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

**Análise transcriptômica de plantas de cana de açúcar inoculadas com
Leifsonia xyli subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras**

Mariana Cicarelli Cia

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

**Piracicaba
2014**

Mariana Cicarelli Cia
Engenheira Agrônoma

**Análise transcriptômica de plantas de cana-de-açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli*
subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras**

Orientador:
Prof. Dr. **LUIS EDUARDO ARANHA CAMARGO**

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

Piracicaba
2014

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

Cia, Mariana Cicarelli
Análise transcriptômica de plantas de cana de açúcar inoculadas com
Leifsonia xyli subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras / Mariana
Cicarelli Cia. - - Piracicaba, 2014.
105 p.: il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Cana-de-açúcar 2. *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* 3. Microarranjo 4. Expressão
gênica I. Título

CDD 633.61
C565a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

À minha família por todo o apoio, incentivo e amor

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ/USP, onde me tornei Engenheira agrônoma e cursei o mestrado e doutorado, pela inestimável oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

Ao professor Dr. Luis Eduardo Aranha Camargo pela orientação, paciência, ensinamentos, conversas, apoio e especialmente pela confiança no meu trabalho.

Aos professores Ricardo Antunes de Azevedo, Daniel Scherer de Moura e a pesquisadora Dra Carolina Vianna Morgante por terem contribuído como grandes incentivadores da minha carreira científica.

À professora Dra Claudia Barros Monteiro-Vitorello pelo incentivo e auxílio durante o desenvolvimento do meu projeto de doutorado.

Aos professores do departamento de Genética e Melhoramento de Plantas pelos ensinamentos.

À Carolina Lembke e Milton Y. Nishiyama Junior pela colaboração nas hibridizações e análises de bioinformática.

À Silvio Cristofolletti e Felipe Sabadin por cederem o material vegetal utilizado no experimento.

À todos os funcionários dos departamentos de Genética e Fitopatologia pelo o auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

À Raphael Severo pela colaboração em todas as etapas deste trabalho. Muito obrigada pela sua amizade, disponibilidade em me ajudar, paciência nos momentos de nervosismo e pelas boas risadas.

À Giselle de Carvalho, Fernanda Moretti e Suzane Saito por terem me auxiliado no cultivo *in vitro* de Lxx.

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular (LGM), Fernanda Moretti, Maisa Curtolo, Raphael Severo, Jerônimo Vieira, Giselle de Carvalho, Thais Egreja, Débora Wassano, Aline Zavaglia, Thayne Munhoz, Leandro Dallagnol, Líllian Bibiano e Rafael Popin pela amizade, boa convivência e ajuda na montagem dos vários experimentos. Torcerei sempre pelo sucesso de todos vocês.

Aos meus queridos amigos Victor A. Forti, Luciane Santini, Cristiane Carvalho, Silvio Cristofolletti, Renato Lima, Thalita da Silva e Eduardo Picelli. Guardo com carinho todos os momentos que passamos juntos.

À minha irmã Sandra, meu cunhado Vlademir e meu sobrinho Guilherme pela ajuda no cultivo e avaliação das plantas, inclusive nos feriados.

À minha família por estar sempre ao meu lado e acreditar em mim.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	15
2.2 O raquitismo das soqueiras.....	16
2.3 Interação planta patógeno	18
2.4 Uso de tecnologias de análise de expressão gênica em larga escala no estudo da interação planta-patógeno.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Análises de expressão gênica por hibridização em lâminas de microarranjos	23
3.1.1 Material vegetal	23
3.1.2 Hibridização de microarranjos e análise de dados.....	24
3.2 Análises de validação	26
3.2.1 Seleção de genes para validação e desenho de <i>primers</i>	26
3.2.2 Análise de expressão por qPCR.....	27
3.2.3 Experimento de validação I	29
3.2.4 Experimento de validação II.....	29
4 RESULTADOS	33
4.1 Análise de expressão gênica com base em hibridização em lâminas de microarranjos	33
4.1.1 Extração de RNA do cartucho foliar da cana-de-açúcar	33
4.1.2 Genes diferencialmente expressos entre plantas inoculadas e não inoculadas com Lxx	33
4.1.3 Classificação funcional e agrupamento dos genes diferencialmente expressos	34
4.1.4 Seleção dos genes para validação e teste de especificidade dos <i>primers</i>	36
4.1.5 Estabilidade dos genes normalizadores	46
4.2 Experimentos de validação dos resultados do microarranjo	46
4.2.1 Ensaio I de validação	46
4.2.2 Ensaio de validação II	49
5 DISCUSSÃO	53
5.1 Relação Lxx versus cana-de-açúcar	53
5.2 Processos e via afetados em função do aumento no título de Lxx	54
5.2.1 Ciclo celular e metabolismo do DNA.....	54

5.2.2 Metabolismo de hormônios.....	57
5.2.3 Transdução de sinal.....	58
5.2.4 Regulação da transcrição	60
5.2.5 Defesa.....	62
5.2.6 Adaptação ao hospedeiro	66
5.3 Validação dos dados.....	66
5.4 Proteômica x transcriptômica.....	67
5.5 Considerações finais	68
6 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
ANEXOS	94

RESUMO

Análise transcriptômica de plantas de cana de açúcar inoculadas com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo das soqueiras

O raquitismo das soqueiras, causado pela bactéria endofítica *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), já foi identificado em praticamente todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar no mundo causando sérias perdas na produção. A doença é caracterizada por reduzir o crescimento da planta, resultando no afinamento dos colmos e encurtamento dos internódios. A intensidade destes sintomas está positivamente correlacionada ao título de Lxx nas plantas. Diante disto, o objetivo deste estudo foi investigar diferenças na expressão gênica em plantas da variedade SP80-3280 em resposta à variação na quantidade de bactéria em seus tecidos. As plantas, infectadas com Lxx, foram cultivadas em casa de vegetação e inoculadas ou não com Lxx. Em plantas inoculadas, a população bacteriana média foi de 27,3 e 264 células de Lxx / 100 ng de DNA aos 30 e 60 dias após a inoculação, respectivamente, ao passo que em plantas não inoculadas, os níveis foram significativamente menores, de 6,8 e 34,5 células de Lxx / 100 ng de DNA. Os níveis de expressão gênica foram comparados entre plantas inoculadas e não inoculadas, em cada tempo de avaliação, por meio de hibridização de cDNA sintetizado a partir de RNAm extraído do cartucho foliar em lâminas de microarranjo. Ao todo foram identificados 272 genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas com maior título bacteriano em relação às não inoculadas, com menor título, sendo 106 e 152 diferencialmente expressos unicamente aos 30 e 60 DAI, respectivamente. Destes, 55 genes foram selecionados para validação por qPCR, com ênfase nos genes pertencentes às categorias de ciclo celular, metabolismo de DNA e hormônios, transdução de sinal e regulação da transcrição já que estes processos estão diretamente implicados no crescimento vegetal. Dos genes diferencialmente expressos aos 30 DAI, 17 (60,7%) foram validados, compreendendo 11 genes com menor expressão envolvidos no controle do ciclo celular e metabolismo de DNA como ciclinas, kinase dependente de ciclina (CDKB1;1), *minichromosome maintenance proteins* (MCM) e histona H4. Aos 60 DAI, 17 (53%) foram validados e englobaram genes com maior expressão relacionados a síntese de hormônios, fatores de transcrição e defesa como ACC oxidase, fator de transcrição contendo o domínio WRKY e fenilalanina amônia liase, além da repressão de genes MCM. Os padrões de expressão gênica são consistentes com os sintomas clássicos da doença e indicam que o aumento no título de Lxx altera o balanço hormonal e reduz o crescimento da planta ao reprimir a divisão celular.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Microarranjo; Expressão gênica

ABSTRACT

Transcriptomic analysis of sugarcane plants inoculated with *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease

Ratoon stunting disease (RSD), caused by endophytic bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) has been identified in all sugarcane producing regions worldwide causing serious yield losses. The disease reduces the plant growth, resulting in thinner stalks and shorter internodes. The intensity of these symptoms correlates positively with levels of Lxx titers in the plant. In view of this, the objective of this study was to investigate differences in gene expression in plants of the variety SP80-3280 in response to the variation in the amount of the bacteria in leaf tissue. Lxx-infected plants were grown in a greenhouse and inoculated or not with Lxx. In inoculated plants the mean bacterial populations were 27,3 and 264 Lxx cells / 100 ng of DNA at 30 and 60 days after inoculation (DAI), respectively, while in non-inoculated plants, the levels were significantly lower, reaching 6.8 and 34.5 cells / 100 ng of DNA. The levels of gene expression were compared between inoculated and non-inoculated plants at each time through hybridization of cDNA synthesized from mRNA extracted from leaf roll on microarray slides. A total of 272 differentially expressed genes were identified in inoculated compared with non inoculated plants, being 106 and 152 differentially expressed exclusively at 30 or 60 DAI, respectively. Of these, 55 genes were selected for validation by qPCR, with emphasis on genes belonging to the categories of cell cycle, DNA metabolism and hormones, signal transduction and transcriptional regulation, since these processes are directly correlated with plant growth. Of the genes differentially expressed at 30 DAI, 17 (60.7%) were validated, comprising 11 genes down-regulated involved in the control of cell cycle and DNA metabolism, such as cyclins, cyclin-dependent kinase (CDKB1;1), minichromosome maintenance (MCM) and histone H4 encoding-genes. Of the genes differentially expressed at 60 DAI, 17 (53%) were validated, comprising up-regulated genes related to the synthesis of hormones, transcription factors and defense such as ACC oxidase, a transcription factor containing the WRKY domain, phenylalanine ammonia lyase and repressed MCM genes. The patterns of gene expression are consistent with the classical symptoms of the disease and indicate that increased Lxx titers alters hormonal balance and reduces plant growth by repressing cell division.

Keywords: Sugarcane; *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Microarray; Gene expression

1 INTRODUÇÃO

A cana-de-açúcar é uma cultura de interesse mundial, sendo cultivada em mais de 100 países (FAO, 2014). O Brasil é o maior produtor mundial, com uma estimativa de produção para a safra 2013/2014 de, aproximadamente, 595 milhões de toneladas (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2013), as quais deverão suprir a crescente demanda, interna e externa, por álcool combustível e açúcar (CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA - CEPEA, 2013). O agronegócio sucroalcooleiro do país movimenta cerca de R\$ 40 bilhões por ano, considerando faturamentos diretos e indiretos, o que corresponde a aproximadamente 2,35% do PIB. Além disto, é um dos setores que mais empregam no país, responsável pela geração de 4,5 milhões de empregos diretos e indiretos e pela congregação de mais de 72.000 agricultores (UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR - UNICA, 2012).

Nos últimos anos, sua área de cultivo vem se expandindo principalmente nas regiões Centro-Sul e Centro-Oeste do país, englobando o oeste e noroeste do Estado de São Paulo, sudoeste de Minas Gerais, além dos Estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Goiás. A estas se somam as potenciais novas fronteiras do Vale do São Francisco e do oeste da Bahia, Maranhão e Piauí. Assim, para que a produção agrícola da cana-de-açúcar no Brasil seja sustentável, é necessário compreender os mecanismos de resposta e adaptação da cultura aos fatores de estresses bióticos e abióticos às quais está submetida nestes variados ambientes de produção. Neste contexto, entre os fatores bióticos, destaca-se a doença denominada de raquitismo da soqueira (RSD), causada pela bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx).

Considerada uma das principais doenças da cana-de-açúcar, o RSD leva a redução na produtividade da cultura, característica que se agrava após sucessivos cortes, com consequente redução da vida útil dos canaviais (GRISHAM et al., 1991). Perdas anuais de US\$11 e US\$36 milhões, respectivamente, já foram relatadas na Austrália e Flórida (EUA) (FEGAN et al., 1998; DEAN; DAVIS, 1990). Estima-se que somente no estado de São Paulo, nas últimas três décadas, as perdas decorrentes do RSD superaram dois bilhões de dólares (TOKESHI; RAGO, 2005). Urashima e Marchetti (2013) relatam que a porcentagem de cultivares infectadas por Lxx no estado em 2010 foi de aproximadamente 70%. Resultados semelhantes foram obtidos por Ponte et al. (2010) em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, oeste de Minas Gerais e sul da Bahia. É importante salientar que estas áreas estão sujeitas a condições prolongadas de déficit hídrico, o que pode agravar as perdas ocasionadas pelo RSD (BRUMBLEY et al., 2006).

Embora a doença seja conhecida há muito tempo, a literatura sobre o RSD é escassa no que tange aspectos da interação de Lxx com seu hospedeiro. Assim, este trabalho analisou perfis de expressão gênica em plantas de cana-de-açúcar infectadas com a bactéria visando identificar genes e vias metabólicas responsivas ao desenvolvimento do patógeno. Em plantas com maior população de Lxx observou-se redução na expressão de genes envolvidos no controle do ciclo e metabolismo de DNA, o que é consistente com o principal sintoma da doença, isto é, o subdesenvolvimento vegetativo. Em contrapartida, à medida que o título bacteriano aumentou ao longo do tempo, também ocorreu a indução de genes de defesa e transdução de sinais, sugerindo um rearranjo das vias metabólicas do hospedeiro durante a colonização pela bactéria.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Agente causal do raquitismo das soqueiras (DAVIS et al., 1980), Lxx é uma bactéria de hábito nutricional fastidioso, pequena (0,25 x 5 µm), corineforme, Gram positiva e que coloniza a cana-de-açúcar (GILLASPIE; TEAKLE, 1989). O seu genoma possui elevado conteúdo de bases GC (67,7%) e de pseudogenes, o que sugere um processo de decaimento genético (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Por outro lado, o número de genes de patogenicidade é baixo comparado a outras bactérias fitopatogênicas (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Entre estes estão genes envolvidos na síntese de pectinase, celulase e lisozima. O sequenciamento do genoma de Lxx trouxe ainda informações relevantes sobre a presença de um *operon* carotenóide (genes *lctB*, *crtYe*, *crtB*, *crtl* e *crtE*) e uma enzima desaturase (*desA*) que poderiam estar envolvidos na síntese de um análogo ao fitormônio ácido abscísico (ABA). Este é reconhecidamente um inibidor do crescimento em plantas e poderia ser o responsável pelo principal sintoma da doença, o raquitismo (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Já foi demonstrado que extratos de sobrenadantes de culturas líquidas de Lxx, cultivadas sob estresse osmótico, inibem a germinação das sementes e o alongamento das radículas em alface, sugerindo que a bactéria é capaz de secretar um produto com ação similar ao ABA. Entretanto ainda não se conhece a composição desse extrato (CASTRO, 2012).

O contato de Lxx com a cana-de-açúcar parece ter sido recente, uma vez que a bactéria não foi encontrada no centro de diversidade genética de *Saccharum officinarum*, em Papua Nova Guiné, e só recentemente foi identificada em plantações comerciais deste país (MARGAREY et al., 2002). A hipótese de contato recente é corroborada pelo fato de existir alta uniformidade genética entre isolados coletados em cana cultivada (YOUNG et al., 2006). Além disso, Lxx apresenta maior crescimento em clones de *S. spontaneum* em comparação a *S. officinarum* (ROACH; JACKSON, 1992), o que levanta a hipótese de que Lxx tenha sido introduzida nas cultivares modernas após o cruzamento dessas espécies, sendo *S. spontaneum* o hospedeiro natural da bactéria (BRUMBLEY et al., 2006). Diante do exposto, Lxx pode ser considerada um endófito obrigatório da cana-de-açúcar (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004; BRUMBLEY et al., 2006). De fato, a existência de uma bactéria semelhante a Lxx foi relatada em diversas espécies de gramíneas encontradas em áreas próximas a regiões de

cultivo de cana-de-açúcar, porém os resultados não permitiram concluir com certeza se tratar de Lxx (MILLS et al., 2001).

Embora seja encontrada nas folhas e colmos, a distribuição de Lxx na planta é irregular, onde maiores títulos bacterianos são encontrados em vasos do xilema (MARAMOROSCH et al., 1973; KAO; DAMANN, 1980) dos colmos basais (BAILEY, 1977; HARRISON; DAVIS, 1988). Fatores como idade da planta, *background* genético da variedade (BAILEY, 1977; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988), temperatura (TEAKLE; RYAN, 1992; NGARUIYA; SHIPTON; COVENTRY, 2005) e estresse hídrico (COMSTOCK, 2002) influenciam seu crescimento *in planta*. Ramos (2013), por exemplo, observou incremento no título de Lxx em plantas naturalmente colonizadas pela bactéria após a imposição de estresse hídrico e injúria mecânica às plantas.

2.2 O raquitismo das soqueiras

O RSD é uma das principais doenças da cana-de-açúcar (BRUMBLEY et al., 2006) e pode causar perdas bastante significativas em importantes centros produtores como Austrália e Estados Unidos onde perdas superiores a 30% já foram relatadas (YOUNG; BRUMBLEY, 2004; GRISHAM; JOHNSON; VIATOR, 2009). Estas podem aumentar após sucessivos cortes da cultura. Grisham (1991) relata perdas na produtividade de 14% e 27%, em média, respectivamente para o primeiro e o terceiro corte das plantas. No Brasil, um estudo conduzido por Gagliardi e Camargo (2009) com dez variedades, entre as quais se encontravam seis das dez variedades mais cultivadas no Estado de São Paulo e que ainda se classificam como tal segundo o censo varietal 2012 (REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO - RIDESA, 2012), indicou perdas de até 26% no peso médio das parcelas inoculadas com Lxx. Porém, perdas superiores a 50% já foram relatadas em genótipos altamente suscetíveis (DAVIS; BAILEY, 2000). A intensidade dos danos parece estar relacionada às condições ambientais, já que a produtividade pode ser reduzida em 15-30% sob boas condições de cultivo e disponibilidade de água comparado a 20-40% sob déficit hídrico (BAILEY; MCFARLANE, 1999; NGARUIYA; SHIPTON; COVENTRY, 2005). Além disto, as perdas estão diretamente relacionadas ao título bacteriano (DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; ZEKARIAS et al., 2012), ou seja, as maiores perdas em produtividade foram identificadas em plantações com alta concentração do patógeno. Harrison e Davis (1988) correlacionaram a resistência dos cultivares de cana-de-açúcar ao RSD a menor densidade de Lxx na seiva xilemática.

