



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

SAMUEL GOMES DE ABREU

**ALTERAÇÕES NO FLUXO METABÓLICO EM FOLHAS DE DUAS CULTIVARES
DE FEIJÃO-CAUPI SOB INFECÇÃO DO VÍRUS CPSMV**

**FORTALEZA
2025**

SAMUEL GOMES DE ABREU

**ALTERAÇÕES NO FLUXO METABÓLICO EM FOLHAS DE DUAS CULTIVARES
DE FEIJÃO-CAUPI SOB INFECÇÃO DO VÍRUS CPSMV**

Monografia apresentada ao Programa Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A99a Abreu, Samuel Gomes de.

Alterações no fluxo metabólico em folhas de duas cultivares de feijão-caupi sob infecção do vírus
CPSMV / Samuel Gomes de Abreu. – 2025.
50 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2025.

Orientação: Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso.

1. Feijão-caupi. 2. CPSMV. 3. Metabolômica. I. Título.

CDD 661

SAMUEL GOMES DE ABREU

ANÁLISE COMPARATIVA DE FLUXO METABÓLICO DE DUAS CULTIVARES DE
CAUPI SOB INFECÇÃO DE CPSMV

Monografia apresentada ao Programa de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovada em: 18/07/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Danilo de Menezes Daloso (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

D.ra Eva Gomes Morais
Universidade Federal do Ceará (UFC)

M.a Isabelle Mary Costa Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Wladya e Alfredo.
A minha tia, Elisa Mara.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo aporte financeiro à realização desse trabalho.

À minha família, minha fonte de suporte em todas as fases da vida. À minha mãe, por todo o sacrifício, noites mal dormidas, abraços e conversas. Ao meu pai, por todo o sacrifício, sempre me incentivar a ir mais longe, todos os cafés e me testar como cientista. À minha tia, por todo o sacrifício, lembranças e idas ao interior.

Aos meus padrinhos, Fábio e Jesus, Ricardo e Fábio por serem como uma segunda família para mim.

Aos meus amigos que me acompanham desde a época de escola até hoje, Carolina, Laura, Matheus, Neto, Pedro e Vitória, por crescerem comigo, partilharem momentos, risadas, conquistas, derrotas e continuarem sendo excelentes amigos.

Ao grupo expandido que chegou recentemente, Ana Júlia, Eugênio, Lívia, Maria Júlia e Vitória, por sempre compartilharem momentos de leveza e alegria, além de todas as complicações diárias.

Aos meus amigos da universidade, em especial o Gabinete, Alana, Ana Carolina, Arlene, Axel, Beatriz, Carolina, Débora, Gabrielly, Guilherme, Ianah, Júlia, Laryssa, Levi, Luan, Maria Eduarda, Pedro, Rudá, Thiago, Vitória e Yandra, pelos incontáveis e mais variados momentos juntos na universidade, passamos por provas, conquistas, desafios, perdas, viagens, festas, brigas e eu não poderia ter escolhido pessoas melhores para passar por essa experiência.

Aos professores do laboratório, Professor Albenísio por sempre instigar o conhecimento científico e ao Professor Danilo pela excelente orientação, por sempre conseguir tranquilizar e estar disponível para seus orientandos.

Aos meus parceiros de laboratório, Allana, Bruno, Caroline, Daiane, Eva, Fábio, Janaina, Jônatas, Katharine, Magna, Matheus, Patrick, Paulo, Raysa e Vitória, por fazerem a rotina no laboratório um trabalho mais leve e divertido. Em especial ao Levi, que entrou junto comigo e juntos conseguimos provar que nenhuma tarefa é pequena demais para ser dividida.

À Universidade Federal do Ceará pela estrutura e oportunidade.

RESUMO

O feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) é uma espécie de suma importância para a região Nordeste do Brasil, sendo responsável por mais de um milhão de hectares de terra cultivada todos os anos na região. A diversidade genética do feijão-caupi permite que genótipos apresentem diferenças substanciais no que concerne a produtividade e o desempenho frente aos estresses bióticos e abióticos. Neste contexto, a infecção pelo vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV) é responsável por perdas consideráveis na produção. Assim, torna-se importante investigar os mecanismos subjacentes à resistência e à sensibilidade ao CPSMV para melhor entender quais fatores regulam a dicotomia entre crescimento e defesa ao CPSMV nesta espécie. Neste estudo, foram utilizados dois cultivares com características contrastantes; (i) macaibo - resistente a estresses abióticos (ex: calor e escassez de água) e bióticos (ex: infecções virais), mas com baixa produtividade; (ii) pitiuba - sensível à infecção viral bem como a fatores abióticos, porém com maior capacidade produtiva. A fim de desvendar as respostas metabólicas de macaibo e pitiuba à infecção por CPSMV, plantas desses genótipos foram cultivadas e, após atingirem estágio V4, a folha central do segundo trifoliolo, aqui chamada de folha local, foi inoculado com o vírus. O trifoliolo foi coletado e imerso em solução de glicose uniformemente marcada com carbono 13 (glicose- ^{13}C), sendo retirado e congelado em 2 e 8 horas após a inoculação do vírus. Metabólitos polares foram extraídos e analisados via cromatografia gasosa acoplada a um espectômetro de massas. Os metabólitos foram identificados com base em bibliotecas, em seguida, foi realizado tratamento estatístico para calcular o enriquecimento relativo de ^{13}C ($R^{13}\text{C}$) nos fragmentos identificados. Aumento em $R^{13}\text{C}$ foi identificado em myoinositol, ácido butírico, glicose e sacarose no macaibo. No pitiuba, foi constatado incremento de $R^{13}\text{C}$ apenas em sacarose. No entanto, foram observados aumentos de ^{13}C em alguns isotópicos de outros metabólitos em ambos os genótipos. A resposta ao estresse do Macaibo é potencialmente mais ampla que a do Pitiuba, modificando diferentes rotas, o que pode justificar sua melhor resistência a estresses, entretanto, conclusões sobre as diferentes respostas metabólicas dos genótipos frente a infecção por CPSMV ainda são limitadas.

Palavras-chave: Feijão-caupi; CPSMV; Metabolômica.

ABSTRACT

Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) is a species of paramount importance for the Northeast region of Brazil, being responsible for more than one million hectares of cultivated land every year in the region. The genetic diversity of cowpea allows genotypes to present substantial differences in terms of yield and performance against biotic and abiotic stresses. In this context, infection by the severe cowpea mosaic virus (CPSMV) is responsible for considerable losses in production. Thus, it is important to investigate the mechanisms underlying resistance and sensitivity to CPSMV to better understand which factors regulate the dichotomy between growth and defense to CPSMV in this species. In this study, two cultivars with contrasting characteristics were used; (i) macaibo - resistant to abiotic (e.g. heat and water scarcity) and biotic (e.g. viral infections) stresses, but with low productivity; (ii) pitiuba - sensitive to viral infection as well as to abiotic factors, but with greater productive capacity. To unravel the metabolic responses of macaibo and pitiuba to infection by CPSMV, plants of these genotypes were cultured and, after reaching stage V3, the central leaf of the second trifoliolate, here called the local leaf, was inoculated with the virus. The trifoliolate was collected and immersed in glucose solution uniformly labeled with carbon 13 (glucose-¹³C), being removed and frozen in 2 and 8 hours after inoculation of the virus. Polar metabolites were extracted and analyzed via gas chromatography coupled to a mass spectrometer. The metabolites were identified based on libraries, then statistical treatment was performed to calculate the relative enrichment of ¹³C (R¹³C) in the identified fragments. An increase in R¹³C was identified in myo-inositol, butyric acid, glucose and sucrose in macaibo. In Pitiuba, an increase in R¹³C was found only in sucrose. However, increases in ¹³C were observed in some isotopologues of other metabolites in both genotypes. The stress response of Macaibo is potentially broader than that of Pitiuba, modifying different pathways, which may explain its better resistance to stresses, however, conclusions about the different metabolic responses of genotypes to CPSMV infection are still limited.

Keywords: Cowpea; CPSMV; Metabolomic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema ilustrando A metodologia de marcação com ^{13}C	18
Figura 2 - Relação de todos os metabólitos identificados pela análise de CG-EM nas amostras.....	23
Figura 3 – Heatmap (1) dos metabólitos que tiveram seus $R^{13}\text{C}$ calculados em macaibo.	25
Figura 4 – Heatmap (2) dos metabólitos que tiveram seus $R^{13}\text{C}$ calculados em macaibo.	26
Figura 5 – Heatmap (1) dos metabólitos que tiveram seus $R^{13}\text{C}$ calculados em pitiuba.....	27
Figura 6 – Heatmap (2) dos metabólitos que tiveram seus $R^{13}\text{C}$ calculados em pitiuba.....	28
Figura 7 - PCA dos metabólitos usando os dados de $F^{13}\text{C}$	29
Figura 8 - Análise de correlação de Pearson.....	31
Figura 9 – Heatmap (1) das razões M1/M0 e M2/M0 do ácido succínico do macaibo.....	33
Figura 10 – Heatmap (2) das razões M1/M0 e M2/M0 do ácido succínico do macaibo.....	34
Figura 11 – Heatmap (1) das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido succínico do pitiuba.	
.....	35
Figura 12 – Heatmap (2) das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido succínico do pitiuba.	
.....	36
Figura 13 – Heatmap da razão M1/M0 da xilose do pitiuba.	37
Figura 14 – Heatmap (1) das razões M1/M0 e M2/M0 da xilose do macaibo.	38
Figura 15 – Heatmap (2) das razões M1/M0 e M2/M0 da xilose do macaibo.	39
Figura 16 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 da rafinose do macaibo.	40
Figura 17 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 da rafinose do pitiuba.	41
Figura 18 – Heatmap das razões M1/M0 e M2/M0 do ácido cítrico do macaibo.	42
Figura 19 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido cítrico do pitiuba.	43
Figura 20 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido piroglutâmico do	
macaibo.....	44
Figura 21 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido glutâmico do macaibo.	45
Figura 22 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido málico do macaibo.	46
Figura 23 - Ciclo do TCA com os metabólitos enriquecidos encontrados em destaque	49

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1- Cálculo para se obter o enriquecimento fracionário (F13C). M1, M2 e Mn: Abundância relativa de cada isotopólogo; n: Número de carbonos 13 presentes no fragmento.	20
Equação 2- Cálculo para se obter o enriquecimento fracional relativo (R13C). R13C: Enriquecimento fracional relativo; t0: Amostra controle	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CPSMV	Vírus do mosaico severo do caupi
^{13}C	Carbono 13
R^{13}C	Enriquecimento relativo de ^{13}C
F^{13}C	Enriquecimento fracional
RNA	Ácido ribonucleico
RIA	Abundância relativa dos isotopólogos
PCA	Análise componente principal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 HIPÓTESE.....	16
3 OBJETIVOS	16
3.1 Objetivos geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Desenho experimental	17
4.2 Material vegetal e condições de crescimento.....	17
4.3 Inoculação com CPSMV	17
4.4 Marcação com ^{13}C e coleta do material foliar	18
4.5 Extração metabólica.....	18
4.6 Derivatização das amostras	19
4.7 Análise de cromatografia gasosa acoplada à spectrometria de massas	19
4.8 Análise de enriquecimento por ^{13}C.....	20
4.9 Análises das razões Mn/M0.....	21
4.10 Análises estatísticas.....	21
5 RESULTADOS.....	22
5.1 Identificação de metabólitos	22
5.2 Metabólitos enriquecidos com ^{13}C.....	24
5.3 Análise de enriquecimento de ^{13}C através das razões Mn/M0.....	32
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	51

1 INTRODUÇÃO

Conhecido como feijão-caipi ou feijão-de-corda, *Vigna unguiculata* (L.) Walp é uma cultura com importância reconhecida na região do Nordeste brasileiro. Entre os anos de 1996 e 2003, essa cultura ocupou mais de 1.300.000 hectares em média por ano na região e produziu mais de 400.000 toneladas de grãos (EMBRAPA, 2025). O cultivo desse grão também é importante para a geração de empregos e alimentação, visto que suas vagens podem ser colhidas tanto no estado de plena maturação quanto ainda na fase imatura, assim sendo denominado de “feijão-verde” (EMBRAPA, 2025). Uma das características que corroboram para o cultivo de feijão-caipi ser viável na região Nordeste é a sua resiliência a estresses abióticos típicos do território, como longos períodos de estiagem, salinidade do solo e altas temperaturas (Goufo et al., 2017; Liu et al., 2023; Mohammed et al., 2024). Entretanto, ainda existem uma gama de agentes biológicos que causam doenças no feijão-caipi, os principais são os vírus, como, por exemplo, o Vírus do Mosaico Severo do Caipi (CPSMV), enfoque deste estudo (Albersio et al., 2005).

