeiro.

### 2.7.2 RT- qPCR

Kary Mullis desenvolveu a reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) em 1983. A partir de então, diferentes técnicas foram adaptadas, melhoradas e inventadas utilizando-se desse princípio, como por exemplo, a RT- qPCR (YILMAZ et al., 2012). A técnica baseia-se na quantificação do alvo durante o processo de amplificação do material genético. A incorporação de moléculas fluorescentes aos nucleotídeos permite a quantificação absoluta ou relativa do número de cópias de um fragmento de material genético ao longo do progresso dos ciclos de amplificação, durante a cinética da reação (HEID et al., 1996).

De modo geral, uma PCR pode ser dividida em quatro fases: linear, exponencial, log-linear e platô (TICHOPAD et al., 2003). A região alvo do DNA é amplificada através de um processo cíclico de aquecimento e resfriamento (TELLINGHUISEN; SPIESS, 2014). Na medida em que o material genético é amplificado, o nível de fluorescência cresce proporcionalmente, e nesta etapa, a detecção é realizada.

As aplicações da técnica de PCR quantitativa incluem a quantificação de ácidos nucleicos obtidos de células ou tecidos, para comparação da variação do status de infecção, detecção de translocações cromossômicas, genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único e determinação do nível de expressão gênica de amostras (YILMAZ et al., 2012).

Considerando o patossistema feijoeiro-antracnose, a técnica RT-qPCR vem sendo amplamente utilizada para a validação de genes putativos a resistência. Fraire-Velázquez e Lozoya-Gloria (2003) observaram regulação positiva dos genes fenilalanina amônia liase (PAL) e chalcona sintase (CHS) em linhagens resistentes de feijão em interação com a raça 73. Borges et al. (2012) verificaram genes relacionados à patogênese (PR1a, PR1b, PR2, PR16a e PR16b) diferencialmente regulados após a inoculação com a raça 73 do patógeno, com os níveis variando de acordo com o tecido e tempo de inoculação. Fontenelle et al. (2017) verificaram a expressão dos genes da subunidade reguladora da proteína fosfatase PP2A (cla34); proteínas hipotéticas detectadas nas diferentes bibliotecas (cla66, cla76, cl5d127 e cl7d22); cetol-ácido redutoisomerase (cla71); desidrogenase/reductase da família das oxidoredutases (cl3d18a); fitase (cl7d37); ativador transcricional de metalotioneína (cl5d328); fosfatase alcalina (cl5d186); transportador de mio-inositol (cl7d116); glucoamilase (cl7d11); e cutinase (cl7d31), nas fases biotróficas e necrotróficas do fungo após a inoculação, com a raça 89, na planta. Para a raça 65, Silva et al. (2021) observaram maiores níveis de expressão dos genes PR1, FLS2, NPR1, e  $\beta$ -GLUC na cultivar resistente quando comparada a cultivar suscetível.

A técnica apresenta alta precisão para estudos de análise de expressão gênica, e vem sendo usada muitas vezes associadas a outras técnicas, de modo, a permitir a validação dos resultados (KOZERA; RAPACZ, 2013). Com isso, sua utilização torna-se fundamental em estudos acerca da interação planta patógeno em diversos patossistemas.

### 3. CONCLUSÕES

Dado ao exposto, pode se verificar a importância do patógeno para a cultura do feijoeiro, assim como reconhecer os esforços no entendimento do controle genético da resistência do hospedeiro ao *C. lindemuthianum*. Entretanto, ainda se faz necessária a expansão do conhecimento dos genes e vias metabólicas atuantes nesse processo. Este trabalho visou explorar essa vertente, de maneira a fornecer um panorama inicial dos mecanismos moleculares envolvidos com a resistência à raça 65 do patógeno, tão importante para as lavouras de feijão no Brasil.



## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ-DIAZ, J. C. et al. Genome-Wide Transcriptomic Analysis of the Effects of Infection with the Hemibiotrophic Fungus *Colletotrichum lindemuthianum* on Common Bean. **Plants**, v.11, p. 1995, 2022.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Inheritance of anthracnose resistance in common bean differential cultivar AB 136. **Plant Breeding**, v. 81, n. 9, p. 996–998, 1997.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. **Euphytica**, v. 133, n. 2, p. 165–169, 2003.
- ALZATE-MARIN, A. L. et al. Genetic characterization of anthracnose resistance genes *Co-43* and *Co-9* in common bean cultivar tlalnepantla 64 (PI 207262). **Euphytica**, v. 154, n. 1–2, p. 1–8, 2007.
- ANDERSEN, E. J. et al. Disease resistance mechanisms in plants. **Genes**, v. 9, n. 7, p. 339, 2018.
- ANDOLFO, G. et al. Genome-wide identification and analysis of candidate genes for disease resistance in tomato. **Molecular Breeding**, v. 33, n. 1, p. 227–233, 2014.
- BALINT-KURTI, P. The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. **Molecular Plant Pathology**, v. 20, n. 8, p. 1163–1178, 2019.
- BARRUS, M. F. Variation of varieties of bean in their susceptibility to anthracnose. **Phytopathology**, v. 1, n. 6, p. 190–195, 1911.
- BISNETA, M. V.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. Integration of anthracnose resistance loci and RLK and NBS-LRR-encoding genes in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2901–2918, 2020.
- BLAIR, M. W. et al. A legume biofortification quandary: Variability and genetic control of seed coat micronutrient accumulation in common beans. **Frontiers in Plant Science**, v. 4, p. 275, 2013.
- BORGES, A. et al. Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, n. 12, p. 1216–1220, 2012.
- BOUROT, F.; ZIPFEL, C. Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, v. 55, n. 11.1, p. 11–30, 2017.
- BOYD, L. A. et al. Plant-pathogen interactions: Disease resistance in modern agriculture. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 233–240, 2013.

BULKHOLDER, W. H. The production of an anthracnose resistant White Marrow bean. **Phytopathology**, v. 8, p. 353–359, 1918.

CAMPA, A. et al. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **BMC Plant Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–12, 2014.

CAMPA, A.; TRABANCO, N.; FERREIRA, J. J. Identification of clusters that condition resistance to anthracnose in the common bean differential cultivars AB136 and MDRK. **Phytopathology**, v. 107, n. 12, p. 1515–1521, 2017.

CARNEIRO, J. E.; JÚNIOR, T. DE P.; BOREM, A. **Feijão: do plantio à colheita**. Ed. UFV, 2 ed. Viçosa-MG: [s.n.], 2015.

CASTRO-GUERREIRO, N. A. et al. Common Bean: A Legume Model on the Rise for Unraveling Responses and Adaptations to Iron, Zinc, and Phosphate Deficiency. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 600, 2016.

CHAVES, G. La antracnosis. In: . In: SCHWARTZ, H.F. & GÁLVEZ, G.E. **Problemas de producción del frijol: enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris***. [s.l: s.n.]. p. 37–53, 1980.

CHEN, L. et al. Combined de novo transcriptome and metabolome analysis of common bean response to *Fusarium oxysporum* f. Sp. phaseoli infection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, 2019.

CHEN, M. et al. Mapping and genetic structure analysis of the anthracnose resistance locus *Co-1HY* in the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2017.

CHINCHILLA, D. et al. A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 497–500, 2007.

CHOUDHARY, N. et al. Gene/QTL discovery for Anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from North-western Himalayas. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–12, 2018.

COELHO, M. et al. Caracterização da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando sequenciamento das regiões ITS. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 4, p. 429–438, 2016.

COIMBRA-GONÇALVES, G. K. et al. Characterization and mapping of anthracnose resistance gene in mesoamerican common bean cultivar Crioulo 159. **Crop Science**, v. 56, n. 6, p. 2904–2915, 2016.

**CONAB- Companhia Nacional de Abastecimento da safra brasileira: grãos, safra 2021/2022**. Segundo levantamento, 2022. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safra/graos>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

COSTA, L. C. et al. Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

- COSTA, L. C. et al. Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 134, n. 2, p. 543–556, 2021.
- COSTA, V. et al. Uncovering the complexity of transcriptomes with RNA-Seq. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, p. 19, 2010.
- DA SILVA, D. A. et al. Analysis of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) transcriptome regarding efficiency of phosphorus use. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–27, 2019.
- DANGL, J. L.; JONES, J. D. G. Plant pathogens and integrated defence responses to infection *Nature*, v. 411, n. 6839, p. 826–833, 2001.
- DAVIDE, L. M. C.; DE SOUZA, E. A. Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 9, n. 1, p. 23–29, 2009.
- DE LIMA CASTRO, S. A. et al. Genetics and mapping of a new anthracnose resistance locus in Andean common bean Paloma. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2017.
- DE RON, A. M. et al. History of the common bean crop: Its evolution beyond its areas of origin and domestication. **Arbor**, v. 192, n. 779, 2016.
- DE WIT, P. J. G. M. On guard. **Nature**, v. 416, p. 801–803, 2002.
- FERNANDES, C. DE F. et al. Mecanismos de defesa de plantas contra o ataque de agentes fitopatogênicos. **Embrapa Rondonia**, v. 1, p. 14 p., 2009.
- FERREIRA, J. J. et al. Reaction of a bean germplasm collection against five races of *Colletotrichum lindemuthianum* identified in northern Spain and implications for breeding. **Plant Disease**, v. 92, n. 5, p. 705–708, 2008.
- FERREIRA, J. J.; CAMPA, A.; KELLY, J. D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. In: **Translational Genomics for Crop Breeding, Volume I: Biotic Stress**. [s.l: s.n.]. v. Ip. 151–181, 2013.
- FISCHER, I. et al. Evolutionary dynamics of the leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms. **Plant Physiology**, v. 170, n. 3, p. 1595–1610, 2016.
- FLOR, H. H. Current status of the gene-for-gene concept. **Annual Reviews Phytopathology**, v.9, p.275-296, 1971.
- FONTENELLE, M. R. et al. Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. **European Journal of Plant Pathology**, v. 147, n. 3, p. 653–670, 2017.
- FOUILLOUX G. New races of bean anthracnose and consequences on our breeding programs. **International symposium on diseases of tropical food crops. Louvain-la-**

Neuve. **Proceedings**, v.3, p. 221– 235., 1979.

FRAIRE-VELÁZQUEZ, S.; LOZOYA-GLORIA, E. Differential early gene expression in *Phaseolus vulgaris* to Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* in incompatible and compatible interactions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 63, n. 2, p. 79–89, 2003.

FRITSCHÉ-NETO, R. et al. Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 4, p. 321–327, 2019.

GANASCINI, D. et al. Analysis of the Production Chain of Bean Culture in Brazil. **Journal of Agricultural Science**, v. 11, n. 7, p. 256, 2019.

GEFFROY, V. et al. Identification of an ancestral resistance gene cluster involved in the coevolution process between *Phaseolus vulgaris* and its fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 12, n. 9, p. 774–784, 1999.

GEFFROY, V. et al. Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: A case study for mapping two independent genes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 116, n. 3, p. 407–415, 2008.

GEPTS, P. Origin and evolution of common bean: Past events and recent trends. **HortScience**, v. 33, n. 7, p. 1124–1130, 1998.

GŁOWACKI, S.; MACIOSZEK, V. K.; KONONOWICZ, A. K. R proteins as fundamentals of plant innate immunity. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 16, n. 1, p. 1–24, 2011.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. et al. Genetic analysis of anthracnose resistance in “Pitanga” dry bean cultivar. **Plant Breeding**, v. 131, n. 3, p. 423–429, 2012.

GONÇALVES-VIDIGAL, M. C.; KELLY, J. D. Inheritance of anthracnose resistance in the common bean cultivar Widusa. **Euphytica**, v. 151, n. 3, p. 411–419, 2006.

GONZÁLEZ, A. M. et al. Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. **Frontiers in Plant Science**, v. 6, n. 141, p. 13, 2015.

GOUVEIA, B. C. et al. Immune receptors and co-receptors in antiviral innate immunity in plants. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 2139, p. 1–14, 2017.

GURURANI, M. A. et al. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 78, n. October, p. 51–65, 2012.

HABGOOD, R. M. Designation of Physiological Races of Plant Pathogens. **Nature Publishing Group**, v. 228, p. 726–734, 1970.

HAN, G. Z. Origin and evolution of the plant immune system. **New Phytologist**, v. 222, n. 1,

p. 70–83, 2019.

HE, Y. et al. Plant cell surface receptor-mediated signaling - A common theme amid diversity. **Journal of Cell Science**, v. 131, n. 2, 2018.

HEID, C. A. et al. Real time quantitative PCR. **Experimental & molecular medicine**, v. 33, n. 1 Suppl, p. 101–109, 1996.

HOSEINZADEH, A. H. et al. Comparative transcriptome provides molecular insight into defense-associated mechanisms against spider mite in resistant and susceptible common bean cultivars. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. 1–17, 2020.

İLHAN, E.; BÜYÜK, İ.; İNAL, B. Transcriptome – Scale characterization of salt responsive bean TCP transcription factors. **Gene**, v. 642, n. March 2017, p. 64–73, 2018.

ISHIKAWA, F. H.; DE SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belonging to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, v. 63, n. 2, p. 156–161, 2008.

ISHIKAWA F. H.; RAMALHO M. A. P.; SOUZA E. A. Common bean lines as potential differential cultivars for race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Plant Pathology**, v. 93, p. 461-464, 2011.

JAIN, S. et al. Comparative transcriptome analysis of resistant and susceptible common bean genotypes in response to soybean cyst nematode infection. **PLoS ONE**, v. 11, n. 7, p. 1–21, 2016.

JHA, A. B. et al. Genetic diversity of folate profiles in seeds of common bean, lentil, chickpea and pea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 42, p. 134–140, 2015.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. The plant immune system. **Nature**, v. 444, n. 7117, p. 323–329, 2006.

KAMFWA, K. et al. Transcriptome analysis of two recombinant inbred lines of common bean contrasting for symbiotic nitrogen fixation. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–19, 2017.

KARAVIDAS, I. et al. Agronomic Practices to Increase the Yield and Quality of Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.): A Systematic Review. **Agronomy**, v. 12, n. 2, 2022.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia**. 3 ed. ed. [s.l.] São Paulo: Agronômica Ceres, 1997.

KOURELIS, J.; VAN DER HOORN, R. A. L. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. **Plant Cell**, v. 30, n. 2, p. 285–299, 2018.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. **Journal of Applied Genetics**, v. 54, n. 4, p. 391–406, 2013.

LACANALLO, G. F.; GONÇALVES-VIDIGAL, M. C. Mapping of an andean gene for anthracnose resistance (*Co-13*) in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Jalo Listras Pretas landrace. **Australian Journal of Crop Science**, v. 9, n. 5, p. 394–400, 2015.

**LSPA/IBGE- Levantamento sistemático da produção agrícola: Prognóstico da produção agrícola.** Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br>>. Acessado em 28 de Setembro de 2022.

LIMA I. A.; SANTOS J. B.; RAMALHO M. A. P. Are the common bean *Co-3* and *Co-7* resistant alleles to anthracnose the same? **Annual Reports Bean Improving Coop**, v. 51, p. 188–189, 2008.

LOBO-JUNIOR, M. Fitossanidade. In: IN: RAMALHO, M. A. P.; ABREU, A. de F. B.; GUILHERME, S.R. (Ed.). **Informações técnicas para o cultivo do feijoeiro-comum na região central-brasileira: 2015-2017**. [s.l: s.n.]. p. 106–163, 2014.

LOVÉN, J. et al. Revisiting global gene expression analysis. **Cell**, v. 151, n. 3, p. 476–482, 2012.

LU, Y.; TSUDA, K. Intimate Association of PRR- and NLR-Mediated Signaling in Plant Immunity. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, v. 34, n. 1, p. 3–14, 2021.

MACHO, A. P.; ZIPFEL, C. Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. **Molecular Cell**, v. 54, n. 2, p. 263–272, 2014.

MCHALE, L. et al. Plant NBS-LRR proteins: Adaptable guards. **Genome Biology**, v. 7, n. 4, 2006.

MELOTTO, M.; KELLY, J. D. An allelic series at the *Co-1* locus for anthracnose in common bean of Andean origin. **Euphytica**, v. 116, p. 143–149, 2000.

MEYERS, B. C.; KAUSHIK, S.; NANDETY, R. S. Evolving disease resistance genes. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 8, n. 2, p. 129–134, 2005.

MEZIADI, C. et al. Development of molecular markers linked to disease resistance genes in common bean based on whole genome sequence. **Plant Science**, v. 242, p. 351–357, 2016.

MIKLAS, P. N. et al. Common bean breeding for resistance against biotic and abiotic stresses: From classical to MAS breeding. **Euphytica**, v. 147, n. 1–2, p. 105–131, 2006.

MOHAMMED, A. An Overview of Distribution, Biology and the Management of Common Bean Anthracnose. **Journal of Plant Pathology & Microbiology**, v. 04, n. 08, p. 4–9, 2013.

MOHAN, S. K. .; A., B.; MENEZES, J. R. DE. **Doenças do feijoeiro no Estado do Paraná: guia para identificação e controle**. 3. ed. [s.l: s.n.], 1989.

MUNGALU, H. et al. Identification of Race-Specific Quantitative Trait Loci for Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in an Andean Population of Common Bean. **Crop Science**, v. 60, n. 6, p. 2843-2856, 2020.

- MURUBE, E.; CAMPA, A.; FERREIRA, J. J. Integrating genetic and physical positions of the anthracnose resistance genes described in bean chromosomes Pv01 and Pv04. **PLoS ONE**, v. 14, n. 2, p. 1–17, 2019.
- NANAMI, D. S. Y. et al. Characterization of genetic resistance in Andean common bean cultivar Amendoim Cavalo to *Colletotrichum lindemuthianum*. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 3, n. 1, p. 43, 2017.
- NELSON, R. et al. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n. 1, p. 21–33, 2018.
- O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 27, n. 1, p. 75–98, 1985.
- OBLESSUC, P. R. et al. Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.
- OBLESSUC, P. R. et al. Quantitative analysis of race-specific resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. **Molecular Breeding**, v. 34, n. 3, p. 1313–1329, 2014.
- OBLESSUC, P. R.; FRANCISCO, C.; MELOTTO, M. The *Co-4* locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 COK-4 genes and is regulated by immune response in common bean. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 128, n. 6, p. 1193–1208, 2015.
- PADDER, B. A. et al. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. **PLoS ONE**, v. 11, n. 11, p. 1–26, 2016.
- PADDER, B. A. et al. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. **Journal of Plant Pathology**, v. 99, n. 2, p. 317–330, 2017.
- PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Mecanismos bioquímicos de resistência a doenças. In: **Revisão anual de patologia de plantas**. 2. ed. [s.l.] Família, Passo Fundo: Gráfica e Editora Padre Berthier dos Missionários da Sagrada, p. 1–51, , 1994.
- PASTOR-CORRALES, M. A. Estandarización de variedades diferenciales y de designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Phytopathology**, v. 81, p. 694, 1991.
- PAULA JÚNIOR, T.J. ZAMBOLIN, L. Doenças. In: VIEIRA C; PAULA JÚNIOR R; BORÉM A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. [s.l: s.n.]. p. 415–436, 2006.
- PAULINO, P. P. S. et al. Occurrence of anthracnose pathogen races and resistance genes in common bean across 30 years in Brazil. **Agronomy Science and Biotechnology**, v. 8, p. 1–21, 2021.
- PERSEGUINI, J. M. K. C. et al. Genome-Wide Association Studies of Anthracnose and Angular Leaf Spot Resistance in Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–19, 2016.

PINTO, J. M. A. et al. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v. 102, n. 5, p. 490–497, 2012.

POLAND, J. A. et al. Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 14, n. 1, p. 21–29, 2009.

RAVA, C. A.; PURCHIO, A. F.; SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. **Fitopatologia Brasileira**, v. 19, n. 2, p. 167–172, 1994.

RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Antracnose. In: SARTORATO, A.; RAVA, C. A. (Ed.). **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. [s.l: s.n.]. p. 17–39, 1994.

RECCHIA, G. H. et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis leads to differential regulation of drought-responsive genes in tissue-specific root cells of common bean. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. JUN, p. 1–24, 2018.

RIBEIRO, T. et al. Classificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* em cultivares diferenciadoras de feijoeiro comum. **Acta Scientiarum - Agronomy**, v. 38, n. 2, p. 179–184, 2016.

RODRIGUEZ-SUAREZ C; PANEDA A; CAMPA A; FERREIRA JJ; GIRALDEZ. Anthracnose resistance spectra of breeding lines derived from the dry bean landrace Andecha. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative. Bean Improvement Cooperative.**, v. 48, p. 72–73, 2005.

RODRIGUEZ, M. et al. Landscape genetics, adaptive diversity and population structure in *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, v. 209, n. 4, p. 1781–1794, 2016.

SAGI, M. S.; DEOKAR, A. A.; TAR'AN, B. Genetic analysis of NBS-LRR gene family in chickpea and their expression profiles in response to ascochyta blight infection. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. May, p. 1–14, 2017.

SANTALLA, M.; DE RON, A. M.; DE LA FUENTE, M. Integration of genome and phenotypic scanning gives evidence of genetic structure in Mesoamerican common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) landraces from the southwest of Europe. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 120, n. 8, p. 1635–1651, 2010.

SANTOS, J. R. P. et al. QTL mapping and transcriptome analysis of cowpea reveals candidate genes for root-knot nematode resistance. **PLoS ONE**, v. 13, n. 1, p. 1–22, 2018.

SARTORATO, A.-M. AND ALZATE-MARIM, A. L.. Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative.**, v. 47, p. 241–242, 2004.

SCHEFE, J. H. et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: Current concepts and the novel “gene expression’s CT difference” formula. **Journal of Molecular Medicine**, v. 84, n. 11, p. 901–910, 2006.



- SHI, C. et al. Identification of candidate genes associated with CBB resistance in common bean HR45 (*Phaseolus vulgaris* L.) using cDNA-AFLP. **Molecular Biology Reports**, v. 38, n. 1, p. 75–81, 2011.
- SILVA, C. M. DA et al. Differential gene expression in common bean during interaction with race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Tropical Plant Pathology**, n. 46, p. 518–527, 2021.
- SILVA, F. O.; WANDER, A. E. O feijão-comum no Brasil: passado, presente e futuro. **Documentos Embrapa Arroz e Feijão**, v. 287, p. 1–63, 2013.
- SILVA, K. J. D.; DE SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 4, p. 241–247, 2007.
- SINGH, J.; ZHAO, J.; VALLEJOS, C. E. Differential transcriptome patterns associated with early seedling development in a wild and a domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) accession. **Plant Science**, v. 274, p. 153–162, 2018.
- SKIPP, R. A.; DEVERALL, B. J. Relationships between fungal growth and host changes visible by light microscopy during infection of bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) susceptible and resistant to physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v. 2, n. 4, p. 357–374, 1972.
- SOUSA, L. L. et al. Genetic characterization and mapping of anthracnose resistance of common bean landrace cultivar corinthiano. **Crop Science**, v. 55, n. 5, p. 1900–1910, 2015.
- SOUZA, E. A.; CAMARGO, O. A.; PINTO, J. M. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 9, n. 3, p. 1759–1769, 2010.
- STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 10, p. 18–46, 2011.
- STARK, R.; GRZELAK, M.; HADFIELD, J. RNA sequencing: the teenage years. **Nature Reviews Genetics**, v. 20, n. 11, p. 631–656, 2019.
- TAMBORSKI, J.; KRASILEVA, K. V. Evolution of Plant NLRs: From Natural History to Precise Modifications. **Annual Review of Plant Biology**, v. 71, p. 355–378, 2020.
- TAMELING, W. I. L.; JOOSTEN, M. H. A. J. The diverse roles of NB-LRR proteins in plants. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 71, n. 4–6, p. 126–134, 2007.
- TELLINGHUISEN, J.; SPIESS, A. N. Comparing real-time quantitative polymerase chain reaction analysis methods for precision, linearity, and accuracy of estimating amplification efficiency. **Analytical Biochemistry**, v. 449, n. 1, p. 76–82, 2014.
- TICHOPAD, A. et al. Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single

reaction set-up. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 20, p. 2–7, 2003.

VALENTINI, G. et al. High-resolution mapping reveals linkage between genes in common bean cultivar Ouro Negro conferring resistance to the rust, anthracnose, and angular leaf spot diseases. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, n. 8, p. 1705–1722, 2017.

VALLEJO, V.; KELLY, J. D. New Insights into the Anthracnose Resistance of Common Bean Landrace G 2333. **The Open Horticulture Journal**, v. 2, n. 1, p. 29–33, 2009.

VIDIGAL FILHO, P. S. et al. Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, Brazil. **Journal of Phytopathology**, v. 155, n. 2, p. 108–113, 2007.

VIDIGAL FILHO, P. S. et al. Genome-wide association study of resistance to the anthracnose and angular leaf spot diseases in Brazilian Mesoamerican and Andean common bean cultivars. **Crop Science**, v. 12, p. 440–447, 2020.

VIEIRA, A. F. et al. Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. **Genetics and Molecular Research**, v. 17, n. 3, p. 1–10, 2018.

VIERA, C. Melhoramento do feijão. In: BORÉM, A. (Ed.). **Melhoramento de espécies cultivadas**. [s.l.: s.n.]. p. 301–392, 2005.

WANG, J.; CHAI, J. Structural insights into the plant immune receptors PRRs and NLRs. **Plant Physiology**, v. 182, n. 4, p. 1566–1581, 2020.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature reviews | genetics**, v. 10, n. January, p. 57–63, 2009.

WU, Y. et al. Genome-Wide Expression Pattern Analyses of the Arabidopsis Leucine-Rich Repeat Receptor-Like Kinases. **Molecular Plant**, v. 9, n. 2, p. 289–300, 2016.

YILMAZ, A. et al. Real-Time PCR for Gene Expression Analysis. **Polymerase Chain Reaction**, p. 229-254, 2012.

YOUNG, R. A. et al. Marker-assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar, “G 2333”. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 96, n. 1, p. 87–94, 1998.

ZUIDERVEEN, G. H. et al. Genome-Wide association study of anthracnose resistance in andean beans (*Phaseolus vulgaris*). **PLoS ONE**, v. 11, n. 6, p. 1–17, 2016.