O raquitismo se caracteriza por ser uma doença de difícil dignose no campo, já que seus sintomas externos, que compreendem encurtamento dos entrenódios e diminuição no porte da planta, podem ser causados por diversos outros fatores de estresse. Em casos extremos, podem ocorrer murcha e necrose nas bordas das folhas em genótipos suscetíveis (DAVIS et al., 1980). O efeito deletério da doença pode ser reflexo tanto do efeito de uma substância produzida pela bactéria (KAO; DAMANN, 1980; MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004) como pelo entupimento dos vasos do xilema em decorrência da deposição de gomas ou tiloses pelo hospedeiro (TEAKLE; APPLETON; STEINDL, 1978). Internamente, pode-se verificar a presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas na região inferior do nó especialmente em colmos basais e também uma coloração rosada próximo ao meristema apical em plantas jovens (PAN et al., 1998; IGLESIA, 2003).

Diante da dificuldade de diagnose da doença com base em sintomatologia, várias metodologias foram desenvolvidas para detectar e, em alguns casos, quantificar a bactéria *in planta*. Entre as principais técnicas empregadas estão a microscopia de luz, o teste ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), EB-EIA (*evaporative-binding enzyme-linked immunoassay*), TB-EIA (*tissue blot enzyme immunoassay*) e *dot blot enzyme immunoassay* (COMSTOCK, 2002; IGLESIA, 2003; CARNEIRO et al., 2004). Contudo, estas técnicas são demoradas e podem não detectar células bacterianas em baixas concentrações (TAYLOR et al., 2003). Métodos baseados na técnica de PCR (*polimerase chain reaction*) são mais sensíveis e específicos para diagnóstico do que imunoenaios (IGLESIAS et al., 2003). Taylor et al. (2003) utilizaram a técnica de RAPD (*random amplified polymorphic DNA*) para identificar Lxx em pequenas concentrações no fluido fibrovascular da cana-de-açúcar. Grisham et al. (2007) e Carvalho (2012) desenvolveram iniciadores específicos para a detecção precoce de Lxx via *Real Time – PCR* a partir de plantas jovens de cana-de-açúcar. Recentemente, foram desenvolvidos trabalhos para identificação de Lxx pelo sistema Taqman[®] qPCR (PELOSI et al., 2013) e *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP) (LIU et al., 2013).

A disseminação de Lxx dá-se através do plantio de material propagativo infectado ou do contato dos instrumentos de corte com o fluido vascular de plantas infectadas durante a colheita (COMSTOCK, 2002). Assim, o controle da doença fundamenta-se no plantio de material vegetal sadio oriundo do tratamento térmico dos toletes (BENDA; RICAUD, 1978; DAMANN; BENDA, 1983) ou do cultivo de meristemas *in vitro* (HOY et al., 2003). Durante o tratamento térmico, os toletes-semente que darão origem a canas-planta são tratados por imersão em água quente, sendo as combinações 50°C por 2 horas ou 52°C por 30 minutos as

mais utilizadas no país (URASHIMA; GRACHET, 2012). O material propagativo é mantido em viveiros controlados, supostamente livre de doenças, e todos os instrumentos de corte são desinfetados através do calor ou por imersão em solução química. O cultivo *in vitro* é bastante promissor no controle do RSD (SANDHU et al., 2009), entretanto, assim como o tratamento térmico, não é totalmente eficaz, podendo apresentar escapes que atuam como fonte de inóculo da bactéria (FERNANDES Jr. et al., 2010). Outra opção no controle da doença é o uso de variedades resistentes. Todavia, a disponibilidade de germoplasma resistente é restrita (LI et al. 2013), o que reforça a necessidade de estudo da interação cana-de-açúcar e Lxx.

2.3 Interação planta patógeno

Para sobreviver ao ataque de patógenos, as plantas desenvolveram diversos mecanismos de defesa que, em seu conjunto, constituem seu sistema imune inato. A primeira linha de defesa compreende mecanismos estruturais e bioquímicos pré-formados, que previnem ou restringem a infecção. Os mecanismos estruturais compreendem barreiras físicas à entrada dos patógenos, tais como a presença de cutícula e tricomas nas folhas ou os microfilamentos de actina do citoesqueleto, enquanto os mecanismos bioquímicos englobam substâncias capazes de dificultar ou inibir a colonização dos tecidos do hospedeiro. Compostos fenólicos, alcaloides e inibidores proteicos são exemplos dessas substâncias. Entretanto, ao longo do processo evolutivo, alguns microrganismos desenvolveram mecanismos que os permitam vencer estas barreiras e penetrar na planta através do uso de enzimas que degradam a cutina e parede celular ou de substâncias que inativem os compostos antimicrobianos produzidos pelas plantas (SENTHIL-KUMAR; MYSORE, 2013).

Uma vez que essas barreiras tenham sido superadas, as plantas devem ser capazes de reconhecer o invasor e traduzir essa informação em respostas de defesa. Neste processo, as plantas reconhecem padrões moleculares derivados do patógeno (PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*) ou até de si mesmas (MIMPs – *Microbe Induced Molecular Patterns*). Os PAMPs correspondem a moléculas, ou porções destas, altamente conservadas e essenciais para os patógenos, como a proteína flagelina de flagelos de bactérias (MACKEY, McFALL, 2006). Já MIMPs são moléculas do próprio hospedeiro que sofrem alteração em sua conformação ou são liberadas devido à ação de enzimas do patógeno, como pequenos fragmentos da parede celular do hospedeiro (MACKEY, McFALL, 2006). Após o reconhecimento dessas moléculas pelo hospedeiro, genes de defesa são ativados em um processo conhecido como *pathogen triggered immunity* (PTI) (ABRAMOVITCH; MARTIN,

2004). Estes mecanismos são extremamente efetivos e garantem que a planta seja imune à grande maioria dos microrganismos com potencial fitopatogênico, que desta forma não conseguem estabelecer relações parasíticas com o hospedeiro. Por isto, estes mecanismos inespecíficos são denominados de mecanismos de resistência de não-hospedeiro.

A PTI, por sua vez, pode ser suprimida por moléculas efetoras produzidas pelo patógeno que atuam no sistema de reconhecimento, permitindo a colonização do hospedeiro. Em resposta, as plantas fazem uso de proteínas de resistência (R), que reconhecem diretamente o efector (modelo chave-fechadura) ou identificam alterações em moléculas-alvos do hospedeiro (modelo guarda) (DODDS; RATHJEN, 2010). Estes processos levam à indução de um segundo nível de resposta de defesa denominado *effector-triggered immunity* (ETI) (ABRAMOVITCH; MARTIN, 2004). Pode-se considerar que ETI corresponda uma resposta rápida e amplificada de PTI (JONES; DANGL, 2006).

Diversos receptores kinase (RLK) atuam no reconhecimento de moléculas extracelulares, tanto de patógenos quanto de organismos simbioses. Estes podem apresentar apenas um domínio citoplasmático serina / treonina kinase ou ainda um domínio extracelular rico em leucina (LRR) ou lisina (LysM) (ANTOLÍN-LLOVERA et al., 2012). Após o reconhecimento, os RLKs ativam uma série de outras proteínas kinase (fenômeno denominado de cascatas de kinases) que traduzem os estímulos extracelulares em respostas intracelulares (TENA; BOUDSOCQ; SHEEN, 2011). Outro componente importante no processo de transdução de sinal são as calmodulinas. Estas são sensores de cálcio, cujos níveis intracelulares podem ser modificados em resposta ao patógeno (LECOURIEUX; RANJEVA, PUGIN, 2006) e regulam a atividade de outras proteínas, tais como fatores de transcrição, kinases, fosfatases, proteínas do citoesqueleto entre outras (PEROCHON et al., 2011).

As cascatas de sinalização culminam na ativação de vias hormonais. Os papéis dos fitormônios ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) na interação planta patógeno são bem conhecidos. De modo geral, o SA está relacionado à ativação da resposta de defesa contra patógenos biotróficos e hemi-biotróficos, enquanto JA e ET são normalmente associados à patógenos necrotróficos (PIETERSE et al., 2009). Além disso, a modulação dos níveis de etileno também está associada ao controle da colonização da planta por bactérias endofíticas (HARDOIM; OVERBEEK; ELSAS, 2008). Cavalcante et al. (2007) observaram que o fator SCERF1 de resposta ao etileno foi induzido em plantas de cana-de-açúcar inoculadas com a bactéria fixadora de nitrogênio *Gluconacetobacter diazotrophicus*, enquanto que o mesmo foi reprimido em plantas inoculadas com Lxx. Outros hormônios como auxina (AUX), giberelina (GA), citocinina (CK), ácido abscísico (ABA) e brassinoesteróides (BR)

também participam na regulação da defesa em plantas e dependendo do tipo de interação planta – patógeno podem atuar positiva ou negativamente, além de interagirem entre si (BARI; JONES, 2009). Como estes hormônios também controlam o desenvolvimento em plantas, especula-se que haja uma relação entre o crescimento destas e as respostas de defesa, sendo este último favorecido em detrimento do primeiro (KAZAN; MANNERS, 2009).

2.4 Uso de tecnologias de análise de expressão gênica em larga escala no estudo da interação planta-patógeno

Atualmente, o foco da pesquisa na área de fitopatógenos, antes confinado à diagnose da doença e controle via práticas culturais, foi ampliado pela necessidade de compreensão dos mecanismos moleculares de interação entre o patógeno e a planta hospedeira. Avanços recentes no campo da Genômica vegetal estimularam novas abordagens, especialmente voltadas para aplicações no melhoramento genético. A busca por variedades resistentes ou tolerantes ao RSD, antes considerada de importância secundária, hoje é uma das grandes preocupações dos melhoristas diante de um mercado cada vez mais competitivo, como o da cana-de-açúcar (LI et al., 2013). A busca por genes candidatos para identificação de QTLs (*Quantitative Traci Loci*) é um dos principais alvos nos programas de melhoramento, visando acelerar a identificação de genótipos superiores (MIURA; ASHIKARI; MATSUOKA, 2011). Neste contexto, a análise do transcrito da planta hospedeira durante a interação com patógenos pode identificar genes candidatos de resistência a doenças, assim como elucidar as alterações que ocorrem nas plantas quando expostas a este tipo de estresse (SCHENK; CARVALHAIS; KAZAN, 2012).

Em soja, por exemplo, a análise do transcrito de cultivares tolerante e suscetível a *Phakopsora pachyrhizi*, identificou 1.342 genes diferencialmente expressos em plantas infectadas e não infectadas. Destes, aqueles que codificam peroxidases, glutathione S-transferase e lipoxigenase, assim como os associados com a rota de biossíntese de flavonóides, podem estar relacionados à resistência a ferrugem, além de serem prováveis alvos de seleção em programas de melhoramento genético da cultura (SORIA-GUERRA et al., 2010). A análise do transcrito da planta hospedeira infectada é uma ferramenta que permitirá a compreensão da interação planta-patógeno, especialmente em fitopatógenos como *Ralstonia solanacearum*, *Liberibacter asiaticus*, *X. fastidiosa* e *Clavibacter sepedonicum*, os quais podem permanecer durante longos períodos em uma forma latente dentro da planta (ALLEN; BENT; CHARKOWSKI, 2009), a exemplo de Lxx. Em citrus, o estudo da

expressão gênica de plantas infectadas pela bactéria fastidiosa *Liberibacter asiaticus* através da técnica de microarranjo permitiu relacionar as alterações no perfil de expressão com os sintomas ocasionados pela doença, além de identificar diversos genes de defesa na planta (ALBRECHT; BOWMAN, 2008). Souza et al. (2007) e Rodrigues et al. (2013) demonstraram a importância de se estudar as alterações que ocorrem nos estágios iniciais da interação citrus – *X. fastidiosa*, antes mesmo que qualquer sintoma seja visível, ao identificar genes que estariam envolvidos no controle do estabelecimento e colonização da planta pelo patógeno.

Diversas tecnologias para análise da expressão gênica têm sido utilizadas em cana-de-açúcar para estudo da interação de plantas e microrganismos. Ferro et al. (2006) analisaram a expressão diferencial de genes em variedades de cana-de-açúcar suscetível e tolerante ao RSD, nove meses após a inoculação com Lxx, através da técnica de macroarranjos de cDNA. A repressão de um gene que codifica para uma lipase, na variedade suscetível, levantou a hipótese de que o ácido jasmônico pode ter um papel importante na defesa contra Lxx, enquanto os fatores de transcrição como MYB e NAC, os quais podem estar relacionados à defesa, foram induzidos na variedade tolerante. Os mesmos, assim como os fatores de transcrição WRKY e bZIP, foram induzidos durante a interação incompatível entre a cana-de-açúcar e *Colletotrichum falcatum*, através da técnica de RT-PCR (MUTHIAH et al., 2013). O sequenciamento pela plataforma Solexa foi utilizado na busca por genes diferencialmente expressos em plantas de cana-de-açúcar infectadas pelo fungo *Sporisorium scitaminea* (WU et al., 2013) e a técnica de hibridização subtrativa por supressão foi utilizada por Oloriz et al. (2012) durante a interação da cana-de-açúcar com *Puccinia melanocephala*. A análise de expressão diferencial pela técnica de microarranjo em plantas inoculadas com a bactéria endofítica *G. diazotrophicus* identificou um gene envolvido na biossíntese de ácido salicílico e de vários genes R (ROCHA et al., 2007).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análises de expressão gênica por hibridização em lâminas de microarranjos

3.1.1 Material vegetal

O material vegetal utilizado para este estudo foi o mesmo utilizado em um estudo anterior para análise de proteínas de cana diferencialmente expressas durante a interação com Lxx (CARVALHO, 2012). Neste experimento, realizado em casa de vegetação durante os meses de julho a outubro, plantas oriundas de toletes da variedade SP80-3280 tratados por imersão em água quente a 50,5 °C por duas horas foram plantados em vasos de 0,5L contendo substrato Basaplant (Base). Após 30 dias, as plantas foram transferidas para vasos de 22,5L contendo uma mistura de solo e substrato (2:1) adicionada de 2g/L do adubo Basacote (3M) de formulação 15-8-12. Sete dias após o transplante, as plantas foram inoculadas através do corte da parte aérea a 2 cm da base e perfuração do tecido remanescente com agulhas estéreis seguido da deposição de 50 µL de cultura líquida de Lxx (OD = 0,7) na superfície de corte. As plantas controle foram inoculadas com meio de cultura estéril. O preparo do inóculo deu-se conforme descrito por Carvalho (2012). Todo o experimento foi conduzido em casa de vegetação com temperatura média de 25,5 °C umidade relativa do ar de 58%.

O experimento compreendeu quatro tratamentos com três repetições: plantas inoculadas com Lxx (tratamentos LxxI) ou com meio de cultura estéril (tratamentos MI) analisadas aos 30 ou 60 dias após a inoculação (DAI). As repetições consistiram de um vaso contendo três plantas arranjadas em um delineamento de blocos ao acaso. Os títulos bacterianos foram determinados por qPCR nos tempos estabelecidos, a partir do DNA extraído do *pool* do cartucho foliar das três plantas presentes em cada vaso. Foi constatada a presença de bactéria em todos os tratamentos, incluindo os tratamentos inoculados apenas com meio de cultura. Entretanto, o título bacteriano foi maior nos tratamentos inoculados com Lxx em ambos os tempos. Duas repetições de cada tratamento foram selecionadas e utilizadas para as análises de microarranjo. Para a validação dos dados, pela técnica de qPCR, todas as três repetições foram empregadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Número de células de Lxx (log) / 100 ng DNA aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI), em plantas não inoculadas (MI) e inoculadas (LxxI), das amostras empregadas na análise de microarranjo (Rep.1 e Rep.2) e na validação (todas as repetições). A coluna média corresponde à média das três repetições seguida pelo desvio padrão

Tratamentos	30 DAI				60 DAI			
	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Média	Rep.1	Rep.2	Rep.3	Média
MI	0,86	0,92	0,70	0,82±0,12	1,61	1,49	1,50	1,53±0,07
LxxI	1,47	1,38	1,45	1,43±0,05	2,17	2,47	2,54	2,40±0,20

3.1.2 Hibridização de microarranjos e análise de dados

O RNA foi extraído com Trizol® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante a partir de 100 mg de tecido do cartucho foliar. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, ao qual se adicionou 1 mL de Trizol. O homogenato foi agitado por 10 segundos e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12.000g por 15 minutos a 4 °C em centrífuga de bancada. A fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo ao qual se adicionou 200 µL de clorofórmio. Os tubos foram agitados por 10 segundos e mantidos em temperatura ambiente por 3 minutos. A suspensão foi centrifugada novamente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e misturado com 250 µL de isopropanol e 250 µL de solução de precipitação (NaCl 1,2M; citrato de sódio 0,8M) e incubado em temperatura ambiente por 3 minutos. Os tubos foram centrifugados a 12.000g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e 1 mL de etanol 75% foi adicionado aos tubos, que foram misturados por inversão e novamente centrifugados por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e os tubos mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos para secagem. O RNA foi ressuspensionado em 30 µL de água DEPC 0,01%, previamente aquecida a 65 °C e a suspensão foi incubada na mesma temperatura por 10 minutos. A concentração de RNA foi determinada em NanoDrop (Thermo Scientific). Visando eliminar DNA contaminante, a suspensão foi tratada com 1 µL de DNase I (Invitrogen) e 1 µL de DNase I buffer 10X por 1 µg de RNA. O volume da reação foi ajustado segundo as recomendações do fabricante com água DEPC 0,01%. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos e a reação foi encerrada pela adição de 1 µL de EDTA 25 mM, seguida de incubação por 10 minutos a 65 °C. As amostras foram purificadas pelo kit *RNAeasy mini spin columns* (Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do RNA foi avaliada por eletroforese (5V/cm) em gel de agarose 1%, contendo 20% de formaldeído 37%, 10% de tampão MOPS 10X (MOPS 0,2M; acetato de sódio 50 mM; EDTA 10 mM; pH 7,2) e 0,5X de Sybr safe (Invitrogen).

Antes da aplicação no gel, adicionou-se a 400 ng de RNA ao tampão de amostra 5X (30,84% de formamida; 40% de MOPS 10X; 7,2% de formaldeído 37%; 0,5% de EDTA 500mM; 20% de glicerol; 0,35% de azul de bromofenol) na proporção de 4 de amostra : 1 de tampão (v/v). As amostras foram aquecidas a 65 °C por 5 minutos e aplicadas no gel.

Dez microgramas de RNA total foram utilizados para a síntese de cDNA marcado com *Cyanine 3 CTP Dye* (Cy3) ou *Cyanine 5 CTP Dye* (Cy5) utilizando o kit *Low RNA Input Quick Amp Labeling kit, two color* (Agilent Technologies) de acordo com as recomendações do fabricante. Como controle das reações foram empregados dez transcritos poliadenilados do adenovírus E1A com razões previamente conhecidas, sintetizados *in vitro* com o kit *Agilent RNA Spike-In kit two colors* (Agilent Technologies). As hibridizações foram realizadas em chip personalizado 4x44K (Agilent Technologies) composto por 43.802 sondas que correspondem a 14522 SAS (*Sugarcane Assembled Sequence*) (LEMBKE et al., 2012). O kit *Gene Expression Hybridization* (Agilent Technologies) foi utilizado nesta etapa segundo as recomendações do fabricante. Nas réplicas biológicas foi realizada a troca dos fluoróforos entre as amostras (*dye-swap*) inoculadas e não inoculadas com Lxx, a fim de controlar possíveis artefatos resultantes da incorporação preferencial de um dos fluoróforos.