O CPSMV é um vírus de RNA do gênero *Comovirus*, cuja inoculação na natureza acontece de forma mecânica ou por vetores, comumente insetos. Os sintomas ocasionados pelo CPSMV em plantas suscetíveis são: redução do crescimento, clareamento e necrose de nervuras, formação de um mosaico nas folhas e morte celular (BEZERRA, 2016; EMBRAPA, 2025). Estudos mostraram que a infecção por CPSMV pode causar perdas de até 66% da colheita em outras cultivares do feijão-caipi (Booker; Umaharan; McDavid, 2005). Entretanto, existem cultivares de feijão-caipi que são resistentes à infecção do CPSMV, como é o caso da cultivar Macaibo, que não apresenta sintomas sob CPSMV (BRET, 2023). Esse genótipo, entretanto, apresenta uma menor produtividade de grãos, uma relação oposta acontece com outra cultivar do feijão-de-corda, o Pitiuba, que é infectado de forma severa pelo CPSMV, mas apresenta uma melhor produtividade de grãos (Albersio et al., 2005). Essa discrepância na resposta ao CPSMV pode estar relacionada a diferenças inerentes à genética e no metabolismo primário desses genótipos, que podem levar a uma diferença na resposta metabólica quando são inoculadas com o CPSMV, possibilitando a cultivar Macaibo se proteger melhor contra o agente biológico em questão (BRET, 2023).

O metabolismo primário é responsável pela síntese de diversos compostos essenciais, como carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos, e além disso, mais

especificamente, o ciclo glicolítico é responsável pela produção e balanço de moléculas energéticas (ATP) (Kierans; Taylor, 2024). Também é atribuído a esse metabolismo funções de defesa da planta, o que pode alterar a regulação de outras funções desse metabolismo (Bolton, 2009; Maeda, 2019), como o aumento de aminoácidos, que ajudam na resposta ao estresse, e alterações nos açúcares, relevantes como fonte de energia e sinalização (Llave, 2016). O metabolismo primário das plantas também é responsável por respostas a infecções virais, que podem vir a afetar o balanço entre crescimento e proteção da planta (Rojas et al., 2014). Também se sabe que patógenos alteram o metabolismo do hospedeiro e são responsáveis pelo aumento da produção de açúcares (Thines; Weber; Talbot, 2000), ocasionando também mudanças no balanço entre crescimento e defesa das plantas, visto que esses dois aspectos utilizam os mesmos recursos da planta (He; Webster; He, 2022), além disso essas respostas também podem variar entre genótipos (Figueroa-Macías et al., 2021). Portanto, analisar as respostas metabólicas quando a planta é infectada por vírus pode auxiliar a elucidar os mecanismos que regulam o balanço entre crescimento e defesa e que conferem características contrastantes aos genótipos aqui estudados.

Diante do supra exposto e a fim de investigar as bases metabólicas que discriminam essas duas cultivares sob infecção por CPSMV, o objetivo deste trabalho foi identificar como a infecção por CPSMV altera o fluxo do carbono glicolítico, usando glicose totalmente marcada com ^{13}C , substância amplamente usada em experimentos de fluxo metabólico (Zamboni et al., 2009).

2 HIPÓTESE

A tolerância ao CPSMV está relacionada a uma distribuição diferencial do fluxo glicolítico espaço-temporal no metabolismo primário de folhas de feijão-caupi.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos geral

Analisar as alterações metabólicas em cultivares do feijão-caupi em resposta a infecção viral por CPSMV.

3.2 Objetivos específicos

- Infectar as plantas resistentes e sensíveis de feijão-caupi com o CPSMV;
- Realizar a marcação usando glicose-¹³C;
- Avaliar o perfil metabólicos primários das plantas;
- Verificar as rotas de distribuição de ¹³C nos metabólitos identificados;
- Avaliar diferenças entre respostas metabólicas entre os genótipos, além de diferenças entre folhas locais (diretamente infectadas com CPSMV) e sistêmicas (adjacentes do trifolíolo infectado com CPSMV);
- Identificar possíveis vias metabólicas usadas pela planta para reagir a infecção viral;

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho experimental

Foram utilizados dois genótipos do feijão-caupi, Macaibo, genótipo resistente a infecções, e Pitiuba, genótipo suscetível a infecções. Repetições foram inoculadas com e sem o vírus (CPSMV e Mock) e passaram por tempos distintos de marcação com ^{13}C -glicose (2 e 8 horas) (Figura 1). Após, folhas locais e sistêmicas foram coletadas. Totalizando 16 tratamentos no experimento.

4.2 Material vegetal e condições de crescimento

Sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) foram desinfetadas com uma solução de NaClO 0,2% (m/v), agitadas por 5 minutos e posteriormente lavadas por 3 vezes com água destilada. As sementes foram então transferidas para bandejas contendo areia umedecida para que houvesse a germinação. As plântulas foram transplantadas após atingirem o estágio de gancho hipocótilo (5 dias após a germinação) para vasos de plástico com capacidade de 3 L, contendo mistura de areia e vermiculita (1:1) em condições de casa de vegetação com luz solar natural ($300\text{-}650 \mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PPFD) com temperaturas diárias variando entre 27 e 31° C e umidade relativa do ar em $79.8 \pm 10.9\%$. As plantas foram nutridas com solução de Hoagland e Arnon (Hoagland e Arnon, 1920) inicialmente diluída pela quarta parte, com posteriores irrigações com a solução diluída pela metade feitas uma vez na semana até que as plantas de feijão-caupi desenvolvessem seu terceiro trifolíolo (estágio V4).

4.3 Inoculação com CPSMV

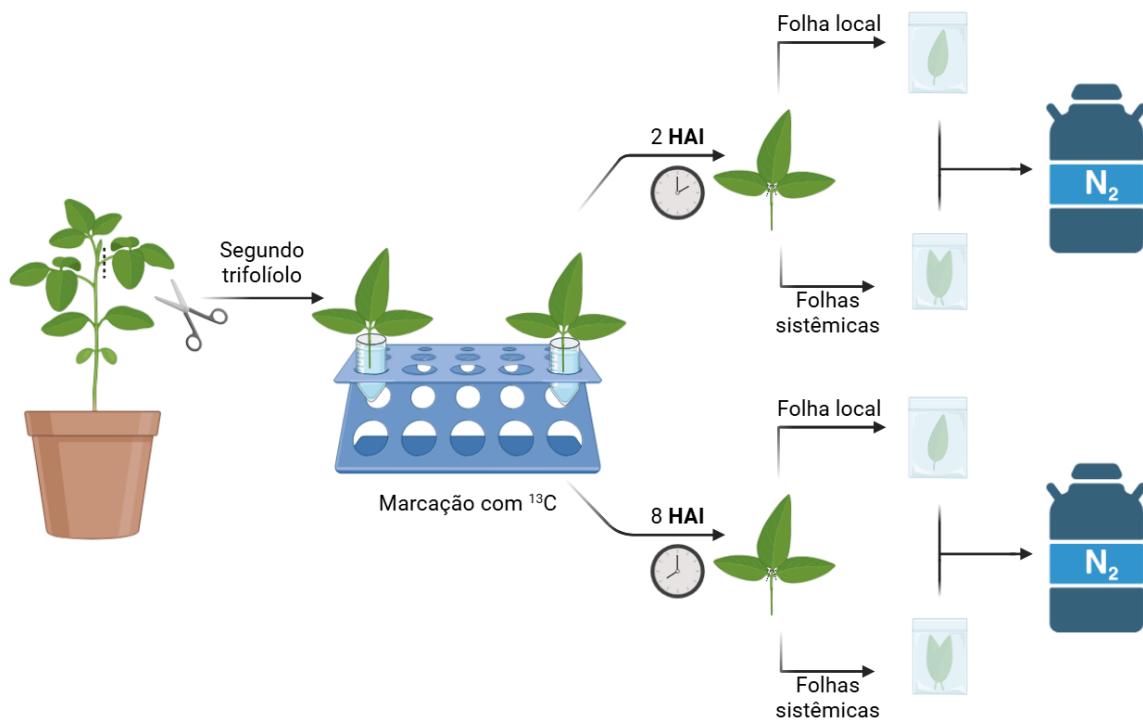
O inóculo do vírus do mosaico severo do caupi (CPSMV), variedade CE, foi isolado de folhas de pitiuba exibindo sintomas clássicos, como descrito anteriormente (Paz et al., 1999). Folhas de pitiuba infectadas com o vírus foram maceradas em tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e sulfito de sódio (1:10, m/v) por 10 minutos. Carborundum (granulação 600) foi adicionado à solução do inóculo para facilitar a entrada do vírus no tecido foliar. A inoculação do controle negativo (Mock) e CPSMV foi feita na folha central do segundo trifolíolo completamente expandido com o auxílio de um algodão. Plantas controles foram inoculadas

com o mesmo tampão, mas sem a presença de CPSMV.

4.4 Marcação com ^{13}C e coleta do material foliar

As plantas foram cultivadas e inoculadas como descrito acima. O segundo trifoliolo foi cortado na base do pecíolo, que logo em seguida foi imerso em 5 mL de uma solução de tampão fosfato de potássio 10 mM (pH 7,0) e 5 mM glicose uniformemente marcada com Carbono 13 (^{13}C) (Sigma-Aldrich). Folhas locais e sistêmicas foram coletadas após 0, 2 e 8 horas após a inoculação e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido para análises metabolômicas.

Figura 1 - Esquema ilustrando A metodologia de marcação com ^{13}C



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Esquematização visual da metodologia de marcação com ^{13}C do material foliar.

4.5 Extração metabólica

As amostras de folhas locais e sistêmicas foram individualmente maceradas em nitrogênio líquido com um pistilo e almofariz até formarem um pó fino e homogêneo. Após, elas foram pesadas separadamente em microtubos (2 ml), com as amostras foliares pesando

aproximadamente 50 mg cada. A extração foi feita baseada num protocolo para extração de metabólitos polares previamente estabelecido (Lisec et al., 2006), com adaptações. Para a extração de metabólitos primários, foram adicionados 700 µL de metanol 100% para interromper a atividade metabólica e 30 µL de uma solução estoque de ribitol (0.2 mg/mL em água ultrapura Milli-Q®) como controle analítico interno. As amostras foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, colocadas sob agitação térmica por 15 minutos, a 350 rpm e 70°C. Depois disso, foram centrifugadas por 10 minutos a 11.000 rcf e 27°C. Após, 500 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo de 2 mL, e 375 µL de CHCl₃ e 750 µL de água ultrapura foram adicionados, com as amostras sendo agitadas em vórtex após a adição de cada uma dessas substâncias. Por fim, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 rcf, 150 µL da fase polar das amostras foram coletadas em novos tubos de 1.5 mL e 500 µL foram armazenados em outros tubos de 1.5 mL como *backup*. As amostras foram secas em *speedvac* e armazenadas em ultrafreezer para a posterior etapa de derivatização.

4.6 Derivatização das amostras

A derivatização foi feita seguindo um protocolo previamente estabelecido (Lisec et al., 2006). As amostras foram secas novamente em *speedvac* por 45 minutos como forma de remover qualquer vestígio de umidade. Após, foram adicionados 20 µL de cloridrato de metoxiamina, presente numa solução com concentração de 20 mg por mL de piridina, e então as amostras foram agitadas em vórtex. As amostras foram colocadas sob agitação térmica por 2 horas, numa temperatura de 37°C a 400 rpm. Depois disso, os tubos foram colocados na centrífuga por 30s a 10.000 rcf para remoção de amostras na parede do tubo. Foram adicionados 35 µL de N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA) e os tubos foram homogeneizados em vórtex. Mais uma vez as amostras foram postas sob agitação térmica por 30 minutos a 37°C e 400 rcf e centrifugadas por 30s a 10.000 rcf. Os mesmos processos foram realizados em um microtubo sem amostra, utilizado como controle da análise. Por fim, foram transferidos 50 µL de cada um dos tubos para *vials* que foram levados para análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).

4.7 Análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

A detecção dos metabólitos derivatizados foi feita por CG-EM (modelo QP-PLUS 2010, Shimadzu, Japão) com fonte de ionização eletroimpacto e um analisador quadrupolo, utilizando coluna RTX-5MS (30m x 0,25mm x 0,25 μ m), com diluição no modo *split* (1:5) e gás Hélio como arraste (vazão 1,2 mL/min). A corrida foi iniciada com a temperatura de 80°C por 4 minutos, com aquecimento de 10°C/min com uma rampa de temperatura final de 315°C por 8 minutos. A temperatura de injeção foi de 230°C, com 250°C na fonte de ionização. A análise dos espectros de massas foi realizada com auxílio do software Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Por meio do padrão de fragmentação de massa/carga (*m/z*) dos picos e por seus tempos de retenção, foi possível comparar esses dados com bancos de dados já existentes para identificar os possíveis metabólitos que foram detectados. Para isso, usamos a biblioteca Golm Metabolome Database (Kopka et al., 2005) e uma biblioteca estabelecida no laboratório.

4.8 Análise de enriquecimento por ^{13}C

Para se obter os valores de enriquecimento por ^{13}C nos diferentes metabólitos identificados, primeiro foi identificado todos os isotopólogos presentes na fragmentação do metabólito.

Após, é calculada a abundância relativa dos isotopólogos (RIA), em que todos os valores dos isotopólogos de cada fragmento são transformados em porcentagens, sendo a soma das intensidades de todos seja igual a 100%. Seguindo esses passos, obtém-se as RIAs, com cada um representado por M_n , em que n é o número de carbonos 13 presentes no fragmento. O enriquecimento fracional ($F^{13}\text{C}$) foi então obtido pela seguinte equação:

Equação 1- Cálculo para se obter o enriquecimento fracionário ($F^{13}\text{C}$). M_1 , M_2 e M_n : Abundância relativa de cada isotopólogo; n : Número de carbonos 13 presentes no fragmento.

$$F^{13}\text{C} = \frac{(M_1 \times 1) + (M_2 \times 2) + \dots + (M_n \times n)}{n}$$

Fonte: Próprio autor.