**SEGUNDA PARTE- ARTIGOS**

## **ARTIGO 1**

Artigo elaborado de acordo com as normas do periódico Tropical Plant Pathology

(versão preliminar)

**Transcritoma comparativo fornece novos insights sobre resposta de feijão-comum à infecção pela raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum***

## TRANSCRITOMA COMPARATIVO FORNECE NOVAS PERCEPÇÕES SOBRE RESPOSTA DE FEIJÃO-COMUM À INFECÇÃO PELA RAÇA 65 DE *Colletotrichum lindemuthianum*

### RESUMO

A raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*, fungo causador da antracnose do feijoeiro, destaca-se, principalmente nos países tropicais, por sua grande variabilidade genética e elevado potencial patogênico, podendo causar danos severos às lavouras de feijão-comum plantadas com genótipos suscetíveis. Os genes situados em locos de resistência já identificados para essa raça, bem como suas atuações nas vias de resposta da planta hospedeira, ainda não haviam sido amplamente explorados. No presente estudo, realizou-se uma análise abrangente de transcritomas, utilizando o sequenciamento Illumina de duas cultivares de feijoeiro infectadas com a raça 65 de *C. lindemuthianum*, considerando os tempos 0, 48 e 96 horas após inoculação (hai). Os resultados permitiram identificar 22.344 genes em todas as amostras e em todos os tempos analisados. A partir da análise dos contrastes entre os diferentes tratamentos e suas interseções foi possível indicar conjuntos de genes Inter R e Inter S que foram potencialmente associados a mecanismos que levam à resistência e/ou suscetibilidade da planta ao patógeno nos diferentes momentos. Sobre o conjunto de genes Inter R, destacam-se aqueles envolvidos no reconhecimento do patógeno, como as quinases e as NB-LRRs, assim como genes envolvidos na via de biossíntese dos fenilpropanóides e glicerolipídios que, juntamente com a via do ácido linoleico, conduzem os mecanismos de resposta que levam à resistência a essa raça. Em resposta à sinalização, genes relacionados com a patogênese (PR), como proteínas da família MLP, e com a síntese de novos carboidratos envolvidos com a remodelagem da parede celular, foram desencadeadas a partir do reconhecimento do patógeno no genótipo resistente. Por outro lado, no genótipo suscetível, a sinalização mediada por auxina e a expressão de genes relacionados ao processamento e transporte de açúcares tiveram destaque. A rede de co-expressão dos genes Inter R e Inter S foi produzida, na qual foi encontrada maior conexão entre os genes associados à resistência, formando uma rede maior e robusta. Com isso, considerando a especificidade do controle genético da resistência em patossistemas envolvendo diferentes raças, este trabalho oferece um panorama inicial de resposta à raça 65, de ocorrência tão significativa na cultura do feijão-comum no Brasil.

**Palavras-chave:** Antracnose. *Phaseolus vulgaris*. Raça 65. Resposta de resistência. RNA-seq.

### INTRODUÇÃO

A antracnose, causada pelo fungo hemibiotrófico *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc & Magn) Scribn, é uma das doenças economicamente mais preocupantes para a cultura do feijoeiro (de Ron et al. 2016), sendo predominante em áreas tropicais e subtropicais, onde as condições climáticas são favoráveis ao desenvolvimento do patógeno (Padder et al. 2017). A doença afeta a qualidade dos grãos e vagens, podendo limitar drasticamente o rendimento da lavoura. O controle desta doença deve ser feito de modo integrado, aliando práticas culturais, controle químico e resistência genética. Nesse processo, a resistência genética destaca-se como

método eficiente e seguro (Ferreira et al. 2013). No entanto, a obtenção de variedades resistentes neste patossistema é um processo complexo, principalmente em função da grande diversidade de virulência de *C. lindemuthianum*, identificada tanto na forma de diferentes raças fisiológicas (Padder et al. 2017), quanto na variabilidade de isolados dentro de uma mesma raça (Davide & de Souza, 2009).

A resistência de *Phaseolus vulgaris* ao fungo *C. lindemuthianum* tem sido caracterizada como predominantemente qualitativa, descrita pelo modelo gene-a-gene (Flor, 1971). Atualmente, já foram descritos, em cultivares resistentes, cerca de 23 locos multialélicos de efeitos independentes (Vidigal Filho et al. 2020). Apesar da predominância dos locos qualitativos, locos com efeitos quantitativos (QTLs) também vêm sendo descritos no controle genético desta doença, conferindo resistência parcial a diferentes raças de *C. lindemuthianum* (Zuiderveen et al. 2016; González et al. 2015; Choudhary et al. 2018). O mapeamento de regiões genômicas revelou uma frequente organização desses locos em complexos aglomerados, os quais compreendem genes intimamente ligados, que podem conferir resistência a raças específicas (Campa et al. 2014; Ferreira et al. 2013; Geffroy et al. 2008; Zuiderveen et al. 2016).

Para a raça 65, por exemplo, foram verificados alguns genes de efeitos independentes para a resistência à antracnose, exibindo, dentre eles, interação de genes duplicados (Costa et al. 2017). Os locos *Co-01*, *Co-02*, *Co-03*, *Co-04*, *Co-05*, *Co-06* e *Co-15* já foram associados, em diferentes cultivares, à resistência a essa raça (Bisneta & Gonçalves-Vidigal, 2020; Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Vidigal Filho et al. 2020; Vieira et al. 2018; Costa et al. 2021). De fato, isolados da raça 65 destacam-se por sua grande variabilidade e ampla distribuição em vários países, incluindo o Brasil (Coelho et al. 2016; Costa et al. 2017).

Apesar do conhecimento estabelecido sobre os locos associados à resistência do feijoeiro às diferentes raças do *C. lindemuthianum*, a compreensão dos genes situados nestes locos, suas atuações, e interações nas vias de resposta da planta hospedeira, tornam-se importantes para um entendimento profundo do processo de resistência. A identificação de genes e vias pode auxiliar nos esforços do melhoramento genético dedicado à obtenção de plantas de feijão resistentes aos seus patógenos (Hoseinzadeh et al. 2020).

Proteínas codificadas por genes relacionados à resistência podem atuar em diferentes etapas do processo, como na codificação de proteínas de reconhecimento, na elicitação secundária ou na codificação de proteínas envolvidas em vias metabólicas (Andersen et al.

2018). Genes que codificam proteínas com domínios quinase, por exemplo, são conhecidos por desempenharem o papel de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Tais receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e ativam a resposta imune. Dentro dessa superfamília gênica, aqueles que codificam proteínas quinases dotadas de repetições ricas em leucina (RLK-LRR) já foram associados a locos de resistência a antracnose (Bisneta & Gonçalves-Vidigal, 2020; Dambroz et al. 2022). Outros genes que têm sido associados a locos de resistência codificam proteínas com domínios de ligação a nucleotídeos e repetições ricas em leucinas (NBS-LRR) (Bisneta & Gonçalves-Vidigal, 2020). Essas proteínas podem atuar no reconhecimento de efetores do patógeno por meio de interações proteína-proteína, monitoramento da presença e função de outras proteínas importantes do hospedeiro, e indução da imunidade desencadeada por efector (ETI), na percepção de qualquer alteração (Boller & Felix, 2009). Em todos os casos, a ativação da resposta imune resulta numa cascata de sinalização e proteínas envolvidas em diferentes vias metabólicas desencadeiam uma série de respostas que, em conjunto, resultará na defesa da planta (Andersen et al. 2018).

A análise de expressão diferencial de genes candidatos tem sido desenvolvida para diferentes raças do patógeno, expandindo o conhecimento sobre genes envolvidos no processo de resistência no patossistema feijoeiro-antracnose (Fraire-Velázquez & Lozoya-Gloria, 2003; Oblessuc et al. 2012; Borges et al. 2012; Fontenelle et al. 2017). Para a raça 65, Silva et al. (2021), utilizando RT-qPCR, encontraram maiores níveis de expressão de genes relacionados à patogênese e receptores quinases, em interação incompatível. Análises envolvendo utilização da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) já foram realizadas contemplando as raças 73 (Padder et al. 2016), 100 e C531 (Alvarez-diaz et al. 2022).

Considerando a especificidade do controle genético a diferentes raças e isolados, e a importância da raça 65 para a cultura, tornou-se necessária a realização de uma análise de amplo espectro. Desse modo, o presente estudo utilizou-se da técnica do RNA-seq para obter os perfis transcricionais de duas cultivares de feijão, sendo uma resistente e outra susceptível à raça 65 de *C. lindemuthianum*, em diferentes tempos após a inoculação. Os resultados forneceram informações úteis sobre genes e mecanismos moleculares envolvidos na resposta de *P. vulgaris* a um isolado específico da raça 65, informações essas que se tornam base para o desenvolvimento de novas estratégias para a obtenção de cultivares de feijoeiro com resistência durável à antracnose.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

## Material vegetal

As cultivares de feijão comum BRS Estilo e Ouro vermelho foram selecionadas para este estudo. Ambas são cultivares brasileiras de feijão-comum, de origem mesoamericana, comercialmente disponíveis para os agricultores. Segundo Costa et al. (2021) essas cultivares diferem em um único loco considerando a reação ao isolado Lv 134 da raça 65 de *C. lindemuthianum*, sendo Ouro Vermelho portadora do alelo dominante responsável pela resistência, diferentemente da BRS Estilo, dotada do alelo recessivo.

Para confirmar as especificidades das reações contrastantes de BRS Estilo e Ouro Vermelho ao isolado Lv 134, raça 65, de *C. lindemuthianum*, suas sementes foram semeadas em duas bandejas de polietileno, com células individualizadas, preenchidas com substrato Plantmax. O ensaio foi conduzido em casa de vegetação sob condições ótimas de umidade e temperatura (UR de 95% e 24°C) para germinação e, em seguida, o desenvolvimento das plântulas. Após a expansão das folhas primárias, as plantas foram inoculadas com o isolado fúngico para avaliação dos sintomas. O experimento foi realizado em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2 (cultivares) x 3 (tempos de coleta).

## Preparo da suspensão de conídios e inoculação com a raça 65 de *C. lindemuthianum*

O isolado Lv 134 da raça 65 de *C. lindemuthianum* pertence à coleção de fungos do Laboratório de Resistência a Doenças de Plantas da Universidade Federal de Lavras (Brasil). As linhagens monospóricas desse isolado, mantidas em placas com meio M3 (Tu, 1985), foram repicadas para vagens esterilizadas em tubos de ensaio, parcialmente cobertas em meio ágar-água (3,75 g de ágar para 250 ml de água) (Mathur et al. 1950). Após a repicagem, as vagens foram mantidas por um período de incubação de 15 dias, a 22°C, no escuro.

A preparação do inóculo foi realizada adicionando-se água destilada aos tubos, seguida pela raspagem dos conídios da superfície da vagem, com o auxílio de uma alça de platina. A suspensão formada foi filtrada através de uma camada de gaze, para remoção dos fragmentos miceliais. A contagem dos conídios foi realizada em microscópio com o auxílio da câmara de Neubauer e a concentração padronizada em  $1,2 \times 10^6$  conídios/ml (Rava, 1993).

A suspensão de esporos, então preparada, foi inoculada pulverizando ambas as faces das folhas e os talos, com pulverizador, até o ponto de escorrimento (Burt et al. 2015). A inoculação foi feita após a abertura completa das folhas primárias, e as plantas foram mantidas em câmara de nebulização (UR de 100% e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) por 48 horas e, posteriormente, transferidas



para casa de vegetação (UR de 95% e 24°C), por aproximadamente 10 dias, para a coleta das amostras foliares e avaliação dos sintomas. Um grupo de plantas, inoculado com água, foi mantido como controle experimental.

### **Coleta do material foliar e avaliação dos sintomas**

A coleta do material foliar foi realizada nos tempos 0, 48 e 96 horas após a inoculação (hai). As metades de duas folhas primárias de cada planta foram coletadas, abrigadas em microtubos de 2,0 mL e imediatamente submergidas em nitrogênio líquido. Na sequência, o material coletado foi armazenado a -80°C até a avaliação e confirmação das reações esperadas de resistência e suscetibilidade, adotando-se como base de análise, as metades das folhas primárias que permaneceram nas plantas. Como condição obrigatória para prosseguimento deste trabalho, após a avaliação e confirmação dos sintomas, foi realizada a extração de RNA das amostras foliares coletadas.

Para análise dos sintomas, cada planta (repetição) foi avaliada individualmente de acordo com a escala descritiva de notas de um a nove (Schoonhoven & Pastor-Corrales, 1987), sete dias após a inoculação. Foram consideradas resistentes todas as plantas com nota menor/igual a três, e suscetíveis, aquelas com nota superior a três. Os dados foram submetidos ao teste t de Student ao nível de 5% de probabilidade, com o objetivo de verificar se houve diferença entre as médias de severidade dos sintomas das cultivares (Silva et al. 2021). As análises foram realizadas com o R software (CoreTeam, 2018).

### **Extração de RNA, construção da biblioteca de cDNA e sequenciamento**

O RNA total foi extraído a partir de 12 amostras, correspondentes a duas cultivares (BRS Estilo e Ouro Vermelho), três tempos (0, 48 e 96 hai) e duas repetições biológicas (Hoseinzadeh et al. 2020). Utilizou-se o RNATRIzol® Isolation Reagent (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante, com pequenas modificações, como descrito por Miranda et al. (2019). A quantidade e pureza do RNA foram analisadas por espectrofotômetro (NanoVuePlus GE Healthcare), observando as concentrações de ácidos nucleicos e as relações de absorbâncias A260/280 e A260/230, priorizando valores entre 1,80 e 2,20. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose a 1%, usando o tampão TAE (Tris, EDTA e ácido bórico).

Os extratos de RNA de cada amostra foram tratados com TURBO™ DNase (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. O mRNA foi enriquecido usando

NEBNext® Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (New England BioLabs). As bibliotecas de RNA-Seq foram preparadas usando o TruSeq Stranded Total RNA Library Plant Kit (Illumina, Inc.) (Malapi-Wight et al. 2021). Após a quantificação no TapeStation 4200 (Agilent), cada biblioteca foi diluída e usada equimolarmente para preparar um pool para sequenciamento no Illumina NextSeq 500 (Illumina, Inc.) no laboratório USDA-APHIS PGQP, com um kit de sequência de alta saída de 75 ciclos (2 x 75 bp, extremidade pareada).

### **Análises de bioinformática**

A qualidade das leituras de sequenciamento obtidas (*reads*) foi analisada utilizando o FastQC v.0.11.7 (Andrews, 2010). As sequências de adaptadores, assim como as bases que apresentaram Q-Score abaixo de 20, foram removidas utilizando o Trimmomatic v.0.39 (Bolger et al. 2014), sob os seguintes parâmetros: Illumicap 2:15:10; Slidingwindow 4:15 e Minlen 32. As leituras filtradas foram mapeadas no genoma de referência de *P. vulgaris* v2.1, disponível no banco de dados Phytozome v.13 (Schmutz et al. 2014), e contadas utilizando o STAR v.2.7.10b (Dobin et al. 2013), com os seguintes parâmetros: *maximum number of multiple alignments allowed for a read*: 20, *minimum overhang for unannotated junctions*: 8, *minimum overhang for annotated junctions*: 1, *maximum number of mismatches per pair*: 999, *maximum number of mismatches per pair relative to read length*: 0.10, *minimum number of matched bases*: 50, *minimum number of bases score over the read length*: 0, *minimum number of bases matched over the read length*: 0, *maximum genomic distance between mates*: 1000, *maximum intron length*: 3000, e, com o modo *count number reads per gene while mapping* acionado.

### **Análise de expressão diferencial e enriquecimento de termos Gene Ontology**

O número de *reads* mapeados em apenas um gene do genoma, estimado pelo STAR, foi utilizado para realização da análise de expressão diferencial, com o pacote DESeq2 v.1.36.0 (Love et al. 2014) no software R v.4.2.1 (CoreTeam, 2018). Para a criação da matriz de contagem foram utilizadas as contagens da fita antisense. Uma pré-filtragem foi realizada retirando genes com números muito baixos (menor que 50) de expressão. Como análises multivariadas, foram realizados (i) um agrupamento hierárquico com o método da ligação média (UPGMA) utilizando o complemento das correlações de Spearman entre os valores de expressão gênica das amostras; e, (ii) uma análise de componentes principais (PCA).

A identificação de genes diferencialmente expressos (DEGs) pelo DESeq2 (Love et al. 2014) foi realizada, utilizando os dados brutos de contagens, para diferentes contrastes, incluindo comparações entre as cultivares em um mesmo tempo e entre os tempos de cada cultivar (Tabela 1). Os genes com p-valor corrigido pela taxa de falsas descobertas (Benjamini & Hochberg, 1995) abaixo de 0,05, e alteração mínima de  $\log^2$  fold-change (based on the Transcripts Per Million - TPM metric) de 2.0, foram considerados DEGs.

**Tabela 1.** Contrastes realizados para a análise de expressão gênica diferencial, a partir dos diferentes tempos de inoculação (0, 48 e 96 hai) das cultivares BRS Estilo (E) e Ouro Vermelho (OV), respectivamente, suscetível (S) e resistente (R) ao isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

<b>Respostas a 48 horas de infecção</b>		
Contraste 1	OV 48 hai x E 48 hai	
Contraste 2	OV 48 hai x OV 0 hai	
Contraste 3	E 48 hai x E 0 hai	
Interseção dos Contrastes 1 e 2	(OV 48 hai x E 48 hai) x (OV 48 hai x OV 0 hai)	= Inter R1 + Inter S1
Interseção dos Contrastes 1 e 3	(OV 48 hai x E 48 hai) x (E 48 hai x E 0 hai)	= Inter R2 + Inter S2
<b>Respostas a 96 horas de infecção</b>		
Contraste 4	OV 96 hai x E 96 hai	
Contraste 5	OV 96 hai x OV 0 hai	
Contraste 6	E 96 hai x E 0 hai	
Interseção dos Contrastes 4 e 5	(OV 48 hai x E 96 hai) x (OV 96 hai x OV 48 hai)	= Inter R1 + Inter S1
Interseção dos Contrastes 4 e 6	(OV 48 hai x E 96 hai) x (E 96 hai x E 0 hai)	= Inter R2 + Inter S2

As interseções realizadas permitiram selecionar genes que foram DEGs em comum entre os diferentes contrastes, em ambos os tempos de infecção, agrupando-os em dois grupos. Por exemplo, considerando os contrastes 1 e 2, que colocam em foco a cultivar resistente, os genes que foram regulados positivamente, em comum em ambos os contrastes, são chamados de genes Inter R1. Enquanto aqueles que foram regulados negativamente são chamados de Inter S1. Já para os contrastes 1 e 3, que se referem a cultivar suscetível, genes que foram regulados positivamente no contraste 1 e, ao mesmo tempo, negativamente no contraste 3 são chamados de Inter R2. Os genes regulados negativamente nos contrastes 1 e 3 foram chamados de Inter S2. Por fim, os genes Inter R1 e Inter R2 foram agrupados no conjunto de genes Inter R, e os

genes Inter S1 e Inter S2 foram agrupados no conjunto de genes Inter S. O mesmo raciocínio se aplica aos contrastes 4, 5 e 6, e suas interseções, no tempo de 96 hai (Tabela 1).

Os conjuntos de genes Inter R e Inter S foram utilizados para as análises posteriores. A análise de enriquecimento de termos Gene Ontology (GO) (Gene Ontology; The Gene Ontology Consortium 2001) dos DEGs foi realizada utilizando teste de Fisher e FDR de corte de 0,05 com o uso do pacote topGO v.2.48.0 (Alexa and Rahnenfuhrer, 2022). Valores de expressão desses genes, normalizados para a escala  $\log_2$  nos diferentes tratamentos foram destacados em um gráfico de calor (*heatmap*) em conjunto com análises UPGMA, utilizando o pacote pheatmap v.1.0.12 (Kolde, 2012) no software R.

Informações sobre a posição cromossômica de locos de resistência já descritos na literatura em diferentes cultivares foram obtidas (Paulino et al., 2022), e a partir dessas regiões verificou-se DEGs que se localizavam próximos a esses locos.

### **Vias metabólicas**

A partir das anotações gênicas obtidas no Phytozome v.13 (Goodstein et al., 2012), as vias metabólicas potenciais, das quais os genes selecionados participam, foram estimadas. Também foi realizada a verificação da presença de alguma via enriquecida nos grupos de genes obtidos a partir das interseções entre os contrastes analisados, nos diferentes tempos. Para tal, o número do Enzyme Consortium (EC) das enzimas associadas aos genes de interesse foi obtido da atribuição GO (Bono et al. 1998), e utilizado para a busca das vias metabólicas que essas enzimas participam, no banco de dados KEGG (Kanehisa et al. 2000). Utilizando essas informações, realizou-se um teste de Fisher (p-valor de 0,05), com o software estatístico R, a fim de testar quais vias se encontram enriquecidas em grupos de genes de interesse.

### **Redes de co-expressão**

Com o objetivo de elucidar novas associações gênicas com a resistência, foram modeladas redes de co-expressão gênica utilizando correlações de Pearson (coeficiente de correlação mínimo de 0.9) e o método de ranqueamento recíproco mais alto (*highest reciprocal rank* [HRR]) (Mutwil et al. 2010). Foi estabelecido um limite de 30 correlações para seleção das conexões significativas. Foram construídas duas redes de co-expressão com o software R e o pacote igraph v.1.3.5 (Csardi et al. 2006), sendo uma representando o genótipo suscetível (BRS Estilo) e outra representando o genótipo resistente (Ouro Vermelho). A partir das redes modeladas, foram selecionados os nós relacionados aos grupos de interseção de DEGs

estabelecidos. Esta seleção foi então expandida para os primeiros vizinhos desses genes na rede, de modo a fornecer inferências moleculares mais abrangentes na análise de resistência e a construção de diferentes redes específicas associadas à resistência e suscetibilidade. Adicionalmente, foram calculados os graus dos nós como indicação de *hubs* putativos.

## RESULTADOS

### Desenvolvimento da doença

As reações de resistência e suscetibilidade das cultivares Ouro Vermelho (média 1,27) e BRS Estilo (média 8,78), respectivamente, foram confirmadas de acordo com a identificação dos sintomas (Figura 1). As médias de severidade da doença foram significativamente diferentes pelo teste t de Student ( $p < 0.01$ ) (Figura 2). Os primeiros sintomas, na interação compatível, foram observados a 96 hai, como pequenas lesões no caule, e nas nervuras da superfície abaxial das folhas. As lesões foram se desenvolvendo ao longo do tempo, e sete dias após a inoculação, as plantas suscetíveis já estavam mortas. Em contraste, na interação incompatível, as plantas resistentes não apresentaram nenhum sintoma ou resposta de hipersensibilidade, mesmo sete dias após a inoculação.

Figura 1. Avaliação fenotípica das cultivares Ouro Vermelho e BRS Estilo, sete dias após a inoculação com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. (A) Cultivar resistente sem lesões; (B) Cultivar suscetível com lesões nas nervuras da superfície abaxial da folha e no caule da cultivar.

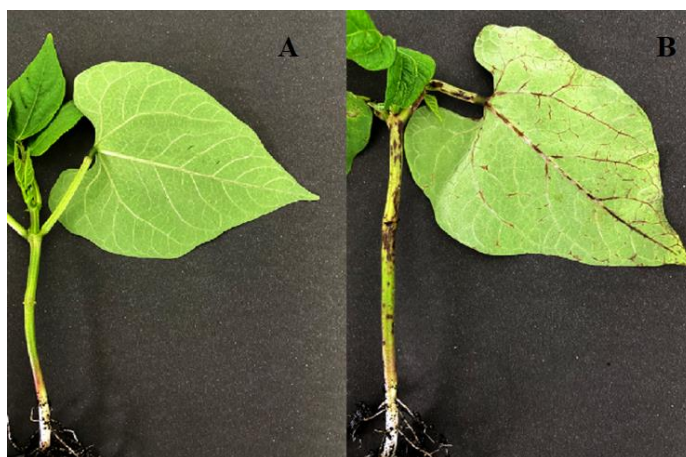
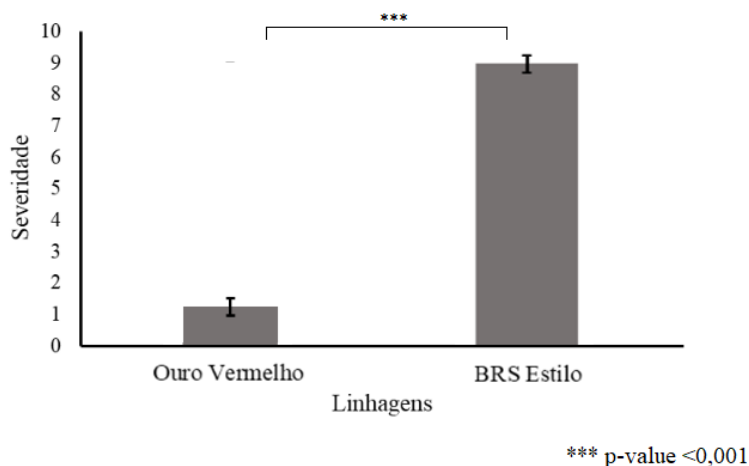


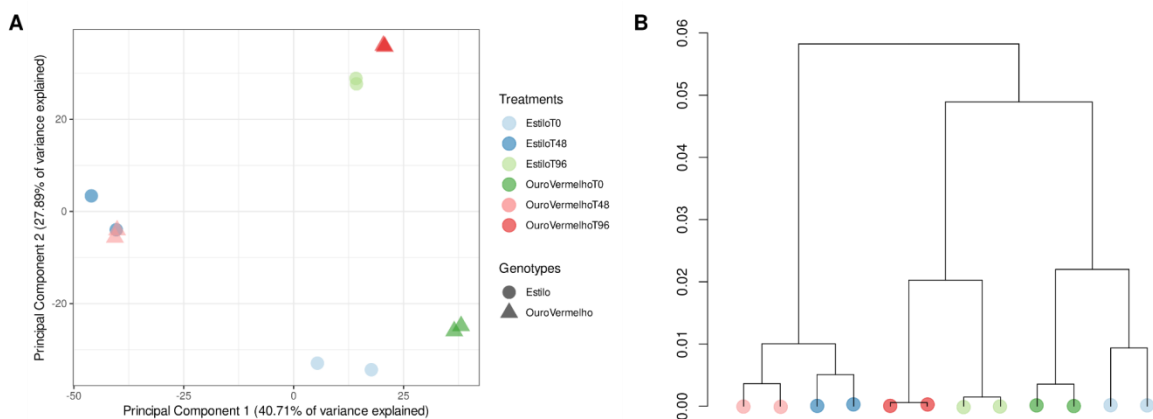
Figura 2. Teste t de Student aplicado entre as notas médias de severidade da antracnose das cultivares de feijoeiro Ouro Vermelho e BRS Estilo inoculadas com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. Três asteriscos (\*\*\*) indicam significância a 0,01% de probabilidade pelo teste t.