As lâminas foram analisadas em scanner GenePix 4000B (Molecular Devices, USA). Os dados de intensidade das imagens foram obtidos com o software *Feature Extration 9.5.3* (Agilent Technologies), o qual subtrai a média do sinal do *background* de cada *spot* presente na lâmina. A normalização dos valores brutos de intensidade foi realizada pelo algoritmo LOWESS (YANG et al., 2002). Esta normalização utiliza uma função de regressão ponderada dentro de cada intervalo pré-definido através da abscissa de gráficos do tipo M x S, onde M corresponde a $\log_2(\text{Cy5/Cy3})$ e S a $\log_2[(\text{Cy5}+\text{Cy3})/2]$, de modo a ajustar os desvios ocasionados pela incorporação, emissão de fluoróforos e diferenças no sinal em função da intensidade. Os contrastes de perfis de expressão foram realizados entre plantas inoculadas e não inoculadas aos 30 ou 60 DAI (Figura 1). Desta forma, os contrastes visaram identificar genes diferencialmente expressos entre plantas infectadas com títulos bacterianos contrastantes em dois tempos de análise. As análises foram realizadas pelo método HTself (VENCIO; KOIDE, 2005), que utiliza bancos de dados compostos por experimentos *self-self* onde o mesmo material biológico é marcado com ambos os fluoróforos Cy3 e Cy5 e hibridizados na mesma lâmina. Esta estratégia permite a obtenção de *cut-offs* dependentes de intensidade para classificar os genes como diferencialmente expressos e assume que o mesmo processo que gera ruído experimental em experimentos *self-self* está presente nos demais. Para a obtenção do *cutoff* foi utilizado o nível de credibilidade de 0,95, ou seja, foram

considerados nas análises apenas os 5% de *spots* com maior variação na intensidade de fluorescência (*up* / *down*).

Figura 1 – Contrastes entre plantas de cana inoculadas com Lxx (SP LxxI) ou com meio de cultura estéril (MI) analisadas aos 30 (1) ou 60 (2) dias após a inoculação utilizados para identificar genes com expressão diferencial em plantas com maior título bacteriano por meio de hibridizações em lâminas de microarranjo

Os genes identificados como diferencialmente expressos foram disponibilizados no banco de dados SUCEST – FUN (<http://www.sucest-fun.org/wsapp/crossingexperiment.do>) e distribuídos em categorias funcionais com base em análise pela ferramenta *Term enrichment analysis* e de informações obtidas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) e Uniprot (*Universal Protein Resource*), além da literatura científica. Um *heat map* com agrupamento hierárquico foi obtido através do *software* Cluster 3.0 (HOON et al., 2004) com o intuito de visualizar e agrupar os genes com padrão de expressão similar. A ferramenta ClueGO (BINDEA et al., 2009), a partir do programa Cytoscape (SHANNON et al., 2003) foi utilizada para visualizar e facilitar a interpretação biológica das vias e processos metabólicos do hospedeiro afetados pelo crescimento de Lxx.

3.2 Análises de validação

3.2.1 Seleção de genes para validação e desenho de *primers*

Para a etapa de validação via qPCR, genes com expressão diferenciada entre os contrastes, tanto os mais como os menos expressos, foram selecionados com base na maior variação de expressão e nas categorias funcionais julgadas de maior relevância para entender a gênese dos sintomas da doença. Os iniciadores foram desenvolvidos com auxílio do

software *Primer3Plus* (UNTERGASSER et al., 2007) atendendo os seguintes parâmetros: a) tamanho do produto entre 90 e 200 pb; b) tamanho do *primer* entre 18 e 23 pb; c) temperatura de *Melting* entre 57 e 63 °C; d) quantidade de CG entre 40 e 60%. A qualidade do par de *primers* foi analisada através do software *Beacon Designer* (PREMIER Biosoft International) a fim de evitar a formação de estruturas secundárias. As sequências dos *primers* foram usadas em buscas no banco de dados SUCEST utilizando o algoritmo BLAST a fim de avaliar sua especificidade. Esta também foi analisada por reações de PCR convencional utilizando 12,5 µL de Master Mix 2X (Promega), *primer* F (*forward*) 0,3 µM, *primer* R (*reverse*) 0,3 µM, 2 µL de cDNA e água isenta de nucleases (Ambion) para um volume final de 25 µL. A amplificação consistiu de um ciclo inicial de 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento a 58 °C por 30 segundos e extensão a 72° C por 20 segundos. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada em função do tamanho dos fragmentos gerados em gel de agarose 2%.

3.2.2 Análise de expressão por qPCR

A extração de RNA foi realizada como descrito anteriormente. A ausência de DNA contaminante foi verificada por meio de uma reação de PCR qualitativo conforme descrito no item 3.2.1. A síntese de cDNA foi feita utilizando o kit SuperScript III[®] First-Strand Synthesis for RT-PCR (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Na síntese de cDNA, além do RNA tratado, foram utilizados 0,5 µL de oligo(dT) 50 µM, 1 µL de primers hexâmeros randômicos 50 ng/ µL e 1 µL de dNTP 10 mM. As amostras foram incubadas a 65 °C por 5 minutos e acondicionadas no gelo por 1 minuto. Em seguida foram adicionados, a cada amostra, 2 µL de tampão de transcrição reversa 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM), 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 2 µL de DTT 0,1 M, 1 µL de RNase OUT (40 U/µL) e 1 µL de SuperScript III[®] RT (200 U/µL). A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, 50 °C por 50 minutos e 85 °C por 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado 1 µL de RNase H e as amostras mantidas a 37 °C por 20 minutos. O cDNA foi armazenado a -20 °C e posteriormente utilizado nas reações de qPCR.

As reações de qPCR foram realizadas em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações consistiram de 2 µL do cDNA, 6,25 µL de tampão de amplificação SuperMix, 0,3 µM de cada *primer*, 50 nM de padrão de referência interna (ROX) e água *Nuclease free* para um volume final de 12,5 µL. A

amplificação consistiu de um ciclo inicial a 50 °C por 2 minutos e um ciclo de 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos e anelamento e extensão a 58 °C por 30 segundos. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação. A eficiência da reação foi determinada utilizando o software LinReg PCR (RAMAKERS et al., 2003). Todas as reações foram realizadas em duplicada na placa.

Como normalizadores foram testados os genes que codificam para glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), 25S rRNA, β -actina, β -tubulina (ISKANDAR et al., 2004), poliubiquitina e proteína 14-3-3 (ROCHA et al., 2007). O teste de estabilidade dos genes endógenos foi realizado através da ferramenta RefFinder (www.leonxie.com/referencegene.php) que integra os programas Δ Ct method (SILVER et al., 2006), BestKeeper (PFAFFL et al., 2004), NormFinder (ANDERSEN; JENSEN; ORNTTOFT, 2004) e GeNorm (VANDESOMPELE et al., 2002). O método Δ Ct compara a expressão relativa de pares de genes dentro de cada amostra. Assim, se a variação entre dois genes para diferentes amostras permanecer constante, conclui-se que suas expressões são estáveis. De forma semelhante, o BestKeeper considera que os genes com menor desvio padrão (SD) e coeficiente de variação (CV) são os mais consistentes. O programa ainda estabelece o coeficiente de correlação de Pearson e o *p-value* para cada par de genes. Baseado no conceito de que genes endógenos devem ter padrão de expressão similar, uma alta correlação indica maior estabilidade. O programa NormFinder avalia a variação inter e intragrupos de genes, sendo os mais estáveis aqueles com menor variabilidade. O GeNorm calcula a estabilidade de expressão dos genes endógenos (M) a partir da média da variação em pares comparando um gene particular com todos os demais candidatos incluídos na análise. Genes com baixos valores de M apresentam maior estabilidade. A ferramenta Reffinder, atribui pesos diferentes a cada gene com base na classificação gerada por cada programa e, a partir da média geométrica destes, os classifica quanto a sua estabilidade. A expressão relativa dos genes alvos normalizados com os respectivos controles internos e as análises estatísticas foram geradas no programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

3.2.3 Experimento de validação I

No primeiro experimento de validação, foram utilizadas, além das duas repetições biológicas empregadas nas hibridizações dos microarranjos, uma repetição adicional oriunda do experimento de proteômica.

3.2.4 Experimento de validação II

Um segundo experimento independente de validação foi conduzido durante o período de março a junho também em casa de vegetação seguindo a mesma metodologia de obtenção de toletes do experimento I. Vinte dias após o plantio, as plantas foram transferidas para vasos de 22,5L contendo solo esterilizado e substrato (2:1) (Figura 2) adubado com Osmocote 14-14-14 na proporção de 3g/L de substrato. As plantas foram inoculadas dez dias após o transplante, conforme descrito a seguir.

Figura 2 - Implantação do experimento em casa de vegetação. Tratamento térmico das gemas a 52 °C por 30 min (A e B). Plantio das gemas em vasos de 0,5L (C). Transplante das mudas para vasos de 22,5L aos 30 dias após o plantio

A estirpe CTCB07 de Lxx foi cultivada em meio de cultura líquido M-SC new (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), composto por 8,0 g de peptona de soja, 0,2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mL de K_2HPO_4 0,13M, 100 mL de KH_2PO_4 0,87M, 30mL de solução de

0,1% de hemina bovina (Sigma) em NaOH 0,05M em um volume final de 900 mL. No caso do preparo de meio sólido adicionou-se 17 g/L de ágar de milho e 4 g/L de ágar bacteriológico. O pH foi ajustado para 7,5 com NaOH 1M e o meio esterilizado a 121 °C, 1 atm por 25 minutos. Em seguida foram adicionados 100 mL (10% v/v) de uma solução estéril contendo 5 g de glicose (Merck), 0,5g de cisteína (Sigma), 2,0g de albumina bovina fração V (Sigma) e 0,5 g de metionina (Sigma).

O inóculo foi preparado transferindo-se colônias de células bacterianas cultivadas em meio sólido para 50 mL de meio de cultura líquido. A cultura bacteriana foi incubada a 28°C por sete dias sob agitação constante a 150 rpm. Leituras de absorbância (600nm) foram realizadas em alíquotas de 1 mL visando confirmar que a cultura estava em fase log de crescimento. Posteriormente, alíquotas de 100 µL foram retiradas e submetidas a diluições seriadas e plaqueadas em meio de cultura sólido para contagem do número de UFC e confirmação da pureza do inóculo.

Para a inoculação, as plantas foram cortadas a aproximadamente 3 cm do solo com lâminas de bisturis (nº 22) estéreis. Na base do tecido restante foram realizadas três perfurações com agulha estéril (0,55 x 20 mm) e depositados 50 µL da cultura bacteriana. As plantas controle foram inoculadas com a mesma quantidade de meio de cultura estéril. O delineamento experimental empregado foi o de blocos inteiramente ao acaso com cinco réplicas, sendo cada uma composta por três plantas. O tecido do cartucho foliar foi coletado aos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI). Além disso, quatro plantas foram mantidas em casa de vegetação por seis meses com o intuito de reisolar a bactéria. A temperatura média durante todo o experimento foi de 25 °C ± 1,8 e a umidade relativa de 67% ± 8,4.

O DNA foi extraído conforme Pospiech e Neumann (1995), com modificações, a partir de 100 mg de tecido vegetal. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino, o qual foi transferido para tubos de microcentrifuga de 1,5 mL. Foram realizadas duas lavagens em solução de NaCl 1M em tampão T₁₀E₁₀ (Tris 10 mM; EDTA 10 mM), pH 8,0. O material foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. As amostras foram suspendidas em 337,5 µL de solução SET (NaCl 75 mM; EDTA 25 mM; Tris-base 20 mM) pH 7,5 adicionada de 1 mg/mL de lisozima e incubadas a 37 °C por duas horas. À suspensão foram adicionados 35 µL de SDS 10% (p/v) contendo 0,5 mg/mL de proteinase K. Esta foi incubada a 55 °C por 2 horas. Em seguida foram adicionados 125 µL de NaCl 5M e 375 µL de clorofórmio. Os tubos foram incubados a temperatura ambiente por 30 minutos, centrifugados a 5.000 rpm por 15 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para novo tubo ao qual adicionou-se 375 µL de isopropanol gelado.

As amostras foram mantidas a -8 °C por 12 horas, centrifugadas a 10.000 rpm por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. O precipitado foi seco em estufa a 37 °C por 30 minutos e suspenso em 200 µL de tampão T₁₀E₁₀. Em seguida foram adicionados 100 µL de NaCl 5M e 80 µL de CTAB 10 % (p/v) em NaCl 1M. O material foi aquecido a 65 °C por 10 minutos e acrescentou-se 600 µL de clorofórmio. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante transferido para um novo tubo ao qual adicionou-se 600 µL de isopropanol gelado. O homogenato foi incubado por 2 horas a -20 °C e em seguida centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e procederam-se duas lavagens com 1 mL de etanol 70% gelado. O DNA foi seco em estufa a 37 °C por 30 minutos, ressuspensionado em 40 µL de água MILLIQ autoclavada contendo RNase 10 µg/mL e quantificado em NanoDrop® 1000 (Thermo Scientific). A qualidade das amostras foi determinada em gel de agarose 1%. As amostras foram armazenadas a -20 °C.

O título bacteriano nas plantas foi determinado por qPCR em termociclador 7500 Fast (Applied Biosystems) utilizando o kit Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. As reações de qPCR consistiram de 2 µL de DNA 50 ng/µL, 12,5 µL de tampão de amplificação SuperMix, *primer* 12950F 0,2 µM, *primer* 12950R 0,2 µM (CARVALHO, 2012), padrão de referência interna (ROX) 50 nM e água *Nuclease free* para um volume final de 25 µL. O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo inicial a 50 °C por 2 minutos e um ciclo de 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento e extensão a 60 °C por 30 segundos. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada pelas curvas de dissociação geradas pelo equipamento. A curva padrão que correlaciona diferentes massas de DNA com os valores de Ct foi obtida utilizando 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 0,001 ng e 0,0001 ng do DNA de Lxx por reação, as quais correspondem, respectivamente, a $3,8 \times 10^6$, $3,8 \times 10^5$, $3,8 \times 10^4$, $3,8 \times 10^3$, 380, 38 células de Lxx.

Visando confirmar a eficiência da inoculação, quatro plantas inoculadas com Lxx foram mantidas em casa de vegetação por seis meses para isolamento de Lxx. A bactéria foi reisolada de secções de colmos desinfestados superficialmente por imersão em álcool 70% seguida por imersão em hipoclorito de sódio 4% e lavagem em água Milli-Q autoclavada. Cerca de 500 mg do tecido foram macerados em 5 mL de solução NaCl 0,85% e 100 µL da suspensão foram semeados em meio M-SC *new* sólido contendo 0,02 mg/mL do antibiótico ácido nalidíxico (BRUMBLEY et al., 2002). As placas foram mantidas por 20 dias a 28 °C.

Reações de PCR convencional utilizando como molde DNA de colônias isoladas supostamente de Lxx foram realizadas em termociclador Applied Biosystem. As reações

consistiram de 12,5 µL de Master Mix (Promega), 0,2 µM dos *primers* 12950F e 12950R (CARVALHO, 2012) ou 0,2 µM de Lxx202F e Lxx331R (GRISHAM et al., 2007) e água *Nuclease free* para um volume final de 25 µL. A amplificação consistiu de um ciclo inicial a 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C/ 10 s, anelamento a 60 °C/ 30 s e extensão a 72° C/ 20 s, e um ciclo final de 72°C/ 5 min. A especificidade dos produtos amplificados foi analisada em função do tamanho do fragmento gerado, em gel de agarose 2%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise de expressão gênica com base em hibridização em lâminas de microarranjos

4.1.1 Extração de RNA do cartucho foliar da cana-de-açúcar

A concentração de RNA variou de 214,32 ng/ μ L a 437,10 ng/ μ L. Estas foram aceitáveis considerando que são necessários cerca de 10 μ g para a hibridização. Os valores das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} variaram, respectivamente, de 1,9 a 2,0 e de 1,8 a 2,0. A análise por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% (Figura 3) revelou que a intensidade da banda correspondente ao RNAr 23S é, aproximadamente, o dobro da banda de RNAr 18S, indicando que houve pouca ou nenhuma degradação do RNA. Este foi utilizado em uma reação de PCR convencional, após o tratamento com DNase I. Nenhuma amplificação foi observada, indicando ausência de contaminação por DNA (dados não apresentados). Todos os parâmetros analisados estão de acordo com o recomendado por Sambrook et al. (2001).

Figura 3 - Eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% de RNA extraído de amostras não inoculadas (MI) e inoculadas (LxxI) com Lxx, aos 30 e 60 DAI. As bandas correspondentes ao RNAr 23S e RNAr 18S estão indicadas

4.1.2 Genes diferencialmente expressos entre plantas inoculadas e não inoculadas com Lxx

Foram identificados 272 genes diferencialmente expressos ($p=0,05$) entre plantas inoculadas (maior título bacteriano) e não inoculadas (menor título bacteriano) com Lxx. Destes, 106 foram diferencialmente expressos exclusivamente aos 30 DAI, ao passo que 152 o foram exclusivamente aos 60 DAI (Anexo A). Quatorze genes foram diferencialmente expressos em ambos os tempos de análise (Figura 4).

Figura 4 - Número de genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas com Lxx (SP LxxI) em relação a plantas não inoculadas (SP MI), aos 30 e 60 DAI. As setas indicam o número de genes com expressão induzida (vermelho) e reprimida (verde) para os contrastes analisados

4.1.3 Classificação funcional e agrupamento dos genes diferencialmente expressos

Os genes diferencialmente expressos foram organizados em categorias funcionais (Figura 5) a fim de identificar os principais processos metabólicos da planta afetados por alterações no título bacteriano em seus tecidos. Aos 30 DAI, a de maior destaque está relacionada ao controle do ciclo celular, onde todos os membros desta categoria, que compreende 22 genes, foram menos expressos em plantas inoculadas com maior título bacteriano. Também foi detectada redução na expressão de vários genes envolvidos no metabolismo de DNA (8 genes) e citoesqueleto (7 genes). A maioria dos genes pertencentes às categorias de transdução de sinal, regulação da transcrição e de defesa também tiveram menor expressão em plantas com maior título.