Por fim, para se obter o R¹³C, normalizou-se o F¹³C pelo tempo 0 do experimento. Como indica a fórmula abaixo:

Equação 2- Cálculo para se obter o enriquecimento fracional relativo (R13C). R13C: Enriquecimento fracional relativo; t0: Amostra controle

$$R^{13}C = \frac{F^{13}C_{tx}}{F^{13}C_{t0}}$$

Fonte: Próprio autor.

Os cálculos descritos acima são baseados em trabalho prévio (Lima et al., 2018)

4.9 Análises das razões Mn/M0

Nem todos os isotopólogos foram detectados nos metabólitos identificados por CG-EM. Como uma forma de manter esses metabólitos nas análises, decidiu-se usar a razão entre o isotopólogo mais pesado identificado pelo M0, que representa a abundância natural de ¹³C. Ao calcular a razão da intensidade de Mn por M0, é possível analisar o nível de enriquecimento isotópico no fragmento analisado. Um valor maior dessa razão indica uma maior incorporação do isótopo pesado (¹³C) neste metabólito, em comparação com a abundância natural de ¹³C observada no M0.

4.10 Análises estatísticas

Foram utilizadas 4 repetições de cada tratamento em um delineamento inteiramente casualizado. Diferenças significativas em F¹³C e R¹³C através do tempo foram determinadas por análise de variância (ANOVA) e teste Tukey ($P \leq 0.05$) e Dunnet, usando o tempo 0 H como

controle. Essas análises estatísticas foram feitas utilizando o software estatístico Minitab 22 (State College, PA: Minitab, Inc.). Os gráficos foram feitos pelo Excel e heatmaps no MetaboAnalyst 6.0.

5 RESULTADOS

5.1 Identificação de metabólitos

Foram identificados ao todo 41 metabólitos (Tabela 1) nas amostras, dentre eles ácidos orgânicos, carboidratos, aminoácidos etc. Entretanto, esse número não representa a quantidade total de metabólitos em que todos isotopólogos foram identificados. Neste sentido, apenas 13 metabólitos tiveram fragmentos com todos os seus isotopólogos identificados nos dois genótipos. Em seguida, foram calculadas as abundâncias relativas de cada isotopólogo, que foi usada para o cálculo do F¹³C e R¹³C de cada tratamento/genótipo.

Figura 2 - Relação de todos os metabólitos identificados pela análise de CG-EM nas amostras.

Metabólito	TR	m/z	KEGG ID	Classificação
1 Lactic acid	8.05	191	C00256	Ac. Orgânico
2 Glycolic acid	8.36	177	C00160	Ac. Orgânico
3 Alanine	8.93	116	C00041	Aminoácido
4 Oxalic acid	9.68	190	C00209	Ac. Orgânico
5 Malonic acid	10.38	233	C00383	Ac. Orgânico
6 Valine	11.07	144	C16436	Aminoácido
7 Serine	11.76	116	C00065	Aminoácido
8 Norleucine	12.01	158	C01933	Ac. Orgânico
9 Glycerol	12.07	205	C00116	Outro
10 Isoleucine	12.36	158	C16434	Aminoácido
11 Proline	12.40	177	C00148	Aminoácido
11 Glycine	12.56	174	C00037	Aminoácido
12 Succinic acid	12.60	147	C00042	Ac. Orgânico
13 Glyceric acid	12.95	189	C00258	Ac. Orgânico
14 Fumaric acid	13.08	245	C00122	Ac. Orgânico
15 Malic acid	15.13	233	C00711	Ac. Orgânico
16 Pyroglutamic acid	15.57	156	C01879	Aminoácido
17 Butyric acid, 4-amino	15.65	174	C00334	Ac. Orgânico
18 Xylulose	15.82	263	C00310	Carboidrato
19 Threonic acid	15.93	177	C01620	Ac. Orgânico
20 D-Threitol	15.95	217	C16884	Álcool
21 Erythronic acid	16.13	292	C03064	Ac. Orgânico
22 Glutaric acid	16.20	198	C00489	Ac. Orgânico
23 Glutamic acid	16.74	246	C00025	Aminoácido
24 Phenylalanine	16.87	192	C02057	Aminoácido
25 D-Xylose	17.70	307	C00181	Carboidrato
26 Xylitol	17.81	217	C00379	Carboidrato
27 D-Arabinol	18.52	307	C01904	Álcool
28 Cinnamic acid	18.64	293	C10438	Ac. Orgânico
29 Shikimic acid	18.88	204	C00493	Ac. Orgânico
30 Citric acid	19.07	273	C00158	Ac. Orgânico
31 Dehydroascorbate	19.42	173	C05422	Ac. Orgânico
32 Fructose	19.73	217	C00095	Carboidrato
33 Mannopyranoside	19.95	133	-	Carboidrato
34 Glucose	20.01	319	C00031	Carboidrato
35 Inositol allo	20.58	191	-	Carboidrato
36 Mio-Inositol	21.90	305	C00137	Carboidrato
37 Glucoheptose	24.61	160	M00064	Carboidrato
38 Sucrose	26.58	361	C00042	Carboidrato
39 Galactinol	29.62	204	C01235	Carboidrato
40 Galactopyranoside	31.10	204	C03619	Carboidrato
41 Raffinose	36.13	437	C00492	Carboidrato

Fonte: Próprio autor.

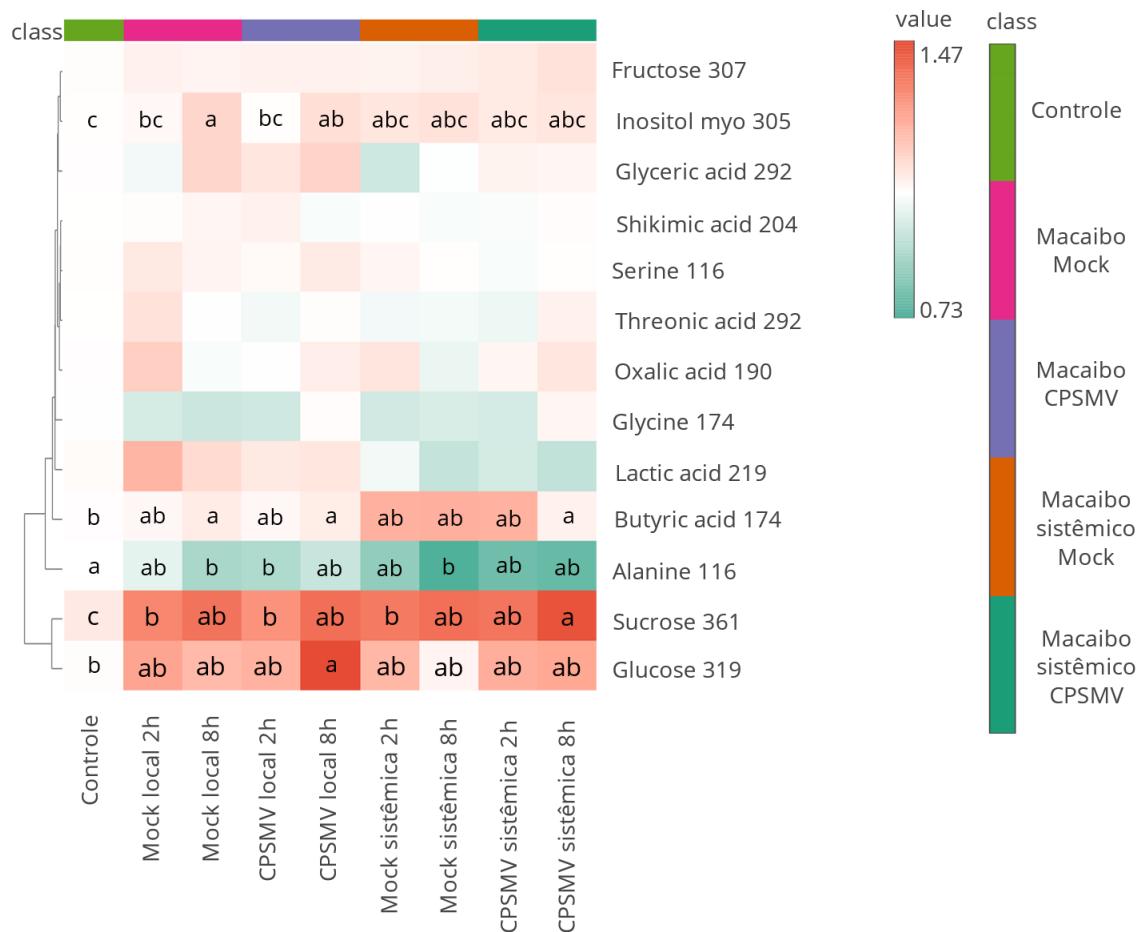
Legenda: Lista dos metabólitos encontrados nas amostras analisadas. A lista possui metabólitos polares que foram volatilizados, a lista possui uma relação com os nomes dos metabólitos, o seu tempo de retenção (TR) na cromatografia, a identificação da base de dados KEGG (KEGG ID) e sua classificação.

5.2 Metabólitos enriquecidos com ^{13}C

Através das análises estatísticas, foi possível constatar diferenças significativas de R ^{13}C nas amostras de Mock e CPSMV, quando comparadas com as amostras controle (tempo 0H), em ambos os genótipos. Isso significa que houve um aumento de ^{13}C em alguns metabólitos, tanto nas plantas de Macaibo, como nas plantas de Pitiuba. No Macaibo, genótipo naturalmente resistente à infecção viral, foram constatados uma maior quantidade de metabólitos com um aumento significativo de R ^{13}C ao longo dos tempos testados. No Pitiuba, genótipo suscetível a infecção, também foram identificados metabólitos com uma variação significativa de R ^{13}C , mas em menor quantidade (Figuras 2-3).

No Macaibo, os metabólitos com aumento significativo de R ^{13}C foram myo-inositol, ácido butírico, ácido glicérico, sacarose e glicose (Figura 2 e 3). Já no Pitiuba, foram observados aumento em R ^{13}C em sacarose, ácido glicérico e glicose (Figura 4 e 5). O R ^{13}C em alanina no Macaibo e shikimato e glicina no Pitiuba também variaram significativamente ao longo do tempo, mas não apresentaram incrementos em R ^{13}C , quando comparado com o tempo 0h (Figuras 2-3).

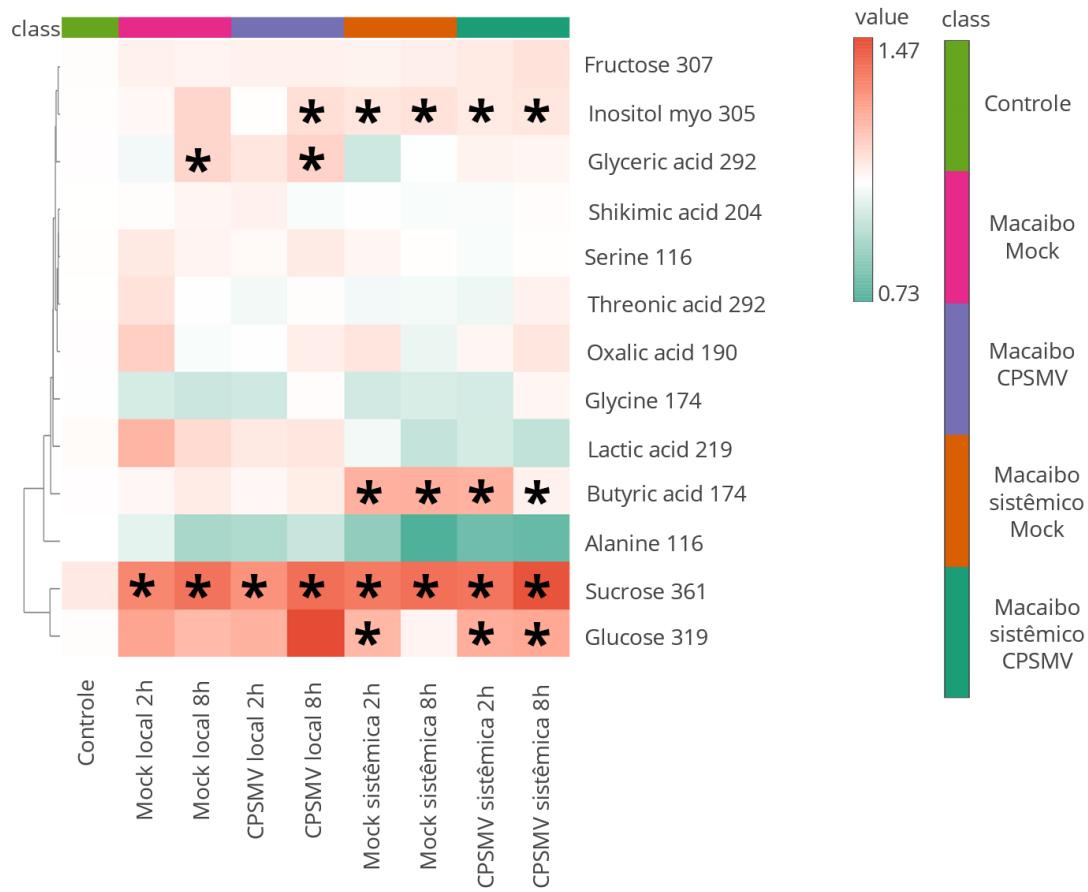
Figura 3 – Heatmap (1) dos metabólitos que tiveram seus R¹³C calculados em macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém todos os metabólitos do macaibo que tiveram seus R¹³C calculados e mostra a variação deles com relação ao controle pelo gradiente ao lado (value). Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada linha de metabólito indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