### Controle de qualidade das análises de transcrito

O número de *reads* obtido após a filtragem com o Trimmomatic para as 12 bibliotecas de RNA-Seq analisadas variou de 17 a 35 milhões aproximadamente, com média em torno de 30 milhões (Tabela S1). As *reads* mapeadas contra o genoma de referência, apresentaram uma taxa média de 90% de *reads* mapeadas exclusivamente (Tabela S1). A verificação das amostras para controle de qualidade foi realizada a partir de análises de agrupamento. O gráfico da PCA evidencia o agrupamento de amostras de ambas as cultivares sob o mesmo tratamento de tempo de inoculação (Figura 3), confirmando a similaridade entre as réplicas. Os dois primeiros componentes explicam aproximadamente 79% da variação total dos dados entre as 12 amostras. No dendrograma também é possível observar o agrupamento de réplicas da mesma amostra, assim como um agrupamento próximo de cultivares sob o mesmo tratamento de tempo de coleta (Figura 3).

Figura 3. Controle de qualidade do sequenciamento a partir de análises de agrupamento dos tratamentos. (A) Análise de componentes principais indicando o nível de similaridade entre os padrões de expressão gênica do feijoeiro em resposta ao patógeno *Colletotrichum lindemuthianum*. (B) Dendrograma obtido pelo método UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages) a partir dos níveis de expressão gênica das diferentes bibliotecas.



## Análise de expressão diferencial

### *DEGs em interação compatível e incompatível com o patógeno, 48 horas após infecção*

Ao todo, 22.344 genes foram identificados para todas as amostras, em todos os tempos analisados (Tabela suplementar S2). Considerando o primeiro contraste, entre os genótipos Ouro Vermelho e BRS Estilo, no tempo de 48 hai (OV 48 hai x E 48 hai), foram identificados 770 DEGs, sendo dessas, 353 negativamente reguladas e 417 reguladas positivamente (Figura 4, seções A e B). Esses DEGs podem representar tanto a resposta ao patógeno quanto processos gerais das plantas. Para selecionar genes que tiveram uma mudança na sua expressão ao longo do tempo, a partir do momento da infecção (Hoseinzadeh et al. 2020), em cada um dos genótipos, foram realizados mais dois contrastes. O segundo contraste contempla a alteração gênica temporal no genótipo resistente (OV 48 hai x OV 0 hai), e apresentou expressão diferencial de 6.474 DEGs, sendo desses, 3.742 reguladas negativamente e 2.732 positivamente (Figura 4, seção A). Já para o terceiro contraste, que considera a alteração temporal no genótipo suscetível (E 48 hai x E 0 hai), a ativação foi menor, com um total de 4.855 DEGs, sendo dessas, 2.761 reguladas negativamente, e 2.094 positivamente (Figura 4, seção B). Aplicando a interseção entre os contrastes 1 (OV 48 hai x E 48 hai) e 2 (OV 48 hai x OV 0 hai), e a interseção entre os contrastes 1 (OV 48 hai x E 48 hai) e 3 (E 48 hai x E 0 hai), tornou-se possível o acesso a genes potencialmente associados aos mecanismos que levam a resposta de resistência ou suscetibilidade, através dos conjuntos Inter R, com 196 DEGs, e Inter S, com 202 DEGs dos genótipos resistente e suscetível (Figura 4, seções A, B e E).

### *DEGs em interação compatível e incompatível com o patógeno, 96 horas de infecção*

Foram identificados 1.560 DEGs para o contraste 4 (OV 96 hai x E 96 hai), sendo dessas, 575 reguladas negativamente, e 985 positivamente (Figura 4, seções C e D). No contraste 5 (OV 96 hai x OV 48 hai), houve a identificação de 5.361 DEGs. Dessas, 1.716 foram reguladas negativamente e 3.645 reguladas positivamente (Figura 4, seção C). Já para a cultivar suscetível, o contraste 6 (E 96 hai x E 48 hai), foram identificados 4.721 DEGs. Desse somatório, 1.521 DEGs foram reguladas negativamente e 3.200 positivamente (Figura 4, seção D). Da mesma forma, com as interseções realizadas (Contraste 4 e 5, e contraste 4 e 6), tornou-se possível o acesso a genes potencialmente associados aos mecanismos que levam a resposta de resistência ou suscetibilidade, através dos conjuntos Inter R, agora 725 DEGs, e Inter S, com 367 DEGs dos genótipos resistente e suscetível (Figura 4, seções C, D e E).

Para a realização das análises posteriores foram considerados dois grupos de genes para cada tempo, Inter R e Inter S. Ambos os grupos são formados pela soma dos genes obtidos nas interseções realizadas entre os diferentes contrastes utilizados (Figura 4, seção E). A análise de agrupamento das amostras utilizando valores normalizados dos padrões de expressão dos genes destacados nos grupos Inter R e Inter S foi realizada (Figura 5). O heatmap possibilitou a visão global dos padrões de expressão, e, nesse caso, nota-se um remodelamento do padrão de expressão de genes do grupo Inter R na cultivar Ouro Vermelho, onde pode-se verificar que a 48 hai genes não expressos ou regulados negativamente, passaram a se expressar no contexto de 96 hai. Na cultivar BRS Estilo, os genes Inter S foram regulados positivamente a 48 horas de infecção, quando comparados com genes Inter R, que por sua vez foram regulados negativamente. Com a evolução da infecção, a 96 hai, houve uma transição na regulação de genes do conjunto Inter R, onde eles passaram de negativamente para positivamente regulados, no genótipo suscetível (Figura 5).



Figura 4. Quantidade de DEGs encontrados, a partir do DESeq2, nos diferentes contrastes realizados considerando os tempos 0, 48 e 96 após a inoculação das cultivares Ouro Vermelho (resistente) e BRS Estilo (suscetível) com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. As interseções entre os contrastes 1 e 2, e 1 e 3 indicam dois conjuntos de genes, indicados por Inter R (1 e 2) e Inter S (1 e 2).

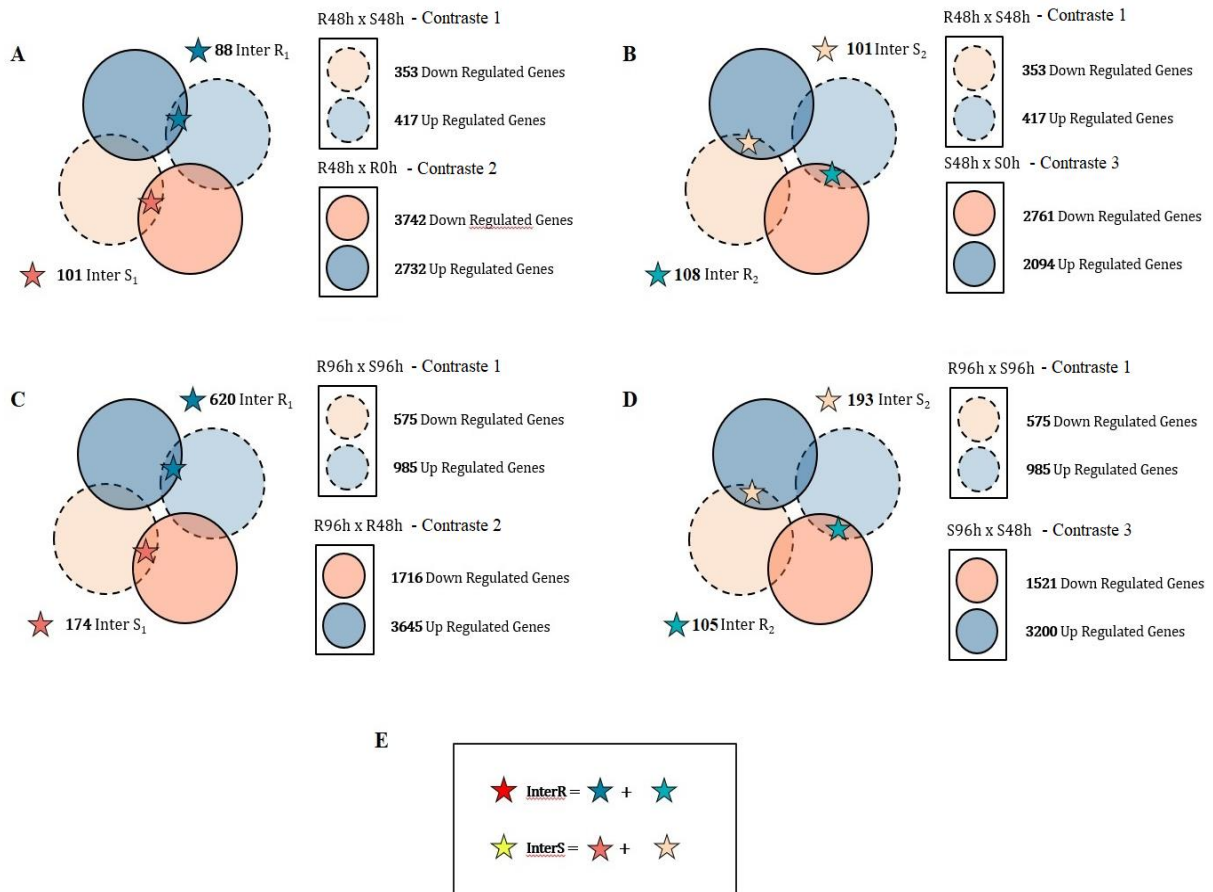
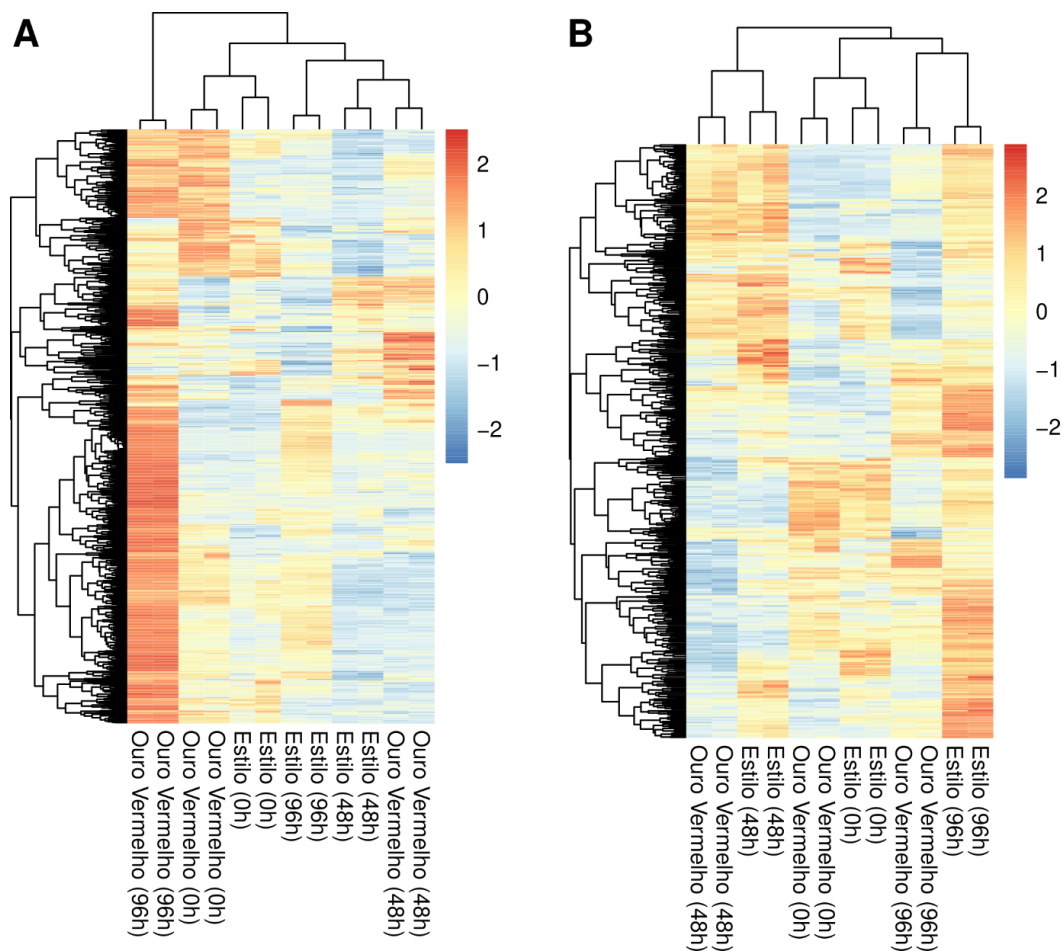


Figura 5. Análise de agrupamento hierárquico de padrões de expressão gênica, normalizados, em Ouro Vermelho e BRS Estilo. O heatmap mostra os níveis de expressão de genes diferencialmente expressos (DEGs) significativos que compõe o grupo Inter R (A) e o grupo Inter S (B) em plantas inoculadas com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* nos tempos de 0, 48 e 96 hai. Os genes regulados positivamente e negativamente são representados em vermelho e azul, respectivamente.



### Análise de enriquecimento Gene Ontology (GO)

#### *DEGs em interação compatível e incompatível com o patógeno, 48 horas de infecção*

Para determinar as funções dos DEGs envolvidos na resposta de feijão comum a *C. lindemuthianum*, foi realizada a análise de enriquecimento de termos GO. Considerando a interseção realizada para os contrastes envolvendo os genótipos resistente e suscetível nos tempos de 0 e 48 hai, 196 DEGs foram identificados como genes Inter R, sendo 88 provenientes dos contrastes considerando o genótipo resistente, e 108, o genótipo suscetível (Figura 4,

seções A e B). Tais genes foram associados a seis processos biológicos (Tabela 2), dentre eles, processo metabólico (GO:0008152) e fissão de peroxissomos (GO:0016559). Outros dois processos identificados, resposta a estímulo biótico (GO:0009607) e biossíntese de celulose (GO:0030244), mostraram-se presentes também entre os 202 genes Inter S (Tabela 2).

#### *DEGs em interação compatível e incompatível com o patógeno, 96 horas de infecção*

Com o progresso da infecção pelo patógeno, o processo de biossíntese de celulose (GO:0030244), que no tempo de 48 horas mostrou-se presente em ambas as respostas (resistência e suscetibilidade), passou a ser anotado apenas entre os genes Inter R (Tabela 2). Ainda para esses genes, processos envolvendo modificação da parede celular (GO:0042545), resposta a estresses oxidativos (GO:0006979), fosforilação de proteínas (GO: 000648), biossíntese de esteroides (GO: 0006694) e retenção de proteínas no lúmen do retículo endoplasmático (GO:0006621) também foram verificados na resposta a 96 hai (Tabela 2). Para a resposta da planta suscetível foi encontrado genes relacionados aos processos de regulação da transcrição (GO: 0006355), macromoléculas associadas a parede celular (GO: 0016998) e processo catabólico de quitina (GO: 0006032).

#### **Enriquecimento de vias metabólicas**

A análise de enriquecimento de vias metabólicas foi realizada com a finalidade de possibilitar uma visão global das diferentes vias metabólicas reguladas durante a interação das plantas resistente e suscetível com a raça 65 do patógeno. As mesmas vias foram acionadas tanto para a interação compatível, quanto para a incompatível (Tabela Suplementar S3). Entretanto, o enriquecimento das vias no grupo de genes Inter R, considerando o p-valor de 0,05, revelou a via de biossíntese de fenilpropanóide, representada pelos genes arogenato desidratase, Phvul.006G149600 e Phvul.005G127100, regulados positivamente no genótipo resistente; a via de metabolismo do ácido linoleico, pela expressão de genes lipoxigenases, tais como Phvul.006G185300, Phvul.005G156800 e Phvul.009G262900; e a via do metabolismo dos glicerolípídeos, a partir da expressão de genes glycerol-3-phosphate acyltransferase, por exemplo, Phvul.002G192000. Para o grupo Inter S, além das vias de biossíntese de fenilpropanóide, foram enriquecidas também as vias de biossíntese de flavonoides, isoflavonoides, alcalóides de tropano, piperidina e piridina, e biossíntese de sesquiterpenóides e triterpenóides (Tabela Suplementar S3).

**Tabela 2.** Termos de enriquecimento Gene Ontology (GO) de genes Inter R e Inter S expressos diferencialmente nos diferentes contrastes realizados considerando os tempos 0, 48 e 96 após a inoculação das cultivares Ouro Vermelho (resistente) e BRS Estilo (suscetível) com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Enriquecimento genes Inter R- 48 horas de infecção						
Go ID	Termos	Anotados	Significativos	Esperado	Fisher	DEGs
GO:0030244	cellulose biosynthetic process	25	2	0.22	0.0206	Phvul.005G001000 Phvul.005G116551
GO:0009607	response to biotic stimulus	35	2	0.31	0.0386	Phvul.011G183500 Phvul.011G183766 Phvul.011G183832
GO:0008152	metabolic process	5325	49	47.47	0.0012	Phvul.004G043300 Phvul.004G043600
GO:0016559	peroxisome fission	3	1	0.03	0.0012	Phvul.011G015800
GO:0030150	protein import into mitochondrial matrix	3	1	0.03	0.0265	Phvul.004G092000
GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	29	2	0.26	0.0272	Phvul.004G091600

**Tabela 2.** Termos de enriquecimento Gene Ontology (GO) de genes Inter R e Inter S expressos diferencialmente nos diferentes contrastes realizados considerando os tempos 0, 48 e 96 após a inoculação das cultivares BRS Estilo (suscetível) e Ouro Vermelho (resistente) com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. (CONTINUAÇÃO).

Enriquecimento genes Inter S- 48 horas de infecção						
Go ID	Termos	Anotados	Significativos	Esperado	Fisher	DEGs
GO:0030244	cellulose biosynthetic process	25	4	0.19	0.00011	Phvul.002G136300 Phvul.005G001000
GO:0009607	response to biotic stimulus	35	3	0.27	0.04994	Phvul.011G183950 Phvul.011G182900
GO:0006952	defense response	56	4	0.43	0.01963	Phvul.001G175900 Phvul.003G221250
GO:0045040	protein insertion into mitochondrial	2	1	0.02	0.02047	Phvul.001G261400
GO:0016567	protein ubiquitination	73	3	0.75	0.03893	Phvul.001G228500 Phvul.003G101500 Phvul.008G238500
GO:0042545	cell wall modification	33	2	0.34	0.04490	Phvul.001G209100 Phvul.003G126500
GO:0006979	response to oxidative stress	78	3	0.8	0.04594	Phvul.009G140700

**Tabela 2.** Termos de enriquecimento Gene Ontology (GO) de genes Inter R e Inter S expressos diferencialmente nos diferentes contrastes realizados considerando os tempos 0, 48 e 96 após a inoculação das cultivares BRS Estilo (suscetível) e Ouro Vermelho (resistente) com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. (CONTINUAÇÃO).

Enriquecimento genes Inter R- 96 horas de infecção						
Go ID	Termos	Anotados	Significativos	Esperado	Fisher	DEGs
GO:0006073	cellular glucan metabolic process	65	12	1.89	4.9e-08	Phvul.003G147300 Phvul.003G231900
GO:0006468	protein phosphorylation	1091	48	31.72	0.0017	Phvul.003G024000 Phvul.002G115800 Phvul.002G115900
GO:0042545	cell wall modification	33	5	0.96	0.024	Phvul.005G011900 Phvul.005G184400 Phvul.009G222100 Phvul.010G123132
GO:0050826	response to freezing	1	1	0.03	0.0291	Phvul.008G223000
GO:0006855	xenobiotic transmembrane transport	45	4	1.31	0.0409	Phvul.002G154600 Phvul.005G021900
GO:0006694	steroid biosynthetic process	29	4	0.84	0.0093	Phvul.005G128500 Phvul.L001841
GO:0006621	protein retention in ER lumen	7	2	0.2	0.0160	Phvul.010G022100
GO:0030244	cellulose biosynthetic process	25	3	0.73	0.0348	Phvul.005G001000 Phvul.005G116551

**Tabela 2.** Termos de enriquecimento Gene Ontology (GO) de genes Inter R e Inter S expressos diferencialmente nos diferentes contrastes realizados considerando os tempos 0, 48 e 96 após a inoculação das cultivares BRS Estilo (suscetível) e Ouro Vermelho (resistente) com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. (CONCLUSÃO).

Enriquecimento genes Inter S- 96 horas de infecção						
Go ID	Termos	Anotados	Significativos	Esperado	Fisher	DEGs
GO:0006355	regulation of transcription, DNA	798	22	13.35	0.012	Phvul.001G100200 Phvul.001G251200 Phvul.002G008600 Phvul.002G110600 Phvul.002G285800 Phvul.005G068500 Phvul.007G095300 Phvul.007G176700
GO:0045747	positive regulation of Notch signaling .	1	1	0.02	0.017	Phvul.001G040900
GO:0006032	chitin catabolic process	13	2	0.22	0.019	Phvul.001G218600 Phvul.003G268500 Phvul.003G268600
GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic proces	19	2	0.32	0.039	Phvul.001G218600 Phvul.003G268500 Phvul.003G268600
GO:0042128	nitrate assimilation	3	1	0.05	0.049	Phvul.009G121000
GO:0006537	glutamate biosynthetic process	3	1	0.05	0.049	Phvul.009G053900
GO:0009638	Phototropism	3	1	0.05	0.049	Phvul.006G080400

## Redes de co-expressão gênica

Com o objetivo de definir grupos de genes com padrões semelhantes nas interações compatível e incompatível da planta com o patógeno, foram construídas redes de co-expressão gênica, sendo uma para amostras de BRS Estilo e outra para amostras de Ouro Vermelho. Nessas duas redes, foram selecionados os genes Inter R e Inter S e seus respectivos vizinhos, definindo quatro sub-redes (Figura 6).

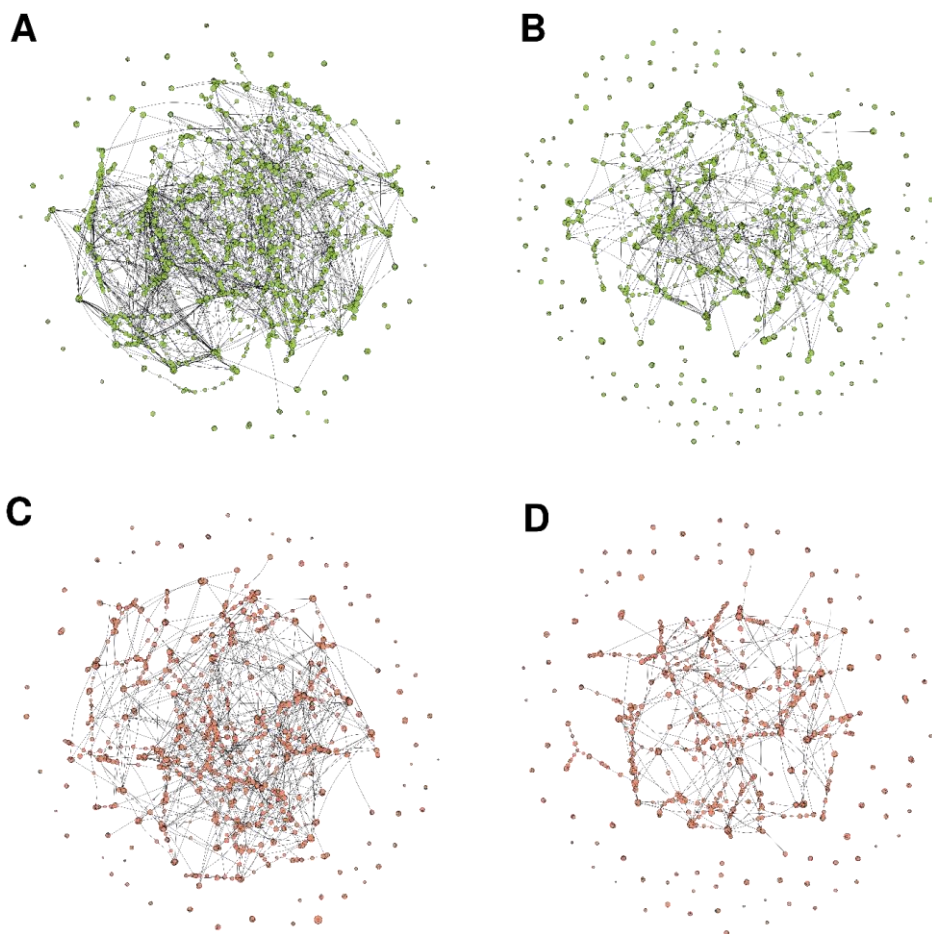
A rede Inter R do genótipo resistente foi a que mais apresentou conexões entre os genes (Figura 6A). Os genes com graus mais elevados (Tabela suplementar S4) representam elementos centrais na rede, possuindo um papel essencial no sistema biológico aqui abordado. Nesse sentido, o gene Phvul.002G106300, que corresponde a uma proteína da família GDSL-like Lipase/Acylhydrolase, envolvido com a modulação de vias de sinalização, apresentou o maior número de conexões (*degrees*), 130, e foi mais expresso no genótipo resistente comparado com o suscetível a 96 hai. O gene Phvul.002G076400, ocupou a segunda posição, com 116 conexões. Esse gene codifica uma proteína matrix metalloproteinase, e assim como o primeiro, foi mais expresso a 96 hai no genótipo resistente quando comparado ao suscetível. Phvul.002G107900, que corresponde a uma proteína relacionada à patogênese semelhante a taumamatina, foi mais expressa a 96 hai no genótipo resistente quando comparado com o suscetível, e apresentou 112 conexões. Genes que atuam no reconhecimento do patógeno, como os que codificam proteínas quinases (exemplificadas pelos genes Phvul.002G115800, Phvul.002G115900 e Phvul.003G024000) e proteínas NBS-LRR (p.ex. Phvul.002G021700) também foram bem representados na rede com altos valores de conexões, 106, 94, 52 e 50, respectivamente (Tabela Suplementar S4). DEGs, como Phvul.009G080000 e Phvul.005G124100, referentes aos fatores de transcrição bZIP e WRKY, respectivamente, foram regulados positivamente no genótipo resistente a 48 hai, e estiveram presentes na rede de co-expressão dos genes R, assim como genes associados ao metabolismo secundário de carboidratos, como as enzimas beta glucosidase e hidrolases (Phvul.005G082800, Phvul.005G130900). Curiosamente, os DEGs, incluindo proteínas quinases, NB-LRR e de patogênese, que apresentaram altas quantidades de conexões na rede de co-expressão para a resposta de resistência à raça 65 do patógeno, estão concentradas nos cromossomos dois e três de feijão-comum (Tabela Suplementar S4). Considerando a rede dos genes Inter S no genótipo



resistente, o gene central (102 conexões) foi o Phvul.002G096500, que corresponde a uma proteína UDP-glucosyl transferase.