Aos 60 DAI, genes relacionados ao ciclo celular (7 genes) e metabolismo de DNA (6 genes) também se mostraram menos expressos em plantas inoculadas. Entretanto, neste período, as categorias com maior abundância de genes diferencialmente expressos foram as de transdução de sinal e regulação da transcrição. Ao contrário do que foi observado aos 30 DAI, a maioria dos genes pertencentes a estas categorias apresentou aumento na expressão aos 60 DAI nas plantas com maior título bacteriano. Nenhum gene pertencente às categorias citoesqueleto, tradução e elementos transponíveis teve expressão diferenciada.

Dos quatorze genes diferencialmente expressos tanto aos 30 como aos 60 DAI, sete pertencem às categorias de ciclo celular e metabolismo de DNA. A maioria destes genes corresponde a *minichromosome maintenance proteins* (MCM) e foram menos expressos nas

plantas inoculadas. Ainda o gene que codifica para uma *lipoxygenase*, a qual pode estar envolvida na síntese do ácido jasmônico, foi mais expresso nos dois tempos de análise.

Figura 5 - Distribuição em categorias funcionais dos genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas aos 30 e 60 DAI comparadas a plantas não inoculadas

A análise de agrupamento hierárquico (distância Euclidiana) dos genes diferencialmente expressos permitiu identificar cinco padrões de expressão (Figura 6 e Anexo 1). O grupo I compreende a maioria dos genes com menor expressão aos 30 DAI em plantas inoculadas, tais como *cyclins*, *kinesins* e proteínas envolvidas na replicação e manutenção do DNA. Além destes, este grupo incluiu todos os genes pertencentes às categorias de ciclo celular e metabolismo de DNA com expressão reduzida aos 60 DAI e genes com menor

expressão nas plantas com maior título de Lxx nos dois tempos de análise como os genes MCM2, MCM3, MCM6 e MCM7; todos os genes envolvidos no controle do ciclo celular foram agrupados neste conjunto. O grupo II agregou apenas genes com menor expressão aos 60 DAI. Neste grupo, a categoria regulação da transcrição foi a de maior relevância e incluiu diversos fatores de transcrição como PCF7 (*Proliferating Cell Factor*), bHLH (*basic helix-loop-helix*), *Homeobox-leucine zipper proteins* e uma *zinc finger protein*. Embora pequeno, o grupo III abrange genes com menor expressão unicamente aos 30 DAI e que podem estar envolvidos com a defesa da planta tais como *4-coumarate-CoA ligase*, *thaumatin-like protein* e um fator de resposta ao etileno (AP2/EREBP). O grupo IV representa genes induzidos em plantas inoculadas aos 60 DAI. Fazem parte deste grupo genes de regulação da transcrição e transdução de sinais como os fatores de transcrição contendo os domínios MYB, NAC e AP2/EREBP e diversas proteínas kinase. Os genes *phenylalanine ammonia lyase* (PAL) e ACC oxidase que participam, respectivamente, na defesa e metabolismo de hormônios também foram incluídos neste grupo. O grupo V corresponde aos genes com maior expressão unicamente aos 30 DAI em plantas com maior título bacteriano. Diversas categorias funcionais estão presentes neste grupo que incluiu genes envolvidos na síntese de uma peroxidase, *glycine rich cell wall protein*, *methionine synthase* e uma proteína da família do *cytochrome P450* (CYP88A8).

Para facilitar a visualização e ajudar na escolha dos genes selecionados para a validação uma rede de interação gênica contendo os genes diferencialmente expressos foi gerada pelo programa ClueGO. Nesta pode-se observar os *GO (Gene Ontology) terms* em nível de processos biológicos que ilustram os principais processos afetados pelo incremento no título de Lxx aos 30 (Figura 7) e 60 DAI (Figura 8).

4.1.4 Seleção dos genes para validação e teste de especificidade dos *primers*

Ao todo, 28 e 32 genes diferencialmente expressos aos 30 e 60 DAI, respectivamente, foram selecionados para os experimentos de validação (Tabela 2). Destes, cinco são comuns aos dois tempos analisados. As categorias ciclo celular, metabolismo de hormônios, defesa, transdução de sinal e regulação da transcrição foram as que receberam maior ênfase devido a sua importância para a compreensão da doença.

Figura 6 – Agrupamento hierárquico dos genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas aos 30 e 60 DAI. Em verde estão representados os genes reprimidos e em vermelho os induzidos

Figura 7 – Rede de interação entre genes diferencialmente expressos aos 30 DAI agrupados. Cada nó é representado por um termo de ontologia gênica (*GOterm*) em nível de processos biológicos

Figura 8 – Rede de interação entre genes diferencialmente expressos aos 30 DAI agrupados. Cada nó é representado por um termo de ontologia gênica (*GOterm*) em nível de processos biológicos

Tabela 2 – Genes diferencialmente expressos selecionados para validação agrupados por categoria funcional e identificados por seus respectivos SAS (*Sugarcane Assembled Sequence*), nome e sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos amplificados

(continua)

SAS	Categoria funcional	Gene	Sigla dos genes	Sequencia <i>primers</i>	Tamanho fragmento (pb)
SCEPAM1023G10.g	Ciclo celular	<i>Mitotic spindle checkpoint component MAD3</i>	MAD3	F:TAAATGGCATGGCTCTGTCC R:AAAGTGTGGCTCGAATACGC	94
SCCCRZ1C01E03.g		<i>Minichromosome maintenance protein 4</i>	MCM4	F: GTTTGTTTCATCCGCCTTGTC R: TTACAACCCCAGGCTTTCT	104
SCCCRZ2003E03.g		<i>Centromeric protein E</i>	CENPE	F: TGACACATTTTGCTCTACTTGC R: TTGACACGCATTCTCGAACC	132
SCACLR1057B10.g		<i>Cyclin-dependent protein kinase CDKB1;1</i>	CDKB	F: CTCTCCCACTCCATCTACG R: TACTTCTTGAGGTCGGTGTGC	113
SCEPCL6019G04.g		<i>Condensin subunit 1</i>	CS	F:TCAGAAGCGTAATATCAAAGTGC R: GCCAGAAATTCATCAAGCGAGC	170
SCSGHR1071A09.g		<i>Non-SMC condensin I complex subunit H</i>	CAP-H	F: TCCAGAAGATTGCCATTACC R: GTCATCATCATTATCCACTG	120
SCJLLR1103B02.g		<i>Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase superfamily</i>	UCT	F: AGTCCCCAATCTGCTCTAC R: TTATCTTGCTGCGAGTGTGG	133
SCEPCL6029A03.g		<i>Minichromosome maintenance protein 6 - 2</i>	MCM6	F: GCCAGCCAAACCATCGCCA R: TGACCAAGCAGCGGATAAC	137
SCACAM2042F03.g		<i>Cyclin A</i>	CycA	F:ATTCAGTAGGGATTTGTGGTG R: GCGACTGTGTAAAGGCATTG	139
SCEPCL6029D04.g		<i>Cyclin B</i>	CycB	F: ACAAAGGCACAGCAAATC R: GACAGTCTACATCATCGA	146
SCJLRZ1023B07.g		<i>Minichromosome maintenance protein 2</i>	MCM2	F:GGCGATATCAATGTCCTCCTC R:TGTGAACCGCAGCAGTAAG	144
SCCCLR1072B11.g		<i>Minichromosome maintenance protein 3 - 1</i>	MCM3	F:GATGAAATTGAGCAGGCGGT R:AGGAGATCCACGGGTAAACG	169
SCCCLR1C05C04.g		<i>Minichromosome maintenance protein 7</i>	MCM7	F: CCAGGATCAACCAAAGGAG R: GTAATGGAGCAGCAAACAG	189
SCCCCL4005H10.g		<i>Structural maintenance of chromosome 4</i>	SMC4	F: GGCTCGCTTGTATGGTGA R: AAGTTCCAGTTCGGCATCAC	195

Tabela 2 – Genes diferencialmente expressos selecionados para validação agrupados por categoria funcional e identificados por seus respectivos SAS (*Sugarcane Assembled Sequence*), nome e sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos amplificados

(continuação)					
SAS	Categoria funcional	Gene	Sigla dos genes	Sequencia <i>primers</i>	Tamanho fragmento (pb)
SCUTLR1058G02.g	Ciclo celular	<i>Cyclin III</i>	CYC3	F: CAATCCAGCCCACCAAATAG R: GCGAAATCGGAACCTGCAAC	200
SCUTFL3075D03.g		<i>TypeA cyclin</i>	CycA60	F: TTGCGACTCGAAAAAGACCG R: TTATTGTAGCATCCCCCTTCC	93
SCCCLR2002D04.g	Metabolismo de DNA	<i>Histone H4</i>	H4	F: ATGCCCTGGATGTTGTCG R: CGAGCGGAAGAAGCCATG	104
SCBGLR1002A12.g		<i>DNA topoisomerase II</i>	DNAT	F: CCTTTGTATTGACTGTCTTCTC R: ATTGGAAGTGGATGGAGCAC	155
SCBFAM2021A04.g	Citoesqueleto	<i>Kinesin-like protein</i>	KIF	F: TCATTGTTGCCTTCTGTCC R: GGACTTCTTATTGGCATTG	114
SCCCFL1097H04.g	Transdução de sinal	<i>WD40-like beta propeller repeat family protein</i>	WD40	F: GCTGATTCTGTGATTGGAT R: AAGGCAGGCAGTAAATGGTA	90
SCJLFL4099D04.g		<i>Rac GTPase activating protein - 2</i>	RAC	F: TGAAGGACTGCCAAGAACGA R: CGTAAGCAAATCCTCACAAG	104
SCCCCL3120A10.b		<i>Auxin response factor 12</i>	AUX12	F: TCTACCGACTTGCTGATTGAG R: TGAAGTACGGGAGGAGCACC	156
SCBFRT3095E07.g		<i>Receptor Ser/Thr kinase</i>	KINASE	F: CCTCCACAGACCTTGCTCATC R: CTGGACCCCGACATGAAG	156
SCQGFL4078E12.g		<i>Calmodulin binding protein</i>	CBP	F: GCTTCTCGTCATGCTCCG R: GTGGCCCTGTTTCAATCG	110
SCAGLR1064B08.g	Regulação da transcrição	<i>AP2/EREBP - 4</i>	AP2	F: CGTCCTGCCTACTCTCCTTC R: ATGGTGTGTCGCGGTTGCC	142
SCCCCL4002B07.g		<i>AP2/EREBP - 3</i>	AP260	F: CATTTGATACATCGGCACTG R: GTTTTGGGTGCTGGAGTTC	93
SCCCRZ1004G12.g		<i>NAC-domain containing protein</i>	NAC	F: TCTTCTCTCCCTTAGCCCCAC R: CAGCATTTTGGTGACACGAC	94
SCEQAM2039A10.g		<i>Scarecrow-like protein</i>	SCR	F: CTTTTGGCTGCTGAGAGTC R: CATCCATATACGCTGTGAG	102

Tabela 2 – Genes diferencialmente expressos selecionados para validação agrupados por categoria funcional e identificados por seus respectivos SAS (*Sugarcane Assembled Sequence*), nome e sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos amplificados

(continuação)					
SAS	Categoria funcional	Gene	Sigla dos genes	Sequencia <i>primers</i>	Tamanho fragmento (pb)
SCJLRZ1020B01.g	Regulação da transcrição	<i>Growth-regulating factor 3</i>	GRF	F:ATGAGTGATGCCAGGAAGAAATG R: AGCAAAACGGTGAGAACAGC	135
SCQGST1032D08.g		<i>MYB-like protein</i>	MYB	F: TCTCTGCTCCGACGACGAC R: TTCTTGGTACGCACGCTTC	157
SCCCCL4001A01.g		<i>WRKY transcription factor</i>	WRKY	F: GCCATCGGGATTAGTTGAGG R: AGCGGGACAAGGACGACC	162
SCRURT3061D05.g		<i>Transcription factor bHLH61</i>	bHLH	F:CGCATCGTCGTACATCAAAGA R:GCCTCAAGAATGGAAGCAAGT	186
SCEPAM1018C05.g		<i>Transcription factor PCF7</i>	PCF7	F: AAGTCTTTGTTCCCCTCGTC R: CTGAACATCTGCTGCTGCTG	176
SCACLR1130H08.g	Defesa	<i>Zinc finger protein - 2</i>	ZFP	F: GCGGTGGTATATATGTTTCG R: CCTTCTTCATTGCCTGCTG	128
SCCCLR1066D07.g		<i>Glycine-rich cell wall structural protein</i>	GRCW	F:GGAAAAACCGCCACAGCCA R: CTTGCATTATCCTTGTCG	95
SCEZLB1005H06.g		<i>Defensin</i>	LMCR	F:CGTGTGCCAGACCGAGAACT R:AAACAGCAACGCAGGAGAAC	146
SCSGAM1094D05.g		<i>Phenylalanine ammonia-lyase</i>	PAL	F: TGGAATACAGTCAGCCTTTGC R: TAGGGAGAAAGAATGGAGTG	100
SCEPRZ3047D01.g		<i>LRR serine/threonine protein kinase</i>	LRR	F: CGTGAACAGACAAGCGAAAAGG R: CTGATGCTCGGGATGCGGTG	148
SCCCCL3002F08.b	Detoxificação	<i>Peroxidase - 1</i>	PERO	F: CGACGAGCAGCAACAACC R: CGTGAGGAGATCGGCGTC	125
SCCCCL5002F03.g		<i>Cytochrome P450</i>	P450	F: CGACGACAAGTACCTCCG R: GGGTTCTTGGACAGGAGC	105
SCCCCL2001D02.b		<i>Peroxidase - 2</i>	PER60	F: AGGGCTTGTTTCATCTCCGAC R: TAGTGGTTGACGACGAAGC	190

Tabela 2 – Genes diferencialmente expressos selecionados para validação agrupados por categoria funcional e identificados por seus respectivos SAS (*Sugarcane Assembled Sequence*), nome e sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos amplificados

(conclusão)					
SAS	Categoria funcional	Gene	Sigla dos genes	Sequencia <i>primers</i>	Tamanho fragmento (pb)
SCCCRT1001E01.g	Metabolismo de hormônios	<i>Lipoxygenase</i>	LOX	F: CAGTTGAGGAGGATGGAT R: ATGACGGATGAGGAGTTTGG	98
SCAGRT3046D01.g		<i>CYP88A Cytochrome P450</i>	CYP88A	F: GGAACCCGACACCACAAC R: TACACGGACCTCAACTACG	165
SCSFRT2070A10.g		<i>Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein</i>	OXIR	F: CATGGCGTCCTTGAAATCGG R: CAACTGGCGTGACTACCTCC	94
SCCCLR1048H03.g		<i>9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase</i>	NCED	F: TAGCAAGAGGCACCACCAGC R: GTAGGAGAGAGAAGAAAGGCG	100
SCCCLR1022A02.g		<i>ACC oxidase</i>	ACC	F: ACAATGGTGGTTCCCGTG R: TCACGAGCTGGAAGAATC	112
SCRFRZ3058E03.b	Metabolismo de proteínas	<i>Abscisic acid 8-hydroxylase</i>	ABAH	F: CGTGGTTTCCTTTTGACTCC R: CCTGATTGGGATTGTATGTAAGC	127
SCJFRZ2009E12.g		<i>Protease</i>	PROT	F: TCGTGCTGGGTGGAATAAC R: TCTTCCCTCGTATCTTGCTG	183
SCRLLR1059F03.g		<i>Ubiquitin conjugating enzyme UBC9A</i>	UBIQ	F: ATCACCATCCATTTCCCTCC R: AGATGTTCCCGTTGCTGTTG	100
SCCCLR1069H11.g	Metabolismo de aminoácidos	<i>Methionine synthase</i>	METS	F: TGGAGTGGATGATGTCGTTG R: TGGAGCCTTGTCAGTGTGAG	115
SCBFAM2117B08.g	Outras	<i>Alcohol dehydrogenase 1</i>	ADH	F: GAGGCTGGAGGGTACATTATC R: CCAGAGTCCACGCAACATAAC	171
SCQSRT1035G12.g	Desconhecida	<i>Universal stress protein (USP) family protein</i>	USPA	F: CACGACAACGAGCATGACC R: GGCAGCAGGAAAATAAGGAC	120
SCJLLR2013D11.g		<i>Hypothetical protein SORBIDRAFT_09g008890</i>	HYP	F: GGGAAGACATTACTGAAAGG R: TTATTGACGGCATTGCTAC	102
SCEPLR1051D05.g	Transdução de sinal	<i>Calreticulin</i>	CALR	F: TCCCAACCCAGAATACAAGG R: CAGCTCAATGCCAATGTAC	159

Os testes revelaram a temperatura de 58 °C como a melhor para o anelamento dos iniciadores. A especificidade dos *primers* foi demonstrada pela presença de um único fragmento com o tamanho esperado do *amplicon*, conforme visualização em gel de agarose (Figura 9). As curvas de dissociação obtidas nas reações de PCR em tempo real confirmaram a existência de um único fragmento, evidenciado pela presença de um único pico (Figura 10).

Figura 9 - PCR qualitativo com os *primers* selecionados para o experimento de validação. Marcador de peso molecular 100 pb (M) com a banda mais forte correspondente a 500 pb. Os números de 1 a 53 correspondem, respectivamente, aos genes amplificados com os pares de *primers* WD40, MAD3, GRCW, LOX, SCR, HYP, MCM4, H4, RAC, CALM, CDKB, KIF, METS, CAP-H, PERO, UCT, MCM6, CYCA, AP2, CYCB, LMCN, DNAT, CYP88A, MCM3, MCM7, SMC4, CYC3, AP260, CYCA60, NAC, OXIR, PAL, NCED, P450, ACC, USPA, ABAH, CENPE, GRF, MCM2, LRR, AUX12, KINASE, MYB, WRKY, ADH, CS, PROT, bHLH, PER60, CALR, PCF7, UBIQ, ZFP. Os números de 54 a 59 correspondem, respectivamente aos genes que codificam para GAPDH, actina, tubulina, poliubiquitina, proteína 14-3-3 e RNAr 25S

Figura 10 – Exemplos de curvas de dissociação geradas para os genes lipoxigenase (A), MCM6 (B), ciclina III (C), MAD3 (D), ciclina B (E) e DNA topoisomerase II (F), calmodulin binding protein (G), Metionina sintase (H), AP2-60 (I) e ABA-H (J)

4.1.5 Estabilidade dos genes normalizadores

De acordo com a ferramenta RefFinder, que integra os programas GeNorm, NormFinder, Bestkeeper e o método ΔC_t para classificar os genes normalizadores, os genes que codificam para poliubiquitina e proteína 14-3-3 foram os mais estáveis, uma vez que apresentaram a menor média geométrica (Figura 11). Estes foram selecionados como genes referência para análises posteriores de expressão gênica.