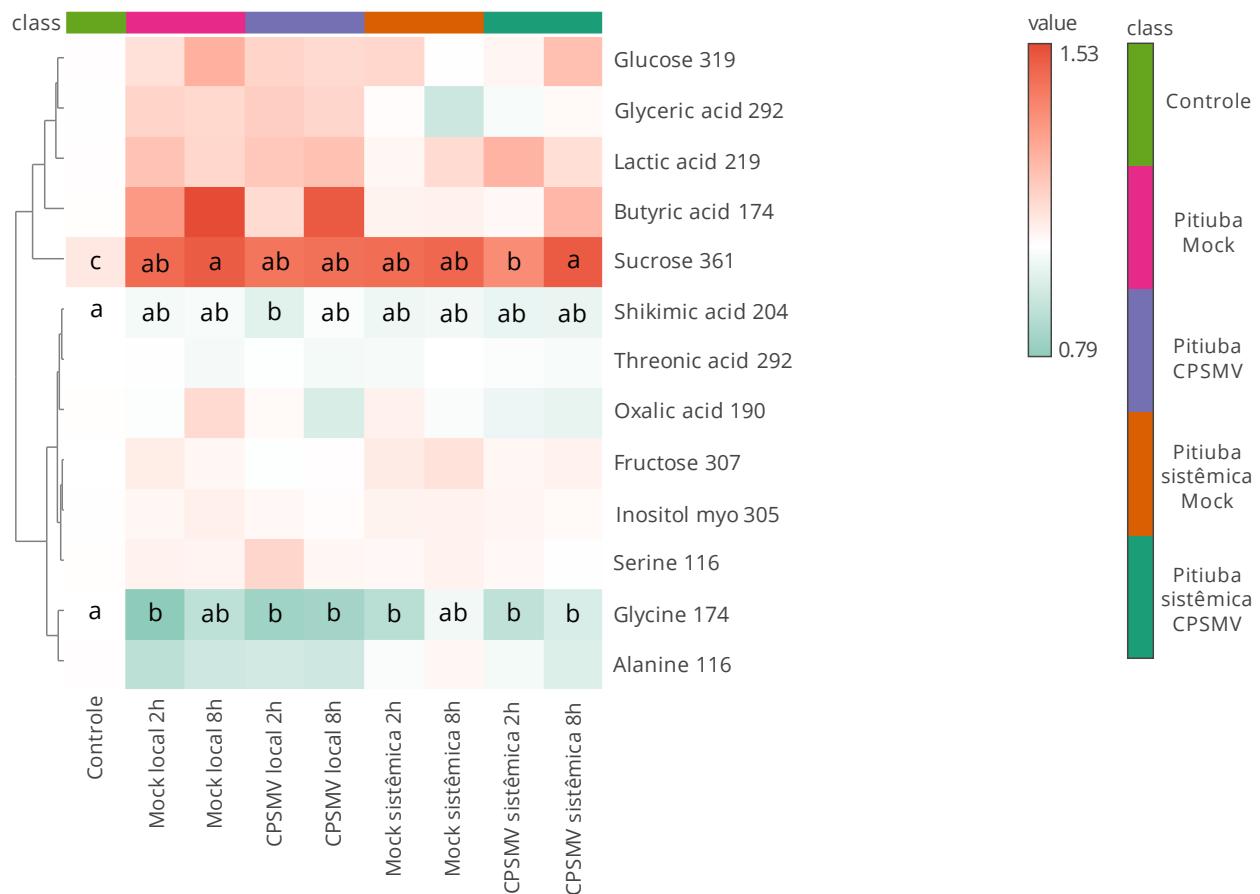
Figura 4 – Heatmap (2) dos metabólitos que tiveram seus R¹³C calculados em macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém todos os metabólitos do macaibo que tiveram seus R¹³C calculados e mostra a variação deles com relação ao controle pelo gradiente ao lado (value). Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst (n = 4).

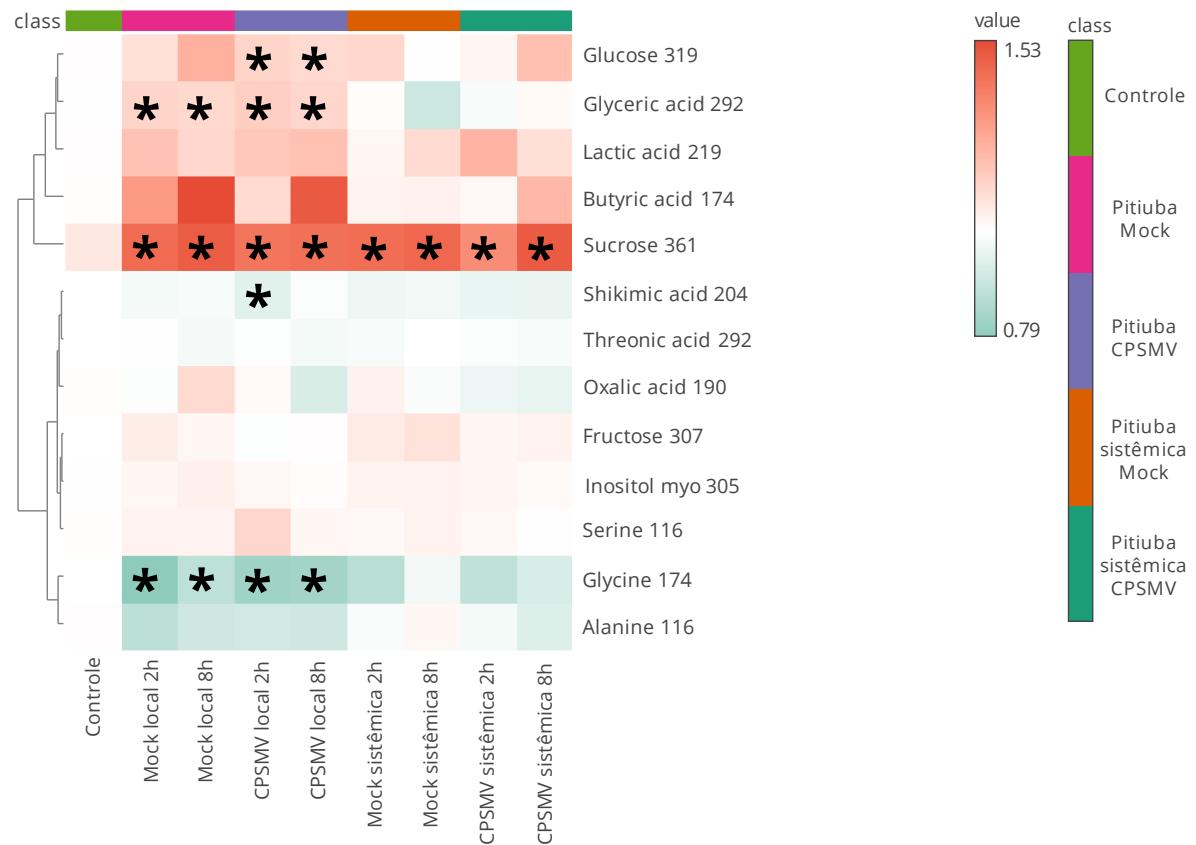
Figura 5 – Heatmap (1) dos metabólitos que tiveram seus R¹³C calculados em pitiuba.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém todos os metabólitos do pitaya que tiveram seus R¹³C calculados e mostra a variação deles com relação ao controle pelo gradiente ao lado (value). Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada linha de metabólito indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

Figura 6 – Heatmap (2) dos metabólitos que tiveram seus R¹³C calculados em pitiuba.

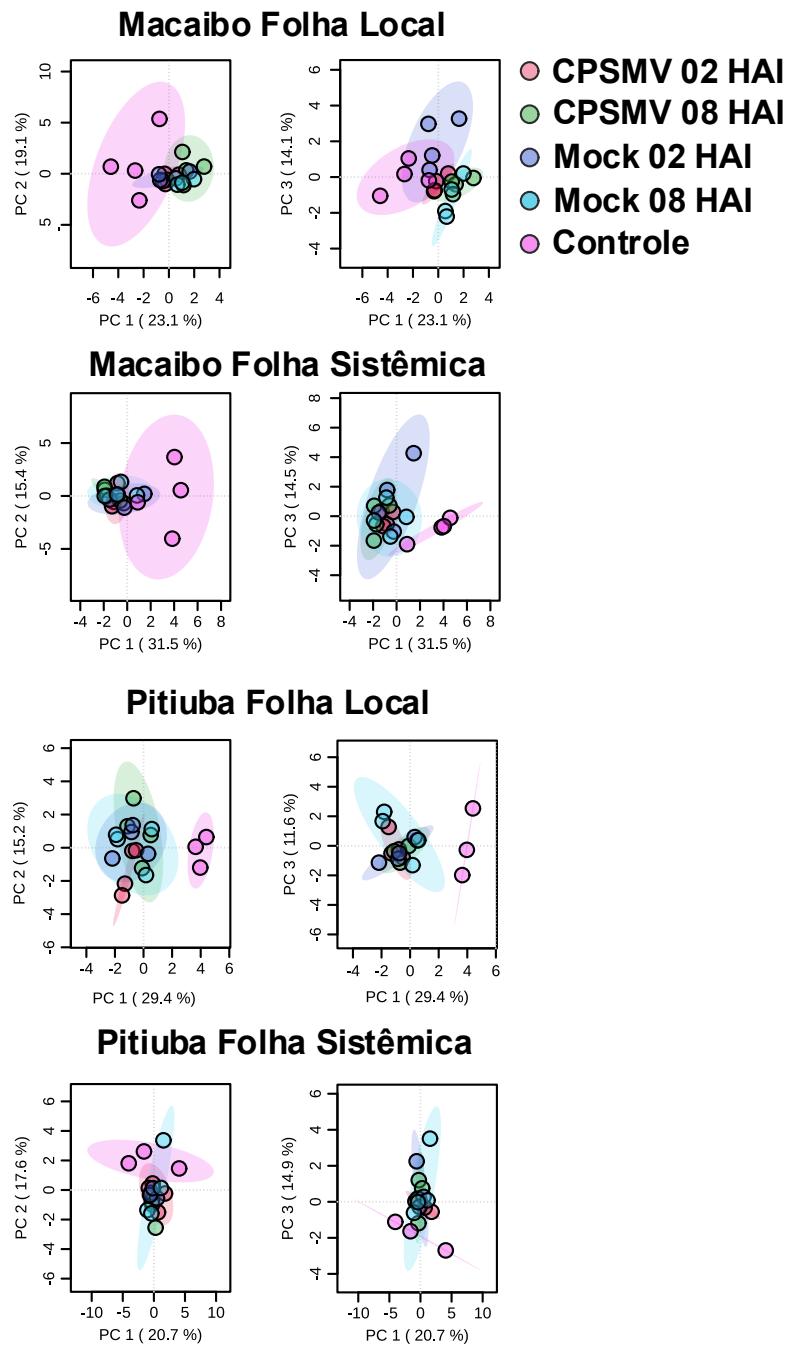


Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém todos os metabólitos do pitiuba que tiveram seus R¹³C calculados e mostra a variação deles com relação ao controle pelo gradiente ao lado (value). Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst (n = 4).

Os dados de F¹³C foram analisados usando a análise de componentes principais (PCA), considerando os 3 principais componentes (PC1, PC2 e PC3). Essa análise demonstrou que há uma certa separação entre os tempos 02 e 08 HAI em relação ao controle em quase todas as folhas e tratamentos, sendo menos aparente nas folhas sistêmicas do Pitiuba. Em contraste, a separação mais evidente pelo PC1 foi observada nas folhas local do Pitiuba. Em ambos os genótipos, não foi observado uma separação clara entre os tratamentos Mock e CPSMV (Figura 6).

Figura 7 - PCA dos metabólitos usando os dados de F¹³C.