Considerando os genes Inter R na cultivar suscetível, genes Phvul.002G106300 e Phvul.002G022600, que também codificam proteínas da família GDSL-like Lipase/Acylhydrolase foram representados na rede com altos valores de conexões, 75 e 59 *degrees*, respectivamente. O gene Phvul.002G152700, que codifica a enzima leucoantocianidina dioxigenase, relacionada com a biossíntese de flavonoides, teve sua expressão bem relacionada com outros genes, a partir de 78 conexões. Também foram representados na rede, genes da família de proteína de resposta a auxina do tipo SAUR, como Phvul.006G022900 e Phvul.009G001400 (Tabela suplementar S4). Já para o conjunto de genes Inter S do genótipo suscetível, o processo de transporte de açúcar foi representado na rede pelo gene Phvul.002G073100 (71 *degrees*), da família de proteína nodulina MtN21 /EamA-like, positivamente regulado no genótipo suscetível quando comparado com o resistente a 48 hai. O gene Phvul.002G154600, que corresponde a uma proteína de efluxo MATE relacionado com o transporte transmembrana de substâncias, foi mais expresso no genótipo suscetível a 48h e apresentou 66 conexões em sua rede (Tabela Suplementar S4). O gene que apresentou maior número de conexões nessa rede foi Phvul.002G096500, com 125 conexões. Corresponde a uma proteína UDP-glucosyl transferase, e foi regulado positivamente no genótipo suscetível, nos contrastes realizados, quando comparado ao genótipo resistente.

Figura 6. Redes de co-expressão de genes pertencentes aos grupos Inter R e Inter S identificados nos diferentes contrastes considerando os tempos 0, 48 e 96 após a inoculação das cultivares Ouro Vermelho (resistente) e BRS Estilo (suscetível) com o isolado Lv 134 da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum*. (A) genes Inter R obtidos nos contrastes a partir do genótipo resistente; (B) genes Inter R obtidos nos contrastes a partir do genótipo suscetível; (C) genes Inter S obtidos nos contrastes a partir do genótipo resistente; (D) genes Inter S obtidos nos contrastes a partir do genótipo suscetível.



### DEGs encontrados em locos associados a resistência à raça 65

Locos como *Co-01*, *Co-02*, *Co-03*, *Co-04*, *Co-05*, *Co-06* e *Co-15* já foram previamente associados à resistência de cultivares de feijão à raça 65 de *C. lindemuthianum* (Bisneta &

Gonçalves-Vidigal, 2020; Paulino et al., 2021; Alzate- Marin & Sartorato, 2004; Vidigal Filho et al., 2020; Vieira et al., 2018). Os genes localizados próximos a esses locos descritos na literatura, que fizeram parte da rede de expressão no genótipo resistente, e que também apresentaram padrões de expressão diferencial entre as cultivares resistente e suscetível, nos contrastes envolvendo os tempos de 0, 48 e 96 hai, foram investigados.

O loco *Co-1* foi previamente mapeado na região genômica de 49.583.965 pares de bases (pbs) do cromossomo Pv01, pelo marcador ss715645251 (Campa et al., 2014). Aqui, foi verificada a presença de 13 genes próximos a esse loco, sendo destes, apenas um DEG presente na rede de co-expressão dos genes Inter R (localizada num intervalo de 500 kb acima e abaixo dessa região). O gene Phvul.001G243300, codificador de uma fosfolipase C2, passou a ser exclusivamente expresso pelo genótipo resistente a 96 hai, quando comparado com o tempo de 48 hai. Já para o loco *Co-04*, localizado no Pv08 associado ao marcador SAS13 (2,281,755 pb) (Oblessuc et al., 2015), quatro proteínas RLK-LRR com domínios de lelectinas foram encontradas. Uma delas, Phvul.008G028400, foi regulada positivamente a 96 hai e integrada na rede de co-expressão dos genes Inter R. No loco *Co-06*, cromossomo Pv07, foram identificados 54 genes localizados próximos ao marcador SZ04, que ocupa a posição 9.624.142 pb (Campa et al., 2017). Neste loco, foi identificado um gene expresso diferencialmente entre os contrastes analisados, no presente estudo. O gene Phvul.007G095300, codificante do fator de transcrição GATA, foi regulado positivamente somente no genótipo resistente a 96 hai.

## DISCUSSÃO

No presente estudo, analisamos plantas em interação compatível e incompatível com o isolado Lv 134, da raça 65, de *C. lindemuthianum*, nos tempos 0, 48 e 96 hai. As análises revelam alterações nos padrões de expressão gênica que são chaves para um entendimento profundo dos mecanismos moleculares envolvidos no processo de resistência da planta ao patógeno. O entendimento de tais mecanismos torna-se uma importante ferramenta para o manejo da doença, fornecendo uma base para o processo de obtenção de cultivares resistentes. A escolha da raça 65, neste estudo, vem com a intenção de oferecer um panorama sobre a resposta de plantas resistentes e suscetíveis a essa raça, tão relevante para programas de melhoramento no Brasil, dada sua ampla distribuição, elevado número de isolados fúngicos e

alta patogenicidade dos mesmos (Coelho et al. 2016; Davide & de Souza, 2009; Ribeiro et al. 2016; Vidigal Filho et al. 2020).

O ensaio fenotípico foi realizado de modo a acompanhar e avaliar os sintomas da doença nas cultivares utilizadas neste estudo (Figura 1). Após o procedimento de inoculação, os primeiros sintomas tornaram-se visíveis na cultivar suscetível cerca de 96 hai. Este mesmo padrão foi observado também por Silva et al. (2021). Após a infecção do patógeno, os conídios se aderem na superfície das plantas, liberando o tubo germinativo e conseqüentemente formando o apressório, que permite a penetração na cutícula da planta. A partir de então, há a formação de vesículas de infecção e diferenciação das hifas primárias, caracterizando a fase biotrófica do fungo, em que a célula hospedeira permanece viva, que dura aproximadamente 24 horas (O'Connell et al. 1985). No período de 48 horas após a penetração, hifas secundárias necrotróficas são formadas e inicia-se a desintegração das células com hifas primárias e secundárias, caracterizando a segunda fase de vida do patógeno, necrotrófica. O processo de degradação do tecido vegetal inicia-se aqui e se completa em cerca de 60 a 72 horas após a infecção. Entretanto, sintomas macroscópicos só são vistos a partir de 96 horas após a infecção (O'Connell et al. 1985; Skipp & Deverall, 1972). Esses importantes marcos no processo de infecção foram considerados na escolha dos tempos de avaliação de 0, 48 e 96 hai do presente estudo. Dessa forma, foi possível analisar a modulação dos padrões de expressão gênica da planta em resposta às diferentes fases de infecção do patógeno.

Os contrastes envolvendo a comparação dos genótipos resistente e suscetível no mesmo tempo de infecção, e envolvendo a evolução transcricional de cada cultivar, comparando dois tempos, foram realizados, e a interseção deles permitiu separar dois conjuntos de DEGs, nos tempos de 48 e 96 hai (Tabela 1). Os resultados das análises funcionais, como anotações GO e vias metabólicas, indicam que o conjunto de genes Inter R e Inter S são potencialmente relacionados aos mecanismos de resistência e suscetibilidade, respectivamente, oferecendo um indício do caminho de resposta que a planta conduz para a resistência (Tabela 2; Tabela suplementar S2, S3).

A célula reconhece o patógeno por meio de seus receptores extracelulares, que também são conhecidos por PRR. Proteínas quinases, como as codificadas pelos genes Phvul.003G024000, Phvul.002G115800 e Phvul.002G115900, constituem o maior grupo de receptores e são conhecidas por sua atuação no processo de resistência (Bisneta & Gonçalves-Vidigal, 2020; Dambroz et al. 2022). Além do reconhecimento, as proteínas quinases atuam na

comunicação celular, e isso ocorre a partir da autofosforilação e transfosforilação à jusante de outras proteínas (Hubbard & Miller, 2007). Dessa forma, a expressão de quinases faz-se presente ao longo de todo o tempo de infecção do patógeno, sendo anotadas no genótipo resistente a 96 hai como processo de fosforilação de proteína (Tabela 2). Quando o patógeno consegue inserir seu efector na célula, o reconhecimento é realizado de modo específico por proteínas da classe NBS-LRR, que é codificada como por exemplo, pelo gene Phvul.002G021700. Nesse estudo, tais proteínas foram identificadas em ambos os genótipos a 48 horas, entretanto, maior quantidade foi ativada na resposta da planta resistente (Tabela suplementar S2). Dada a importância dessas proteínas, elas foram destacadas entre as mais conectadas na rede de co-expressão dos genes Inter R no genótipo resistente (Tabela suplementar S4). A importância e ativação desses receptores no patossistema feijoeiro-antracnose já foi anteriormente relatada por Alvarez-Diaz et al. (2022) e Padder et al. (2016).

A indução de resistência começa no local de infecção a partir de uma cascata de reações bioquímicas, em que os compostos sinalizadores passam a mensagem à célula sobre o que está acontecendo, permitindo que ela prepare sua resposta (Dangl & Jones, 2006). Nesse sentido, um mensageiro bastante conhecido por sua atuação nos mecanismos de resistência é o ácido salicílico. Este, juntamente com fitoalexinas, são formados a partir da via dos fenilpropanóides (Yadav et al. 2020). Genes, como o Phvul.006G149600 e o Phvul.005G127100, codificadores da enzima arogenato desidratase, são precursores da enzima inicial dessa via, fenilalanina (Tabela 2). Tais genes fazem parte da rede de co-expressão dos genes Inter R do genótipo resistente (Tabela suplementar S4). A resistência de *Glycine max* ao *Phytophthora sojae* foi relacionada com a ativação dessa via (Li et al. 2023). Para o patossistema feijoeiro-antracnose, a importância da via foi anteriormente relatada para outras raças, a partir de análises de expressão de fenilalanina amônia-liase (PAL<sub>2</sub>) (Borges et al. 2012; Fraire-Velázquez & Lozoya-Gloria, 2003; Obléssuc et al. 2012, Silva et al. 2021).

Outra via de sinalização é a via do ácido jasmônico, que é produzido por ácido linoleico, um importante ácido graxo natural. A via de produção de ácido linoleico também foi enriquecida no conjunto de genes Inter R, sendo também associada a sinalização que leva à resistência à raça 65 (Tabela suplementar S4). Genes como Phvul.006G185300, Phvul.005G156800 e Phvul.009G262900, que codificam lipoxigenases, estão envolvidos nessa via. Esses, foram expressos diferencialmente no genótipo resistente. E fizeram parte da rede de co-expressão dos genes Inter R (Tabela 2; Tabela suplementar S4). A associação com a resposta

de plantas a patógenos tem sido observada para diferentes patossistemas, por exemplo, na resistência do tabaco ao patógeno bacteriano da podridão mole (Sumayo et al. 2014), bem como na resistência do arroz à brusone (Yara et al. 2008). Outro gene que teve sua expressão bastante correlacionada nas redes pertence à família GDSL-like Lipase/Acylhydrolase (Tabela suplementar S4). A superexpressão desse gene em *Arabidopsis thaliana* melhorou sua resistência ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* por meio da modulação de vias dependentes de ácido salicílico e ácido jasmônico (Ding et al. 2020).

Uma terceira via de sinalização que se mostrou importante para o mecanismo de resistência do feijoeiro à raça 65 é a via de metabolismo de glicerolípídeos (Tabela suplementar S3). Glicerol-3-fosfato e ácido oleico são duas importantes moléculas sinalizadoras associadas à resistência a patógenos fúngicos em plantas (Li et al. 2020). A resistência do trigo ao oídio é induzida por glicerol pela regulação do metabolismo de ácidos graxos vegetais, promovendo um *cross-talk* de hormônios com ácido jasmônico e ácido salicílico, induzindo a expressão de genes relacionados a patogênese (Li et al. 2020).

Outro caminho de ativação das respostas de defesa se dá a partir da sinalização retrógrada. Por esse mecanismo, espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas em peroxissomos e outras organelas, ativam vias de transdução de sinais, desencadeando respostas rápidas e adaptativas (Su et al. 2019). Além disso, nos peroxissomos, ocorre a biossíntese de fitohormônios, como ácido indol-3-acético, ácido jasmônico e ácido salicílico (Su et al. 2019). O processo biológico relacionado a fissão de peroxissomos foi anotado no conjunto de genes Inter R do genótipo resistente a 48 horas (Tabela 2). A proteína matrix metalloproteínase teve seu gene codificante como o segundo mais conectado na rede Inter R do genótipo resistente (Tabela suplementar S4), e sua atuação no mecanismo de defesa em plantas ainda vem sendo elucidado. No tomateiro, tais genes funcionam como reguladores positivos na resposta de defesa contra *Botrytis cinerea*, atuando como um controlador do acúmulo de ROS (Li et al. 2015).

Fatores de transcrição têm sido associados à resposta de defesa a estímulos bióticos. Foi observada regulação positiva de genes WRKY e bZIP no genótipo resistente no intervalo de 48 hai, e estiveram presentes na rede de co-expressão dos genes Inter R (Tabelas suplementares S3 e S4). Os fatores de transcrição WRKY são associados às vias de sinalização de ácido salicílico e etileno, e sua atuação já foi relatada na resposta de *Arabidopsis* ao fungo necrotrófico *Botrytis cinerea*, e na infecção de milho com o fungo *Aspergillus flavus*

(Birkenbihl et al. 2012; Fountain et al. 2015). Padder et al. (2016), por sua vez, associaram a regulação desses fatores com o genótipo suscetível. Os fatores bZIP também são associados à via de sinalização de ácido salicílico, e já foi anteriormente associada com a resposta do feijoeiro a antracnose (Padder et al. 2016).

Os mecanismos de sinalização celular levam a uma resposta da planta a partir da síntese de proteínas relacionadas à patogênese, como por exemplo, as proteínas da subfamília MLP, codificadas pelos genes Phvul.011G183500, Phvul.011G183766 e Phvul.011G183832, que estiveram presentes na rede de genes Inter R do genótipo resistente (Tabela suplementar S4). Também foram representadas pela anotação do processo biológico resposta a estímulo biótico nos genes Inter R a 48 e 96 hai e Inter S a 48 hai (Tabela 2). Essas proteínas correspondem a uma subfamília da família de proteínas Bet v\_1. Membros dessa família respondem a estresses bióticos e abióticos e desempenham papéis importantes no crescimento e desenvolvimento das plantas, incluindo resistência a doenças e tolerância ao estresse (Song et al. 2020). A proteína MLP 28 permitiu o aumento da reação de resistência ao Potato virus Y em *Nicotiana benthamiana* (Song et al. 2020). Outro gene relacionado à patogênese, que apresentou associação significativa com outros genes na rede de co-expressão Inter R, foi o gene que codifica proteína de patogênese semelhante a taumamatina (Phvul.002G107900) (Tabela suplementar S4). Tal proteína é associada com a resistência do trigo ao fungo *Puccinia triticina*, responsável pela ferrugem da folha (Zhang et al. 2018).

Após a infiltração do patógeno na parede celular, outra resposta da planta é a síntese de novos carboidratos, envolvidos com a remodelagem da parede que é quebrada pelo patógeno na tentativa de infecção (Souza et al. 2017), como a celulose (codificada pelos genes Phvul.002G136300, Phvul.005G001000), que foi regulada positivamente no genótipo resistente (Tabela suplementar S2). O processo associado ao metabolismo de celulose foi anotado nos genes Inter R e Inter S a 48 horas, entretanto, se manteve ao longo do tempo, somente no conjunto de genes Inter R, no genótipo resistente, mostrando que é uma resposta mais intensificada e contínua (Tabela 2; Tabela suplementar S4). Nos hospedeiros suscetíveis, a papila e a espessura da parede secundária geralmente são deficientes ou pobremente desenvolvidas (Matiello, Barbieri & Carvalho, 1997). Outros tipos de carboidratos associados à composição da parede são os glucanos e pectinas. Para o primeiro, a via de anotação referente à sua síntese foi bem representada pela expressão positiva, no genótipo resistente, de genes xiloglucano endotransglucosilase/hidrolase 6 (Phvul.003G147300 e Phvul.003G231900). Para

o segundo, pela via referente ao processo de modificação da parede, anotada no genótipo resistente, e representada por genes tais como Phvul.005G011900, Phvul.005G184400, Phvul.009G222100 e Phvul.010G123132 (Tabela 2; Tabelas suplementares S2 e S4).

Por outro lado, genes associados ao metabolismo de carboidratos, como enzimas beta glucosidase e hidrolases (Phvul.005G082800, Phvul.005G130900), presentes nas redes de co-expressão de genes Inter R, tendem a ser regulados negativamente no genótipo resistente, quando comparados com o genótipo suscetível (Tabelas suplementares S2 e S4). A energia economizada com a regulação negativa de processos associados ao metabolismo primário e fotossíntese é desviada e utilizada para a resposta de defesa da planta (Rojas et al. 2014).

Dando enfoque para os genes Inter R, no genótipo suscetível, genes da família de proteína de resposta a auxina do tipo SAUR, como Phvul.006G022900 e Phvul.009G001400, estão presentes em sua rede de co-expressão (Tabela suplementar S4). A sinalização aprimorada de auxina pode promover o desenvolvimento de doenças em algumas interações planta-patógeno. A presença de auxina livre aumentou em plantas infectadas com o patógeno fúngico *Puccinia graminis*, bem como com patógenos bacterianos *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas campestris* e *Ralstonia solanacearum* (Chen et al. 2000; Denancé et al. 2013; Ding et al. 2008; Kunkel & Harper, 2018; O'Donnell et al. 2003; Yin et al. 2014). Transportadores de açúcar, como Phvul.002G073100, Phvul.001G129500 e Phvul.007G083300 também foram regulados positivamente a 96 hai no genótipo suscetível (Tabela suplementar S2), e fazem parte da rede Inter S do genótipo suscetível (Tabela suplementar S4). Padder et al. (2016) verificaram a expressão desses genes 72 hai. Tal regulação pode contribuir para a sobrevivência do fungo na planta, visto que várias enzimas de quebra de açúcar são relatadas como cruciais para a manutenção do fungo em lesões necrotróficas (Padder et al. 2016). As atividades de genes semelhantes à nodulina, que também atuam no transporte de açúcar, são importantes para os patógenos melhorarem sua aptidão durante a colonização do hospedeiro (Denancé et al. 2013).

Ao observar o conjunto de genes Inter S pode-se notar, além da ativação da via dos fenilpropanoides, duas vias associadas a biossíntese de metabólitos secundários, incluindo a via de biossíntese de flavonoide, isoflavonoide alcalóides de tropano, piperidina e piridina, e a via biossíntese de sesquiterpenóides e triterpenóides, as quais foram significativamente enriquecidas considerando os contrastes e suas interseções. Essas vias permitem a formação de fitoalexinas, que são definidas como metabólitos antimicrobianos de baixo peso que são sintetizados e se acumulam nas plantas após um desafio com patógenos (Paxton, 1981). No



entanto, a contribuição eficiente de metabólitos secundários de plantas para a imunidade requer que os produtos se acumulem nos locais e tempos certos, e em quantidades suficientes para cumprir suas funções, visto que a colonização de plantas por microrganismos patogênicos é um processo espacialmente dinâmico (Piasekca et al. 2015). O gene central da rede Inter S (102 conexões) foi o Phvul.002G096500, que corresponde a uma proteína UDP-glucosyl transferase. A expressão da glucosiltransferase é regulada pelo desenvolvimento e induzida por desoxinivalenol, bem como ácido salicílico, etileno e ácido jasmônico. O processo biológico associado a biossíntese de glutamato foi anotado nos genes Inter S (Tabela 2). Durante as interações com patógenos, o metabolismo de glutamato pode levar a dois estados metabólicos, o primeiro denominado “resistência”, no qual a viabilidade celular é mantida, ou a um estado metabólico oposto, denominado “evasão”, no qual o processo de morte celular é facilitado. Patógenos hemibiotróficos desenvolveram estratégias para explorar esse processo a seu benefício, e facilitar a infecção (Seifi et al. 2013).

Diferentes locos de resistência vêm sendo associados à resposta à raça 65 do patógeno (Bisneta & Gonçalves-Vidigal, 2020; Paulino et al. 2021; Alzate-Marin & Sartorato, 2004; Vidigal Filho et al. 2007; Vieira et al. 2018). Nas análises deste estudo, foi verificada a expressão diferencial de genes localizados nos locos *Co-01*, *Co-04* e *Co-06*, presentes nos cromossomos Pv01, Pv08 e Pv11, respectivamente. No primeiro loco, a Fosfolipase C foi regulada positivamente na cultivar resistente, e em sua rede de co-expressão de genes Inter R (Tabelas suplementares S2 e S4). Essa enzima hidrolisa a ligação fosfodiéster no lado glicérol dos fosfolipídios para produzir diacilglicerol (DAG) e um grupo principal fosforilado. O DAG é subsequentemente fosforilado por uma diacilglicerol quinase em ácido fosfatídico, por sua vez, empregado como segundo mensageiro durante a sinalização mediante reconhecimento de efetores de patógenos (González-Mendoza et al. 2021). A participação de vias de sinalização fosfolipídica na resposta de plantas a infecções bacterianas têm sido bem documentadas, como por exemplo, em *Arabidopsis* em resposta à bactéria *Pseudomonas syringae* (Krčková et al. 2017; Kiba et al. 2020; Gonzales-Mendonza et al. 2021). Um aglomerado de proteínas quinases com domínios de malectina foram localizados no cromossomo Pv08, sendo uma delas regulada positivamente no genótipo resistente a 96 hai, e presente em sua rede de co-expressão de genes Inter R (Tabelas Suplementares S2 e S4). Tais proteínas funcionam como sensores de parede celular. A detecção de perturbações na parede e a consequente sinalização são cruciais para o crescimento e sobrevivência da planta (Yang et al. 2021). Dambroz et al. (2022) associaram

algumas proteínas desta classe a locos de resistência a antracnose distribuídos nos cromossomos de feijão comum. Associado ao loco *Co-06* foi encontrado um fator de transcrição GATA regulado positivamente e presente na rede R do genótipo resistente (Tabela suplementar S4). A interação entre o fator de transcrição GATA e a via de sinalização do ácido jasmônico já foi anteriormente relatada (Peng et al. 2021).

Sabe-se que a reação de resistência da cultivar Ouro Vermelho ao isolado Lv 134 da raça 65 de *C. lindemuthianum* é ocasionada por um único loco de resistência (Costa et al. 2021). Costa et al. (2021) identificaram alguns marcadores SNPs significativos no cromossomo Pv04 para a interação entre a cultivar Ouro Vermelho e isolado Lv 134, também utilizados em nosso estudo, e propuseram o gene Phvul.004G001500, que codifica um fator de alongação, e o gene Phvul004G005800, que codifica uma proteína hipotética com domínio citocromo P450. Ao analisar os perfis de expressão desses genes, o primeiro não foi considerado DEG nos contrastes analisados, enquanto o segundo, foi regulado negativamente no genótipo resistente, quando comparado com o suscetível a 96 hai, e não fez parte da composição das redes de co-expressão associadas ao genótipo resistente (Tabelas suplementares S2 e S4). Entretanto, ainda não foi identificado qual seria esse loco especificamente. Como resultado deste estudo, nota-se expressão significativa de genes relacionados à resistência, integrados em redes de co-expressão, localizados no cromossomo Pv02 da espécie (Tabela Suplementar S4). Este cromossomo foi anteriormente associado à resistência à raça 65 na cultivar BAT 93 e Xana, a partir dos locos *Co-u* e *CoPv02c<sup>X</sup>*, respectivamente (Campa et al. 2014; Geffroy et al. 2008; Paulino et al. 2021). Dessa forma, acredita-se tratar-se de um cromossomo com potencial associação. Entretanto, faz-se necessária o complemento e suplemento na forma de estudos posteriores para identificação de qual seria o loco envolvido com a resistência da cultivar Ouro Vermelho à raça 65 e sua localização cromossômica.

Neste estudo, foram avaliados os perfis transcricionais de genótipos de feijão em interação compatível e incompatível com o isolado Lv 134 da raça 65 de *C. lindemuthianum*, o que possibilitou a análise de como se dá o remodelamento na ativação de genes envolvidos na resposta de resistência da planta diante das diferentes fases de infecção do patógeno. Dessa forma, foi possível a obtenção de uma lista de genes envolvidos na resistência, seus perfis de expressão, e sua interação em redes de co-expressão. Além de associar processos biológicos e vias metabólicas relacionadas com a resistência à raça 65. Considerando a especificidade do controle genético da resistência em patossistemas envolvendo diferentes raças, esse trabalho

apresenta um panorama de resposta à raça 65, tão relevante no cenário econômico de produção da cultura do feijoeiro no Brasil.

### **Material Suplementar**

O material suplementar se encontra disponível através do link <https://drive.google.com/drive/u/1/folders/1Ubc0ov5TGZeDjjDEHuprq-LPMNVN20Vm>.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) no Brasil pelo apoio financeiro para o desenvolvimento dessa pesquisa.

### **Referências Bibliográficas**

Alexa A. & Rahnenfuhrer J. (2022). *topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology*. R package version 2.50.0. Disponível em: <https://bioconductor.statistik.tu-dortmund.de/packages/3.3/bioc/vignettes/topGO/inst/doc/topGO.pdf>. Acessado em: 26 de março de 2023.