Figura 11 – Classificação da estabilidade de seis genes normalizadores de acordo com a ferramenta RefFinder

4.2 Experimentos de validação dos resultados do microarranjo

4.2.1 Ensaio I de validação

Para as amostras oriundas do experimento de proteômica, a quantidade de RNA total variou de 1 a 2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Os valores das razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} variaram, respectivamente, de 1,9 a 2,0 e de 1,6 a 1,8. A análise por eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% (Figura 12) demonstrou que não ocorreu degradação do RNA. Este foi utilizado em uma reação de PCR convencional com o iniciador METS, após o tratamento com DNase I. Nenhuma amplificação foi observada, indicando ausência de contaminação por DNA (dados não apresentados).

Figura 12 - Eletroforese em gel desnaturante de agarose 1% das amostras não inoculadas (SP MI) e inoculadas (SP LxxI) com a bactéria Lxx, 30 e 60 DAI. As bandas correspondem ao RNAr 23S e RNAr 18S

Um gene foi considerado como tendo seu padrão de expressão validado somente quando foi observada concordância entre as técnicas de microarranjo e qPCR. Assim, dos 28 genes testados, 17 (60,7%) foram validados aos 30 DAI (Figura 13A). Estes correspondem aos genes *MCM3*, *MCM4*, *MCM6*, *cyclin A* (*CycA*), *cyclin B* (*CycB*), *AP2/EREBP* (*AP2*), *cyclin-dependent protein kinase CDKB1;1* (*CDKB*), *low-molecular-weight cysteine-rich protein* (*LMCR*), *structural maintenance chromosome protein 4* (*SMC4*), *calmodulin binding protein* (*CBP*), *mitotic spindle checkpoint component MAD3* (30), *histone H4*, *DNA topoisomerase II* (*DNAT*), *scarecrow-like protein* (*SCR*), *non-SMC condensin I complex subunit H* (*CAP-H*), *lipoxygenase* (*LOX*) e *methionine synthase* (*METS*). Apenas os dois últimos correspondem a genes com maior expressão aos 30 DAI.

Aos 60 DAI, 53% dos genes analisados foram validados (Figura 13B). Diversos genes relacionados à síntese e degradação de hormônios e fatores de transcrição foram induzidos tais como *ACC oxidase* (*ACC*), *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase* (*NCED*), *abscisic acid 8-hydroxylase 1* (*ABAH*), *lipoxygenase* (*LOX*), *oxidoreductase*, *2OG-Fe oxygenase family protein* (*OXIR*), proteínas contendo o domínio *WRKY* e *AP2/EREBP* (*AP260*). Também foram mais expressos em plantas inoculadas os genes que codificam para *cytochrome P450* (*P450*), *peroxidase* (*PER60*), *alcohol dehydrogenase 1* (*ADH*), *protein kinase* (*KINASE*), *universal stress protein A* (*USPA*) e *phenylalanine ammonia-lyase* (*PAL*). Os genes *bLHL*, *condensin subunit 1* (*CS*), e *MCM3* e *MCM6* foram menos expressos nas plantas com maior título bacteriano.

Figura 13 – Razão de expressão dos genes validados como diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) em plantas inoculadas aos 30 (A) e 60 (B) DAI. As barras representam o desvio padrão

4.2.2 Ensaio de validação II

Na quantificação de Lxx no tecido vegetal por qPCR, a bactéria não foi detectada em plantas inoculadas somente com o meio de cultura em nenhum dos tempos analisados (Figura 14). Nas plantas inoculadas com Lxx, no entanto, o título bacteriano médio, expresso em função do log do número de células por 100 ng de tecido, foi de $3,08 \pm 0,31$ e $3,05 \pm 0,32$ aos 30 e 60 DAI, respectivamente, indicando que não houve incremento do título bacteriano entre os tempos analisados.

Figura 14 - Curvas de amplificação aos 30 (A) e 60 (C) DAI. Curvas de Melting aos 30 (B) e 60 (D) DAI. Linhas vermelhas correspondem a plantas inoculadas com meio, amarelas a plantas inoculadas e as azuis ao controle positivo (DNA puro de Lxx)

A partir de quatro plantas mantidas em casa de vegetação durante 180 DAI foi realizado o reisolamento da bactéria. O bioPCR com os iniciadores 12950F e 12950R (CARVALHO, 2012) e 212F e 303R (GRISHAM et al., 2007) confirmou tratar-se de Lxx (dados não apresentados).

A análise da qualidade do RNA demonstrou que as razões A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} variaram, respectivamente, de 1,8 a 2,0 e de 1,6 a 1,8. A eletroforese em gel de agarose (1%) desnaturante não apresentou evidência de degradação do RNA (Figura 15). O RNA foi posteriormente utilizado em uma reação de PCR qualitativo com o *primer* METS confirmando a ausência de contaminação por DNA genômico na amostra já que não foi verificada amplificação de fragmento (dados não apresentados).

Figura 15 - Gel desnaturante de RNA em agarose 1% aos 30 (A) e 60 (B) DAI. As bandas correspondem aos RNAr 28S e 23S

Na análise de expressão por qPCR, apenas os genes que codificam para *WD40-like beta propeller repeat family protein* (WD40) e MCM7 foram validados aos 30 DAI (Figura 16A). Já aos 60 DAI, os genes PAL, ABAH, ADH, ACC, P450, MYB, WRKY, OXIR, protease, MCM2 e CycA-60 foram validados (Figura 16B). Como o número de genes validados aos 30 DAI foi baixo, genes anteriormente selecionados para validação aos 60 DAI foram testados também aos 30 DAI. Os genes que codificam para PAL, ACC oxidase, P450, *NAC-domain containing protein* (NAC), *MYB-like protein* (MYB) e protease foram diferencialmente expressos (Figura 16A).

Figura 16 – Razão de expressão dos genes validados como diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$) em plantas inoculadas aos 30 (A) e 60 (B) DAI. As barras representam o desvio padrão

5 DISCUSSÃO

5.1 Relação Lxx versus cana-de-açúcar

Desde que foi descrito pela primeira vez na Austrália em meados de 1945, o raquitismo das soqueiras foi identificado em praticamente todas as regiões produtoras de cana-de-açúcar do mundo (PAN et al., 1998). A ausência de variabilidade genética entre isolados de Lxx oriundos de nove países diferentes (YOUNG et al. 2006), indica que a disseminação da bactéria deu-se partir de um único clone bacteriano. Este fato, aliado à constatação de que Lxx não foi encontrada no centro de diversidade genética de *Saccharum officinarum*, em Papua Nova Guiné e só recentemente foi identificada em plantações comerciais deste país (MARGAREY et al., 2002), sugere que Lxx pode ter sido transferida para esta espécie a partir de cruzamentos com *S. spontaneum* durante o processo de nobilitação da cana cultivada (BRUMBLEY et al., 2006) que resultou na geração das cultivares modernas de cana de açúcar. Ainda, a frequente colonização assintomática de cana por Lxx (GRISHAM; PAN; RICHARD, 2007) certamente facilitou sua disseminação através do intercâmbio de material vegetal contaminado ou, como tem sido especulado, até mesmo através da semente (SILVA, 2013). Em *S. spontaneum*, Lxx apresenta melhor adaptação que em *S. officinarum*, já que clones desta primeira espécie são capazes de sustentar maiores títulos bacterianos em seus tecidos (ROACH e JACKSON, 1992). Desta maneira, e considerando que Lxx não foi descrita colonizando naturalmente outro hospedeiro que não a cana de açúcar, esta bactéria pode ser considerada um organismo endofítico obrigatório desta hospedeira (BRUMBLEY et al., 2006).

No experimento utilizado para hibridização em lâminas de microarranjo, todas as plantas estavam infectadas com Lxx, mesmo após o tratamento térmico dos toletes, não sendo possível, portanto, comparar as respostas de plantas infectadas com as de plantas não infectadas. Este fato possivelmente limitou a identificação de um número maior de genes diferencialmente expressos, dado que a técnica de microarranjo pode não detectar pequenas variações na expressão gênica (MIRNICS et al., 2000; EVANS; WATSON; AKIL, 2003; JOHNSTONE et al., 2013). Por outro lado, a comparação usada no trabalho se aproxima de uma condição normalmente observada em campo, onde plantas com alto e baixo título de Lxx são encontradas, pois a termoterapia, embora bastante utilizada no controle do RSD (URASHIMA; GRACHET, 2012), apresenta elevado índice de escape, ou seja, não elimina

totalmente o patógeno nos toletes semente (GRISHAM; PAN; RICHARD, 2007; FERNANDES Jr et al., 2010).

Não obstante a limitação apontada acima, as plantas inoculadas aos 30 DAI apresentaram cerca de 4 vezes mais células bacterianas do que as não inoculadas, enquanto que aos 60 DAI as primeiras possuíam cerca de 8 vezes mais. Como em plantas inoculadas os títulos bacterianos foram sempre maiores que em plantas não inoculadas em ambos os tempos analisados, as comparações permitiram identificar um conjunto de genes responsivos a variações em títulos bacterianos em dois tempos distintos. Mais importante é que os padrões de modulação da expressão destes genes explicam de maneira satisfatória o principal sintoma que empresta o nome à doença. Por outro lado, se considerarmos Lxx como uma bactéria endofítica e que perdas em produtividade estão correlacionadas a maiores títulos bacterianos (BAILEY, 1977; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988; McFARLANE, 2002; NGARUYA; SHIPTON; COVENTRY, 2005; ZEKARIAS et al., 2012), este estudo também contribuiu para identificar vias metabólicas chaves que são moduladas na planta em resposta a perturbações nas densidades populacionais do patógeno e que podem desencadear a patogênese.

5.2 Processos e via afetados em função do aumento no título de Lxx

5.2.1 Ciclo celular e metabolismo do DNA

O RSD é caracterizado pela redução generalizada do crescimento das plantas, expressa pelo encurtamento dos entrenós, redução no número de perfilhos e do diâmetro de colmos. Estes danos se acentuam em função do número de cortes (GRISHAM, 1991) e também de fatores do ambiente como estresse hídrico e temperatura (BAILEY; BECHET, 1995; NGARUYA; SHIPTON; COVENTRY, 2005). Como já relatado anteriormente, estes danos estão positivamente relacionados ao título bacteriano (BAILEY, 1977; HARRISON; DAVIS, 1986; DAVIS; DEAN; HARRISON, 1988). Em um trabalho recente, Zekarias et al. (2012) avaliaram a redução na produtividade ocasionada após a inoculação das plantas com diferentes quantidades de Lxx. As maiores perdas ocorreram em plantas com alta concentração da bactéria. Assim, a redução na expressão de diversos genes envolvidos na regulação do ciclo celular e no metabolismo de DNA encontrada neste trabalho é condizente com o que seria esperado em plantas com maiores títulos bacteriano. Entretanto, o número de genes pertencentes às categorias de ciclo celular e metabolismo de DNA foi menor aos 60 em

comparação a 30 DAI, embora os genes tenham permanecido menos expressos. A identificação de genes diferencialmente expressos pertencentes a estas categorias pode ter sido prejudicada neste tempo pelo aumento no título bacteriano nas plantas não inoculadas em comparação aos 30 DAI. Além disso, o ciclo celular é um processo altamente regulado onde centenas de genes apresentam um perfil de expressão periódico, além de ser influenciado pelo ambiente, o que torna seu estudo bastante complexo (BREYNE; ZABEAU, 2001; MENGES et al., 2002). Todavia, os genes identificados como diferencialmente expressos relacionados ao controle do ciclo celular, seja aos 30 ou aos 60 DAI, foram agrupados conjuntamente pela análise do *heat map*, o que sugere que genes destes processos metabólicos apresentam o mesmo padrão de comportamento nos dois tempos de análise.

Na categoria ciclo celular destacaram-se os genes *MCM*, os quais tiveram expressão reduzida em média 3 e 3,5 vezes, aos 30 e 60 DAI, respectivamente, em plantas inoculadas com Lxx, segundo os resultados do *array*. Estes genes codificam proteínas que compõem o complexo de pré-replicação e se ligam às origens de replicação durante o final da fase G1 e início da fase S do ciclo celular, período que coincide com o aumento da transcrição dos mesmos (FORSBURG, 2004; TUTEJA et al., 2011). Acredita-se que o complexo MCM2-7 apresente atividade de DNA helicase. Em plantas, os genes *MCM* são expressos, especialmente, em tecidos jovens em constante divisão celular, como o meristema (SABELLI et al., 1996), o que está de acordo com nossos dados, uma vez que foi utilizado o cartucho foliar nas análises. Herridge et al. (2014) demonstraram que mutações nestes genes, quando em homozigose, impedem a germinação das sementes, enquanto que em heterozigose levam à semi-esterilidade em *A. thaliana*. Os mutantes ainda apresentaram falhas na citocinese. A repressão do gene *MCM6* levou a redução no crescimento dos tecidos vegetativos e órgãos reprodutivos em tabaco (DRESSELHAUS et al., 2006). Já a superexpressão de *MCM2* aumentou a divisão celular em *Arabidopsis* (NI et al., 2009).

A transcrição de genes envolvidos na síntese das histonas H2A e H4 também foi menor em plantas inoculadas com Lxx aos 30 DAI. Sabelli et al. (1996) relataram uma forte correlação entre os genes *MCM3* e *H4* em milho, entretanto, ao contrário do que é observado para leveduras e animais, os níveis do RNAm de histonas não estão diretamente relacionados com síntese de DNA (MARZLUFF; DURONIO, 2002; REICHHELD et al., 1995). A transcrição destes genes pode ser influenciada negativamente pelo aumento na produção de ROS, fenômeno normalmente associado à interação planta-patógeno, assim como a presença de efetores (LOGEMANN et al., 1995; PLANCHAIS et al., 2000). Logemann et al. (1995) relatam a repressão de genes envolvidos na síntese de histonas, em células de salsa, após o

tratamento com um elicitor produzido pelo patógeno *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*, com conseguinte redução na divisão celular. A transcrição do gene *H4* tem sido utilizada como um marcador da entrada das células na fase S; assim, a redução na expressão desse gene em plantas com alto título de Lxx sinaliza uma redução (ou alteração) na taxa normal de divisão celular.

Já alterações na expressão de genes que codificam para ciclinas foram detectadas nos dois tempos de análise. Genes que codificam para ciclinas A e B tiveram menor expressão em plantas com maior título de Lxx aos 30 DAI, enquanto que aos 60 DAI, ocorreu a redução na transcrição de uma outra ciclina do tipo A. As ciclinas A são ativas durante a transição das fases S a M e as ciclinas B durante a transição G2/M e a mitose (INZÉ; DE VEYLLER, 2006), embora Menges et al. (2005) relatem que o pico na transcrição de diversos genes que codificam para ciclinas A e B ocorra durante a transição G2/M. Estas são necessárias para a regulação positiva de kinases dependentes de ciclinas (CDKs), o que está de acordo com nossos resultados, já que estes apontaram a redução na expressão de um gene que codifica para a proteína CDKB1;1 aos 30 DAI. Esta CDK do tipo B é específica de plantas e o aumento na sua transcrição ocorre normalmente durante a fase S (BOUDOLF et al., 2004; FRANCIS, 2007). Supostamente, uma das funções atribuídas a CDKB1;1 seria se associar ao complexo de pré-replicação, após sua dissociação das origens de replicação, para evitar a endomitose (BOUDOLF et al., 2004). Ao contrário de nossos resultados, Depuydt et al. (2009) observaram a indução do gene *CDKB1;1* após a inoculação com a bactéria Gram positiva *Rhodococcus fascians*. Interessante, no entanto, é notar que a doença causada por esta bactéria tem o efeito justamente oposto ao do RSD, já que seu sintoma predominante é uma hiperplasia manifestada na forma de galhas, resultado da divisão exagerada das células em função da produção do hormônio citocinina por parte do patógeno. Os autores especulam que esta CDK seria o alvo deste fitormônio. Os hormônios auxina, brassinoesteróides e ácido jasmônico (JA) também podem atuar na regulação deste gene (POZO et al., 2005; SWIATEK et al., 2004).

É também durante a transição G2/M que ocorre o pico na transcrição do gene *MAD3* (CAILLAUD et al., 2009), homólogo ao gene *BubR1* em leveduras, o qual foi menos expresso em nossas análises aos 30 DAI. Mutações neste gene podem acelerar a saída das células da metáfase, além de resultar em falhas na segregação dos cromossomos (BASU et al., 1999). Burgos-Rivera et al. (2012) relatam que a reduzida expressão do gene *BubR1* especificamente em pétalas de *Arabidopsis* ocasionou redução no crescimento destas. Os autores especulam que em plantas, BubR1 atua na formação da nova parede celular, uma vez

que não foi detectada nenhuma anormalidade durante a mitose, porém não existem dúvidas da participação de BubR1 na regulação do complexo promotor da anáfase durante a mitose em plantas (CAILLAUD et al., 2009).

Aos 30 DAI, plantas com maior título de Lxx apresentaram ainda diminuição na expressão dos genes que codificam para SMC2, SMC4, CAP-H e DNA topoisomerase II, enquanto que aos 60 DAI ocorreu a redução na expressão do gene *condensin subunit 1*. Importantes durante a mitose, as condensinas são complexos proteicos multi-subunidades que atuam na condensação e segregação dos cromossomos. O complexo condensina é formado pelo heterodímero SMC2 e SMC4 o qual é regulado por três subunidades *non*-SMC (CAP-D2, CAP-G e CAP-H). Estas atuam em conjunto com a DNA topoisomerase II para a condensação dos cromossomos e a manutenção das regiões de heterocromatina durante a mitose (OLIVEIRA et al., 2005). Siddiqui et al. (2003) demonstraram que a inibição do gene *AtCAP-E (SMC2)* originou meristemas defeituosos e redução no crescimento das plantas, características semelhantes às encontradas em mutantes de *Arabidopsis* para o gene *SMC4* (SIDDIQUI et al., 2006). Em leveduras, especula-se que este gene esteja envolvido na replicação do DNA (YU et al., 2006). Fato muito interessante é que a inibição de DNA topoisomerase II ocasiona atraso na ativação de CDKs e na entrada das células em mitose (GIMÉNEZ-ABIÁN et al., 2002). A inibição desses genes leva a falhas na mitose e pode estar relacionada com os sintomas do raquitismo.