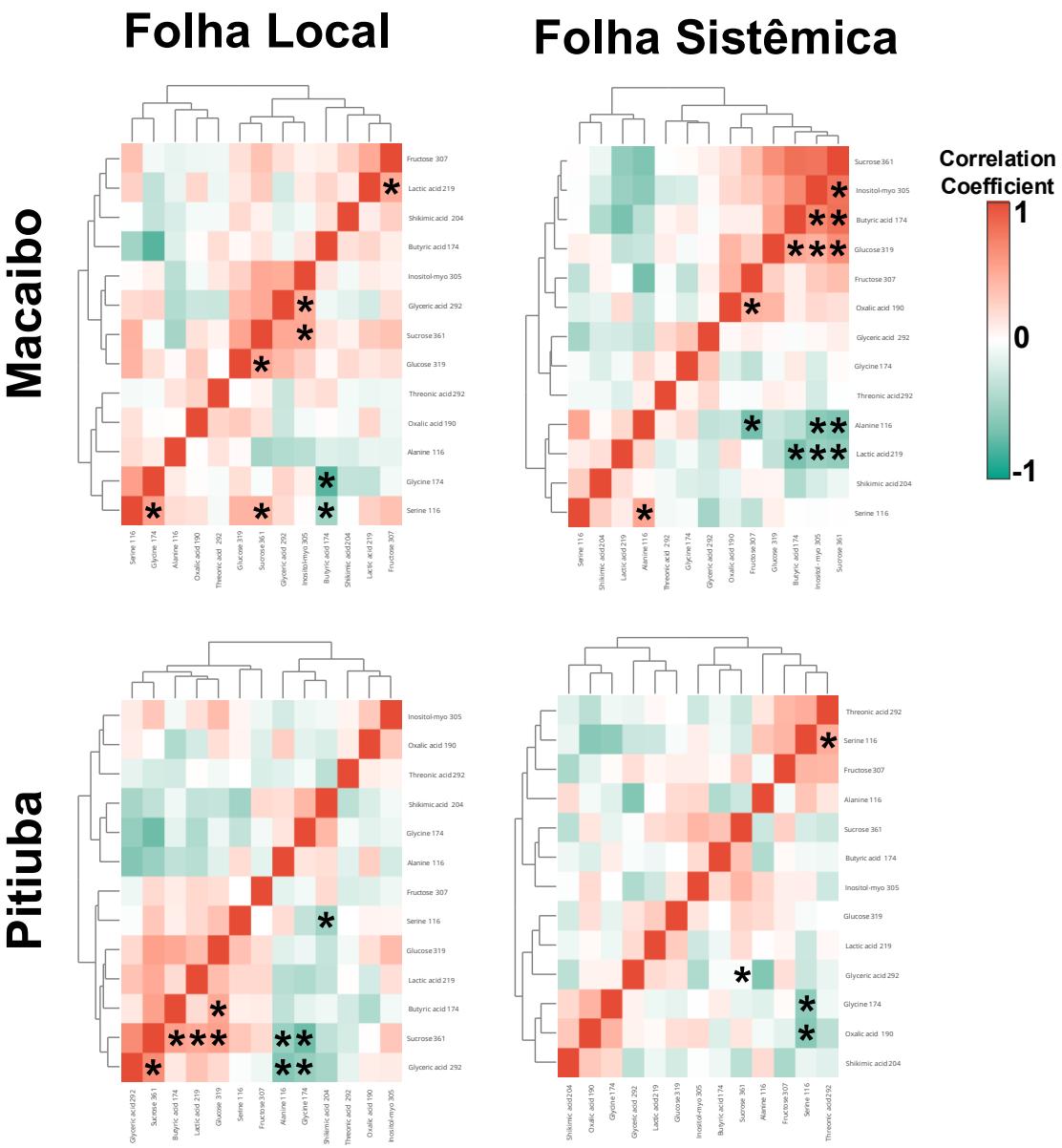


Fonte: Próprio autor.

Legenda: A PCA mostra o agrupamento dos metabólitos em cada tratamento usando os dados de F¹³C. Nos gráficos das análises o PC 1 se mantém no eixo x em ambos os gráficos do tratamento e o eixo y é composto pelo PC 2 e 3, respectivamente em cada tratamento.

Após, nós usamos os dados de F¹³C e realizamos uma análise de correlação de pearson em cada folha e genótipo. Nas folhas locais, 8 e 10 metabólitos apresentaram correlação significativa no macaibo e pitiuba, respectivamente. No entanto, nas folhas sistêmicas, uma grande diferença foi observada, em que 14 e 4 metabólitos apresentaram correlação significativa no macaibo e pitiuba, respectivamente. Sacarose foi positivamente correlacionada com glicose em todas as folhas, exceto nas folhas sistêmicas do pitiuba. Ademais, sacarose foi positivamente correlacionada com myo-inositol nas folhas local e sistêmica de macaibo e positiva e negativamente correlacionada com GABA e alanina nas folhas local do Pitiuba e sistêmica do Macaibo, respectivamente. De maneira contrária, sacarose foi positiva e negativamente correlacionada com lactato nas folhas local do Pitiuba e sistêmica do Macaibo, respectivamente. Similarmente, sacarose foi positiva e negativamente correlacionada com serina e glicina nas folhas local Macaibo e Pitiuba, respectivamente (Figura 7).

Figura 8 - Análise de correlação de Pearson.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: Análise de correlação de pearson dos tratamentos usando os dados de F¹³C. Os metabólitos que apresentaram correlação entre si foram demarcados com um asterisco.

5.3 Análise de enriquecimento de ^{13}C através das razões Mn/M0

Embora alguns metabólitos não tiveram todos os seus isotopólogos detectados, foi possível observar um incremento nas razões Mn/M0 em alguns deles. No Macaibo, constatou-se aumento das razão M1(m/z 248)/M0(m/z 247) do ácido succínico (fragmento m/z 247-251) em folhas sistêmicas 2 horas após a inoculação (HAI) do CPSMV (Figura 8) e da razão M2(m/z 249)/M0(m/z 247) em folhas locais e sistêmicas do Mock e CPSMV (Figura 9). No Pitiuba, embora não houve diferença na razão M2/M0, pôde-se constatar um aumento na razão M1/M0 na folha local do tratamento Mock no tempo de 2 HAI e na razão M3(m/z 250)/M0(m/z 247) do ácido succínico (fragmento m/z 247-251) nas folhas local e sistêmica do tratamento Mock e CPSMV no tempo de 2 e 8 HAI (Figura 10 e 11).

Detectamos também os isotopólogos de xilose M1 (m/z 308) em todas as folhas analisadas de Pitiuba e M1 e M2 (m/z 309) em folhas sistêmicas do macaibo. No Pitiuba, aumentos na razão M1(m/z 308)/M0(m/z 307) foram observados em folhas sistêmicas Mock 08 HAI e CPSMV 02 e 08 HAI, quando comparado com o controle sistêmico (Figura 12). No Macaibo, não houve diferença nesta razão, mas a razão M2(m/z 309)/M0(m/z 307) aumentou nas folhas CPSMV sistêmicas em 02 HAI e Mock e CPSMV sistêmicas 08 HAI (Figura 13 e 14).

Observou-se também mudanças em rafinose (fragmento m/z 361-367) em ambos os genótipos. No Macaibo, reduções significativas foram observadas na razão M2(m/z 363)/M0(m/z 361), sobretudo nas folhas sistêmicas sob CPSMV. No entanto, não houve diferenças na razão M3(m/z 364)/M0(m/z 361) nas folhas sistêmicas, enquanto essa razão aumentou em todas as folhas locais, quando comparadas com seus respectivos os controles (Figura 15). No Pitiuba, houve uma diminuição da razão M2(m/z 363)/M0(m/z 361) na folha local Mock em 08 HAI e um aumento na razão M3(m/z 364)/M0(m/z 361) em folha local CPSMV em 02 HAI (Figura 16).

Constatou-se também alterações no ácido cítrico (fragmento m/z 273-278) do Macaibo e do Pitiuba. No Macaibo, foram detectadas reduções das razões M1(m/z 274)/M0(m/z 273) na folha local Mock em 08 HAI e da razão M2(m/z 275)/M0(m/z 273) em folhas Mock local em 08 HAI e CPSMV local em 02 HAI (Figura 17). Já no Pitiuba, foram detectados os fragmentos M1 (m/z 274), M2 (m/z 275) e M3 (m/z 276), mas observou-se apenas um aumento na razão M3(m/z 276)/M0(m/z 273) nas folhas locais Mock em 08 HAI (Figura 18).

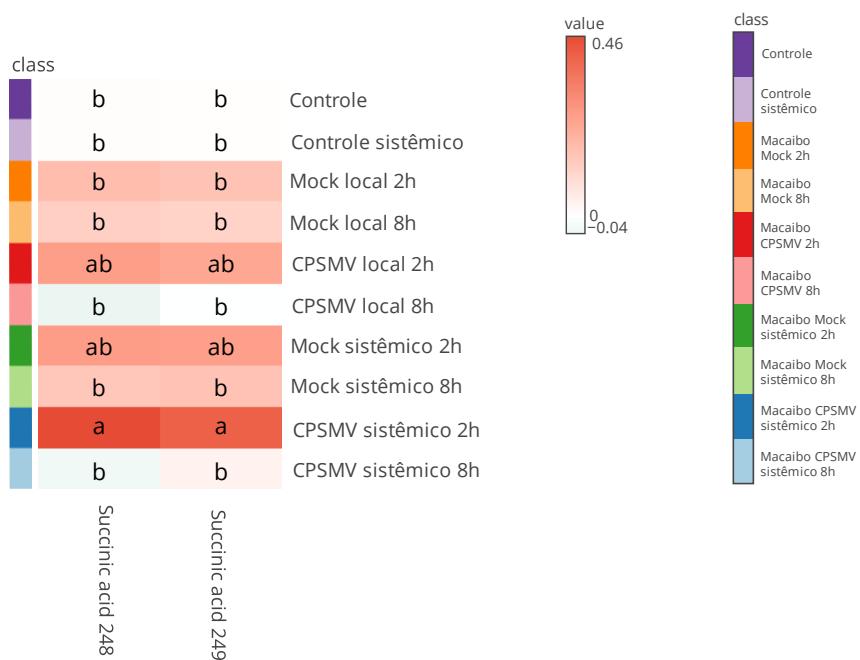
Observou-se também reduções em razões do ácido piroglutâmico (fragmento m/z 156-160) do Macaibo, essas foram as razões M1(m/z 157)/M0(m/z 156) nas folhas locais e

sistêmicas do Mock em 08 HAI; e M2(*m/z* 158)/M0(*m/z* 156) em folhas sistêmicas do Mock em 02 HAI (Figura 19).

O ácido glutâmico (fragmento *m/z* 246-250) apresentou alteração em uma única razão, M2(*m/z* 248)/M0(*m/z* 246) nas folhas sistêmicas do CPSMV em 08 HAI (Figura 20).

Constatou-se também variações no ácido málico (fragmento *m/z* 233-236) do Macaibo, as alterações foram na razão M2(*m/z* 235)/M0(*m/z* 233), sendo um aumento nas folhas sistêmicas de Mock e CPSMV em 08 HAI e uma diminuição nas folhas sistêmicas de CPSMV em 02 HAI (Figura 21).

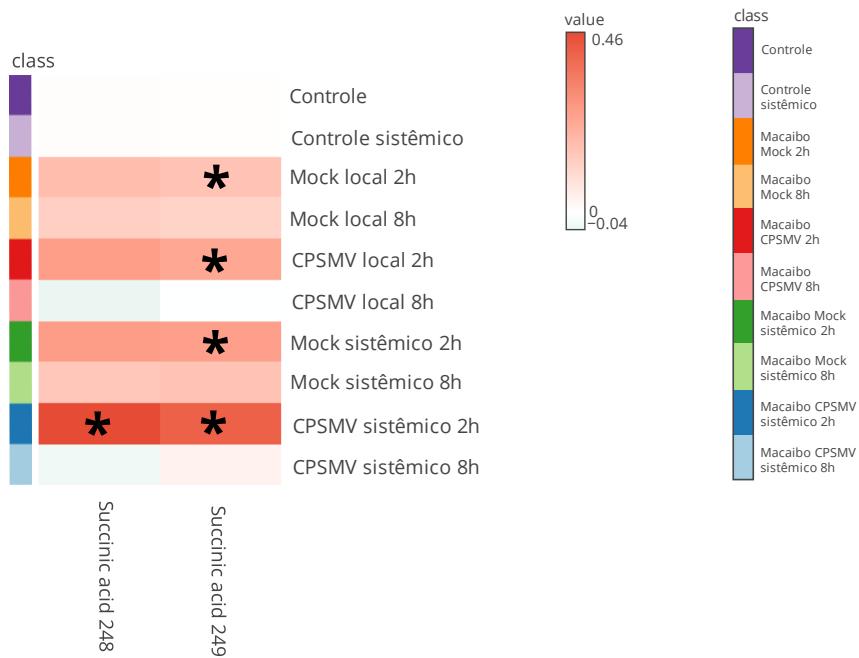
Figura 9 – Heatmap (1) das razões M1/M0 e M2/M0 do ácido succínico do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0 e M2/M0 do ácido succínico do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 247 m/z com 5 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

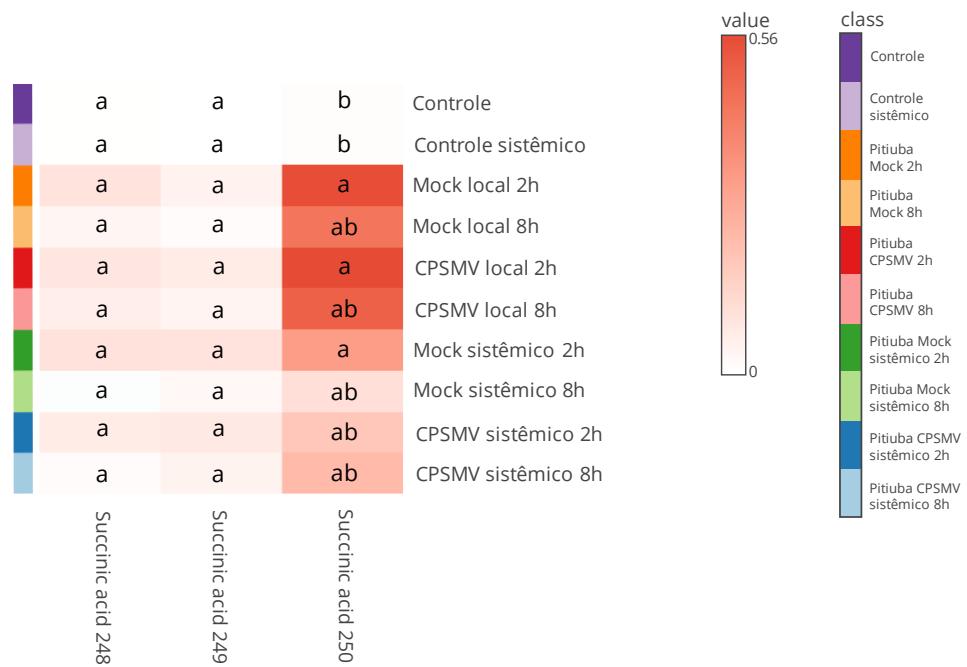
Figura 10 – Heatmap (2) das razões M1/M0 e M2/M0 do ácido succínico do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0 e M2/M0 do ácido succínico do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 247 m/z com 5 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