Alvarez-diaz, J. C. Laug, R. Delannoy, E. Roux, C. P. & Gratiás, A. (2022). *Genome-Wide Transcriptomic Analysis of the Effects of Infection with the Hemibiotrophic Fungus Colletotrichum lindemuthianum on Common Bean*. *Plants*, 11(15), 1995. <https://doi.org/10.3390/plants11151995>

Alzate-Marin, A. L. & Sartorato, A. (2004). Analysis of the pathogenic variability of *Colletotrichum lindemuthianum* in Brazil. *Annual report-bean improvement cooperative*, 47, 241-242. Disponível em: <https://handle.nal.usda.gov/10113/IND43758334>. Acessado em: 14 de janeiro de 2023.

Andersen, E. J. Ali, S. Byamukama, E. Yen, Y. & Nepal, M. P. (2018). Disease resistance mechanisms in plants. *Genes*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/genes9070339>

Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data*. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acessado em: 26 de março de 2023.

Benjamini, Y. & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. In *J. R. Statist. Soc. B* (Vol. 57, Issue 1). Disponível em: <https://rss.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>. Acessado em: 14 de Janeiro de 2023.

Birkenbihl, R. P. Diezel, C. & Somssich, I. E. (2012). Arabidopsis WRKY33 is a key transcriptional regulator of hormonal and metabolic responses toward *Botrytis cinerea* infection. *Plant physiology*, 159(1), 266-285. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192641>

Bisneta, M. V. & Gonçalves-Vidigal, M. C. (2020). Integration of anthracnose resistance loci and RLK and NBS-LRR-encoding genes in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. *Crop Science*. 60(6), 2901-2918. <https://doi.org/10.1002/csc2.20288>

Bolger, A. M. Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>

Boller, T. & Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 379–407. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105346>

Bono, H. Ogata, H. Goto, S. & Kanehisa, M. (1998). Reconstruction of amino acid biosynthesis pathways from the complete genome sequence. *Genome research*, 8(3), 203-210. <https://10.1101/gr.8.3.203>

Borges, A. Melotto, M. Tsai, S. M. & Caldas, D. G. G. (2012). Changes in spatial and temporal gene expression during incompatible interaction between common bean and anthracnose

pathogen. *Journal of Plant Physiology*, 169(12), 1216–1220.  
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.04.003>

Burt, A. J. Manilal William, H. Perry, G. Khanal, R. Peter Pauls, K. Kelly, J. D. & Navabi, A. (2015). Candidate gene identification with SNP marker-based fine mapping of anthracnose resistance gene *Co-4* in common bean. *PLoS ONE*, 10(10), 1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139450>

Campa, A. Rodríguez-Suárez, C. Giraldez, R. & Ferreira, J. J. (2014). Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a RIL population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biology*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2229-14-115>

Campa, A. Trabanco, N. & Ferreira, J. J. (2017). Identification of clusters that condition resistance to anthracnose in the common bean differential cultivars AB136 and MDRK. *Phytopathology*, 107(12), 1515–1521. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-17-0012-R>

Chen, Z. Kloek, A. P. Boch, J. Katagiri, F. & Kunkel, B. N. (2000). The *Pseudomonas syringae* avrRpt2 gene product promotes Pathogen virulence from Inside Plant Cells. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(12), 1312-1321. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.12.1312>

Choudhary, N. Bawa, V. Paliwal, R. Singh, B. Bhat, M. A. Mir, J. I. Gupta, M. Sofi, P.A. Thudi, M. Varshney, R.K. & Mir, R. R. (2018). Gene/QTL discovery for Anthracnose in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from North-western Himalayas. *PLoS One*, 13(2), e0191700.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191700>

Coêlho, M. Gonçalves-Vidigal, M. C. de Sousa, L. L. Nunes, M. P. B. A. Azevedo, R. F. & Galván, M. Z. (2016). Caracterização da raça 65 de *Colletotrichum lindemuthianum* utilizando sequenciamento das regiões ITS. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 38(4), 429–438.  
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i4.30586>

CoreTeam, R. (2018). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (Vol. 2).  
<https://www.r-project.org/>

Costa, L. C. Nalin, R. S. Ramalho, M. A. P. & de Souza, E. A. (2017). Are duplicated genes responsible for anthracnose resistance in common bean? *PLoS ONE*, 12(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173789>

Costa, L. C. Nalin, R. S. Dias, M. A. Ferreira, M. E. Song, Q. Pastor-Corrales, M. A. Hurtado-Gonzales, O. P. & de Souza, E. A. (2021). Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 134, 543-556. <https://doi.org/10.1007/s00122-020-03713-x>

Csardi, Gabor & Tamas Nepusz. The igraph software package for complex network research. *InterJournal, complex systems*, 1695.5 (2006): 1-9. Disponível em: <https://igraph.org/c/html/latest/>. Acessado em: 14 de Janeiro de 2023.

Davide, L. M. C. & de Souza, E. A. (2009). Pathogenic variability within race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum* and its implications for common bean breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 9(1), 23–29. <https://doi.org/10.12702/1984-7033.v09n01a04>

Dangl, J. L. & Jones, J. D. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826-833. <https://doi.org/10.1038/35081161>

Dambroz, C. M. S. Aono, A. H. Silva, E. M. D. A. & Pereira, W. A. (2022). Genome-wide analysis and characterization of the LRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bean. *bioRxiv*, 2022-10. <https://doi.org/10.1101/2022.10.03.510363>

de Ron, A. M. González, A. M. Rodiño, A. P. Santalla, M. Godoy, L. & Papa, R. (2016). History of the common bean crop: Its evolution beyond its areas of origin and domestication. *Arbor*, 192(779). <https://doi.org/10.3989/arbor.2016.779n3007>

Denancé, N. Ranocha, P. Oria, N. Barlet, X. Rivière, M. P. Yadeta, K. A. Hoffmann, L. Perreau, F. Clément, G. Maia-Grondard, A. van den Berg, G. C. M. Savelli, B. Fournier, S. Aubert, Y. Pelletier, S. Thomma, B. P. H. J. Molina, A. Jouanin, L. Marco, Y. & Goffner, D. (2013).

Arabidopsis *wat1* (walls are thin1)-mediated resistance to the bacterial vascular pathogen, *Ralstonia solanacearum*, is accompanied by cross-regulation of salicylic acid and tryptophan metabolism. *Plant Journal*, 73(2), 225–239. <https://doi.org/10.1111/tpj.12027>

Ding, L. N. Li, M. Guo, X. J. Tang, M. Q. Cao, J. Wang, Z. Liu, R. Zhu, K. M. Guo, L. Liu, S. Y. & Tan, X. L. (2020). Arabidopsis GDSL1 overexpression enhances rapeseed *Sclerotinia sclerotiorum* resistance and the functional identification of its homolog in *Brassica napus*. *Plant Biotechnology Journal*, 18(5), 1255–1270. <https://doi.org/10.1111/pbi.13289>

Ding, X. Cao, Y. Huang, L. Zhao, J. Xu, C. Li, X. & Wang, S. (2008). Activation of the indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3-8 suppresses expansin expression and promotes salicylate- and jasmonate-independent basal immunity in rice. *Plant Cell*, 20(1), 228–240. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055657>

Dobin, A. Davis, C. A. Schlesinger, F. Drenkow, J. Zaleski, C. Jha, S. Batut, P. Chaisson, M. & Gingeras, T. R. (2013). STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>

Ferreira, J. J. Campa, A. & Kelly, J. D. (2013). Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. In *Translational Genomics for Crop Breeding, Volume I: Biotic Stress: Vol. I* (Issue Flor 1955, pp. 151–181). <https://doi.org/10.1002/9781118728475.ch9>

Flor, H. H. (1971). *Current status of the gene-fob-gene concept*. 275–296. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>. Acessado em: 14 de março de 2023.

Fontenelle, M. R. Santana, M. F. Cnossen, A. Bazzolli, D. M. S. Bromonschenkel, S. H. de Araújo, E. F. & de Queiroz, M. V. (2017). Differential expression of genes during the interaction between *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. *European Journal of Plant Pathology*, 147(3), 653–670. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1033-4>

Fountain, J. C. Raruang, Y. Luo, M. Brown, R. L. Guo, B. & Chen, Z. Y. (2015). Potential roles of WRKY transcription factors in regulating host defense responses during *Aspergillus flavus* infection of immature maize kernels. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 89, 31-40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pmpp.2014.11.005>

Fraire-Velázquez, S. & Lozoya-Gloria, E. (2003). Differential early gene expression in *Phaseolus vulgaris* to Mexican isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* in incompatible and compatible interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 63(2), 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2003.10.004>

Geffroy, V. Sévignac, M. Billant, P. Dron, M. & Langin, T. (2008). Resistance to *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus vulgaris*: A case study for mapping two independent genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 116 (3), 407–415. <https://doi.org/10.1007/s00122-007-0678-y>

Gene Ontology Consortium. (2001). Creating the gene ontology resource: design and implementation. *Genome research*, 11: 1425-1433. <https://10.1101/gr.180801>

González, A. M. Yuste-Lisbona, F. J. Rodiño, A. P. De Ron, A. M. Capel, C. García-Alcázar, M. Lozano, R. & Santalla, M. (2015). Uncovering the genetic architecture of *Colletotrichum lindemuthianum* resistance through QTL mapping and epistatic interaction analysis in common bean. *Frontiers in Plant Science*, 6, 141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00141>

González-Mendoza, V. M. Sánchez-Sandoval, M. E. Castro-Concha, L. A. & Teresa Hernández-Sotomayor, S. M. (2021). Phospholipases c and d and their role in biotic and abiotic stresses. *Plants*, 10:5. <https://doi.org/10.3390/plants10050921>

Goodstein, D. M. Shu, S. Howson, R. Neupane, R. Hayes, R. D. Fazo, J. ... & Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1178-D1186. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr944>



Hoseinzadeh, A. H. Soorni, A. Shoorooei, M. Torkzadeh Mahani, M. Maali Amiri, R. Allahyari, H. & Mohammadi, R. (2020). Comparative transcriptome provides molecular insight into defense-associated mechanisms against spider mite in resistant and susceptible common bean cultivars. *PLoS One*, 15(2), e0228680. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228680>

Hubbard, S. R. & Miller, W. T. (2007). Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2007.02.010>

Kanehisa, M. & Goto, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Reserch*. 28, 27-30 (2000). <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>

Kiba, A. Nakano, M. Hosokawa, M. Galis, I. Nakatani, H. Shinya, T. Ohnishi, K. & Hikichi, Y. (2020). Phosphatidylinositol-phospholipase C2 regulates pattern-triggered immunity in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Experimental Botany*, 71(16), 5027–5038. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa233>

Kolde, R. "Pheatmap: pretty heatmaps." R package version 1.2 (2012): 726. Disponível em: <https://rdr.io/cran/pheatmap/>. Acessado em: 26 de Março de 2023.

Krčková, Z. Kocourková, D. Daněk, M. Brouzdová, J. Pejchar, P. Janda, M. Pokotylo, I. Ott, P. G. Valentová, O. & Martinec, J. (2018). The *Arabidopsis thaliana* non-specific phospholipase C2 is involved in the response to *Pseudomonas syringae* attack. *Annals of Botany*, 121(2), 297–310. <https://doi.org/10.1093/aob/mcx160>

Kunkel, B. N. & Harper, C. P. (2018). The roles of auxin during interactions between bacterial plant pathogens and their hosts. *Journal of Experimental Botany*, 69: 2, pp. 245–254. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx447>

Li, D. Zhang, H. Song, Q. Wang, L. Liu, S. Hong, Y. Huang, L. & Song, F. (2015). Tomato SL3-MMP, a member of the Matrix metalloproteinase family, is required for disease resistance

against *Botrytis cinerea* and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. *BMC Plant Biology*, 15, 1-18. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0536-z>

Li, Y. Qiu, L. Liu, X. Zhang, Q. Zhuansun, X. Fahima, T. Krugman, T. Sun, Q. & Xie, C. (2020). Glycerol-induced powdery mildew resistance in wheat by regulating plant fatty acid metabolism, plant hormones cross-talk, and pathogenesis-related genes. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2), 673. <https://doi.org/10.3390/ijms21020673>

Li, P. Liu, D. Hu, J. & Yu, B. (2023). RNA-seq analysis of soybean (*Glycine max*) responding to *Phytophthora sojae*. *Journal of Phytopathology (online edition)*. <https://doi.org/10.1111/jph.13166>

Love, M. I. Huber, W. & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Malapi-Wight, M. Adhikari, B. Zhou, J. Hendrickson, L. Maroon-Lango, C. J. McFarland, C. Foster, J. A. & Hurtado-Gonzales, O. P. (2021). HTS-based diagnostics of sugarcane viruses: Seasonal variation and its implications for accurate detection. *Viruses*, 13(8), 1627. <https://doi.org/10.3390/v13081627>

Mathur, R. S. Barnett H. L. & Lilly, V. G. (1950). Sporulation of *Colletotrichum lindemuthianum* in culture. *Phytopathology*, 40, 104–114. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19501101352>. Acessado em 14 de março de 2023.

Matiello, R. R. Barbieri, R. L. & Carvalho, F. I. F. D. (1997). Resistência das plantas a moléstias fúngicas. *Ciência rural*, 27, 161-168. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/22531>. Acessado em: 14 de março de 2023.

Miranda, R. N. D. Silva, C. M. Porto, A. C. D. M. & Pereira, W. A. (2019). Protocol adjustment improves the extraction of high-quality total RNA from common bean stems infected by

*Sclerotinia sclerotiorum*. *Ciência e Agrotecnologia*, 43. <https://doi.org/10.1590/1413-7054201943024618>

Mutwil M. Usadel B. Schutte M. Loraine A. Ebenhoh O & Persson S. (2009). Assembly of an interactive correlation network for the Arabidopsis genome using a novel heuristic clustering algorithm. *Plant Physiology*, 152:29–43. <https://doi.org/10.1104/pp.109.145318>

Oblessuc, P. R. Borges, A. Chowdhury, B. Caldas, D. G. G. Tsai, S. M. Camargo, L. E. A. & Melotto, M. (2012). Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. *PLoS ONE*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043161>

Oblessuc, P. R. Francisco, C. & Melotto, M. (2015). The *Co-4* locus on chromosome Pv08 contains a unique cluster of 18 COK-4 genes and is regulated by immune response in common bean. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(6), 1193–1208. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2500-6>

O’Connell, R. J. Bailey, J. A. & Richmond, D. V. (1985). Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. *Physiological Plant Pathology*, 27(1), 75–98. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(85\)90058-X](https://doi.org/10.1016/0048-4059(85)90058-X)

O’Donnell, P. J. Schmelz, E. A. Moussatche, P. Lund, S. T. Jones, J. B. & Klee, H. J. (2003). Susceptible to intolerance - A range of hormonal actions in a susceptible Arabidopsis pathogen response. *Plant Journal*, 33(2), 245–257. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01619.x>

Padder, B. A. Kamfwa, K. Awale, H. E. & Kelly, J. D. (2016). Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris* - *Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. *PLoS ONE*, 11(11), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165823>

Padder, B. A. Sharma, P. N. Awale, H. E. & Kelly, J. D. (2017). *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *Journal of Plant Pathology*, 99(2), 317–330. <https://doi.org/10.4454/jpp.v99i2.3867>

Paulino, P. P. S. Gonçalves-Vidigal, M. C. Bisneta, M. V. Vidigal Filho, P. S. Nunes, M. P. B. A. Xavier, L. F. S. Martins, V. S. R. & Lacanallo, G. F. (2021). Occurrence of anthracnose pathogen races and resistance genes in common bean across 30 years in Brazil. *Agronomy Science and Biotechnology*, 8, 1–21. <https://doi.org/10.33158/asb.r140.v8.2022>

Paxton, J. D. (1981). Phytoalexins—a working redefinition. *Journal of phytopathology*, 101(2), 106-109. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1981.tb03327.x>

Peng, W. Li, W. Song, N. Tang, Z. Liu, J. Wang, Y. Pan, S. Dai, L. & Wang, B. (2021). Genome-wide characterization, evolution, and expression profile analysis of GATA transcription factors in *Brachypodium distachyon*. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms22042026>

Piasecka, A. Jedrzejczak-Rey, N. & Bednarek, P. (2015). Secondary metabolites in plant innate immunity: conserved function of divergent chemicals. *New Phytologist*, 206(3), 948-964. <https://doi.org/10.1111/nph.13325>

Poppenberger, B. Berthiller, F. Lucyshyn, D. Sieberer, T. Schuhmacher, R. Krska, R. Kuchler, K. Glossl, J. Luschnig, C. & Adam, G. (2003). Detoxification of the *Fusarium mycotoxin* deoxynivalenol by a UDP-glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(48), 47905-47914. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307552200>

Rava, C. A. Molina, J. Kauffmann, M. & Briones, I. (1993). Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. *Fitopatologia Brasileira*, 18(3), 388–391. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/197525>. Acessado em: 14 de março de 2023.

Ribeiro, T. Esteves, J. A. de F. Silva, D. A. Gonçalves, J. G. R. Carbonell, S. A. M. & Chiorato, A. F. (2016). Classificação de raças de *Colletotrichum lindemuthianum* em cultivares diferenciadoras de feijoeiro comum. *Acta Scientiarum - Agronomy*, 38(2), 179–184. <https://doi.org/10.4025/actasciagron.v38i2.27866>

Rojas, C. M. Senthil-Kumar, M. Tzin, V. & Mysore, K. S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 5, Issue FEB). Frontiers Research Foundation. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00017>

Schmutz, J. McClean, P. E. Mamidi, S. Wu, G. A. Cannon, S. B. Grimwood, J. Jenkins, J. Shu, S. Song, Q. Chavarro, C. Torres-Torres, M. Geffroy, V. Moghaddam, S. M. Gao, D. Abernathy, B. Barry, K. Blair, M. Brick, M. A. Chovatia, M. Gepts, P. Goodstein, D. M. Gonzales, M. Hellsten, U. Hyten, D. L. Jia, G. Kelly, J. D. Kudrna, D. Lee, R. Richard, M. M. S. Miklas, P. N. Osorno, J. M. Rodrigues, J. Thareau, V. Urrea, C. A. Wang, M. Yu, Y. Zhang, M. Wing, R. A. Cregan, P. B. Rokhsar, D. S. & Jackson, S. A. (2014). A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nature Genetics*, 46(7), 707–713. <https://doi.org/10.1038/ng.3008>

Schoonhoven, A. Van & Pastor-Corrales, M. A. (1987). Standard system for the evaluation of bean germplasm. *CIAT- Centro Internacional de Agricultura Tropical*, 53. Disponível em: <https://cgspace.cgiar.org/handle/10568/69659>. Acessado em: 14 de março de 2023.

Seifi, H. S. Van Bockhaven, J. Angenon, G. & Höfte, M. (2013). Glutamate metabolism in plant disease and defense: friend or foe?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 475-485. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-12-0176-CR>

Silva, C. M. da, Costa, L. C. Porto, A. C. M. Lima, A. A. Chalfun-Junior, A. de Souza, E. A. & Pereira, W. A. (2021). Differential gene expression in common bean during interaction with race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Tropical Plant Pathology*, 46(5), 518-527. <https://doi.org/10.1007/s40858-021-00447-z>

Skipp, R. A. & Deverall, B. J. (1972). Relationships between fungal growth and host changes visible by light microscopy during infection of bean hypocotyls (*Phaseolus vulgaris*) susceptible and resistant to physiological races of *Colletotrichum lindemuthianum*.

*Physiological Plant Pathology*, 2(4), 357–374. [https://doi.org/10.1016/s0048-4059\(72\)80007-9](https://doi.org/10.1016/s0048-4059(72)80007-9)

Song, L. Wang, J. Jia, H. Kamran, A. Qin, Y. Liu, Y. Hao, K. Han, F. Zhang, C. Li, B. Li, Y. Shen, L. Wang, F. Wu, Y. & Yang, J. (2020). Identification and functional characterization of NbMLP28, a novel MLP-like protein 28 enhancing Potato virus Y resistance in *Nicotiana benthamiana*. *BMC microbiology*, 20(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01725-7>

Souza, C. A. Li, S. Lin, A. Z. Boutrot, F. Grossmann, G. Zipfel, C. & Somerville, S. C. (2017). Cellulose-derived oligomers act as damage-associated molecular patterns and trigger defense-like responses. *Plant Physiology*, 173(4), 2383–2398. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01680>

Su, T. Li, W. Wang, P. & Ma, C. (2019). Dynamics of peroxisome homeostasis and its role in stress response and signaling in plants. *Frontiers in Plant Science*, 10, 705. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00705>

Sumayo, M. S. Kwon, D. K. & Ghim, S. Y. (2014). Linoleic acid-induced expression of defense genes and enzymes in tobacco. *Journal of Plant Physiology*, 171(18), 1757–1762. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2014.08.015>

Tu, J. C. (1985). An improved Mathur's medium for growth sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbios*, 44(178), 87–94.

Vidigal Filho, P. S. Gonçalves-Vidigal, M. C. Bisneta, M. V. Souza, V. B. Gilio, T. A. S. Calvi, A. A. Lima, L. R. L. Pastor-Corrales, M. A. & Melotto, M. (2020). Genome-wide association study of resistance to the anthracnose and angular leaf spot diseases in Brazilian Mesoamerican and Andean common bean cultivars. *Crop Science*, 12, 440–447. <https://doi.org/10.1002/csc2.20308>

Vidigal Filho, P. S. Gonçalves-Vidigal, M. C. Kelly, J. D. & Kirk, W. W. (2007). Sources of resistance to anthracnose in traditional common bean cultivars from Paraná, Brazil. *Journal of Phytopathology*, 155(2), 108–113. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2007.01203.x>

- Vieira, A. F. Almeida, L. C. S. Rodrigues, L. A. Costa, J. G. C. Melo, L. C. Pereira, H. S. Sanglard, D. A. & Souza, T. L. P. O. (2018). Selection of resistance sources to common bean anthracnose by field phenotyping and DNA marker-assisted screening. *Genetics and Molecular Research*, 17(3), 1–10. <https://doi.org/10.4238/gmr18066>
- Yadav, V. Wang, Z. Wei, C. Amo, A. Ahmed, B. Yang, X. & Zhang, X. (2020). Phenylpropanoid pathway engineering: An emerging approach towards plant defense. In *Pathogens* (Vol. 9, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040312>
- Yang, H. Wang, D. Guo, L. Pan, H. Yvon, R. Garman, S. Wu, H. M. & Cheung, A. Y. (2021). Malectin/Malectin-like domain-containing proteins: A repertoire of cell surface molecules with broad functional potential. *The Cell Surface*. 7, 100056. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100056>
- Yara, A. Yaeno, T. Montillet, J. L. Hasegawa, M. Seo, S. Kusumi, K. & Iba, K. (2008). Enhancement of disease resistance to *Magnaporthe grisea* in rice by accumulation of hydroxy linoleic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 370(2), 344–347. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.03.083>
- Yin, C. Park, J. J. Gang, D. R. & Hulbert, S. H. (2014). Characterization of a tryptophan 2-monooxygenase gene from *Puccinia graminis* f. sp. tritici involved in auxin biosynthesis and rust pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 227–235. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-13-0289-FI>
- Zhang, J. Wang, F. Liang, F. Zhang, Y. Ma, L. Wang, H. & Liu, D. (2018). Functional analysis of a pathogenesis-related thaumatin-like protein gene TaLr35PR5 from wheat induced by leaf rust fungus. *BMC Plant Biology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1297-2>
- Zuiderveen, G. H. Padder, B. A. Kamfwa, K. Song, Q. & Kelly, J. D. (2016). Genome-Wide association study of anthracnose resistance in andean beans (*Phaseolus vulgaris*). *PLoS ONE*, 11(6), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156391>

**ARTIGO 2**

Artigo elaborado nas normas e submetido no periódico Scientific Reports

**Genome-wide analysis and characterization of the LRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bean**

**Genome-wide analysis and characterization of**



# theLRR-RLK gene family provides insights into anthracnose resistance in common bean

Caroline Marcela da Silva Dambroz<sup>1</sup>, Alexandre Hild Aono<sup>2</sup>, Edson Mario de Andrade Silva<sup>3</sup>, and Welison Andrade Pereira<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Federal University of Lavras (UFLA), Lavras, MG, Brazil

<sup>2</sup>Molecular Biology and Genetic Engineering Center (CBMEG), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brazil

\*welison.pereira@ufla.br

## ABSTRACT

Anthracnose, caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, is a damaging disease of common beans that can drastically reduce crop yield. The most effective strategy to manage anthracnose is the use of resistant cultivars. There are many resistance loci that have been identified, mapped and associated with markers in common bean chromosomes. The Leucine-rich repeat kinase receptor protein (LRR-RLK) family is a diverse group of transmembrane receptors, which potentially recognizes pathogen-associated molecular patterns and activates an immune response. In this study, we performed in silico analyses to identify, classify, and characterize common bean LRR-RLKs, also evaluating their expression profile in response to the infection by *C. lindemuthianum*. By analyzing the entire genome of *Phaseolus vulgaris*, we could identify and classify 230 LRR-RLKs into 15 different subfamilies. The analyses of gene structures, conserved domains and motifs suggest that LRR-RLKs from the same subfamily are consistent in their exon/intron organization and composition. LRR-RLK genes were found along the 11 chromosomes of the species, including regions of proximity with anthracnose resistance markers. By investigating the duplication events within the LRR-RLK family, we associated the importance of such a family with an expansion resulting from a strong stabilizing selection. Promoter analysis was also performed, highlighting cis elements associated with the plant response to biotic stress. With regard to the expression pattern of LRR-RLKs in response to the infection by *C. lindemuthianum*, we could point out several differentially expressed genes in this subfamily, which were associated to specific molecular patterns of LRR-RLKs. Our work provides a broad analysis of the LRR-RLK family in *P. vulgaris*, allowing an in-depth structural and functional characterization of genes and proteins of this family. From specific expression patterns related to anthracnose response, we could infer a direct participation of RLK-LRR genes in the mechanisms of resistance to anthracnose, highlighting important subfamilies for further investigations.

## Introduction

Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) has a significant importance in the current worldwide agricultural productivity scenario, especially in developing countries in South America, Central America, and southwest Africa<sup>1</sup>. Much of this importance is attributed to the versatility of this crop, which possesses nutritional, environmental, and economic benefits for producers and consumers<sup>2</sup>. However, due to its wide distribution and characteristic planting season, comprising several ecosystems and production systems, the bean crop is exposed to several factors that cause production instability, such as pests and diseases, which can be fungal, bacterial, or viral<sup>2,3</sup>.