5.2.2 Metabolismo de hormônios

Em nossa análise, verificou-se aumento na expressão de genes-chave implicados na síntese de JA, ácido abscísico (ABA) e etileno (ET) em plantas com maior título bacteriano. Como estes hormônios desempenham um papel fundamental no controle da divisão celular e na expressão de genes de defesa durante a interação planta – patógeno, os resultados sugerem que a diminuição da expressão de genes do ciclo celular discutidos acima é resultante de alterações hormonais induzidas pela bactéria. É sabido que tanto o ABA como o JA inibem a replicação do DNA, impedindo a transição G1/S (SWIATEK et al., 2002). Swiatek et al. (2004) relatam que estes hormônios também inibem ciclinas do tipo B durante a mitose. Ademais, a aplicação exógena de ABA leva à inibição de *CDKB1;1* (GENDREAU et al., 2012).

Em plantas inoculadas com a bactéria aos 60 DAI foi observado incremento na expressão dos genes *9-cis-epoxycarotenoide dioxygenase* (NCED) e ABA *8'-hydroxylase*

(ABAH) que atuam, respectivamente, na biossíntese e degradação do ABA. O fenômeno do aumento na biossíntese do ABA em resposta a estresses bióticos e abióticos é bem conhecido, entretanto, nos últimos anos, novas evidências indicam que seu catabolismo também é importante no controle de seus próprios níveis (SEILER et al., 2011). A superexpressão de NCED em tabaco levou ao aumento nos níveis endógeno de ABA e também de seu catabólito, o ácido faseico (QIN; ZEEVAART, 2002). Os autores especulam que este último atuaria como sinalizador durante o estresse. O papel do ABA na interação planta – patógeno é controverso e parece ser dependente do tipo de interação (FAN et al., 2009), entretanto, este hormônio é reconhecidamente um inibidor da divisão celular e a modulação em sua síntese poderia estar relacionada aos sintomas do raquitismo.

A expressão dos genes LOX, ACC oxidase e *Oxidoreductase 2OG-Fe oxygenase* também foi aumentada em função da inoculação. O primeiro, que codifica para uma lipoxigenase, está diretamente implicado na síntese de JA, ao passo que os dois restantes participam da síntese de ET. O possível envolvimento de JA na resposta de cana a Lxx foi previamente descrito por Ferro et al. (2007) que relataram a repressão de uma lipase envolvida na síntese do ácido jasmônico em uma variedade suscetível infectada com Lxx. Em nossas análises, o gene *LOX* teve maior expressão nas plantas inoculadas tanto aos 30 quanto aos 60 DAI. O aumento na síntese de JA pode estar relacionado a indução de diversos genes de defesa como discutido adiante, fato não observado no trabalho de Ferro et al. (2007). ACC oxidase e *Oxidoreductase 2OG-Fe oxygenase* estão envolvidas na biossíntese do hormônio etileno. Este, conjuntamente com JA, desempenha um papel importante na defesa de plantas contra patógenos. O gene que codifica para ACC oxidase apresentou a maior razão de expressão na análise de microarranjos, além de ter apresentado maior expressão em ambos os tempos na análise do experimento II. É interessante notar que tanto JA como ET regulam positivamente a expressão do gene que codifica para fenilalanina amônia liase (PAL) (SHORESH et al., 2005), o qual, de maneira análoga, foi igualmente mais expresso em plantas inoculadas, o que sugere que esta é uma possível rota de resposta ativada na interação Lxx – cana-de-açúcar.

5.2.3 Transdução de sinal

Aos 60 DAI, em plantas inoculadas com Lxx, observou-se aumento na expressão de um gene que codifica para um receptor Ser/Thr kinase com domínio extracelular repetido rico em leucina (LRR-RK). Estes receptores reconhecem moléculas derivadas do patógeno e

ativam as redes de sinalização mediadas por proteínas kinases ativadas por mitógenos (MAPK) ou por cálcio (CDPK), as quais culminam na ativação de genes envolvidos na defesa da planta contra bactérias, fungos e oomicetos (TENA; BOUSOCQ; SHEEN, 2011). Durante o reconhecimento do patógeno pode ocorrer aumento na liberação de cálcio (Ca^{+2}) no citoplasma e proteínas sensoras de Ca^{+2} , como as calmodulinas, podem se ligar a este e sofrer alterações em sua conformação que, por sua vez, as permitem interagir e regular a atividade de proteínas conhecidas como *calmodulin binding proteins* (CBP) (KUDLA; BATISTIC; HASHIMOTO, 2010). Em nosso trabalho, além do aumento do receptor kinase LRR-RK, observou-se uma redução na expressão de um gene que codifica para uma CBP. Membros desta família estão envolvidos na regulação da resistência a patógenos, mas ainda não há um padrão de atuação que possa ser generalizado. Em cevada, por exemplo, a perda de função deste gene aumentou a resistência ao fungo *Blumeria graminis* (KIM et al., 2002). Já em *Arabidopsis*, mutantes para o gene CBP60g apresentaram maior susceptibilidade à bactéria *P. syringae* Wang et al. (2009). Ali et al. (2002) observaram a indução e repressão de três e duas CBP, respectivamente, durante a interação incompatível entre feijão e *P. infestans* pv. *tabaci*. Estes resultados revelam a diversidade de mecanismos envolvidos na transdução de sinal durante o estresse.

O aumento observado aos 30 DAI em plantas inoculadas na expressão de um gene contendo o domínio *WD40 beta propeller repeat* também podem esta envolvido na transdução de sinal em resposta a variações no título da bactéria. O exemplo mais característico e também o mais estudado de proteínas contendo este e que participam da transdução de sinais é o da subunidade $G\beta$ de proteínas G heterotriméricas (NOCKER; LUDWING, 2003). Em *Arabidopsis* a superexpressão do gene *AGB1*, o qual codifica para a subunidade $G\beta$, leva a inibição da divisão celular mediada por auxina, enquanto a sua repressão levou a proliferação de raízes laterais (ULLAH et al., 2003). Outros exemplos de proteínas contendo o domínio WD40 são Cdc20 e Cdh1, as quais atuam no controle do ciclo celular. Em leveduras, o aumento na expressão de Cdc20 permitiu que células com falhas na montagem do fuso progredissem durante a mitose, entretanto não foi suficiente para superar o bloqueio no ciclo celular devido a falhas na replicação do DNA (HWANG et al., 1998). A inibição da mitose também foi observada em células de tabaco superexpressando Cdh1 (TARAYRE et al., 2004). Estes dados corroboram com a hipótese abordada neste trabalho, de que o incremento no título de Lxx altera a divisão celular. Entretanto, devido à ampla gama de proteínas contendo este domínio, também podemos especular que outros processos estejam sendo afetados devido à alteração na expressão desse gene. Em *Arabidopsis*, por exemplo,

genes contendo este domínio também atuam na regulação da síntese de flavonóides (WEISSHAAR; JENKINS, 1998).

5.2.4 Regulação da transcrição

O crescimento das plantas, assim como sua defesa contra patógenos, é regulado por fatores de transcrição. Em plantas com maior título de Lxx observou-se maior expressão de genes que codificam para fatores de transcrição normalmente relacionados ao controle da expressão de genes de defesa como aqueles que contem os domínios NAC, MYB e WRKY. Já os genes *SCR* e *bHLH*, comumente associados ao controle do desenvolvimento, foram menos expressos, respectivamente aos 30 e 60 DAI. Genes da família AP2/EREBP apresentaram expressão diferencial nos dois tempos analisados.

Genes contendo os domínios NAC e MYB podem ser induzidos pela aplicação de JA e ET e também pelo ataque de patógenos (LI; QI; YANG, 2001; LIU et al., 2011; PURANIK et al., 2012), o que é consistente como o aumento da expressão de genes participantes da síntese destes dois hormônios discutida anteriormente. A atuação destes na defesa de plantas parece ser dependente do tipo de interação, uma vez que há relatos de que podem regular tanto positivamente como negativamente a (LEE; QI; YANG, 2001; JENSEN et al., 2007; WANG et al., 2009; LIU et al., 2011). Ademais, estes mesmos fatores foram relatados por Ferro et al. (2007) como induzidos em uma variedade tolerante infectada com Lxx. A superexpressão do gene *MYB* ativou genes envolvidos na síntese de fenilpropanóides e aumentou o acúmulo de lignina (BOREVITZ et al., 2000). Lee et al. (2001) observaram aumento na atividade da enzima fenilalanina amônia liase em plantas superexpressando este gene. Embora não tenhamos mensurado a atividade desta enzima, o gene que a codifica (PAL) foi mais expresso em plantas inoculadas no experimento II em ambos os tempos analisados. A expressão de fatores de transcrição contendo o domínio NAC aumentou a espessura da parede celular secundária das células do xilema (MITSUDA et al., 2005; ZHONG; DEMURA; YE, 2006) o que pode contribuir para limitar a colonização deste tecido de condução por Lxx.

Fatores de transcrição contendo o domínio WRKY atuam na resposta do sistema imune em plantas, incluindo PTI, ETI e defesa basal (RUSHTON et al., 2010). Marchive et al. (2013) demonstraram que a superexpressão de WRKY1 aumentou a resistência de videiras ao fungo *Plasmopara viticola*. Os autores ainda relataram que os promotores do gene *LOX*, com maior expressão em plantas com alto título, podem ser ativados por esse fator de transcrição. Fatores de transcrição contendo este domínio também podem interferir no crescimento das

plantas uma vez que a superexpressão de um gene WRKY levou à plantas raquíticas, entretanto aumentou a resistência à bactéria *P. syringae* quando expresso em níveis moderados (CHEN; CHEN, 2002), o que demonstra a diversidade de mecanismos que podem ser regulados durante a interação planta-patógeno.

Neste contexto, o equilíbrio entre desenvolvimento vegetativo e resposta ao estresse é essencial para a sobrevivência das plantas (LÓPEZ-MAURY; MARGUERAT; BÄHLER, 2008). Desta forma, o aumento na expressão de fatores de transcrição envolvidos em respostas de defesa foi acompanhado da diminuição de fatores envolvidos na regulação do crescimento em plantas inoculadas. Mutantes para o gene bHLH93 de *Arabidopsis*, que é homólogo ao gene bHLH61 relatado como menos expresso em nossas análises, apresentaram redução no crescimento e na fertilidade (SHARMA, 2011). Análises de expressão gênica por microarranjo desses mutantes revelaram diminuição na expressão de vários fatores de transcrição requeridos para a manutenção do meristema, tais como SHOOTLESS MERISTEM (STM) e CLAVATA1 (CLV1) (FELDMAN, 2012). Já mutantes para outros fatores de transcrição contendo o domínio bHLH exibiram redução no crescimento da raiz e indução de genes de defesa regulados pelo JA (SONG et al., 2013). O fator de transcrição HBI1 inibe a redução do crescimento mediada por PAMPs, a produção de ROS e a expressão de genes de defesa em *Arabidopsis* como citocromo P450, fatores de transcrição contendo o domínio WRKY e 2-oxoglutarate Fe(II)-dependent oxygenase superfamily (FAN et al., 2014), todos induzidos em nossas análises. Diante disso, a repressão do gene bHLH61 nas plantas com alto título de Lxx pode contribuir para a indução de genes de defesa em detrimento do crescimento das plantas

O fator de transcrição SCR, pertencente a família GRAS, também é importante no controle do desenvolvimento em plantas. O mutante *scr* defectivo na expressão desse gene, por exemplo, apresenta crescimento reduzido da parte aérea e desenvolvimento anormal das raízes em *Arabidopsis* (WYSOCKA-DILLER et al., 2000). Assim, SCR está relacionado ao controle da sinalização da divisão celular e diferenciação da parte aérea e raiz (NAKAJIMA; BENFEY, 2002). Mutantes para este gene também apresentaram redução na expressão do gene que codifica para histona H2A (DHONDT et al., 2010). A expressão do gene *SCR* também pode estar associada à expressão do fator de montagem da cromatina (CAF-1), notando que tanto este como o gene que codifica para a histona H2A foram menos expressos em nossas análises de microarranjo. A mutação nos homólogos funcionais de CAF-1 (FAS1 e FAS2) em *Arabidopsis* levou a repressão de *SCR* com consequente desorganização celular do meristema apical (KAYA et al., 2001). Em um trabalho recente, Zhang et al. (2011)

demonstraram que o gene *SCR* controla a elongação da raiz e da parte aérea ao atuar como um regulador positivo da sinalização por giberelina, onde o gene *SCR* expresso constitutivamente antagoniza proteínas DELLA, reconhecidamente inibidores da ação de giberelina. Assim, a inibição do gene *SCR* em plantas com maior título de Lxx pode inibir a ação deste fitormônio, o que contribuiria para reduzir o crescimento das plantas. Entretanto, a maioria dos estudos com genes *SCR* envolve sua expressão em células radiculares, tecido que não foi utilizado em nosso trabalho.

Genes que codificam para fatores de transcrição pertencentes a família AP2/EREBP foram, respectivamente, menos expressos aos 30 DAI porém mais expressos ao 60 DAI. AP2/EREBP compreendem uma ampla família de fatores de transcrição com mais de 100 membros (SAKUMA et al., 2002). Os fatores de transcrição da subfamília AP2/EREBP estão envolvidos na regulação do crescimento ao longo do ciclo de vida da planta e na modulação de resposta a estresses bióticos e abióticos. Em milho, mutações no gene AP2 levaram ao encurtamento de internódios e folhas (JIANG et al., 2012). Os autores especularam que AP2 participaria da regulação de genes envolvidos em rotas hormonais ou na organização do citoesqueleto. Resultados semelhantes foram obtidos por Mizukami e Fischer (2000) e Nole-Wilson et al. (2005). Entretanto, a expressão constitutiva de outros membros dessa família leva a obtenção de plantas enfezadas (QI et al., 2011), o que sugere que a regulação da expressão de membros dessa família de fatores de transcrição é necessária para controlar o desenvolvimento normal das plantas. Fatores de transcrição contendo o domínio AP2/EREBP atuam também na regulação da expressão de genes de defesa (LORENZO et al., 2003; PRE et al., 2008). Sharoni et al. (2011) avaliaram a expressão de 34 genes que codificam para fatores de transcrição contendo o domínio AP2/EREBP em plantas infectadas com os vírus RDV (*rice dwarf virus*) RSV (*rice stripe virus*) em arroz. Os autores verificaram que plantas resistentes apresentaram maior número de genes induzidos, enquanto nas suscetíveis ocorreu o oposto. Assim, a maior expressão do gene AP2/EREBP aos 60 DAI, acompanhada do aumento na expressão de diversos genes de defesa, pode sugerir um redirecionamento das via de sinalização em função do incremento no título bacteriano.

5.2.5 Defesa

Em nossas análises foi identificada a redução na expressão do gene que codifica para uma proteína de baixo peso molecular rica em cisteína, a qual foi identificada como uma defensina. Inicialmente, as defensinas foram identificadas por sua atividade antifúngica,

porém hoje se sabe que podem agir na defesa contra bactérias e insetos também (SEGURA et al., 1998), embora este grupo seja pouco expressivo em plantas. Carvalho e Gomes (2009) sugerem que estruturas negativamente carregadas presentes na membrana de bactérias atuariam como pontos de ligação de moléculas positivamente carregadas como as defensinas. Dois genes que codificam para defensinas foram inibidos após a aplicação de ABA que induziu susceptibilidade em *A. thaliana* infectada com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (MOHR; CAHILL, 2007). O ABA também foi capaz de reprimir uma defensina (PDF1.2), o que aumentou a susceptibilidade ao fungo *F. oxysporum* em *A. thaliana* (ANDERSON et al., 2004). Como as defensinas fazem parte da resposta basal ou resposta imune de defesa (PTI – *PAMP triggered immunity*), pode-se concluir que a redução aos 30 DAI na expressão deste gene, contribua para suprimir a resposta imune da planta em resposta ao aumento da densidade populacional de Lxx.

Em uma fase mais avançada do processo infeccioso (60 DAI), as plantas podem ter reagido através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais podem atuar tanto como moléculas antimicrobianas como moléculas sinalizadoras durante a interação planta - patógeno (TORRES, 2010). Tal fato pode ser inferido a partir da observação de que os genes *NADPH Respiratory burst oxidase homolog protein B* e *POX* (peroxidase) tiveram sua expressão aumentada neste período. Embora o primeiro gene não tenha sido utilizado para a validação, sabe-se que é importante para a produção de ROS em resposta a infecção bacteriana (TORRES et al., 2002). Já o segundo apresenta homologia ao gene Sb09g002810 de sorgo, o qual codifica para uma peroxidase pertencente à classe III. Peroxidases pertencentes a esta classe são secretadas no apoplasto ou acumuladas no vacúolo onde participam de respostas que levam ao reforço da parede celular e à produção de ROS (ALMAGRO et al., 2009). Souza et al. (2007) relataram aumento na quantidade de transcritos de uma peroxidase, a qual especulam estaria envolvida na síntese de lignina e defesa de citros contra *X. fastidiosa*. Desta forma, o aumento na síntese de lignina poderia contribuir para maior resistência deste tecido de forma generalizada para patógenos do xilema.

Para se adaptar a presença de patógenos no xilema as plantas podem ainda alterar a disponibilidade de oxigênio neste tecido (BASHA; MAZHAR; VASANTHAIAH, 2010) e, sendo Lxx um patógeno estritamente aeróbio (DAVIS et al., 1984), a redução na disponibilidade de O₂ seria um mecanismo efetivo para seu controle. Embora não tenhamos analisado a disponibilidade de oxigênio nas plantas, o aumento na expressão do gene *ADH* (álcool desidrogenase) aos 60 DAI indica que este pode ter diminuído em plantas com maior título bacteriano, já que *ADH* é um gene marcador de hipoxia (PENG et al., 2001). Embora

não se conheça a função fisiológica de ADH durante o estresse, o incremento na transcrição deste gene é dependente tanto de etileno (PENG et al., 2001) como do fator de transcrição MYB (HOEREN et al., 1998), o que é corroborado pelos nossos resultados que indicaram aumento na expressão de genes ligados à síntese destes compostos neste mesmo período. O aumento na expressão do gene ADH foi observado em plantas infectadas com fitoplasma (HREN et al., 2009) e após o tratamento com ácido salicílico, UV e o fungo *P. infestans* (MATTON; CONSTABEL; BRISSON, 1990), assim como baixa temperatura (JARILLO et al., 1993).

Sob condições adversas como estresse oxidativo, osmótico, calor e privação de nutrientes pode ocorrer também o aumento na transcrição de genes que codificam para *universal stress proteins* (USPA) (TKACZUK et al., 2013). O aumento na transcrição de um gene que codifica para uma destas proteínas foi detectado em plantas com alto título de Lxx aos 60 DAI. Primeiramente identificados em procariotos, hoje se sabe que estes genes estão presentes em outros organismos, como fungos e plantas. Embora nestas últimas a função destas proteínas não seja conhecida, sabe-se que o aumento na transcrição do gene pode ocorrer em função da aplicação de etileno, ABA e giberelina (SAUTER et al., 2002; ZAHUR et al., 2009). Além disso, a superexpressão do gene *USPA* pode aumentar a tolerância à seca (LOUKEHAICH et al., 2012). A expressão deste gene colabora para o controle dos níveis endógenos de ROS em plantas expostas ao deficit hídrico (KONOPKA-POSTUPOLSKA et al., 2009). Como plantas infectadas com Lxx apresentam redução no fluxo de água (TEAKLE; APPLETON, 1978) em estádios avançados da doença, pode-se especular que o aumento na transcrição deste gene nesta situação ajudaria as plantas a tolerarem os efeitos adversos ocasionados pelo estresse hídrico.