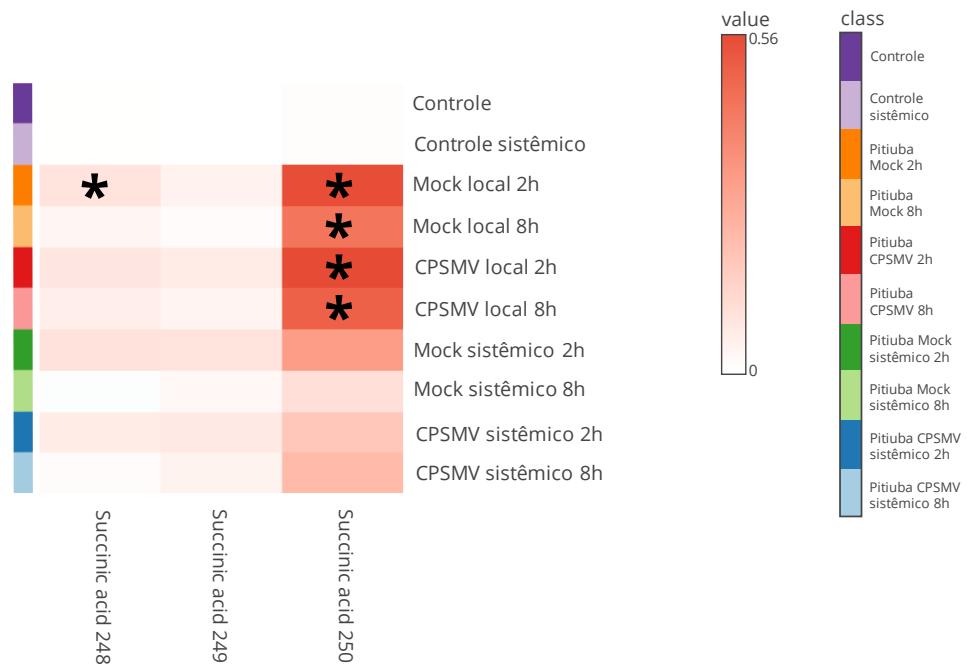
Figura 11 – Heatmap (1) das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido succínico do pitiuba.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido succínico do pitiuba. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 247 m/z com 5 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$).
Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

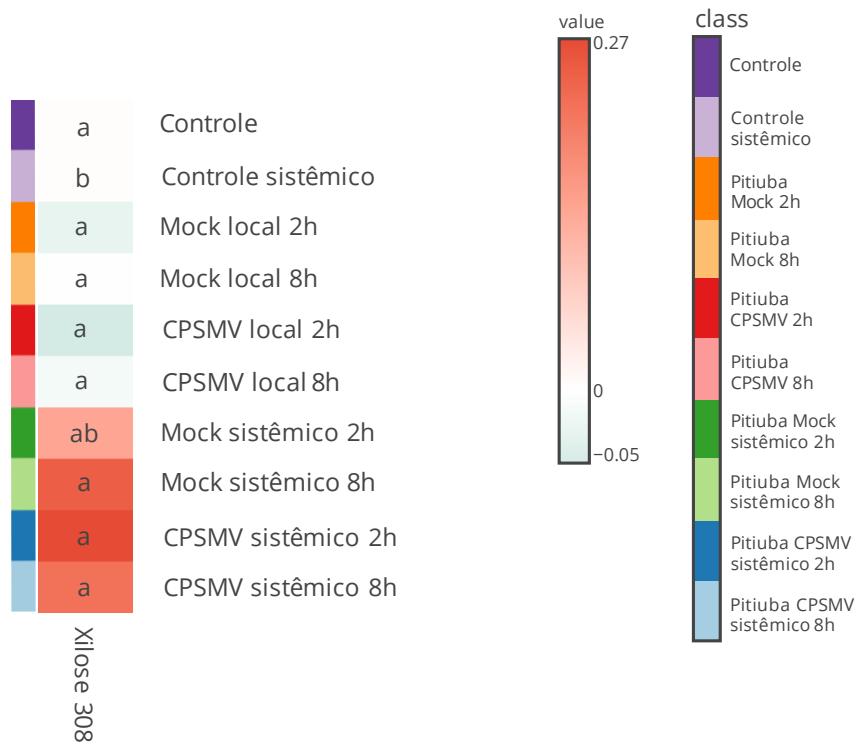
Figura 12 – Heatmap (2) das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido succínico do pitiuba.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido succínico do pitiuba. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 247 m/z com 5 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

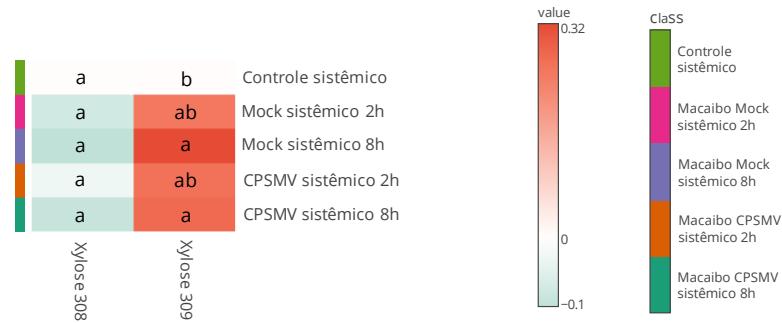
Figura 13 – Heatmap da razão M1/M0 da xilose do pitiuba.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém a razão M1/M0 da xilose do pitiuba. Essa razão é referente ao isotopólogo desse metabólito (Fragmento de 307 m/z com 4 carbonos) que foi detectado e apresentou alguma variação de ^{13}C . Apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

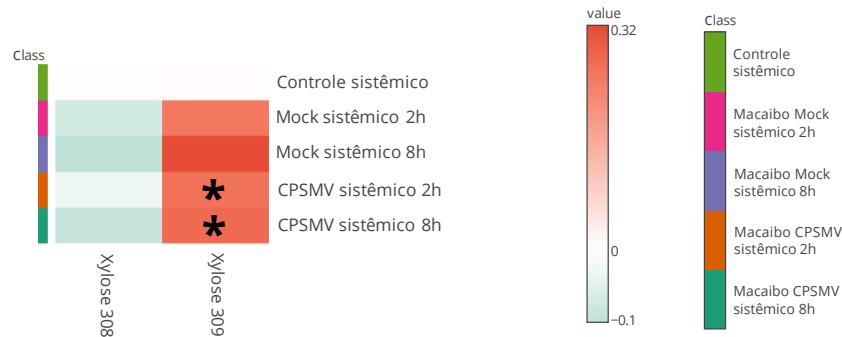
Figura 14 – Heatmap (1) das razões M1/M0 e M2/M0 da xilose do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0 e M2/M0 da xilose do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 307 m/z com 4 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

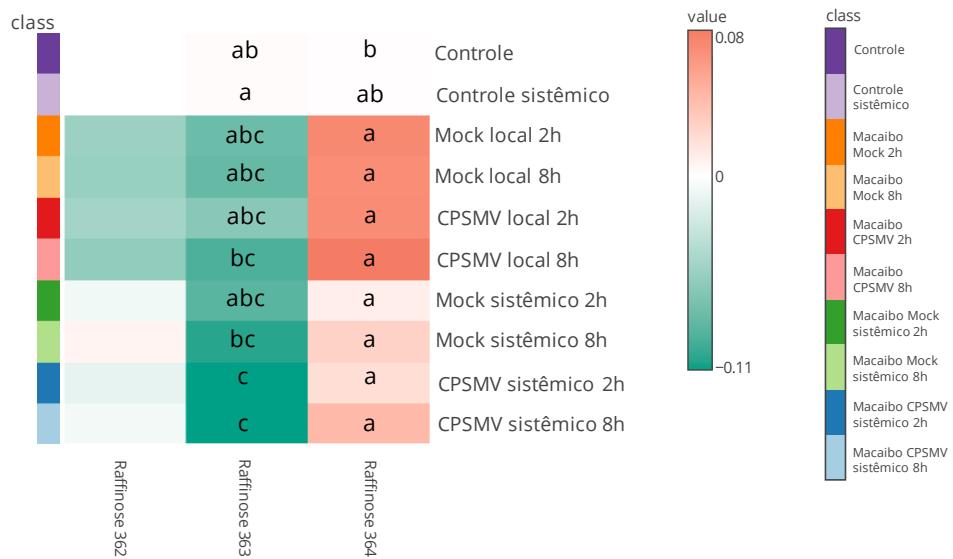
Figura 15 – Heatmap (2) das razões M1/M0 e M2/M0 da xilose do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0 e M2/M0 da xilose do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 307 m/z com 4 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asterisco em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

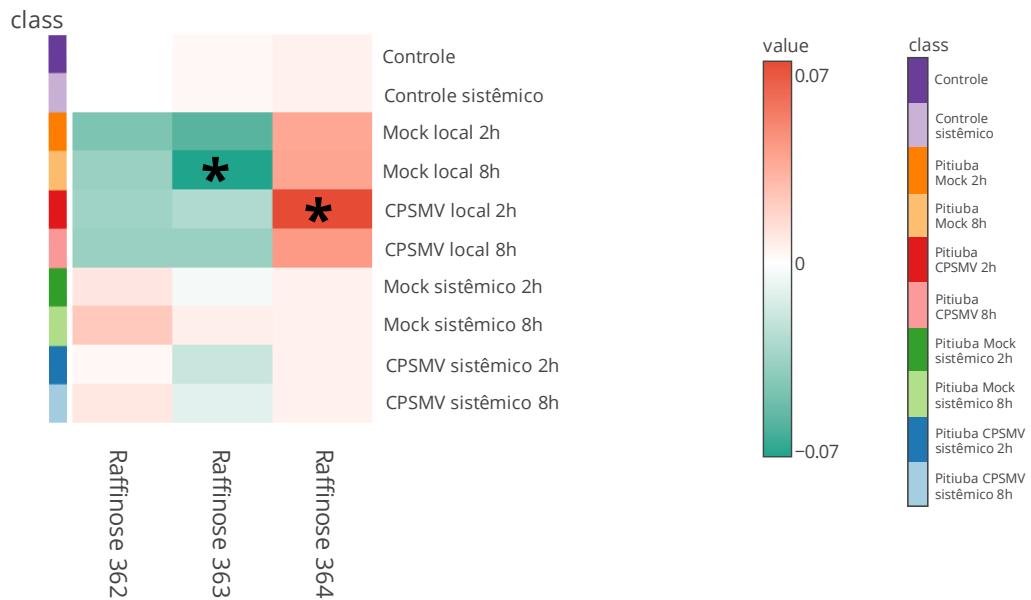
Figura 16 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 da rafinose do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 da rafinose do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 361 m/z com 7 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com letras. Letras diferentes em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Tukey ($P < 0.05$). Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

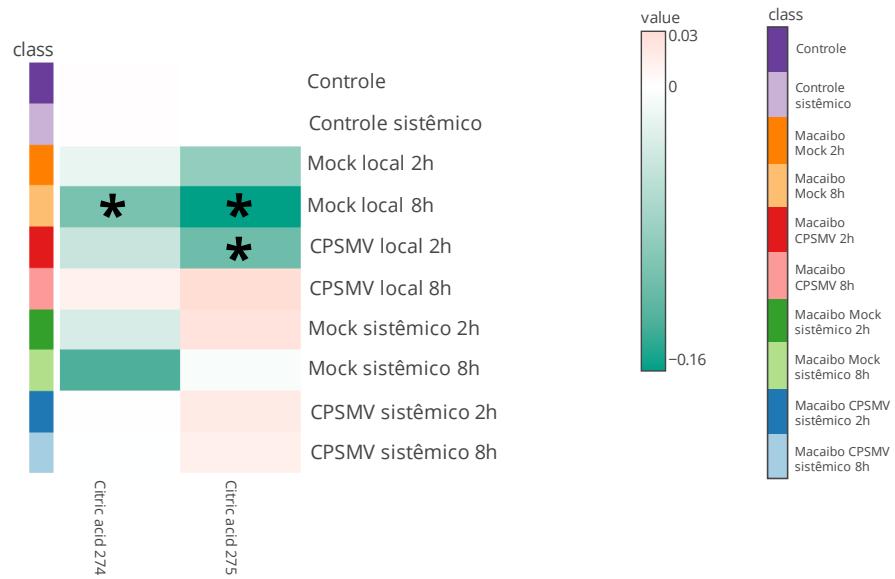
Figura 17 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 da rafinose do pitiuba.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 da rafinose do pitiuba. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 361 m/z com 7 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