Anthracnose is one of the most important diseases that affect the bean crop, caused by the hemibiotrophic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. This disease affects the quality of grains and pods, and can compromise up to 100% of the harvest in susceptible lines under favorable conditions for the pathogen development<sup>1,4</sup>. Genetic resistance is the most effective and safe way to control anthracnose in common beans<sup>5</sup>. Although more than 20 resistance loci, with independent effects, have been identified in different common bean linkage maps<sup>5-8</sup>, the genetic configuration for resistance in this pathosystem is challenging due to the great virulence diversity of *C. lindemuthianum*, which is represented by a large number of physiological races, which co-evolve with the host, allowing the selection of different gene combinations<sup>4,9</sup>. In this sense, several quantitative trait loci (QTLs) have also been mapped for resistance<sup>10</sup>.

Plant response to pathogen infections depends on the innate immunity of each cell and the systemic signs

triggered from infection channels after the pathogen is recognized<sup>11</sup>. Thus, two layers of defense are used to activate the plant immune system. The initial mechanism uses transmembrane pattern recognition receptors (PRRs), which recognize and respond to molecular patterns associated with pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) or microbe-associated molecular patterns (MAMPs).

The reaction triggered by this first mechanism is known as PAMP triggered immunity (PTI). If the pathogen can overcome this initial response by not recognizing PRR receptors or by interrupting the signaling cascade and introducing its effector into the cell, the second response mechanism can be activated, which consists of effector-triggered immunity (ETI). Such a mechanism depends on the specific recognition of the pathogen's effector by a host resistance R protein within the cell, leading to a hypersensitivity response<sup>11,12</sup>. R proteins play a key role at this second level of the plant immune system, both in pathogen recognition and signal transduction during the resistance response<sup>13</sup>.

Receptor-like protein kinases (RLKs) are a comprehensive superfamily of transmembrane receptors that sense stimuli on the cell surface and mediate cell signal transduction through autophosphorylation and subsequent downstream phosphorylation for intercellular communication<sup>14</sup>. The RLK superfamily is currently subdivided into 21 families, which stand out for their important role not only in the host defense system during plant-pathogen interactions but also during plant growth, development, and in response to abiotic and biotic stresses<sup>15,16</sup>.

Structurally, RLKs have a conserved serine/threonine kinase cytoplasmic domain (KD) and an amino-terminal extracellular variable domain (ECD). Most of the ECDs associated with RLK proteins have leucine-rich repeats (LRRs) that favor pathogen recognition due to their structural plasticity capable of detecting different ligands, e.g. proteins, peptides, and lipids<sup>17</sup>. One of the best-studied examples of PRRs in plants is Flagellin-sensitive 2 (FLS2), that recognizes the 22 conserved amino acid of bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana* (flg22) and forms a complex with its co-receptor Brassinosteroid-insensitive 1-associated receptor kinase 1 (BAK1) immediately after the perception to initiate the PTI response<sup>18,19</sup>. The participation of this protein was also verified, based on its expression pattern, in the defense system of *P. vulgaris* when interacting with the race 65 of *C. lindemuthianum*<sup>20</sup>.

LRR-RLKs constitute the largest family of the RLK superfamily and have been characterized in plants such as *A. thaliana*, *Oryza sativa*, *Brassica rapa*, *Solanum lycopersicum*, *Citrus* sp. and *Populus trichocarpa*<sup>16,21-27</sup>. However, despite the increasing characterization of LRR-RLKs in plants in recent years, to our knowledge, a comprehensive analysis has not yet been performed for *P. vulgaris*.

Characterizing a group of proteins in terms of their evolutionary history, structural and functional aspects, and associating this information with the analysis of their expression levels under specific conditions, enable a more accurate understanding of their participation in biological processes, such as plant-pathogen interaction and evolution of plants<sup>27,28</sup>. Furthermore, this information opens up possibilities for practical applications such as the pyramiding of different resistance alleles<sup>12</sup> and the optimization of selection by identifying new loci and pathways related to disease resistance<sup>29</sup>. From this perspective, considering the increasing availability of genomic resources and biocomputational tools, this study aimed to characterize at a genomic scale the *P. vulgaris* LRR-RLK (PvLRR-RLKs) protein subfamily, as well as to study the dynamics of expression in the compatible and incompatible interaction of common bean plants with *C. lindemuthianum*.

## Material and Methods

### LRR-RLK Identification

The identification of the set of LRR-RLKs encoded by common bean was carried out based on the *P. vulgaris* kinome<sup>30</sup>. Initially, all putative protein sequences were downloaded from the *P. vulgaris* genome (v2.1) of Phytozome v13 (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>)<sup>31</sup>. The HMM profiles of typical kinase domains (PF00069 (Pkinase) and PF07714 (Pkinase\_Tyr)) were downloaded from the Pfam protein family database<sup>32</sup>. For kinase protein (PK) identification, all protein sequences were aligned against these HMMs using HMMER v.3.3<sup>33,34</sup> with an E-value cut-off of 0.1. A minimum coverage of 50% was established as the criterion for maintaining a sequence for further analysis. The identified PKs were subsequently classified into families and subfamilies based on the HMMs calculated with PK sequences of 25 plant species<sup>35</sup>. Only the major variant for genes with isoforms of the LRR-RLK subfamily proteins was maintained.

### Phylogenetic Analysis

To confirm the subfamily classification of the PvLRR-RLKs, we estimated a phylogenetic tree based on a multi-sequence alignment performed with the ClustalW software<sup>36</sup>. The tree was constructed using the evolutionary

model of Tajima-Nei<sup>37</sup> and the Neighbor-joining matrix-based reconstruction method considering 1,000 bootstrap replicates<sup>38</sup>. Both analyses were performed with the MEGA-X program (<https://www.megasoftware.net>) using the entire protein sequence and default parameters for each analysis<sup>39</sup>. The sequence of an LRR-RLK protein from *Chlamydomonas reinhardtii* (Cre06.g275450.t1.1), obtained from the phytozome, was used as an outgroup for phylogenetic analysis<sup>40</sup>, being identified in our analyses as Cr.LRR-RLK.

### Protein Properties

The biophysical properties of PvLRR-RLK proteins, including molecular weight (MW), isoelectric point (pI), and number of amino acids (aas), were calculated using the ExPasy ProtParam tool<sup>41</sup>. Additionally, to further verify the presence of LRR and KD domains, we employed the CDD tool (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)<sup>42</sup>, with default parameters and an E-value cut-off of 0.01. For the prediction and analysis of conserved motifs, the sequences were analyzed with the Multiple Em for Motif Elicitation - MEME Suite (version 5.3.3) (<http://meme-suite.org/>), considering a maximum motif number of 15 and an optimum motif width ranging from 6 to 50 amino acid residues<sup>38,43</sup>, with an E-value cut-off of 0.001. Visual inspections were performed with TBtools<sup>44</sup>.

The CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)<sup>45</sup> program was used to predict the subcellular location of PvLRR-RLK proteins. To illustrate the results, we created heatmaps in the TBtools<sup>44</sup>, highlighting the most likely location of each protein.

### Gene Organization and Chromosome Location

For the characterization of the gene organization, both the exon-intron organization and the analysis of regulatory cis-elements of the PvLRR-RLK genes were performed. The intron organization of all PvLRR-RLKs was evaluated using the Gene Structure Display Server - GSDS 2.0 (<http://gsds.cbi.pku.edu.cn/>)<sup>46</sup> considering the coding DNA sequences obtained from the Phytozome files. To evaluate the cis-elements associated with the promoters of the PvLRR-RLK genes, 1,500 base pairs (bps) upstream<sup>47,48</sup> of the start codon were obtained from Phytozome and evaluated with the PlantCARE software (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)<sup>49</sup>.

The distribution of LRR-RLKs across *P. vulgaris* chromosomes was assessed using the general feature format (GFF) file from the Phytozome database. Visual assessments of the PvLRR-RLK distribution across chromosomes were performed using the software PhenoGram (<http://visualization.ritchielab.org/phenograms/plot>)<sup>50</sup>. Additionally, data from markers located 500 kb upstream and downstream to anthracnose resistance loci and QTL's<sup>51</sup> were associated with PvLRR-RLK gene positions and used to construct a chromosomal map using TBtools<sup>44</sup>.

### Duplication Events and Synteny Analysis

Duplication events and synonymous (Ks) and non-synonymous substitution (Ka) rates of LRR-RLKs across the *P. vulgaris* genome were estimated using the MCScanX toolkit implemented in TBtools<sup>44</sup>. The formula  $T = Ks/2\lambda$ , with  $\lambda$  representing the mean value of clock-like Ks rates ( $6.5 \times 10^{-9}$ ) was used to calculate the date of duplication events<sup>52</sup>.

Additionally, we performed a synteny analysis of LRR-RLK genes between *P. vulgaris* and *Glycine max* Wm82.a4. v1 genomes, obtained from the Phytozome database. The syntenic blocks were estimated using the MCScanX toolkit, and the Dual Synteny Plot package was employed for visualization, both available in the TBtools program<sup>44</sup>.

### Gene Expression Analysis

The interaction between *P. vulgaris* and *C. lindemuthianum* was investigated regarding the expression levels of the LRR-RLK gene family. For this task, we employed transcriptomic data of common beans in the incompatible and compatible interaction with race 73 of *C. lindemuthianum*. The experiment was carried out for Padder et al.<sup>53</sup>, in a greenhouse with controlled temperature and humidity conditions. A pair of isogenic lines was used in the study, Jaguar possesses the *Co-1* gene that provides resistance to race 73 of *C. lindemuthianum* whereas Puebla 152 lacks the resistance allele. The genotypes were inoculated with a conidia solution with a concentration of  $2 \times 10^6$  spores, and distilled water was sprayed on the control plants. Leaf samples were collected from both strains, inoculated and mock-inoculated, at 0, 24, 72, and 96 hpi at trifoliate growth stage. The RNA of the samples was extracted using TRIzol Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), and mRNA-Sequencing (RNA-Seq) libraries using

the Illumina TruSeq Stranded mRNA Library Preparation Kit following the manufacturer's protocol. Sequencing was performed using Illumina HiSeq 2500 to generate single end (SE) reads of 50 nucleotides (nt)<sup>53</sup>.

These data are deposited in BioProject under code PRJNA342420<sup>53</sup>. From this library, data from 0 (control), 72, and 96 hours after inoculation (hpi) were used. The quality of the reads was evaluated with FASTqc<sup>54</sup>. The Kallisto tool<sup>55</sup> was used to quantify gene expression. For this, the genome data of *P. vulgaris*, available at Phytozome (*P. vulgaris* v2.1), was used as a reference for the Kallisto index, followed by quantification for single-end libraries.

### Differential Expression Analysis of Anthracnose Resistance

After quantifying gene expression, we performed a differential expression gene (DEG) analysis using the DESeq2 R package version 1.18.1<sup>56</sup>. This analysis was performed by comparing data from resistant and susceptible plants at 72 and 96 hpi against data from the time/control condition at 0 hpi. For defining DEGs, we used a variance stabilizing transformation into read counts and performed a Wald test with a parametric fitting, considering a maximum p-value of 0.05 (FDR) and a minimum absolute log<sub>2</sub> fold-change (based on the Transcripts Per Million - TPM metric) of 1.5. The minimum coverage of 1 (one) read was considered to calculate the saturation and expression. The fold-change calculations and p values (log<sub>2</sub>) were used to construct a volcano plot using the R statistical software<sup>57,58</sup>. Venn diagrams were obtained using the Calculate and draw custom Venn diagrams tool (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) to identify the intersection of DEGs between resistant and susceptible plants. Hierarchical cluster and heatmap analysis were performed in the R environment using the circlize R package with the k-means algorithm considering 5 clusters<sup>59</sup>.

## Results

### Identification of PvLRR-RLK genes

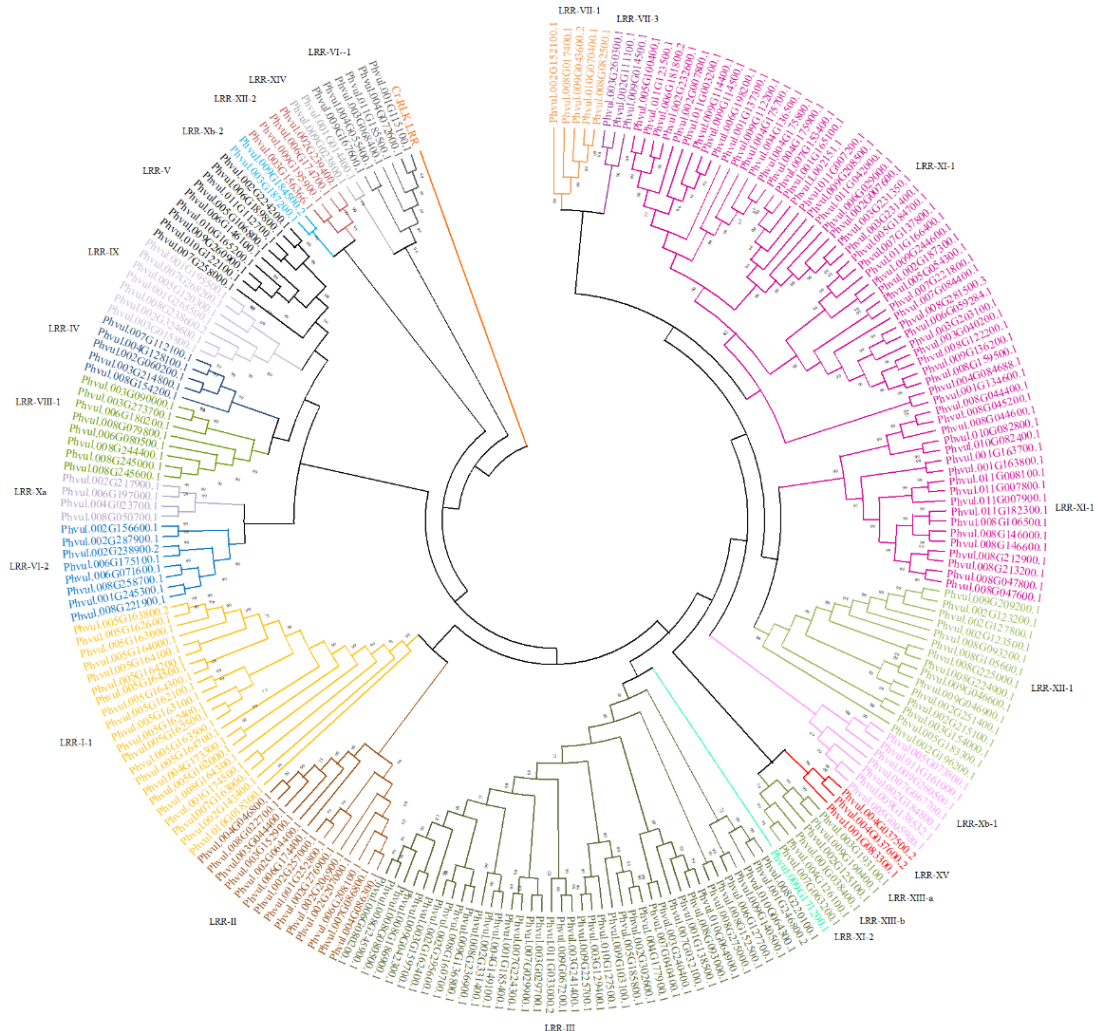
From the kinome of *P. vulgaris*<sup>30</sup>, 1,203 PKs were identified. Of these, only the proteins endowed with the transmembrane kinase and LRR domains were retained (Supplementary Table S1). All PvLRR-RLKs obtained were analyzed for redundancy following the criterion of maintaining the largest variants in the case of genes with isoforms. The nomenclature pattern obtained from Phytozome was maintained in subsequent analyses. After identification and initial screening, we considered a set of 230 PvLRR-RLKs for performing the analysis of this study. These proteins were classified into 15 subfamilies (from I to XV) according to the HMMER prediction, of which some subfamilies were further subdivided into other subgroups, as VI (LRR-VI-1 and LRR-VI-2), VII (LRR-VII-1, LRR-VII-2, and LRR-VII-3), X (LRR-Xa, LRR-Xb-1 and LRR-Xb-2), XI (LRR-XI-1 and LRR-XI-2), and XIII (LRR-XIII-a and LRR-XIII-b) (Supplementary Table S2).

Several characteristics of these proteins, including the number of aas, Mw, and pI, were also determined (Supplementary Table S3). There was a wide variation in the parameters evaluated, protein sizes ranged from 493 aas (Phvul.003G193100) to 1,290 aas (Phvul.006G198200), with a mean value of 855.56 aas (median of 882 and standard deviation of 181.355); the molecular weight ranged from 54,433.43 (Phvul.009G138532) to 140,774.43 (Phvul.007G067700), with a mean value of 73,307.67 (median of 72,847 and standard deviation of 797.84); moreover, the isoelectric point ranged from 5.11 (Phvul.004G173300) to 9.4 (Phvul.006G174700), with a mean value of 7.5 (median of 7.5 and standard deviation of 1.5).

### Phylogenetic analyses of PvLRR-RLKs

When analyzing the phylogenetic tree estimate, we observed that the classification of PvLRR-RLKs into subfamilies could be confirmed. Except for one isolated case (LRR-XI-1 subfamily), all proteins of the same subfamily were grouped together (Fig. 1). In this phylogenetic tree, the presence of an outgroup for the cr.LRR-RLK is clear, as expected. All the 230 LRR-RLKs analyzed were organized in a single group, which contained 23 subclades, representing the 22 different subfamilies. The LRR-XI-1 subfamily was the only one whose members were separated into two distinct subclades, one with 41 and the other with 17 proteins (Fig. 1). The other subclades, which grouped different subfamilies, showed varied sizes, with the smallest of them having only one

protein (Phvul.009G171200) from subfamily LRR-XI-2. In contrast, the largest subclade had 40 and 41 proteins from the LRR-III and LRR-XI-1 subfamilies, respectively.



**Figure 1.** Phylogenetic analysis of LRR-RLK proteins of *Phaseolus vulgaris*. The different colors represent protein classification into subfamilies obtained by HMMER. Phytozome (<https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) identification was maintained for all proteins. The outer group consists of an LRR-RLK protein from the alga *Chlamydomonas reinhardtii*, represented in the figure by Cr.LRR-RLK

### Protein Properties

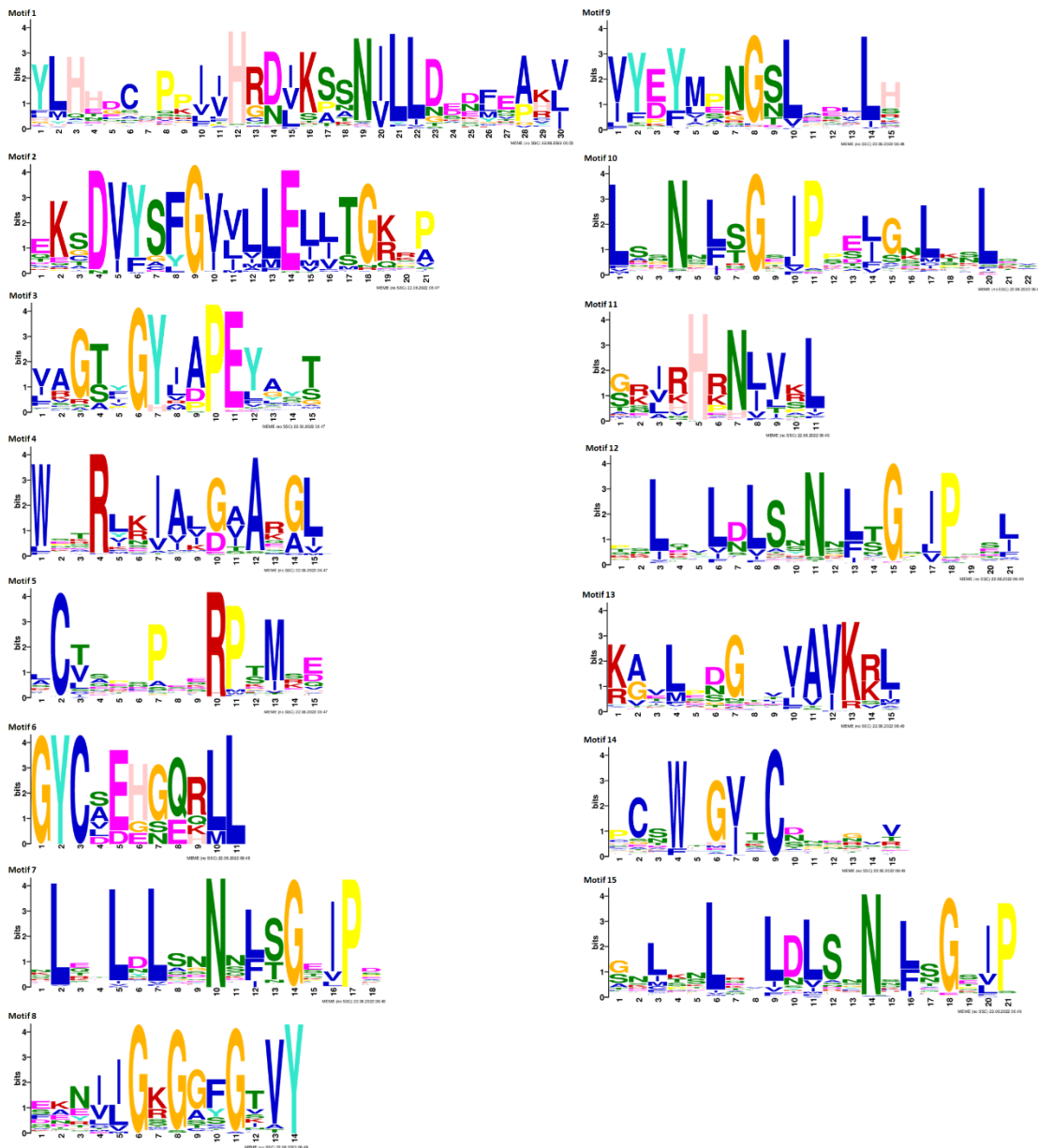
In order to gain insights into the diversity and functional characteristics of PvLRR-RLK proteins, the domain and conserved motif composition were analyzed using the CDD online tool and MEME, respectively, after which 16 conserved functional domains were identified (Supplementary Fig. S1). In addition to the typical kinase domains (Pkinase, and Pkinase\_Tyr), the domains Pkc\_like, LRRNT\_2, and LRR\_8 were the most common. As expected, at least one of these LRR and kinase domains was found in all proteins.

Interestingly, we found domains exclusively for specific PvLRR-RLKs, such as the Pkinase\_fungal, TM\_EphA1, and AsmA\_2 domains, which were found in Phvul.002G206900 (LRR-II), Phvul.011G007800 (LRR-

XI-1), and Phvul.008G045200 (LRR-XI-1) protein, respectively. In contrast, RIO1 was found in two proteins, Phvul.003G154000 (LRR-XII-1) and Phvul.009G184500 (LRR-Xb-2). In general, when we analyze the number and location of the domains in the proteins, we noticed that the domain pattern found was consistent between proteins of the same subfamily (Supplementary Fig. S1). For instance, in the LRR-I-1 subfamily, all proteins have, with exclusivity, the Malectin\_like superfamily domain. Unlike this observation, some proteins differ structurally from others grouped in the same subfamily in one or more domains. In the LRR-XI-1 subfamily, protein Phvul.007G137800 was the only one with the APH domain. Observations like these can be made in all other subfamilies. As for characterization, the PK domains are larger. For example, the Pkinase domain had a size of 264 aas, whereas Pkinase\_Tyr had 259 aas. In contrast, the LRR domains presented reduced sizes, e.g. the LRRNT\_2 domain, with 41 aas, and the LRR8 domain, with 61 aas.

Motif analysis was performed with the MEME program to explore the evolutionary divergence of the KD and LRR domains. Fifteen motifs resulted from the analysis (Fig. 2). The members of the same subfamilies shared a similar motif composition in their domains (Supplementary Fig. S2). Motifs 1, 2, 8, and 14 were the most frequent, present in almost all proteins. Among these motifs, motif 1 belongs to the Pkinase domain, 2 to the Pkinase\_Tyr, 14 to the LRRNT-2, and 8 to the LRR8 domain. However, the number and organization of these motifs vary among proteins grouped into different subfamilies. Variations in the presence of one motif were observed in some groups, such as in the LRR-XI-1, LRR-XII-1, and LRR-Xb-1 subfamilies, in which one or two proteins showed the motif 10 in their structure, whereas the other members of the same group did not present it.

The subcellular location prediction obtained by CELLO v.2.5 showed that out of the 230 PvLRR-RLKs studied, 145 (63.05%) are located in the plasma membrane (Supplementary Table S3). Among the other proteins, the location was distributed in the extracellular space (46 proteins), cytoplasm (19), chloroplast (15), nucleus (7), and mitochondria (2) (Supplementary Fig. S3). Among the highlights, we can mention the case of the LRR-I-1, LRR-XIV, LRR-VII-3, and LRR-XIII-a subfamilies, which presented all the proteins predicted as having the localization in the plasma membrane. There was no consensus subcellular location for all representatives of the other subfamilies. In the subfamily LRR-VIII-1, the Phvul.009G043600 protein was the only one that differed in its subcellular location, being predicted in the chloroplast. In fact, most PvLRR-RLKs from each subfamily were predicted to act at the plasma membrane level. Some members, however, had their location predicted for other subcellular spaces.



**Figure 2.** Conserved motifs, LRR domains, and consensus sequences of *Phaseolus vulgaris* LRR-RLK proteins. If the bit value of amino acid at this position is smaller than 1, it is represented with x;  $2 > \text{bits} \geq 1$ , with lowercase;  $3 > \text{bits} \geq 2$ , withcapital letter;  $\text{bits} \geq 3$ , with bold capital.