Os genes PAL, LOX e citocromo P450 (P450) são importantes na defesa contra patógenos em plantas e foram mais expressos em nossas análises aos 30 (experimento II) e 60 (experimentos I e II). A PAL é a primeira enzima na via de síntese de fenilpropanóides, a partir dos quais são derivados diversos compostos com ação antimicrobiana, além da síntese de lignina (DIXON et al., 2002). LOX, além de participar da síntese do JA, também atua na produção de compostos com ação antibacteriana como (E)-2-hexenal (CROFT; JIITTNER; SLUSARENKO, 1993), enquanto P450 participa de uma série de processos nas células entre eles a detoxificação de substâncias nocivas às células e a síntese de compostos relacionados a defesa como fenilpropanóides, alcalóides e terpenóides assim como os fitohormônios giberelina, auxina e JA (SCHULER, 1996; CHAPPLE, 1998; SCHULER; WERCK-REICHHART, 2003). LOX e P450 podem ainda participar da síntese de oxilipinas, além dos

jasmonatos, que são importantes para a defesa contra patógenos (BLÉE, 2002). Rodrigues et al., 2013 demonstraram que em plantas de *Citrus* infectadas com *X. fastidiosa* ocorreu a indução dos genes PAL e LOX, enquanto Cheng et al. (2010) relatam a indução de P450 para o mesmo tipo de interação. A ativação desses genes estaria relacionada à defesa contra o patógeno o que corrobora com nossos resultados, uma vez que na análise de expressão gênica pela técnica de microarranjo PAL e P450 foram os genes com maior razão de expressão, respectivamente, de 67,44 e 417,29. Além disso, o aumento de expressão do gene que codifica para uma *Oxidoreductase 2OG-Fe oxygenase* citado anteriormente, também poderia contribuir para a síntese de flavonoides, que podem ser sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides (DIXON et al., 2002) e podem atuar na defesa contra patógenos em plantas (KOTTAPALLI et al., 2007).

Proteases são enzimas importantes no metabolismo de proteínas e podem atuar tanto no controle do desenvolvimento como na defesa de plantas contra patógenos. Um gene que codifica para uma protease com domínio similar a subtilisina apresentou incremento em sua expressão nas plantas inoculadas aos do experimento II aos 30 e 60 DAI. Devido a sua ampla gama de substratos, acredita-se que estas atuem como enzimas não seletivas na degradação de proteínas (SCHALLER, 2004). Entretanto, Tornero et al. (1997) identificaram uma protease com domínio similar a subtilisina que se acumula no espaço extracelular de folhas e caules em plantas de tomate infectadas por vírus. A expressão do gene que codifica para esta subtilisina pode ser induzida durante a interação com a bactéria *P. syringae* tanto no local da infecção quanto sistematicamente nos vasos da planta, assim como após a aplicação do hormônio SA (JORDÁ; VERA, 2000). Os autores especulam que esta protease poderia atuar diretamente sobre o patógeno seja hidrolisando proteínas secretadas por estes seja indiretamente degradando compostos da matriz extracelular cujos produtos atuariam como moléculas sinalizadoras. Já foi demonstrado que proteínas contendo este domínio participam do controle da morte celular programada durante o estresse abiótico (oxidativo e osmótico) e biótico (vírus) (VARTAPETIAN et al., 2011). Buhtz et al. (2004) demonstraram que proteases contendo o domínio subtilisina estão presentes na seiva xilemática de brócolis, colza, abóbora e pepino, onde possivelmente atuariam na defesa e sinalização. Assim, podemos especular que esta protease poderia atuar na resposta da cana-de-açúcar infectada com Lxx, seja atuando diretamente na célula bacteriana, seja na degradação de compostos secretados pela mesma.

5.2.6 Adaptação ao hospedeiro

A modificação do hospedeiro em benefício do patógeno é um fenômeno notável e amplamente disseminado nas relações entre plantas e seus parasitas. Fato muito intrigante foi a observação de que um gene que codifica para metionina sintase, a qual participa da síntese do aminoácido metionina, foi induzido aos 30 DAI, sugerindo que o aumento na população bacteriana leva a um aumento na concentração deste aminoácido na planta. Este mecanismo de adaptação é de particular interesse no caso de Lxx, já que os genes *metE* e *metF*, ambos requeridos para a síntese de metionina pela bactéria, provavelmente não são funcionais (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Ainda segundo estes autores, a adição deste aminoácido ao meio de cultura favorece grandemente o crescimento da bactéria. Assim, pode-se especular que diante de sua incapacidade em produzir metionina, Lxx poderia induzir a produção do aminoácido pela planta, revertendo em benefícios ao seu desenvolvimento. Por outro lado, metionina sintase também está envolvida na síntese e regeneração de S'-adenosil-L-metionina que é um precursor na síntese de poliaminas, compostos cuja concentração pode ser alterada durante a interação planta – patógeno (WALTERS, 2003). A poliamina espermidina, sintetizada a partir do aminoácido metionina, é essencial ao crescimento em procariotos e é encontrada em bactérias patogênicas apenas quando oriunda de fonte exógena (SHAH; SWIATLO, 2008).

5.3 Validação dos dados

A porcentagem de genes validados para o experimento I de validação utilizando a técnica de qPCR, uma das mais empregadas para esta finalidade (MOREY; RYAN; DOLAH, 2006), foi de 60,7% e 53% dos genes analisados, respectivamente 30 e 60 DAI. A porcentagem de validação para experimentos de microarranjo com cana-de-açúcar é variável. Na validação dos dados de expressão em diferentes órgãos de cana-de-açúcar Rocha (2006) identificou uma porcentagem de validação de 72%, resultado idêntico ao encontrado por Felix (2006) ao comparar indivíduos com diferentes teores de sacarose, e de 57% ao comparar indivíduos com alto e baixo brix. Entretanto, Andrade (2012) obteve uma taxa de aproximadamente 90% ao analisar genótipos segregantes para o teor de sacarose. Os resultados gerados pela técnica de hibridização em lâminas de microarranjo podem variar em função da plataforma utilizada, da qualidade do RNA, da especificidade dos alvos às sondas e da frequência da incorporação preferencial de um dos fluoróforos (ROCKETT; HELLMANN,

2004). No presente trabalho, além de utilizar RNA de ótima qualidade, também foi empregado o procedimento de *dye swap*, o qual consiste na hibridização das lâminas em duplicata, porém com troca de fluoróforos entre as amostras (CHURCHILL, 2002). Estas variações podem ainda ser resultado do nível de expressão dos genes selecionados para a validação. Segundo Beckman et al. (2004) *spots* com baixa intensidade, característica de genes com expressão reduzida, apresentam menor correlação com os dados oriundos do qPCR. Este fenômeno estaria relacionado à redução na eficiência do qPCR nos últimos ciclos de amplificação quando os genes com menor expressão respondem (MOREY; RYAN; DOLAH, 2006). De maneira geral, os genes que foram mais expressos foram validados em pelo menos um dos nossos experimentos, o que está de acordo com o trabalho desenvolvido por Morey et al. (2006). O aumento na distância entre as sequências utilizadas para o desenho das sondas e os *primers* de qPCR também pode contribuir para as diferenças observadas entre as duas técnicas (ETIENNE et al., 2004). Por fim, considerando que análises de dados da literatura indicam que o coeficiente de correlação (r) entre as técnicas de microarranjo e qPCR varia de 0,48 a 0,94 (MOREY; RYAN; DOLAH, 2006), as porcentagens de validação no experimento I podem ser consideradas dentro das expectativas, ainda mais se consideramos que neste estudo, diferente dos demais relatados em cana, além da planta, há fontes de variação inerentes ao patógeno e à relação deste com o hospedeiro.

Para o segundo experimento de validação, verificou-se uma baixa correlação entre os resultados das duas técnicas. Acreditamos que isto se deve às condições experimentais entre os dois experimentos. O experimento I foi conduzido entre os meses de setembro e outubro, onde a intensidade luminosa e as temperaturas máxima e mínima são mais elevadas em relação aos meses de junho e julho, quando foi desenvolvido o experimento II. Como muito dos genes selecionados para a validação estão relacionados ao controle do ciclo celular, que é um processo notoriamente influenciado pelo ambiente (BREYNE; ZABEAU, 2001; MENGES et al., 2002), espera-se que os resultados sejam igualmente influenciados pela variação ambiental, o que seria uma característica intrínseca ao patossistema em estudo.

5.4 Proteômica x transcriptômica

As plantas utilizadas para hibridização em lâminas de microarranjo neste trabalho foram oriundas do experimento desenvolvido por Carvalho (2012), que comparou as abundâncias de proteínas em plantas com alto e baixo título de Lxx. Embora as comparações desenvolvidas por Carvalho (2012) tenham ocorrido entre plantas inoculadas com meio (MI60

x MI30) ou com suspensão de Lxx (I60 x I30) entre 30 e 60 DAI com o intuito de compreender a modulação das proteínas em resposta ao crescimento de Lxx ao longo do tempo, muitos dos processos celulares afetados foram semelhantes aos encontrados em nosso trabalho. Entre estes destaca-se a interferência no processo de crescimento e desenvolvimento das plantas através da redução na abundância de uma ciclina H e do fator eIF5A, além do aumento na abundância de uma proteína similar à subunidade beta (G β) da proteína G de adesão à guanina e da proteína 2G4 associada a proliferação, em plantas com alto título de Lxx. O trabalho ainda relata o aumento na abundância das proteínas trealose-6-fosfato sintase e trealose-6-fosfato trealose que participam da síntese da trealose, a qual pode atuar como um regulador do ciclo celular (SHI et al., 2010; DELATTE et al., 2011). Estes dados reforçam a hipótese de que Lxx regula negativamente o crescimento da planta ao interferir na progressão do ciclo celular.

Proteínas relacionadas à defesa como a PAL e endo- β -glucanase aumentaram em abundância nas plantas com maior concentração de Lxx. No estudo de transcriptômica, o aumento no título de Lxx também induziu a expressão de genes de defesa aos 60 DAI, sugerindo que o aumento no título bacteriano dispara a indução de genes que visam conter o desenvolvimento da bactéria. Por outro lado, ocorreu redução na abundância da proteína metionina sintase, ao contrário do que observamos neste trabalho para o gene que a codifica. Discrepâncias desta natureza entre estudos de proteômica e de transcriptômica são comuns, pois muitas vezes não há uma boa correlação entre os níveis de RNAm e de proteínas devido principalmente a fatores como diferenças de meia vida destas moléculas e modificações pós transcricionais e traducionais (HAIDER; PAL, 2013). No entanto, embora contrastantes, os resultados sugerem que a modulação da síntese deste aminoácido desempenha um papel relevante durante a interação cana-de-açúcar - Lxx.

5.5 Considerações finais

Como já relatado ao longo deste trabalho, os efeitos na cana-de-açúcar da interação com Lxx são conhecidos há muito tempo. Diversos trabalhos demonstraram a relação entre incremento no título bacteriano e a redução na produtividade e alterações morfológicas e fisiológicas (TEAKLE; APPLETON, 1978; GRISHAM, 1991; NGARUYA; SHIPTON; COVENTRY, 2005). A partir do sequenciamento do genoma de Lxx por Monteiro-Vitorello et al. (2004), levantou-se a hipótese de que subdesenvolvimento da planta resultaria da produção de um análogo ao fitormônio ABA pela bactéria, uma vez que esta possui um

operon de genes homólogos aos envolvidos na síntese de pigmentos carotenóides, que são precursores deste hormônio em vegetais. Embora ainda uma hipótese, existem evidências cada vez mais fortes acumuladas em nosso laboratório de que a bactéria produz e secreta uma substância que inibe o crescimento vegetal (CASTRO, 2012). Essa substância atua sobre as células meristemáticas, afetando negativamente o crescimento da planta. Os resultados deste estudo, que revelaram a repressão de diversos genes relacionados ao controle do ciclo celular e metabolismo de DNA veio reforçar esta hipótese. Vários genes com baixa expressão nas plantas inoculadas em nosso trabalho são sabidamente reprimidos pelo ABA, como genes que codificam para histona H4, ciclina do tipo B, MCM6 e CDKB1;1 (BILGIN et al., 1999; SWIATEK et al., 2004; DANG et al., 2011; GENDREAU et al., 2012). Por outro lado, vários também são os que tem sua expressão aumentada pelo hormônio e cujo padrão de expressão foi maior com o aumento do título bacteriano, como aqueles que codificam para USPA, PAL e fatores de transcrição contendo o domínio WRKY (SAUTER et al., 2002; ZAHUR et al., 2009; SONG; WANG, 2009; RUSHTON et al., 2012). As figuras 17 e 18 resumem os genes validados e processos alterados em função do aumento no título bacteriano aos 30 e 60 DAI e nos permitem visualizar que, embora diferentes genes tenham sido regulados nos dois tempos de análise, basicamente os mesmos processos foram alterados em resposta ao incremento de Lxx ao longo do tempo.

O nosso estudo é pioneiro uma vez que trouxe à luz informações inéditas sobre os processos e vias metabólicas de cana de açúcar afetadas em resposta ao crescimento de Lxx e deve servir como ponto de partida para estudos que permitam correlacionar diretamente as variações na expressão gênica no grupo de genes aqui discutidos, especialmente aqueles envolvidos no ciclo celular, com os sintomas do raquitismo. Além disso, a realização de testes com estes genes em outras variedades de cana-de-açúcar pode ajudar na identificação de genes marcadores que possam ser usados na seleção de genótipos resistentes, especialmente se for possível correlacionar a produção de biomassa com os níveis de expressão destes genes e do crescimento da bactéria nos tecidos vegetais.

Figura 17 – Visão geral dos processos e genes validados em resposta ao incremento no título de Lxx aos 30 DAI

Figura 18 – Visão geral dos processos e genes validados em resposta ao incremento no título de Lxx aos 60 DAI

6 CONCLUSÕES

O aumento na população de Lxx leva a redução na expressão de genes envolvidos no controle do ciclo e metabolismo de DNA, entretanto, à medida que o título bacteriano aumenta também ocorre a indução de genes de defesa e transdução de sinais, sugerindo um rearranjo das vias metabólicas do hospedeiro durante a colonização pela bactéria.

As alterações na expressão gênica observadas em plantas com maior população de Lxx são condizentes com o principal sintoma da doença, o raquitismo, além de colaborarem com a hipótese do possível efetor produzido pela bactéria.

REFERÊNCIAS

- ABRAMOVITCH, R.B.; MARTIN, G.B. Strategies used by bacterial pathogens to suppress plant defenses. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 7, n. 4, p. 356-364, 2004.
- ALBRECHT, U.; BOWMAN, K. D. Gene expression in *Citrus sinensis* (L.) Osbeck after infection with the bacterial pathogen *Candidatus Liberibacter asiaticus* causing Huanglongbing in Florida. **Plant Science**, Shannon, v. 175, n. 3, p. 291-306, 2008.
- ALI, G.S.; REDDY, V.S.; LINDGREN, P.B.; JAKOBEK, J.L.; REDDY, A.S.N. Differential expression of genes encoding calmodulin-binding proteins in response to bacterial pathogens and inducers of defense responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 51, n. 6, p. 803–815, 2003.
- ALLEN, C.; BENT, A.; CHARKOWSKI, A. Underexplored niches in research on plant pathogenic bacteria. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 150, n. 4, p. 1631-1637, 2009.
- ALMAGRO, L.; ROS, L.V.G.; BELCHI-NAVARRO, S.; BRU, R.; BARCELÓ, A.R.; PEDRENO, M.A. Class III peroxidases in plant defence reactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 2, p. 377–390, 2009.
- ANDERSEN, C.L.; JENSEN, J.L.; ØRNTTOFT, T.F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-pcr data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Research**, Baltimore, v. 64, n. 15, p. 5245-5250, 2004.
- ANDERSON, J.P.; BADRUZSAUFARI, E.; SCHENK, P.M.; MANNERS, J.M., DESMOND, O.J.; EHLERT, C.; MACLEAN, D.J.; EBERT, P.R.; KAZAN, K. Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 12, p. 3460-3479, 2004.
- ANDRADE, R.F. **Clonagem de promotores de cana-de-açúcar e análise do transcriptoma de genótipos segregantes para teor de sacarose**. 2012. 89 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- ANTOLÍN-LLOVERA, M.; RIED, M.K.; BINDER, A.; PARNISKE, M. Receptor kinase signaling pathways in plant-microbe interactions. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 50, p. 451-473, 2012.
- BAILEY, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 6, p. 466-467, 1977.
- BAILEY, R.A.; BECHET, G.R. The effect of ratoon stunting disease on the yield of some South African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of The South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 69, p.74-78, 1995.

- BAILEY, R.A.; MCFARLANE, S.A. The incidence and effect of RSD of sugar cane in Southern and Central Africa. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 73, p. 118-122, 1999.
- BARI, R.; JONES, J.D. Role of plant hormones in plant defence responses. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 69, n. 4, p. 473-488, 2009.
- BASHA, S.M.; MAZHAR, H.; VASANTHAIAH, H.K.N. Proteomics approach to identify unique xylem sap proteins in Pierce's disease-tolerant *Vitis* species. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v. 160, n. 3, p. 932-944, 2010.
- BASU, J.; BOUSBAA, H.; LOGARINHO, E.; LI, Z.X.; WILLIAMS, B.C.; LOPES, C.; SUNKEL, C.E.; GOLDBERG, M.L. Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 146, n. 1, p. 13-28, 1999.
- BENDA, G.T.A.; RICAUD, C. The use of heat treatment for sugarcane disease control. **Proceedings of the International Society of Sugar Cane Technologists**, São Paulo, v.16, p. 483-496, 1978.
- BILGIN, M.; DEDEOGLUA, D.; OMIRULLEH, S.; PERES, A.; ENGLER, G.; INZÉ, D.; DUDITS, D.; FEHÉR, A. Meristem, cell division and S phase-dependent activity of wheat histone H4 promoter in transgenic maize plants. **Plant Science**, Limerick, v. 143, n. 1, p. 35-44, 1999.
- BINDEA, G.; MLECNIK, B.; HACKL, H.; CHAROENTONG, P.; TOSOLINI, M.; KIRILOVSKY, A.; FRIDMAN, W.H.; PAGÈS, F.; TRAJANOSKI, Z.; GALON, J. ClueGO: a Cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. **Bioinformatics**, Oxford, v. 25, n. 8, p. 1091-1093, 2009.
- BLÉE, E. Impact of phyto-oxylipins in plant defense. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 7, n. 7, p. 315-322, 2002.
- BOREVITZ, J.O.; XIA, Y.; BLOUNT, J.; DIXON, R.A.; LAMB, C. Activation tagging identifies a conserved myb regulator of phenylpropanoid biosynthesis. **Plant Cell**, Rockville v. 12, n. 12, p. 2383-2393, 2000.
- BOUDOLF, V.; LIEGHE, K.; BEEMSTER, G.T.S., MAGYAR, Z.; ACOSTA, J.A.T.; MAES, S.; DER SCHUEREN, E.V.; INZÉ, D.; DE VEYLLDER, L. The plant-specific cyclin-dependent kinase CDKB1;1 and transcription factor E2Fa-DPa control the balance of mitotically dividing and endoreduplicating cells in Arabidopsis. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 10, p. 2683-2692, 2004.
- BREYNE, P.; ZABEAU, M. Genome-wide expression analysis of plant cell cycle modulated genes. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 4, n. 2, p. 136-142, 2001.
- BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, A.A.; BIRCH, R.G.; TAYLOR, P.W.J. Transformation and transposon mutagenesis of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease of sugarcane. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 15, n. 3, p. 262-268, 2002.