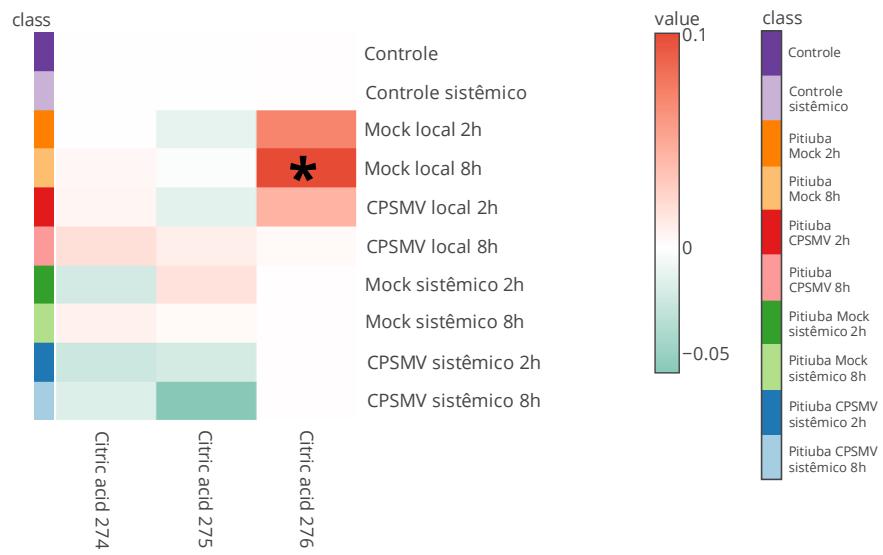
Figura 18 – Heatmap das razões M1/M0 e M2/M0 do ácido cítrico do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0 e M2/M0 do ácido cítrico do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 273 m/z com 6 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

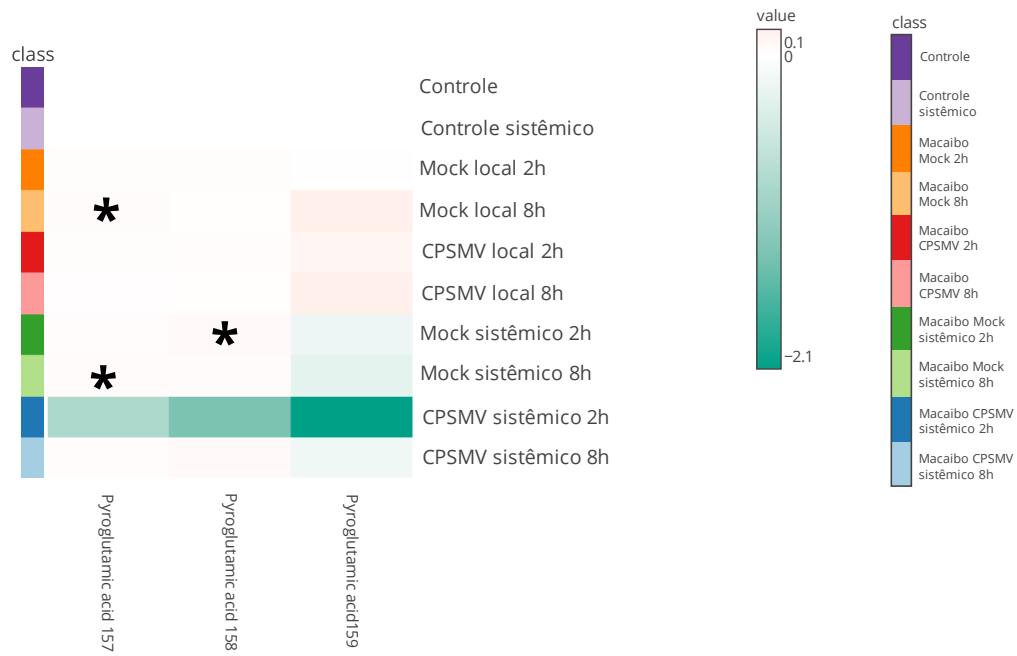
Figura 19 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido cítrico do pitiuba.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido cítrico do pitiuba. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 273 m/z com 6 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

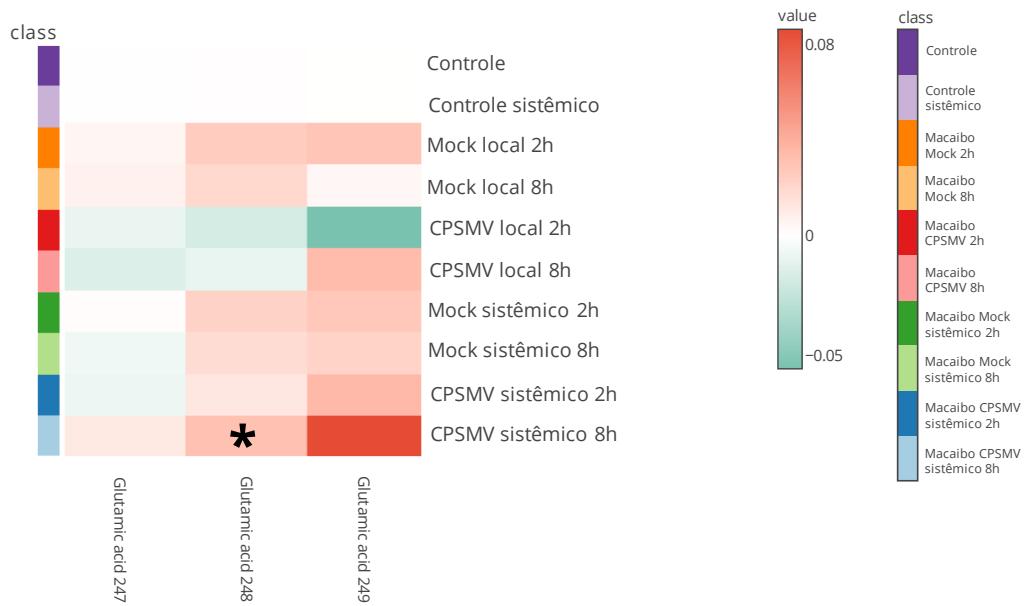
Figura 20 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido piroglutâmico do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido piroglutâmico do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 156 m/z com 5 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

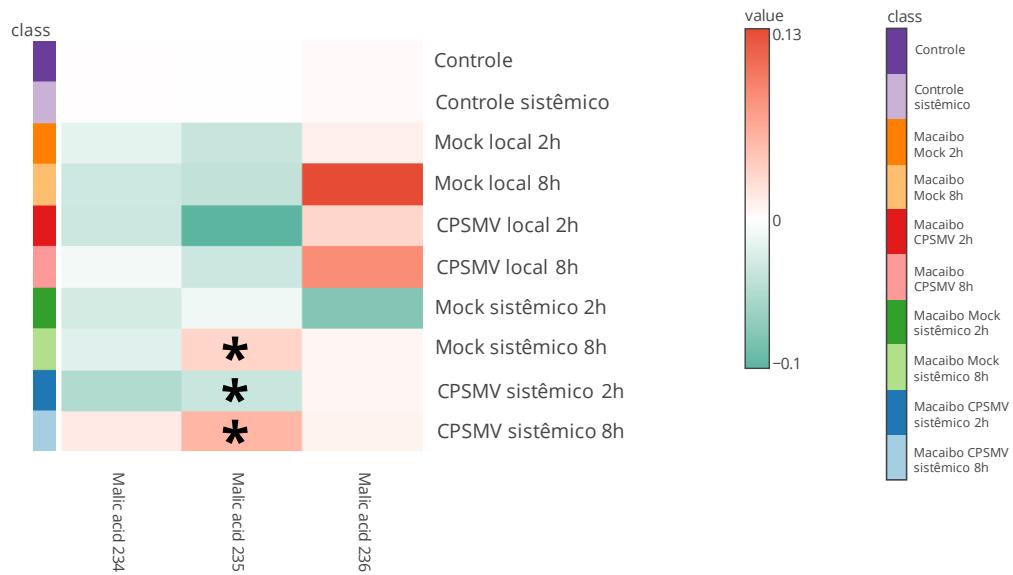
Figura 21 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido glutâmico do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido glutâmico do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 246 m/z com 5 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

Figura 22 – Heatmap das razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido málico do macaibo.



Fonte: Próprio autor.

Legenda: O heatmap contém as razões M1/M0, M2/M0 e M3/M0 do ácido málico do macaibo. Essas razões são referentes aos isotopólogos desse metabólito (Fragmento de 233 m/z com 4 carbonos) que foram detectadas e apresentaram alguma variação de ^{13}C . Metabólitos que não tiveram variações significativas ao longo do tempo estão sem marcação com asterisco. Asteriscos em cada coluna (fragmento do metabólito) indicam diferenças significativas entre os tratamentos por ANOVA e Dunnet. Essas análises foram realizadas utilizando a plataforma Metaboanalyst ($n = 4$).

6 DISCUSSÃO

A sacarose é o principal fotoassimilado translocado dos órgãos fonte para os órgãos dreno da planta e utilizado pelas plantas como fonte de energia (Ruan, 2014). Esse metabólito possui amplo envolvimento em diversas rotas metabólicas, entre elas, respostas de defesa contra patógenos (Tauzin; Giardina, 2014). Nossos resultados demonstraram que este foi o único metabólito que apresentou incremento de R¹³C em ambos os genótipos (Figura 2 e 3). No entanto, não foi observado diferenças claras entre Mock e CPSMV em ambos os genótipos, sugerindo que o incremento em R¹³C em sacarose se deve, prioritariamente, ao uso de ¹³C-glicose e não à resposta ao CPSMV *per se*.

O aumento em R¹³C em sacarose indica que a solução de ¹³C-glicose foi absorvida e convertida em sacarose, que, por sua vez pode ter participado de diversas reações de sinalização do metabolismo da sacarose, visto que, como citado acima, essas reações servem como sinalização em situações de estresse (Gong et al., 2015; Ruan, 2014), e no caso do experimento conduzido, houve tanto o estresse da infecção pelo patógeno viral, quanto o corte feito no pecíolo da planta para a absorção da solução de glicose. Tendo como foco o estresse causado pela infecção viral, é sabido que patógenos como esse alteram o metabolismo da planta, influenciando no estímulo de invertases de parede celular, responsáveis pela hidrólise da sacarose em frutose e glicose, além de participar de mecanismos que regulam a fotossíntese (Roitsch; González, 2004). Entretanto, essas respostas mediadas por sinalizações do metabolismo da sacarose também podem ocorrer devido a estresses abióticos (Gupta; Kaur, 2005) e, em decorrência da metodologia usada para o experimento de marcação com ¹³C-glicose, na qual foram cortados os pecíolos para imersão em solução com essa glicose, é possível que o estresse mecânico gerado pelo corte do pecíolo tenha sido o suficiente para influenciar as mudanças metabólicas identificadas na análise metabolômica posterior.

As análises de correlação revelaram que a sacarose foi correlacionada positiva ou negativamente com diversos metabólitos nas diferentes folhas e condições, com exceção das folhas sistêmica do Pitiuba, em que este metabólito não foi correlacionado com nenhum outro (Figura 5). Ademais, essas folhas apresentaram o menor número de metabólitos correlacionados entre si, apenas 4. Esses resultados, somado ao fato de que poucos metabólitos foram marcados nessas folhas, sugerem que a marcação com ¹³C-glicose na folha central do trifolíolo foi pouco transportada para os folíolos adjacentes ao central no Pitiuba. Em contraste, no Macaibo, sacarose foi positivamente correlacionada com myo-inositol nas folhas local e sistêmica (Figura 5). Este metabólito apresentou aumento de R¹³C neste genótipo, sendo um metabólito

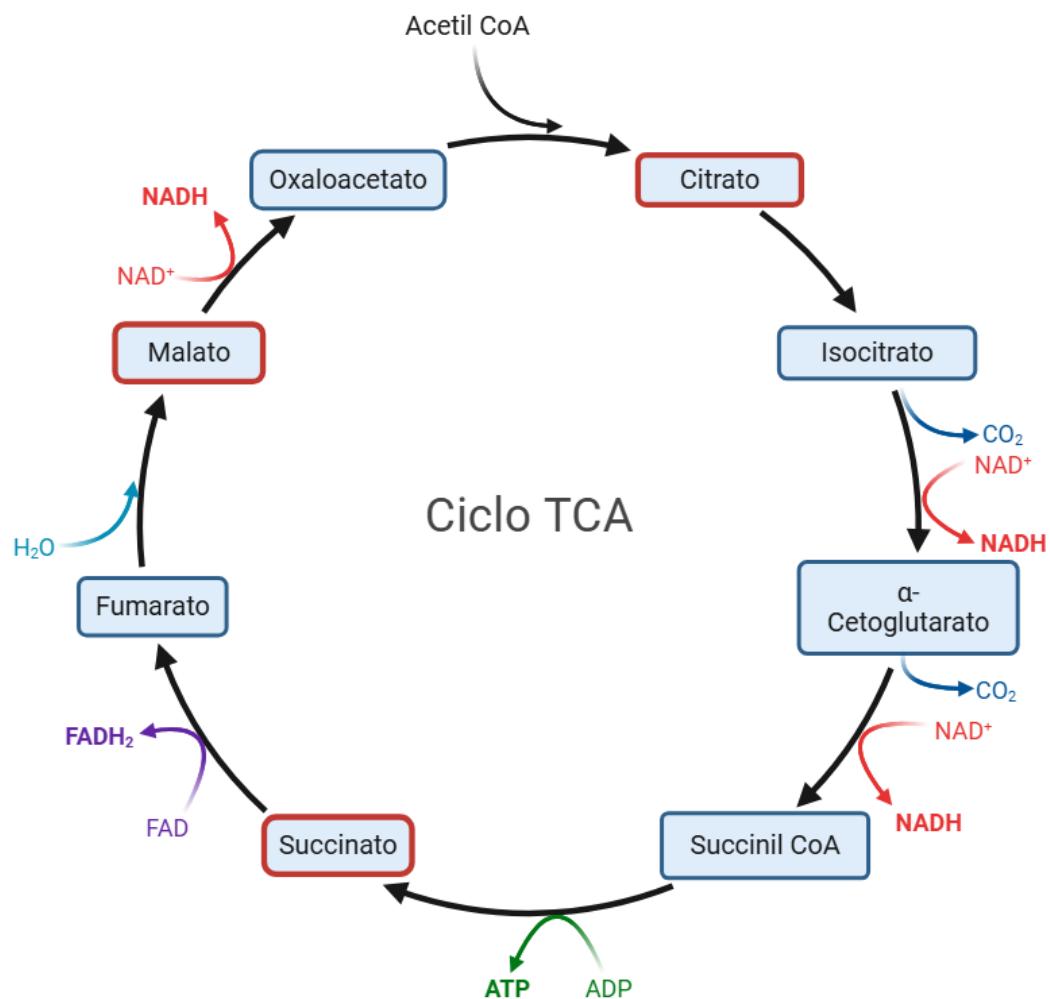
relacionado à diversas respostas a estresse, devido seu papel como osmoprotetor e pela formação de conjugados com o ácido indol-3-acético, um fitormônio do grupo das auxinas, que têm função de armazenamento de auxina em excesso e facilitar o transporte desse fitormônio (Loewus; Murthy, 2000).