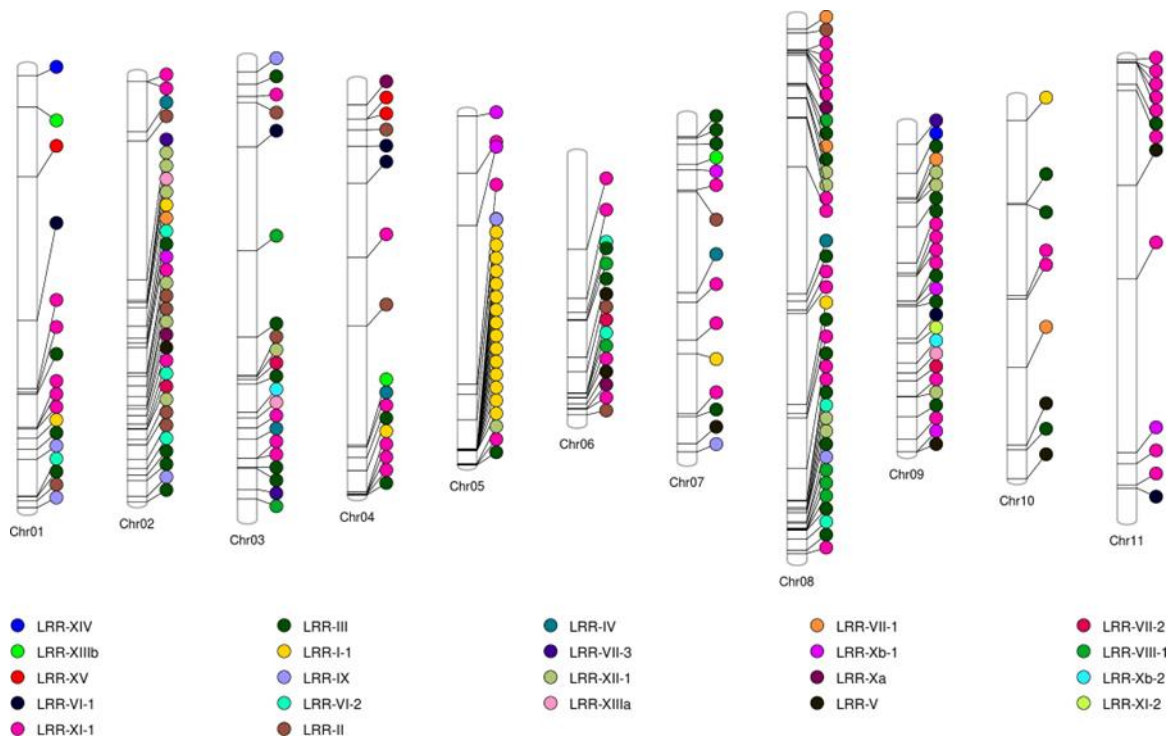
### Gene Organization and Chromosome Location

The LRR-RLKs genes identified in *P. vulgaris* are distributed in its 11 chromosomes (Figure 3). In terms of absolute numbers, chromosome 08 (Chr 08) had the highest number of PvLRR-RLK genes, and Chr 10 the lowest (Table 1). The PhvuL.L002151 gene, from the LRR-XI-1 subfamily, was located in a scaffold and, therefore, information about such a gene is not still available in some analyses (Supplementary Table S2, S3, S4, S7; Table 1). When analyzing the distribution of PvLRR-RLKs in the chromosomes, we observed the presence of these proteins in the telomeric regions, with emphasis on the concentration of proteins of the LRR-I-1 subfamily in the telomeric region of Chr 05, something not repeated at such intensity for other subfamilies and chromosomes. However,

several examples of gene concentration in tandem of the same subfamily were recorded, as observed for subfamily LRR-XI-1 in the Chr 08, Chr 09, and Chr 11 (Fig. 3).

**Table 1.** LRR-RLK genes distribution across chromosomes of *Phaseolus vulgaris*.

Chromosome	Length	Number of PvLRR-RLKs	Percentage
Chr 01	51433939	17	7%
Chr 02	49670989	32	14%
Chr 03	53438756	21	9%
Chr 04	48048378	17	7%
Chr 05	40923498	24	10%
Chr 06	31236378	16	7%
Chr 07	40041001	15	7%
Chr 08	63048260	39	17%
Chr 09	38250102	26	11%
Chr 10	44302882	9	4%
Chr 11	53580169	13	6%
		229	100%



**Figure 3.** Chromosomal location of the genes encoding LRR-RLKs of *Phaseolus vulgaris* in your 11 chromosomes, highlighting their link to the subfamily represented by the colors.

The number of introns in PvLRR-RLKs ranged from 0 to 26 (Supplementary Fig. S4; Supplementary Table S4). We observed 14 genes with no introns in their composition, whereas 100 genes had only one



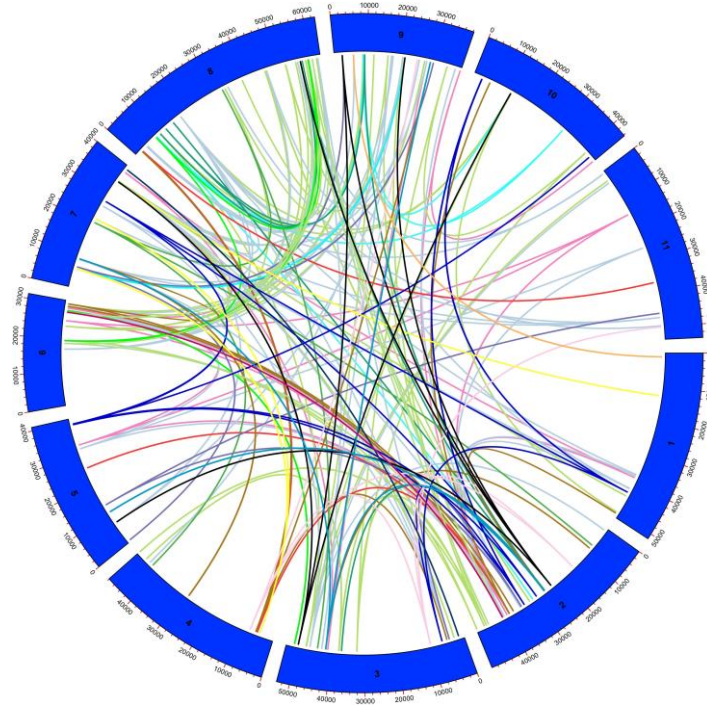
intron, and 24 genes had two introns; showing that the PvLRR-RLKs tend to have few introns, with specific divergences. Proteins Phvul.001G038400, Phvul.004G126100, and Phvul.007G063200 (all the representatives from the subfamily LRR-XIIIa) presented the highest number, with 26 introns. In addition, subfamilies LRR-VII-1, LRR-VII-3, LRR-Xb-1, LRR-XIIIa, LRR-XI-2, LRR-IV, LRR-V, LRR-Xb-2, and LRR-VI -1 showed proteins with the same number of introns in their composition. The other subfamilies showed slight variations in the number of introns. For example, subfamily LRR-I-1 showed the greatest variation of this characteristic among its proteins, with representatives having 8, 11, 13, and 14 introns.

Regarding the promoter region, 115 cis-elements were identified as potential regulators of the expression of the 230 PvLRR-RLKs (Supplementary Fig. S5). Among the typical elements found, the three most frequent were TATA-box (40.17%), CAAT-box (22.86%), and AT TATA-box (3.98%). These elements were identified one or more times in all genes. Elements such as Myb (2.65%), Box 4 (2.56%), MYC (2.21%), ERE (1.38%), G-box (1.33%), and ARE (1.32%) were also frequent in the PvLRR-RLK genes. TC-rich repeats, related to defense and stress responses, were identified 83 times in these genes. A diversity of elements related to light stimuli response, such as LAMP motif, L-BOX, ME, TCT motif, AF1 binding site, GT1-1, CMA chs 1a, and 2a<sup>47</sup> were found in the regions of the studied PvLRR-RLK genes. Furthermore, promoters related to the circadian cycle, low temperature, drought inducibility, and cell cycle are also present in the structure of these genes. These results highlight how complex cis-elements can be, considering that several elements can be present in the same gene.

Bisneta and Gonçalves-Vidigal<sup>51</sup> collect information present in the literature on loci and QTLs associated with anthracnose resistance and created a map associating the markers located 500 kb upstream and downstream of these regions, based on the common bean reference genome (version 2.1). We used information about marker positions and associated them with the position of the PvLRR-RLKs analyzed in this study (Supplementary Fig. S6). It was possible to observe the presence of markers close to regions where these proteins are concentrated, with emphasis on the telomeric region of the Chr 01 and Chr 05. In Chr 01, the Phvul.001G245300 gene is found between single nucleotide polymorphisms (SNPs), kompetitive allele specific PCR (KASP), and sequence-tagged site (STS) and on Chr 05, there is a SNP marker just below a cluster of genes from the LRR-I-1 subfamily. The distance in base pairs between the RLK-LRR genes of *P. vulgaris* and the markers associated with anthracnose resistance loci are shown in the Supplementary Table S5.

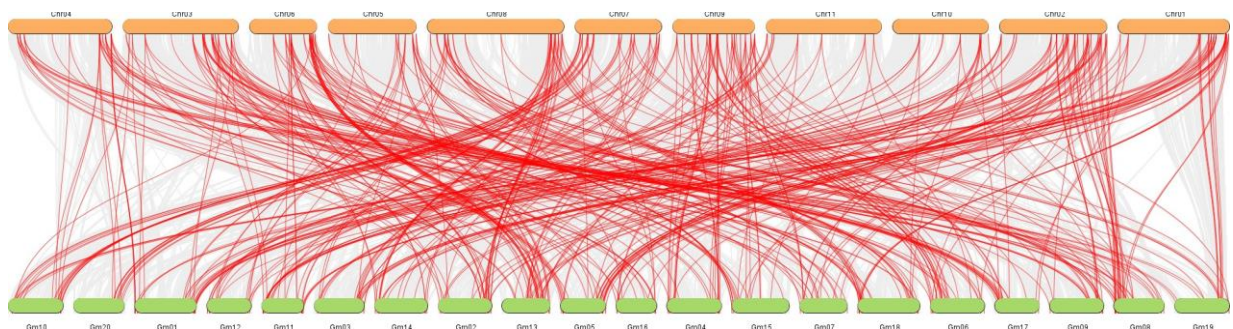
### Duplication Events and Synteny Analysis

When analyzing the duplication events of the LRR-RLK genes throughout the *P. vulgaris* genome (Fig. 4), we observed correspondences between several proteins in more than one chromosome. In total, 178 PvLRR-RLK protein pairs were identified as duplicate segments, corresponding to 77.4% of the total proteins identified in *P. vulgaris*. The collinearity events, Ka/Ks values, and the duplication times were estimated for the PvLRR-RLKs (Supplementary Table S6). Out of the 178 proteins, 175 proteins showed Ka/Ks values lower than one. While the other three (Phvul.005G054300, Phvul.004G037500, and Phvul.001G174500) showed a ratio of more than one. About the duplication time, the Phvul.001G140900 protein was the most recent, having about 32 million years of duplication. On the other hand, Phvul.002G302600 protein has a report of its duplication in approximately 229 million years.



**Figure 4.** Analysis of duplicated LRR-RLK proteins in *Phaseolus vulgaris*. In the circle, in blue, the chromosomes of *P. vulgaris* are represented by numbers from one to ten. Duplicated proteins are identified by the colored lines inside the circle, indicating their location on the chromosomes.

The evolutionary relationships within the members of these subfamilies were explored by synteny analysis of the PvLRR-RLK genes in *Glycine max*. We found homologies between PKs in all bean and soybean chromosomes (Fig. 5). Out of the 229 PvLRR-RLKs, 172 showed a syntenic relationship with soybean genes, with only 32 having a syntenic relationship with a single gene in soybean, and the majority with more than one gene (Supplementary Table S7). The gene Phvul.003G129400 (Chr 03) exemplifies such a fact, being part of the group of genes that showed a syntenic relationship with five soybean genes, each one located in a different chromosome, e.g. Glyma.07G041200 (Gm07), Glyma.13G111800 (Gm13), Glyma.15G179300 (Gm15), Glyma.16G009900 (Gm16), and Glyma.17G047900 (Gm17).

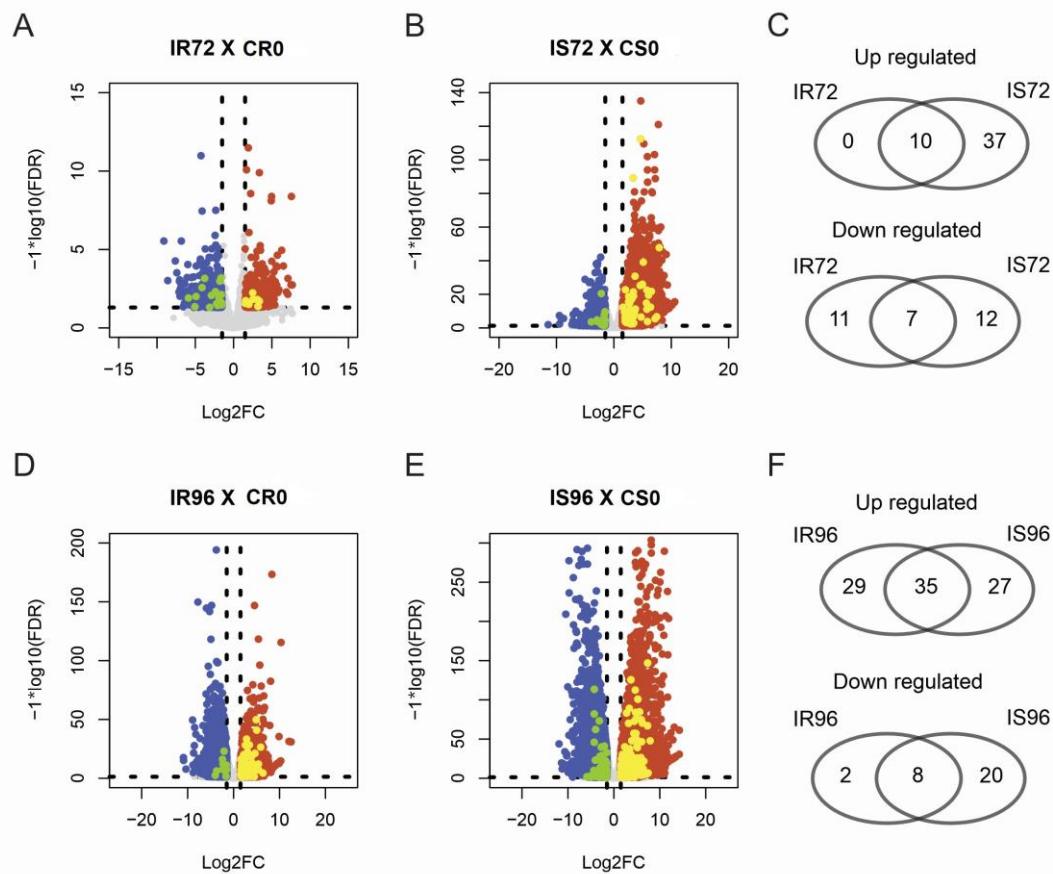


**Figure 5.** Synteny analysis between the LRR-RLK genes of *Phaseolus vulgaris* and *Glycine max*. The chromosomes of *P. vulgaris* are identified by Chr followed by the chromosome number. The chromosomes of *G. max* are identified by Gm followed by the chromosome number. Thus, Chr 01 corresponds to chromosome 1 of *P. vulgaris*, whereas Gm 01, correspondsto chromosome 1 of *G. max*.

### Study of LRR-RLKs Associated with *P. vulgaris* Resistance to Anthracnose

Transcriptome data of *P. vulgaris* interacting with *C. lindemuthianum* were employed in our study to evaluate the gene expression profile of PvLRR-RLK genes under biotic stress. Padder et al.<sup>53</sup> used two lines, one resistant (Puebla 152) and other susceptible (Jaguar) to race 73 of *C. lindemuthianum*.

The phred quality values (q value) were greater than 20, being within the quality standard. It was not necessary to clean the sequences, as they were already presented without adapters. We found a total of 948 DEGs in the resistant line at 72 hpi, when compared to the control time 0 hpi. Of the 443 up-regulated DEGs, 2.26% (10 DEGs) corresponds to PvLRR-RLKs, while for down-regulated proteins, of the 495 DEGs, 3.63% (18) are characterized as PvLRR-RLK (Fig. 6A; 6C). Considering the susceptible line, at the time of 72 hpi, compared with the time control at 0 hpi, 4,303 DEGs were found. Of these, 2,549 were up-regulated, 1.84% (47) were PvLRR-RLKs (Fig. 6B). Considering the down-regulated, 1,754 DEGs were found, 1.08% (19) were PvLRR-RLKs (Fig. 6C). Interestingly, it was observed that the 10 up-regulated genes in the resistant line, at 72 hpi, were also up-regulated in the susceptible line, which in turn had 37 unique up-regulated genes, at the same time (Figure 6C).

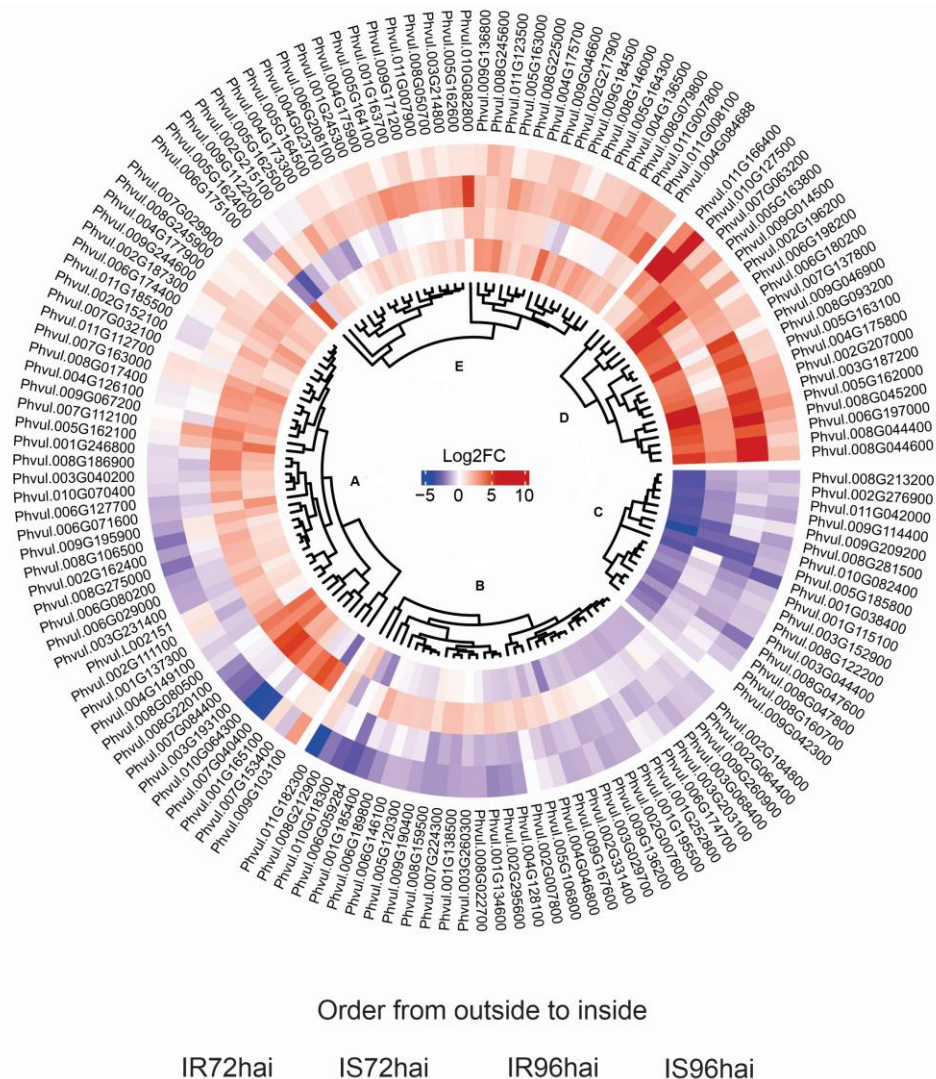


**Figure 6.** Analysis of LRR-RLK genes of *Phaseolus vulgaris* involved in the response of resistant (Puebla 152) and susceptible (Jaguar) lines to race 73 of *Colletotrichum lindemuthianum* at 72 and 96 hours after inoculation (hpi) compared with the time control 0 hpi. IR72 represents the resistant line inoculated at 72 hpi. IR96 represents the resistant line inoculated at 96 hpi. CRO represents the control resistant line inoculated at 0 hpi. IS72 represents the susceptible line inoculated at 72 hpi. IS96 represents the susceptible line inoculated at 96 hpi. CS0 represents the control susceptible line at 0 hpi.

At 96 hpi, 4,587 genes were differentially expressed between the resistant line and the control time 0 hpi. Of the 4,587 DEGs, 2,659 were up-regulated in the resistant line, and 2.40% (64) were PvLRR-RLKs. Out

of the 1,928 down-regulated in the resistant line, 0.52% (10) were PvLRR-RLKs (Fig. 6D, 6F). Comparing the 96 hpi susceptible line with the 0 hpi control time, there were 4,275 up-regulated DEGs and 3,327 down-regulated DEGs in total, being of those 1.45% (62) and 0.84% (28) PvLRR-RLKs up-regulated and down-regulated, respectively (Fig. 6E, 6F). The relationship of up-regulated and down-regulated proteins at each time in the two lines is shown in Supplementary Tables S8, S9.

The profile of the fold-change  $\log_2$  values (based on the TPM values) of the PvLRR-RLKs showed a significant difference in at least one of the interaction times (72 or 96 hpi) in resistant and susceptible plants, which were highlighted in a heatmap cluster analysis. This filter excluded 75 analyzed genes from the analysis. The other genes were separated into five groups (A to E) according to the expression pattern presented at the different analyzed times. In group A, for example, there are genes that, in general, were down-regulated or without expression at 72 hours in the resistant line and that, at 96 hours, started to be up-regulated. Groups B and C stand out for down-regulated genes in the two analyzed times, in both lines. While in groups D and E, there are genes up-regulated, at 72 and 96 hpi, in resistant and susceptible lines. Of D and E groups, the genes grouped in D stand out for presenting higher fold-change  $\log_2$  values, mainly in susceptible line (Fig. 7).



**Figure 7.** Heatmap analysis of differentially expressed LRR-RLK genes of *Phaseolus vulgaris* in resistant (Puebla 152) and susceptible (Jaguar) lines inoculated with race 73 of *Colletotrichum lindemuthianum* at 72 and 96 after inoculation (hpi).

## Discussion

LRR-RLK proteins promote key membrane-anchored receptors responsible for recognizing external factors, transducing apoplastic signals into symplasts, and triggering responses to different stimuli<sup>60</sup>. In our study, we identified and characterized 230 PvLRR-RLKs (Supplementary Table S2). The approximate numbers had already been identified in species such as *A. thaliana* (239)<sup>61</sup> and *Oryza sativa* (309)<sup>62</sup>. The PvLRR-RLK proteins identified vary in physicochemical properties such as molecular weight, isoelectric point, and gene size (Supplementary Table S3). These features may result from the different functions developed in their own microenvironments. In general, LRR-RLKs constitute one of the largest gene families, from the class of KD superfamily, in the animal and plant kingdoms<sup>63</sup>, which can be related to their critical role in different fundamental biological processes, e.g. signal transduction, innate cell immunity, growth and development, cell differentiation and patterning, nodulation, and self-incompatibility mechanisms<sup>64,65</sup>.

The identified proteins were classified into 15 subfamilies, some of which were subdivided (Supplementary Table S3). The classification pattern obtained was similar to *A. thaliana*, *B. rapa*, and *O. sativa*<sup>24</sup>. The phylogenetic tree was estimated in order to confirm the classification obtained for the LRR-RLK proteins. There was a coincidence of both classifications for all subfamilies, except LRR-XI-1, which were divided into two subclades in the tree. However, all other subclades were well-supported, with statistical confidence values above 0.70 (Fig. 1). Such values suggest reliability in the data obtained<sup>16</sup>. The *C. reinhardtii* LRR-RLK protein was used as an outgroup. Evolutionary analysis of the RLK superfamily indicates the existence of this family before the divergence of land plants and algae<sup>40</sup>, and therefore it was used to root the tree in this study.

Conserved domain and motif analysis was performed to structurally characterize these proteins. The presence and organization of the domains and motifs was consistent with the phylogenetics analysis, which corroborates the division into subfamilies (Supplementary Fig. S1; S2). A similar pattern was obtained for proteins of this same family in paper mulberry, *Cucumis sativus*<sup>48,66</sup>, and other gene families, e.g. the WRKY family in wheat<sup>67</sup>. As for domain analysis, the malectin domain

was found in proteins classified as subfamily LRR-I-1 (Supplementary Fig. S1). Current research in plant models suggests that proteins with malectin/malectin-like domains function as multiple wall sensors involved in processes that depend on or affect the cell wall in various ways, e.g. growth control reproduction and multiple stresses<sup>68</sup>. This domain was also found in 13 LRR-RLK proteins in cotton<sup>60</sup> and *Arabidopsis*<sup>69</sup>, which were grouped into the same LRR-1 subfamily. Hu et al.<sup>70</sup> reported that the RLK-V malectin/leucine-rich repeat receptor protein kinase gene from *Haynaldia villosa* acts as a PRR to up-regulate resistance to powdery mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Bgt) in wheat. When analyzing the conserved motifs present in the KD and LRR domains, we found 15 (Supplementary Fig. S2). Similar numbers were found in paper mulberry, with 13 motifs<sup>48</sup>, and in cucumber, with 12 motifs<sup>66</sup>. In some subfamilies, one or two proteins showed a different motif 10 from the others. This motif is associated with the LRR 4 domain. Other motifs were also associated with this same domain, e.g. motif 7 and motif 12. Due to the diverse functional roles of LRR-RLK proteins, these proteins have specialized domains and motifs for functional specializations<sup>69</sup>.

One way to gain insights into possible functions of a protein is to analyze its subcellular localization, considering that most of the biological activities performed by proteins are closely related to where they reside in the cell<sup>71</sup>. Upon further analysis at the cellular level, more than 63% of the PvLRR-RLKs were related to the plasma membrane (Supplementary Fig. S3), corroborating their main functions of recognizing environmental stimuli and internal signals<sup>16</sup>. Except for subfamilies LRR-I-1, LRR-XIV, LRR-VII-3, and LRR-XIII-a, all others showed proteins grouped in different locations, showing that this parameter is not a determining factor in protein grouping. Differences in the extracellular domains and associated structure resulted in the functional specialization of these proteins and, consequently, in their cellular localization<sup>60,72</sup>. For example, only the Phvul.009G043600 protein (subfamily LRR-VIII-1) showed cytoplasmic localization. Coincidentally, it is the only protein in the subfamily that shows a different KD domain, the Kinase-like superfamily, and a tripled LRR 8 domain.