Outros dois açúcares (rafinose e xilose) foram encontrados enriquecidos com ^{13}C . A rafinose apresentou aumentos na razão M3/M0 em Macaibo. Este metabólito está associado a funções de osmoproteção e eliminação de espécies reativas de oxigênio, dessa forma, conferindo proteção à estresses abióticos, como a temperatura, principalmente (Elsayed; Rafudeen; Golldack, 2014; Ruan, 2014). No entanto, como não houve diferenças entre Mock e CPSMV, o aumento em ^{13}C sugere que seja uma rota comumente ativa em Macaibo, independente da presença do CPSMV, mas que pode ajudar a explicar a maior tolerância estresses abióticos desse genótipo, quando comparado com o Pitiuba. Outros metabólitos com aumento de R ^{13}C ou em um de seus isotópicos foram xilose, succinato, GABA, ácido cítrico, ácido glutâmico, ácido piroglutâmico e ácido málico. Xilose tem sido relatada como importante para o bom desenvolvimento da planta em condições de estresses abióticos (Takano et al., 2015). O succinato é um intermediário do ciclo do ácido cítrico, com algumas propriedades associadas a resistência a estresse abiótico, por exemplo estresse salino (WU et al., 2025). O incremento de ^{13}C em succinato sugere ativação nessa importante via metabólica (De Castro Fonseca et al., 2016).

O ácido cítrico desempenha um gama de papéis no metabolismo da planta, inclusive em rotas do metabolismo de defesa, sendo modulador de sistemas antioxidantes, além de estar relacionado a produção de GABA, via um intermediário do ciclo do TCA (Figura 23), além do mais, ele participa da síntese de diversos outros aminoácidos e compostos secundários, que participam de respostas de defesas contra estresses abióticos e bióticos (Singh; Roychoudhury, 2020; Tahjib-Ul-arif et al., 2021). O ácido glutâmico desempenha papel de sinalização rápida ao estresse, sendo liberado por células lesionadas, responsável por desencadear ondas de cálcio por toda a planta, gerando uma resposta ao estresse no escopo de minutos. Além de ser um precursor direto do GABA e de outros metabólitos que participam das respostas antioxidantes (Liao; Chung; Hsieh, 2022; Toyota et al., 2018). Já o ácido piroglutâmico realiza um papel de modificação de proteínas de defesa, através da atividade de enzimas que convertem resíduos N-terminais de glutamina ou glutamato em piroglutamato em proteínas modificadas, que estão ligadas a resposta imune das plantas (Schilling et al., 2007). O ácido málico tem papéis mais diversos na defesa de plantas, como a de reduzir a absorção e a toxicidade de metais pesados pela planta (Guo et al., 2017) Entretanto, para esse estudo, a função mais interessante

desempenhada pelo malato é a de ativação de enzimas antioxidantes e a síntese de compostos de defesa, como os flavonoides (Chen et al., 2019; Sun et al., 2019). No entanto, assim como a rafinose, GABA e demais metabólitos, não tiveram relação com o estresse usado neste experimento, uma vez que não foram observadas diferenças entre Mock e CPSMV. Assim, os resultados deste estudo demonstram que há uma variação nos fluxos glicolíticos entre Macaibo e Pitiuba. No entanto, nossos resultados não discriminaram claramente plantas infectadas ou não com CPSMV e, portanto, não esclarecem se a base genética que confere tolerância ao Macaibo envolve alterações metabólicas induzidas pelo vírus.

Figura 23 - Ciclo do TCA com os metabólitos enriquecidos encontrados em destaque



Fonte: Próprio autor.

7 CONCLUSÃO

Por fim, é possível concluir que houve absorção de glicose marcada com ^{13}C e que essa glicose foi utilizada no metabolismo da planta, garantindo a incorporação do ^{13}C em diversos metabólitos da planta, sobretudo sacarose. A diferença entre os metabólitos que sofreram incremento de R ^{13}C nos dois genótipos sugere que a distribuição do fluxo glicolítico varia entre os dois genótipos, sendo que o Macaíbo possuí uma resposta mais diversificada do que Pituba, o que pode estar relacionado também à sua maior resistência a estresses. Entretanto, esses resultados ainda não são conclusivos para afirmar as diferenças metabólicas dos dois genótipos para responder ao estresse da infecção por CPSMV. Ademais, também não foi possível destacar nenhuma diferença significativa entre folhas locais e sistêmicas que pudessem sinalizar alguma outra diferença na resposta metabólica das folhas do trifoliolo.

REFERÊNCIAS

- ALBERSIO, J. *et al.* **Crotalaria paulinea, Novo Hospedeiro Natural do Vírus do Mosaico Severo do Caupi.** [S.l.: S.n.].
- BOLTON, Melvin D. Primary Metabolism and Plant Defense-Fuel for the Fire. / **487 MPMI**, v. 22, n. 5, p. 487–497, 2009.
- BOOKER, H. M.; UMAHARAN, P.; MCDAVID, C. R. Effect of Cowpea severe mosaic virus on crop growth characteristics and yield of cowpea. **Plant Disease**, v. 89, n. 5, p. 515–520, maio 2005.
- BRET, RAISSA SOUZA CAMINHA. **CHANGES ON PRIMARY METABOLISM DURING THE INTERACTION BETWEEN COWPEA [Vigna unguiculata (L.) Walp.] AND CPSMV: LOCAL AND SYSTEMIC RESPONSES.** Fortaleza: [S.n.].
- CHEN, Qiqi *et al.* Review: The role of NADP-malic enzyme in plants under stress. **Plant Science** Elsevier Ireland Ltd, , 1 abr. 2019.
- DE CASTRO FONSECA, Matheus *et al.* **GPR91: Expanding the frontiers of Krebs cycle intermediates.** **Cell Communication and Signaling** BioMed Central Ltd., , 12 jan. 2016.
- ELSAYED, A. I.; RAFUDEEN, M. S.; GOLLDACK, D. **Physiological aspects of raffinose family oligosaccharides in plants: Protection against abiotic stress.** **Plant Biology**, jan. 2014.
- FIGUEROA-MACÍAS, Juan Pablo *et al.* **Plant growth-defense trade-offs: Molecular processes leading to physiological changes.** **International Journal of Molecular Sciences** MDPI AG, , 2 jan. 2021.
- GONG, Xue *et al.* Arabidopsis AtSUC2 and AtSUC4, encoding sucrose transporters, are required for abiotic stress tolerance in an ABA-dependent pathway. **Physiologia Plantarum**, v. 153, n. 1, p. 119–136, 1 jan. 2015.
- GOUFO, Piebiep *et al.* Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp.) metabolomics: Osmoprotection as a physiological strategy for drought stress resistance and improved yield. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, 20 abr. 2017.
- GUO, Haipeng *et al.* Exogenous malic acid alleviates cadmium toxicity in *Miscanthus sacchariflorus* through enhancing photosynthetic capacity and restraining ROS accumulation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 119–128, 1 jul. 2017.
- GUPTA, Anil K.; KAUR, Narinder. **Sugar signalling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants** *J. Biosci.* [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.ias.ac.in/jbiosci>>.
- HE, Zuhua; WEBSTER, Shanice; HE, Sheng Yang. **Growth–defense trade-offs in plants.** **Current Biology** Cell Press, , 20 jun. 2022.

HOAGLAND, D. R. Optimum Nutrient Solutions for Plants. *Science*, v. 52, n. 1354, p. 562–564, 10 dez. 1920.

KIERANS, Sarah J.; TAYLOR, Cormac T. **Glycolysis: A multifaceted metabolic pathway and signaling hub.** *Journal of Biological Chemistry*American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., , 1 nov. 2024.

KOPKA, Joachim *et al.* GMD@CSB.DB: The Golm metabolome database. *Bioinformatics*, v. 21, n. 8, p. 1635–1638, 15 abr. 2005.

LIAO, Hong-Sheng; CHUNG, Yi-Hsin; HSIEH, Ming-Hsiun. Glutamate: A multifunctional amino acid in plants. *Plant Science*, v. 318, p. 111238, maio 2022.

LIMA, V. F. *et al.* Toward multifaceted roles of sucrose in the regulation of stomatal movement. *Plant Signaling and Behavior*Taylor and Francis Inc., , 3 ago. 2018.

LISEC, Jan *et al.* Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, v. 1, n. 1, p. 387–396, jun. 2006.

LIU, Zhen *et al.* A Salt-Tolerant Strain of *Trichoderma longibrachiatum* HL167 Is Effective in Alleviating Salt Stress, Promoting Plant Growth, and Managing Fusarium Wilt Disease in Cowpea. *Journal of Fungi*, v. 9, n. 3, 1 mar. 2023.

LLAVE, César. Dynamic cross-talk between host primary metabolism and viruses during infections in plants. *Current Opinion in Virology*, v. 19, p. 50–55, ago. 2016.

LOEWUS, Frank A.; MURTHY, Pushpalatha P. N. **myo-Inositol metabolism in plants***Plant Science*. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<http://www.chem.qmw.ac.uk/>>.

MAEDA, Hiroshi A. **Evolutionary diversification of primary metabolism and its contribution to plant chemical diversity.** *Frontiers in Plant Science*Frontiers Media S.A., , 9 jul. 2019.

MOHAMMED, Saba Baba *et al.* **Enhancing Cowpea Tolerance to Elevated Temperature: Achievements, Challenges and Future Directions.** *Agronomy*Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), , 1 mar. 2024.

ROITSCH, Thomas; GONZÁLEZ, Mari Cruz. **Function and regulation of plant invertases: Sweet sensations.** *Trends in Plant Science*, dez. 2004.

ROJAS, Clemencia M. *et al.* **Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense.** *Frontiers in Plant Science*Frontiers Research Foundation, , 10 fev. 2014.

RUAN, Yong Ling. **Sucrose metabolism: Gateway to diverse carbon use and sugar signaling.** *Annual Review of Plant Biology*Annual Reviews Inc., , 2014.

SCHILLING, Stephan *et al.* Isolation and characterization of the glutaminyl cyclases from *Solanum tuberosum* and *Arabidopsis thaliana*: implications for physiological functions. *Biological chemistry*, v. 388, n. 2, p. 145–153, 2007.

SINGH, Ankur; ROYCHOUDHURY, Aryadeep. Role of γ -Aminobutyric Acid in the Mitigation of Abiotic Stress in Plants. In: **Protective Chemical Agents in the Amelioration of Plant Abiotic Stress.** [S.l.]: Wiley, 2020. p. 413–423.

SUN, Xi *et al.* Roles of malic enzymes in plant development and stress responses. **Plant Signaling and Behavior** Taylor and Francis Inc., , 3 out. 2019.

TAHJIB-UL-ARIF, Md *et al.* Citric acid-mediated abiotic stress tolerance in plants. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 jul. 2021.

TAKANO, Sho *et al.* The rice RCN11 gene encodes β 1,2-xylosyltransferase and is required for plant responses to abiotic stresses and phytohormones. **Plant Science**, v. 236, p. 75–88, 1 jul. 2015.

TAUZIN, Alexandra S.; GIARDINA, Thierry. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses. **Frontiers in Plant Science** Frontiers Research Foundation, , 23 jun. 2014.

THINES, Eckhard; WEBER, Roland W. S.; TALBOT, Nicholas J. MAP Kinase and Protein Kinase A-Dependent Mobilization of Triacylglycerol and Glycogen during Appressorium Turgor Generation by Magnaporthe grisea. **The Plant Cell.** [S.l.: S.n.]. Disponível em: <www.plantcell.org>.

TOYOTA, Masatsugu *et al.* Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense signaling. **Science**, v. 361, n. 6407, p. 1112–1115, 14 set. 2018.

ZAMBONI, Nicola *et al.* ^{13}C -based metabolic flux analysis. **Nature Protocols**, v. 4, n. 6, p. 878–892, 2009.