Starting with the characterization of the members of the LRR-RLK family in *P. vulgaris* at the genomic level, we analyzed the gene structure, based on the exon/intron organization and analysis of cis elements. The PvRLK-LRRs genes had from zero to 26 introns in their structure (Supplementary Fig. S4). The same number range was also found for this gene family in *Populus* and *Arabidopsis*<sup>23</sup>. There was no direct relationship between the number of introns found in genes grouped into the same subfamily. However, the variation of this parameter in the same group was small. This pattern of slight variations in gene structure was also found for this same group of proteins in *Populus* and *Arabidopsis*<sup>23</sup>.

For analysis of the promoter regions, 1.5 kb upstream was used. Most cis elements are composed of five

to 20 nucleotides and are located in the proximal promoter, a region that encompasses several hundred nucleotides upstream from the transcription start site<sup>28,73</sup>. The TATABOX and CAAT-BOX elements were the most frequently found (Supplementary Fig. S5). Both elements are important sequences of promoter regions, the first being a nucleotide sequence containing approximately 30 nucleotides before the transcription start site<sup>74</sup>, whereas the second represents a common cis-action element in promoter and enhancer regions, containing about 40 to 100 nucleotides above the transcriptional start site<sup>75</sup>. MYC elements frequent in the promoter regions of PvLRR-RLK genes function primarily in growth and development, as well as in response to stress<sup>76</sup>. In addition, elements related to hormone responses, e.g G-box, ABRE, and ERE, were also identified in these genes. These cis-elements are potentially responsive to abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate. They were also found in large numbers in cotton LRR-RLK genes<sup>47</sup>.

To analyze the evolutionary aspect of PvLRR-RLK genes, we performed duplication and synteny analysis. More than 75% of the genes identified correspond to duplicated segments, suggesting that the formation of some PvLRR-RLK genes may have arisen from duplication events (Fig. 4; Supplementary Table S6). As in *Populus*, approximately 82% of the LRR-RLKs genes are also located in duplicated regions<sup>23</sup>. The Ka/Ks ratio was performed, and of the 178 proteins, only three (Phvul.005G054300, Phvul.004G037500, and Phvul.001G174500) showed values higher than one for this parameter, indicating positive selection. In contrast, all the other 175 proteins showed values lower than one, suggesting that most LRR-RLKs genes of *P. vulgaris* may have passed through stabilizing selection during the evolution process. A similar pattern was observed for the potato bZIP gene family<sup>38</sup>.

Considering the synteny analysis, common bean and soybean are the two most economically important members of the Phaseoleae legumes, soybean for its many human and animal usages, and common bean as an important nutritional crop for many economically poorer countries<sup>79</sup>. LRR-RLK genes showed a high homology index (Fig. 5; Supplementary Table S7), highlighting the close relationship between the two species. The relationship indicates that these genes may have existed before the differentiation of the two species and have maintained a collinear relationship since then<sup>38</sup>. Anthracnose is also an economically important disease for soybean, and can strongly affect its production, under suitable conditions for the development of the pathogen<sup>80</sup>. Therefore, extrapolating the understanding of this protein subfamily to soybean, through the analysis of orthologous genes, constitutes an important tool in obtaining resistant cultivars, one of the main control methods used.

The expression analysis of PvLRR-RLK genes using data from Padder et al.<sup>53</sup> was carried out to verify the expression profile of this gene family, which is often related to stress responses such as diseases in a pathosystem<sup>28</sup>. The strong expression profile of some DEGs draws attention to the image (Fig. 7). For example, the genes Phvul.011G166400 and Phvul.008G045200 were strongly expressed in the susceptible line at 72 hours. The first is associated with a nuclear protein located on Chr 11 and belongs to the subfamily LRR-XII, whereas the second was grouped in the LRR-XI-1 subfamily, representing a plasma membrane protein located on Chr 08. Possibly, these genes could be somehow associated with the onset of symptoms.

In the present investigation, many PvLRR-RLK genes showed an interesting down-regulated or not expressed gene pattern in the resistant line at 72 hpi, with their expression increasing with the time of pathogen infection (Fig. 7A). Of these genes, we highlight some that were located in Chr 01, Phvul.001G246800 (subfamily LRR-III) and Phvul.001G165100 (LRR-XI-1), the first being located between the SNP (SS83) and STS (TGA1.1570) markers, and the second, close to the SNP marker, PvM15. These marks are located near resistance loci<sup>51</sup>. Both genes represent a plasma membrane protein. Even in Chr 01, the Phvul.001G245300 gene (LRR-XI-2) was up-regulated in the resistant line, at 72 hpi, when compared to the susceptible line, and its expression decreased over time, at 96 hpi (Fig. 7E). This gene is a cytoplasmic protein. With the exception of the Phvul.001G165100 gene, the others had already been cited as resistance candidates<sup>51</sup>, however, due to its proximity to a marker associated with anthracnose, and its expression pattern, we believe that it represents a putative element in the common bean resistance response to the disease. In Chr 04, the genes Phvul.004G149100 (LRR-III/membrane plasmatic protein) and Phvul.004G128100 (LRR-IV/extracellular protein) were located close to the SNP marker NSSR65, and showed a higher level of expression in the 96 hpi resistant line when compared to the susceptible line, at the same time. They were present in the genomic region of the *Co-1*, *Co-x*, and *Co-4* genes. These chromosomes have already been reported as important resistance clusters<sup>51</sup>.

At the end of Chr 05, the presence of 15 genes in tandem from the same subfamily, LRR-I-1, caught our attention. When analyzing the expression pattern of these genes, we found 11 DEGs. Of the 11 DEGS, six (Phvul.005G162400, Phvul.005G162500, Phvul.005G162600, Phvul.005G163000, Phvul.005G164300, and Phvul.005G164500) showed the same pattern, being down-regulated at both 72 and 96 hpi, in both lines (Fig. 7, group E). The genes Phvul.005G162000, Phvul.005G163100, and Phvul.005G163800 were up-regulated in all treatments, however, the first two showed higher expression levels at times of 72 and 96 hpi in the susceptible line, and the last one, in the two times of the resistant line (Fig. 7D). These genes are close to the SSR marker

PvM07, previously associated with anthracnose resistance locus<sup>51</sup>. Still considering this subfamily, in addition to Chr 05, there are DEGs distributed in Chr 02, 07, 08 and 10. In Chr 07, the gene is close to the scaffold marker 00098\_217812 (SNP), which is up-regulated in resistant and susceptible lines at 96 hpi, when compared with the same treatments at 72 hpi. In Chr 10, the gene is close to the SNP marker, ss715648754, and was only expressed in the treatments of the line resistant to 72

hpi and susceptible to 96 hpi, which was down-regulated (Supplementary Fig. S6). All the genes of this family present the malectin domain and correspond to membrane plasmatic proteins. Despite the proximity to some markers, so far, no gene from this subfamily has been associated as a candidate for anthracnose resistance.

One of the most well-reported examples in the literature is the protein resulting from the expression of the FLS2 gene, identified as Phvul.002G196200 and grouped in subfamily LRR-XII-1 (Fig. 1). This protein contains one intron and is located on Chr 02 of the *P. vulgaris* genome. According to the heatmap, the FLS2 gene is more expressed at 96 hpi in both lines but stands out in the susceptible line. Identified in *Solanum lycopersicon*, *Brassica*, *Arabidopsis*, and *Oryza sativa*<sup>22,25,27,81</sup>, the FLS2 gene is involved in the perception of the bacterial elicitor FLAGELIN and acts as a PRR in the initial plant defense response<sup>82</sup>. The expression pattern found by Padder et al.<sup>53</sup> shows that the gene is upregulated in all treatments, standing out, however, in resistant and susceptible lines at 96 hpi. Oblessuc et al.<sup>83</sup> observed the downregulation of this gene at 65 hpi with race 73 of *C. lindemuthianum*, indicating a progressive curve of this gene over time. On the contrary, Silva et al.<sup>20</sup> evaluated the expression of genes related to the resistance of common bean to race 65 of *C. lindemuthianum* and obtained a positive regulation of this gene with the BRS Esplendor line, characterized by its resistance to the studied fungus at 72 hpi. In contrast, there was no differential expression between the inoculation and control treatments for the pathosystem involving the susceptible line. Although they are the same crop and the disease, the pathogenic variability between and within races is possibly a determining factor for developing a specific response, with the same genes acting differently.

In our study, we performed a full characterization of 230 PvRLK-LRR proteins, supplying different insights into their evolutionary history. In addition, we integrated our findings with the expression profile of PvLRR-RLK genes in response to the infection with *C. lindemuthianum*, investigating the proximity of such genes with markers associated with resistance loci. This information is important, as it allows insights into the role of these genes in the common bean-anthracnose pathosystem. These candidate genes may be useful for further studies to validate their functions in ANT response and to understand how they interact within metabolic pathways.

## References

1. De Ron, A. M. *et al.* History of the common bean crop: its evolution beyond its areas of origin and domestication. *Arbor* **192** (2016).
2. Degu, T. Yaregal, W. & Gudisa, T. Status of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) diseases in metekel zone, north west ethiopia. *J. Plant Pathol. Microbiol.* **11**, 494 (2020).
3. Carneiro, J. d. S. Paula Júnior, T. d. & Borém, A. Feijão: do plantio à colheita. *UFV, Viçosa*, 384p (2015).
4. Padder, B. Sharma, P. Awale, H. & Kelly, J. *Colletotrichum lindemuthianum*, the causal agent of bean anthracnose. *J. Plant Pathol.* 317–330 (2017).
5. Ferreira, J. J. Campa, A. & Kelly, J. D. Organization of genes conferring resistance to anthracnose in common bean. *Transl. genomics for crop breeding: biotic stress* **1**, 151–181 (2013).
6. Campa, A. Rodríguez-Suárez, C. Giraldez, R. & Ferreira, J. J. Genetic analysis of the response to eleven *Colletotrichum lindemuthianum* races in a ril population of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Plant Biol.* **14**, 1–12 (2014).
7. Costa, L. C. *et al.* Different loci control resistance to different isolates of the same race of *Colletotrichum lindemuthianum* in common bean. *Theor. Appl. Genet.* **134**, 543–556 (2021).
8. Vidigal Filho, P. S. *et al.* Genome-wide association study of resistance to the anthracnose disease in brazilian common bean accessions. In *ASA, CSSA and SSSA International Annual Meetings (2020)/ VIRTUAL (ASA-CSSA-SSSA, 2020)*.

9. Sartorato, A. & Rava, C. A. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. *EMBRAPA-CNPAP. Documentos* (1994).
10. Zuiderveen, G. H. Padder, B. A. Kamfwa, K. Song, Q. & Kelly, J. D. Genome-wide association study of anthracnose resistance in Andean beans (*Phaseolus vulgaris*). *PLoS one* **11**, e0156391 (2016).
11. Jones, J. D. & Dangl, J. L. The plant immune system. *nature* **444**, 323–329 (2006).
12. Nelson, R. Wiesner-Hanks, T. Wissner, R. & Balint-Kurti, P. Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nat. Rev. Genet.* **19**, 21–33 (2018).
13. Kourelis, J. & Van Der Hoorn, R. A. Defended to the nines: 25 years of resistance gene cloning identifies nine mechanisms for R protein function. *The Plant Cell* **30**, 285–299 (2018).
14. Hubbard, S. R. & Miller, W. T. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Curr. opinion cell biology* **19**, 117–123 (2007).
15. Shiu, S.-H. & Bleecker, A. B. Receptor-like kinases from arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 10763–10768 (2001).
16. Magalhães, D. M. *et al.* LRR-RLK family from two citrus species: genome-wide identification and evolutionary aspects. *BMC genomics* **17**, 1–13 (2016).
17. Holt III, B. F. Mackey, D. & Dangl, J. L. Recognition of pathogens by plants. *Curr. biology* **10**, R5–R7 (2000).
18. Macho, A. P. & Zipfel, C. Plant prrs and the activation of innate immune signaling. *Mol. cell* **54**, 263–272 (2014).
19. Sun, Y. Qiao, Z. Muchero, W. & Chen, J.-G. Lectin receptor-like kinases: the sensor and mediator at the plant cell surface. *Front. plant science* **11**, 596301 (2020).
20. da Silva, C. M. *et al.* Differential gene expression in common bean during interaction with race 65 of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Trop. Plant Pathol.* **46**, 518–527 (2021).
21. Shiu, S.-H. *et al.* Comparative analysis of the receptor-like kinase family in arabidopsis and rice. *The plant cell* **16**, 1220–1234 (2004).
22. Sakamoto, T. *et al.* The tomato rlk superfamily: phylogeny and functional predictions about the role of the Lrr-rlk subfamily in antiviral defense. *BMC plant biology* **12**, 1–18 (2012).
23. Zan, Y. *et al.* Genome-wide identification, characterization and expression analysis of populus leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes. *BMC genomics* **14**, 1–14 (2013).
24. Rameneni, J. J. *et al.* Genomic and post-translational modification analysis of leucine-rich-repeat receptor-like kinases in *Brassica rapa*. *PLoS One* **10**, e0142255 (2015).
25. Wei, Z. Wang, J. Yang, S. & Song, Y. Identification and expression analysis of the LRR-RLK gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) Heinz 1706. *Genome* **58**, 121–134 (2015).
26. Fischer, I. Diévert, A. Droc, G. Dufayard, J.-F. & Chantret, N. Evolutionary dynamics of the leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) subfamily in angiosperms. *Plant physiology* **170**, 1595–1610 (2016).
27. Wu, Y. *et al.* Genome-wide expression pattern analyses of the *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Mol. plant* **9**, 289–300 (2016).
28. Andolfo, G. *et al.* Overview of tomato (*Solanum lycopersicum*) candidate pathogen recognition genes reveals important *Solanum* R locus dynamics. *New Phytol.* **197**, 223–237 (2013).
29. Fritsche-Neto, R. *et al.* Association mapping in common bean revealed regions associated with anthracnose and angular leaf spot resistance. *Sci. Agric.* **76**, 321–327 (2019).
30. Aono, A. H. Pimenta, R. J. G. Kuroshu, R. M. de Souza, A. P. & Pereira, W. A. Genome-wide characterization of the common bean kinome: catalog and insights into expression patterns and genetic organization. *bioRxiv* (2022).



31. Goodstein, D. M. *et al.* Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic acids research* **40**, D1178–D1186 (2012).
32. El-Gebali, S. *et al.* The pfam protein families database in 2019. *Nucleic acids research* **47**, D427–D432 (2019).
33. Eddy, S. R. Hidden markov models. *Curr. opinion structural biology* **6**, 361–365 (1996).
34. Finn, R. D. Clements, J. & Eddy, S. R. HMMER web server: interactive sequence similarity searching. *Nucleic acids research* **39**, W29–W37 (2011).
35. Lehti-Shiu, M. D. & Shiu, S.-H. Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philos. Transactions Royal Soc. B: Biol. Sci.* **367**, 2619–2639 (2012).
36. Larkin, M. A. *et al.* Clustal w and clustal x version 2.0. *bioinformatics* **23**, 2947–2948 (2007).
37. Tajima, F. & Nei, M. Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. biology evolution* **1**, 269–285 (1984).
38. Wang, Q. *et al.* Identification and analysis of bzip family genes in potato and their potential roles in stress responses. *Front. plant science* **12**, 637343 (2021).
39. Kumar, S. Stecher, G. Li, M. Knyaz, C. & Tamura, K. Mega x: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. biology evolution* **35**, 1547 (2018).
40. Lehti-Shiu, M. D. Zou, C. Hanada, K. & Shiu, S.-H. Evolutionary history and stress regulation of plant receptor-like kinase/pelle genes. *Plant Physiol.* **150**, 12–26 (2009).
41. Gasteiger, E. *et al.* Protein identification and analysis tools on the expasy server. *The proteomics protocols handbook* 571–607 (2005).
42. Marchler-Bauer, A. *et al.* CDD: a conserved domain database for the functional annotation of proteins. *Nucleic acids research* **39**, D225–D229 (2010).
43. Bailey, T. L. *et al.* Meme suite: tools for motif discovery and searching. *Nucleic acids research* **37**, W202–W208 (2009).
44. Chen, C. *et al.* Tbtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Mol. plant* **13**, 1194–1202 (2020).
45. Yu, C.-S. Chen, Y.-C. Lu, C.-H. & Hwang, J.-K. Prediction of protein subcellular localization. *Proteins: Struct. Funct. Bioinforma.* **64**, 643–651 (2006).
46. Hu, B. *et al.* GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server. *Bioinformatics* **31**, 1296–1297 (2015).
47. Sun, R. Wang, S. Ma, D. & Liu, C. Genome-wide analysis of LRR-RLK gene family in four gossypium species and expression analysis during cotton development and stress responses. *Genes* **9**, 592 (2018).
48. Su, Y. Peng, X. & Shen, S. Identification of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in paper mulberry and their potential roles in response to cold stress. *Comput. Biol. Chem.* **97**, 107622 (2022).
49. Lescot, M. *et al.* Plantcare, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic acids research* **30**, 325–327 (2002).
50. Wolfe, D. Dudek, S. Ritchie, M. D. & Pendergrass, S. A. Visualizing genomic information across chromosomes with phenogram. *BioData mining* **6**, 1–12 (2013).
51. Vaz Bisneta, M. & Gonçalves-Vidigal, M. C. Integration of anthracnose resistance loci and RLK and NBS-LRR-encoding genes in the *Phaseolus vulgaris* L. genome. *Crop. Sci.* **60**, 2901–2918 (2020).
52. Gaut, B. S. Morton, B. R. McCaig, B. C. & Clegg, M. T. Substitution rate comparisons between grasses and palms: synonymous rate differences at the nuclear gene *adh* parallel rate differences at the plastid gene *rbcl*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 10274–10279 (1996).

53. Padder, B. A. Kamfwa, K. Awale, H. E. & Kelly, J. D. Transcriptome profiling of the *Phaseolus vulgaris*-*Colletotrichum lindemuthianum* pathosystem. *PLoS One* **11**, e0165823 (2016).
54. Simons, A. A quality control tool for high throughput sequence data. *A quality control tool for high throughput sequence data* (2010).
55. Bray, N. L. Pimentel, H. Melsted, P. & Pachter, L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat. biotechnology* **34**, 525–527 (2016).
56. Love, M. I. Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for rna-seq data with *deseq2*. *Genome biology* **15**, 1–21 (2014).
57. Graffelman, J. & van Eeuwijk, F. Calibration of multivariate scatter plots for exploratory analysis of relations within and between sets of variables in genomic research. *Biom. Journal: J. Math. Methods Biosci.* **47**, 863–879 (2005).
58. Team, R. C. R: A language and environment for statistical computing. r foundation for statistical computing, vienna, austria. <http://www.R-project.org/> (2013).
59. Gu, Z. Gu, L. Eils, R. Schlesner, M. & Brors, B. Circlize implements and enhances circular visualization in r. *Bioinformatics* **30**, 2811–2812 (2014).
60. Yuan, N. *et al.* Genome-wide identification and characterization of LRR-RLKs reveal functional conservation of the *sif* subfamily in cotton (*Gossypium hirsutum*). *BMC plant biology* **18**, 1–17 (2018).
61. Jose, J. Ghantasala, S. & Roy Choudhury, S. Arabidopsis transmembrane receptor-like kinases (RLKs): a bridge between extracellular signal and intracellular regulatory machinery. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 4000 (2020).
62. Sun, X. & Wang, G.-L. Genome-wide identification, characterization and phylogenetic analysis of the rice LRR-kinases. *PloS one* **6**, e16079 (2011).
63. Diévert, A. *et al.* Leucine-rich repeat receptor kinases are sporadically distributed in eukaryotic genomes. *BMC evolutionary biology* **11**, 1–9 (2011).
64. He, Y. Zhou, J. Shan, L. & Meng, X. Plant cell surface receptor-mediated signaling—a common theme amid diversity. *J. cell science* **131**, jcs209353 (2018).
65. Restrepo-Montoya, D. Brueggeman, R. McClean, P. E. & Osorno, J. M. Computational identification of receptor-like kinases “RLK” and receptor-like proteins “RLP” in legumes. *BMC genomics* **21**, 1–17 (2020).
66. Yu, J. *et al.* Genome-wide characterisation, evolution and expression analysis of the leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK) gene family in cucumbers. *Plant Prot. Sci.* **58**, 125–138 (2022).
67. Ye, H. *et al.* Genome-wide identification of wheat WRKY gene family reveals that TaWRKY75-A is referred to drought and salt resistances. *Front. Plant Sci.* **12**, 663118 (2021).
68. Yang, H. *et al.* Malectin/malectin-like domain-containing proteins: a repertoire of cell surface molecules with broad functional potential. *The Cell Surf.* **7**, 100056 (2021).
69. Yeh, Y.-H. *et al.* The *Arabidopsis* malectin-like/LRR-RLK IOS1 is critical for BAK1-dependent and BAK1-independent pattern-triggered immunity. *The Plant Cell* **28**, 1701–1721 (2016).
70. Hu, P. *et al.* A malectin-like/leucine-rich repeat receptor protein kinase gene, RLK-V, regulates powdery mildew resistance in wheat. *Mol. plant pathology* **19**, 2561–2574 (2018).
71. Nakashima, H. & Nishikawa, K. Discrimination of intracellular and extracellular proteins using amino acid composition and residue-pair frequencies. *J. molecular biology* **238**, 54–61 (1994).
72. Bashton, M. & Chothia, C. The generation of new protein functions by the combination of domains. *Structure* **15**, 85–99 (2007).
73. Rombauts, S. *et al.* Computational approaches to identify promoters and cis-regulatory elements in plant genomes. *Plant physiology* **132**, 1162–1176 (2003).

74. Lee, T. I. & Young, R. A. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. review genetics* **34**, 77–137 (2000).
75. Dolfini, D. Zambelli, F. Pavesi, G. & Mantovani, R. A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell cycle* **8**, 4127–4137 (2009).
76. Chen, S. *et al.* Characteristics and expression pattern of myc genes in *Triticum aestivum*, *Oryza sativa*, and *Brachypodium distachyon*. *Plants* **8**, 274 (2019).
77. Holub, E. B. The arms race is ancient history in arabidopsis, the wildflower. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 516–527 (2001).
78. Schmutz, J. *et al.* A reference genome for common bean and genome-wide analysis of dual domestications. *Nat. genetics* **46**, 707–713 (2014).
79. McClean, P. E. Lavin, M. Gepts, P. & Jackson, S. A. *Phaseolus vulgaris*: a diploid model for soybean. In *Genetics and genomics of soybean*, 55–76 (Springer, 2008).
80. Bouffleur, T. R. *et al.* Soybean anthracnose caused by colletotrichum species: Current status and future prospects. *Mol. Plant Pathol.* **22**, 393–409 (2021).
81. Zipfel, C. *et al.* Perception of the bacterial pamp ef-tu by the receptor efr restricts agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749–760 (2006).
82. Chinchilla, D. *et al.* A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497–500 (2007).
83. Oblessuc, P. R. *et al.* Dissecting *Phaseolus vulgaris* innate immune system against *Colletotrichum lindemuthianum* infection. *Plos One* (2012).

## Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support, and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for a Ph.D. fellowship to AA (2019/03232-6).

## Author contribution statement

Conceived and designed the analysis: CMSD, WAP, AA. Performed the analysis: CMSD, WAP, AA, EMAS. Wrote the original draft preparation: CMSD. Wrote review and editing: CMSD, WAP, AA, EMAS.

## Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

## Competing Interests

The authors declare no competing interests.

## Supplementary Tables

**Supplementary Table S1.** Kinase and LRR domains annotation of 230 proteins.

**Supplementary Table S2.** Subfamily classification of bean 230 LRR-RLKs.

**Supplementary Table S3.** Bean 230 LRR-RLKs compositional analyses.

**Supplementary Table S4.** Bean 230 LRR-RLKs subcellular localizations.

**Supplementary Table S5.** Position of LRR-RLK genes and molecular markers associated with resistance loci in *Phaseolus vulgaris* chromosomes.

**Supplementary Table S6.** Collinearity events and Ka/Ks values of bean LRR-RLKs.

**Supplementary Table S7.** Synteny between *Phaseolus Vulgaris* and *Glycine max* genes.

**Supplementary Table S8.** Bean RLK-LRR genes differentially expressed at 72 hours after inoculation in strains Puebla 152 (resistant) and Jaguar (susceptible) with race 73 of *Colletotrichum lindemuthianum*.

**Supplementary Table S9.** Bean RLK-LRR genes differentially expressed at 96 hours after inoculation in strains Puebla 152 (resistant) and Jaguar (susceptible) with race 73 of *Colletotrichum lindemuthianum*.

## Supplementary Figures

**Supplementary Fig. 1.** Phylogenetic and functional domain analyses of LRR-RLK proteins from *Phaseolus vulgaris*. In the phylogenetic tree, the different colors represent distinct protein classifications into subfamilies obtained by HMMER. The different domains found are also identified by different colors.

**Supplementary Fig. 2.** Phylogenetic and conserved motif analyses of LRR-RLK proteins from *Phaseolus vulgaris*. In the phylogenetic tree, the different colors represent distinct protein classifications into subfamilies obtained by HMMER. The different motifs found are also identified by different colors.

**Supplementary Fig. 3.** Phylogenetic analysis and subcellular localization heatmap of LRR-RLK proteins from *Phaseolus vulgaris*. In the phylogenetic tree, the different colors represent distinct protein classifications into subfamilies obtained by HMMER. The most likely subcellular localization is indicated in parentheses next to the protein identification.

**Supplementary Fig. 4.** Phylogenetic and gene organization (exon and intro compositions) analyses of LRR-RLK genes from *Phaseolus vulgaris*. In the phylogenetic tree, the different colors represent distinct protein classifications into subfamilies obtained by HMMER.

**Supplementary Fig. 5.** Phylogenetic and cis-element analyses of LRR-RLK genes from *Phaseolus vulgaris*. In the phylogenetic tree, the different colors represent distinct protein classifications into subfamilies obtained by HMMER. The different cis-elements found are also represented by different colors.

**Supplementary Fig. 6.** Chromosomal colocalization of *Phaseolus vulgaris* LRR-RLK genes and markers located 500 kb upstream and downstream to anthracnose resistance loci and quantitative trait loci (QTLs).

**Supplementary material is available at the following link:**

<https://drive.google.com/drive/u/1/folders/1Ubc0ov5TGZeDjjDEHuprq-LPMNVN20Vm>