- BRUMBLEY, S.M.; PETRASOVITS, L.A.; HERMANN, S.R.; YOUNG, A.J.; CROFT, B.J. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 35, n. 6, p. 681–689, 2006.
- BUHTZ, A.; KOLASA, A.; ARLT, K.; WALZ, C.; KEHR, J. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. **Planta**, Berlin, v. 219, n. 4, p. 610-618, 2004.
- BURGOS-RIVERA, B.; DAWE, R.K. An Arabidopsis tissue-specific rnaï method for studying genes essential to mitosis. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 12, p. 1-7, 2012.
- CAILLAUD, M.C.; PAGANELLI, L.; LECOMTE, P.; DESLANDES, L.; QUENTIN, M.; PECRIX, Y.; LE BRIS, M.; MARFAING, N.; ABAD, P.; FAVERY, B. Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. 1-8, 2009.
- CARNEIRO, J.B.; SILVEIRA, S.F.; DE SOUZA FILHO, G.A.; OLIVARES, F.L & GIGLIOTI, E.A. Especificidade de anti-soro policlonal à *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 614-619, 2004.
- CARVALHO, A.O.; GOMES, V.M. Plant defensins: prospects for the biological functions and biotechnological properties. **Peptides**, New York, v. 30, n. 5, p. 1007–1020, 2009.
- CARVALHO, G. **Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta a colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras**. 2012. 147 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CASTRO, F.R.O.S.R. **Caracterização do efeito tóxico de extratos de culturas líquidas de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* na germinação de sementes de alface**. 2012. 72 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.
- CAVALCANTE, J.J.V.; VARGAS, C.; NOGUEIRA, E.M.; VINAGRE, F.; SCHWARCZ, K.; BALDANI, J.I.; FERREIRA, P.C.G.; HEMERLY, A.S. Members of the ethylene signalling pathway are regulated in sugarcane during the association with nitrogen-fixing endophytic bacteria. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 3, p. 673-686, 2007.
- CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA. **Índices de exportação do agronegócio**. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/macro/>>. Acesso em: 02 ago. 2014.
- CHAPPLE, C. Molecular-genetic analysis of plant cytochrome P450-dependent monooxygenases. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 49, p. 311-343, 1998.
- CHEN, C.; CHEN, Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced Arabidopsis transcription factor1. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 129, n. 2, p. 706-716, 2002.

- CHENG, D.W.; LIN, H.; TAKAHASHI, Y.; WALKER, M.A.; CIVEROLO, E.L.; STENGER, D.C. Transcriptional regulation of the grape cytochrome P450 monooxygenase gene CYP736B expression in response to *Xylella fastidiosa* infection. **BMC Plant Biology**, London, v. 10, n. 7, p. 1-14, 2010.
- CHURCHILL, G.A. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. **Nature Genetics**, London, v. 32, p. 490-495, 2002.
- COMSTOCK, J.C. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2002.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira: cana-de-açúcar (safra 2014/2015)**. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_28_08_52_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_2014-15.pdf>. Acesso em: 01 set. 2014.
- CROFT, K.P.C.; JIITTNER, F.; SLUSARENKO, A.J. Volatile products of the lipoxygenase pathway evolved from *Phaseolus vulgaris* (L.) leaves inoculated with *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 121, n. 1, p. 13-24, 1993.
- DAMANN JR., K.E.; BENDA, G.T.A. Evaluation of commercial heat treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, n. 9, p. 966-967, 1983.
- DANG, H.Q.; TRAN, N.Q.; GILL, S.S.; TUTEJA, R.; TUTEJA, N. A single subunit MCM6 from pea promotes salinity stress tolerance without affecting yield. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 79, n. 1, p. 19-34, 2011.
- DAVIS, M.J.; BAILEY, R.A. Ratoon stunting. In: ROTT, P.; BAILEY, R.A.; COMSTOCK, J.C.; CROFT, B.J.; SAUMTALLY, A.S. (Ed). **A guide to sugarcane diseases**. Montpellier: CIRAD; ISSCT, 2000. p. 49-54.
- DAVIS, M.J.; DEAN, J.L.; HARRISON, N.A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Ithaca, v. 78, n. 4, p. 462-468, 1988.
- DAVIS, M.J.; GILLASPIE JR., A.G.; HARRIS, R.W.; LAWSON, R.H. Ratoon stunting disease of sugarcane: Isolation of the causal bacterium. **Science**, Washington, v. 210, n. 4476, p. 1978-1980, 1980.
- DAVIS, M.J.; GILLASPIE JR., A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, v. 34, n. 2, p. 107-117, 1984.
- DEAN, M.J.; DAVIS, M.J. Losses caused by ratoon stunting disease of sugarcane in Florida. **American Society of Sugar Cane Technology**, Baton Rouge, v. 10, p. 66-72, 1990.

DELATTE, T.L.; SEDIJANI, P.; KONDOU, Y.; MATSUI, M.; DE JONG, G.J.; SOMSEN, G.W.; WIESE-KLINKENBERG, A.; PRIMAVESI, L.F.; PAUL, M.J.; SCHLUEPMANN, H. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 157, n. 1, p. 160-174, 2011.

DEPUYDT, S.; DE VEYLDER, L.; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. Eternal youth, the fate of developing *Arabidopsis* leaves upon *Rhodococcus fascians* infection. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 149, n. 3, p. 1387–1398, 2009.

DHONDT, S.; COPPENS, F.; DE WINTER, F.; SWARUP, K.; MERKS, R.M.; INZÉ, D.; BENNETT, M.J.; BEEMSTER, G.T. SHORT-ROOT and SCARECROW regulate leaf growth in *Arabidopsis* by stimulating S-phase progression of the cell cycle. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 154, n. 3, p. 1183-1195, 2010.

DIXON, R.A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C.J.; REDDY, M.S.S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defence: a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 3, p. 371-390, 2002.

DODDS, P.N.; RATHJEN, J.P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 11, n. 8, p. 539-48, 2010.

DRESSELHAUS, T.; SRILUNCHANG, K.; LELJAK-LEVANIC, D.; SCHREIBER, D.N.; GARG, P. The fertilization-induced DNA replication factor mcm6 of maize shuttles between cytoplasm and nucleus, and is essential for plant growth and development. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 140, n. 2, p. 512–527, 2006.

ETIENNE, W.; MEYER, M.H.; PEPPERS, J.; MEYER R.A. Comparison of mRNA gene expression by RT-PCR and DNA microarray. **Biotechniques**, Natick, v. 36, n. 4, p. 618-626, 2004.

EVANS, S.J.; WATSON, S.J.; AKIL, H. Evaluation of sensitivity, performance and reproducibility of microarray technology in neuronal tissue. **Integrative and Comparative Biology**, Oxford, v. 43, n. 6, p. 780-785, 2003.

FAN, J.; HILL, L.; CROOKS, C.; DOERNER, P.; LAMB, C. Absciscic acid has a key role in modulating diverse plant-pathogen interactions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 150, n. 4, p. 1750–1761, 2009.

FAN, M.; BAI, M.Y.; KIM, J.G.; WANG, T.; OH, E.; CHEN, L.; PARK, C.H.; SON, S.H.; KIM, S.K.; MUDGETT, M.B.; WANGA, Z.Y. The bHLH transcription factor HBI1 mediates the trade-off between growth and pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity in *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 26, n. 2, p. 828-841, 2014.

FAO. **FAOSTAT agriculture data**. Disponível em:

<<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 05 jun. 2014.

FEGAN, M.; CROFT, B.J.; TEAKLE, D.S.; HAYWARD, A.C.; SMITH, G.R. Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane with a polymerase chain reaction-based assay. **Plant Pathology**, Oxford, v. 47, n. 4, p. 495-504, 1998.

FELDMAN, M.J. **Identifying regulatory components of phytosterol biosynthesis in the genomic era**. 2012. 130 p. Dissertation (Master in Philosophy) - Washington State University, Washington, 2012.

FELIX, J.M. **Análise da expressão gênica envolvida no metabolismo de sacarose em cana-de-açúcar (*Sccharum spp.*)**. 2006. 174 p. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

FERNANDES JÚNIOR, A.R.; GANEM Jr, E.J.; MARCHETTI, L.B.L.; URASHIMA, A.S. Avaliação de diferentes tratamentos térmicos no controle do raquitismo-da-soqueira em cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Lavras, v. 35, n. 1, p. 60-64, 2010.

FERRO, M.I.T.; BARROS, N.M.; DABBAS, K.M.; LAIA, M.L.; KUPPER, K.C.; MORAES, V.A.; OLIVEIRA, J.C.F.; FERRO, J.A.; ZINGARETTI, S.M. Análise do perfil de expressão dos genes da cana-de-açúcar envolvidos na interação com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Summa Phytopathologica**, Jaguariuna, v. 33, n. 2, p. 157-166, 2007.

FORSBURG, S.L. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 68, n. 1, p. 109-131, 2001.

FRANCIS, D. The plant cell cycle: 15 years on. **New Phytologist**, Malden, v. 174, n. 2, p. 261-278, 2007.

GAGLIARDI, P.R.; CAMARGO, L.E.A. Resistência de variedades comerciais de cana-de-açúcar ao agente causal do raquitismo-da-soqueira. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 4, p. 1222-1226, 2009.

GENDREAU, E.; CAYLA, T.; CORBINEAU, F. S phase of the cell cycle: a key phase for the regulation of thermodormancy in barley grain. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 15, p. 5535-5543, 2012.

GILLASPIE, A.G., TEAKLE, D.S. Ratoon stunting disease. In: RICAUD, C.; EGAN, B.T.; GILLASPIE, J.R.; HUGHES, C.G. (Ed.). **Diseases of sugarcane**. New York: Elsevier Science, 1989. p. 59-80.

GIMÉNEZ-ABIÁN, J.F.; WEINGARTNER, M.; BINAROVA, P.; CLARKE, D.J.; ANTHONY, R.G.; CALDERINI, O.; HEBERLE-BORS, E.; ESPINA, S.M.D.; BÖGRE, L.; TORRE, C. A topoisomerase II-dependent checkpoint in G2-phase plant cells can be bypassed by ectopic expression of mitotic cyclin B2. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 1, n. 3, p. 187-192, 2002.

GRISHAM, M.P. Effect of ratoon stunting disease on yield sugarcane grown in multiple three years plantings. **Phytopathology**, Ithaca, v. 81, n. 3, p. 337-340, 1991.

GRISHAM, M.P.; PAN, Y.B.; RICHARD JR, E.P. Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane leaves by real-time polymerase chain reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, p. 430-434, 2007.

GRISHAM, M.P.; JOHNSON, R.M.; VIATOR, R.V. Effect of ratoon stunting disease on yield of recently released sugarcane cultivars in Louisiana. **Journal of the American Society of Sugar Cane Technologists**, Baton Rouge, v. 29, p. 119-127, 2009.

HAIDER, S.; PAL, R. Integrated analysis of transcriptomic and proteomic data. **Current Genomics**, Amsterdam, v. 14, n. 2, p. 91-110, 2013.

HARDOIM, P.R.; VAN OVERBEEK, L.S.; VAN ELSAS, J.D. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 16, n. 10, p. 463-471, 2008.

HARRISON, N.A.; DAVIS, M.J. Infectivity titrations of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* and sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 70, n. 6, p. 556-558, 1986.

HARRISON, N.A.; DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Ithaca, v. 78, n. 6, p. 722-727, 1988.

HERRIDGE, R.P.; DAY, R.C.; MACKNIGHT, R.C. The role of the MCM2-7 helicase complex during *Arabidopsis* seed development. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 86, n. 1, p. 69-84, 2014.

HOEREN, F.U.; DOLFERUS, R.; WU, Y.; PEACOCK, W.J.; DENNIS, E.S. Evidence for a role for *atmyb2* in the induction of the *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase gene (*ADH1*) by low oxygen. **Genetics**, Austin, v. 149, n. 2, p. 479-490, 1998.

HOON, M.J.L.; IMOTO, S.; NOLAN, J.; MIYANO, S. Open source clustering software. **Bioinformatics**, Oxford, v. 20, n. 9, p. 1453-1454, 2004.

HOY, J.W.; BISCHOFF, K.P.; MILLIGAN, S.B.; GRAVOIS, K.A. Effect of tissue culture explant source on sugarcane yield components. **Euphytica**, Wageningen, v. 129, n. 2, p. 237-240, 2003.

HREN, M.; RAVNIKAR, M.; J. ERMACORA, B.P.; CARRARO, L.; BIANCO, P.A.; CASATI, P.; BORGIO, M.; ANGELINI, E.; ROTTER, A.; K. GRUDEN. Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. **Plant Pathology**, Oxford, v. 58, n. 1, p. 170-180, 2009.

HWANG, L.H.; LAU, L.F.; SMITH, D.L.; MISTROT, C.A.; HARDWICK, K.G.; HWANG, E.S.; AMON, A.; MURRAY, A.W. Budding yeast Cdc20: a target of the spindle checkpoint. **Science**, Washington, v. 279, n. 5353, p. 1041-1044, 1998.

IGLESIA, A. Review of ratoon stunting disease of sugarcane (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*). **Revista Protección Vegetal**, Havana, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2003.

ISKANDAR, H.; SIMPSON, R.S.; CASU, R.E.; BONNETT, G.D.; MACLEAN, D.J.; MANNERS, J.M. Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v. 22, n. 4, p. 325-337, 2004.

INZÉ, D.; DE VEYLLER, L. Cell cycle regulation in plant development. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 40, p. 77-105, 2006.

JARILLO, J.A.; LEYVA, A.; SALINAS, J.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 101, n. 3, p. 833-837, 1993.

JENSEN, M.K.; RUNG, J.H.; GREGERSEN, P.L.; GJETTING, T.; FUGLSANG, A.T.; HANSEN, M.; JOEHNK, N.; LYGKJAER, M.F.; COLLINGE, D.B. The HvNAC6 transcription factor: a positive regulator of penetration resistance in barley and *Arabidopsis*. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 65, n. 1, p. 137-150, 2007.

JIANG, F.; GUO, M.; YANG, F.; DUNCAN, K.; JACKSON, D.; RAFALSKI, A.; WANG, S.; LI, B. Mutations in an AP2 transcription factor-like gene affect internode length and leaf shape in maize. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-9, 2012.

JOHNSTONE, D.M.; RIVEROS, C.; HEIDARI, M.; GRAHAM, R.M.; TRINDER, D.; BERRETTA, R.; OLYNYK, J.K.; SCOTT, R.J.; MOSCATO, P.; MILWARD, A. Evaluation of different normalization and analysis procedures for illumina gene expression microarray data involving small changes. **Microarrays**, Oxford, v. 2, n. 2, p. 131-152, 2013.

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

JORDÁ, L.; VERA, P. Local and systemic induction of two defense-related subtilisin-like protease promoters in transgenic *Arabidopsis* plants. Luciferin induction of PR gene expression. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 124, n. 3, p. 1049-1057, 2000.

KAO, J.; DAMANN, K.E. In situ localization and morphology of the bacterium associated with ratoon stunting disease of sugarcane. **Journal of Canadian Botany**, Ottawa, v. 3, n. 3, p. 310-315, 1980.

KAYA, H.; SHIBAHARA, K.; TAOKA, K.; IWABUCHI, M.; STILLMAN, B.; ARAKI, T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. **Cell**, Cambridge, v. 104, p. 131-142, 2001.

KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Linking development to defense: auxin in plant-pathogen interactions. **Trends Plant Science**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 373-82, 2009.

KIM, M.C.; PANSTRUGA, R.; ELLIOTT, C.; MULLER, J.; DEVOTO, A.; YOON, H.W.; PARK, H.C.; CHO, M.J.; SCHULZE-LEFERT, P. Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. **Nature**, London, v. 416, n. 6879, p. 447-451, 2002.

KONOPKA-POSTUPOLSKA, D.; CLARK, G.; GOCH, G.; DEBSKI, J.; FLORAS, K.; CANTERO, A.; FIJOLEK, B.; ROUX, S.; HENNIG, J. The role of annexin 1 in drought stress in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 150, n. 3, p. 1394-1410, 2009.

KOTTAPALLI, K.R.; RAKWAL, R.; SATOH, K.; SHIBATO, J.; KOTTAPALLI, P.; IWAHASHI, H.; KIKUCHI, S. Transcriptional profiling of indica rice cultivar IET8585 (Ajaya) infected with bacterial leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv *oryzae*. **Plant Physiology and Biochemistry**, Palo Alto, v. 45, n. 11, p. 834-850, 2007.

KUDLA, J.; BATISTIC, O.; HASHIMOTO, K. Calcium signals: the lead currency of plant information processing. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 3, p. 541-563, 2010.

LECOURIEUX, D.; RANJEVA, R.; PUGIN, A. Calcium in plant defence-signalling pathways. **New Phytologist**, Malden, v. 171, n. 2, p. 249-269, 2006.

LEE, M.W.; QI, M.; YANG, Y. A Novel jasmonic acid-inducible rice myb gene associates with fungal infection and host cell death. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 14, n. 4, p. 527-535, 2001.

LEMBKE, C.G.; NISHIYAMA JR, M.Y.; SATO, P.M.; ANDRADE, R.F.; SOUZA, G.M. Identification of sense and antisense transcripts regulated by drought in sugarcane. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 78, n. 4, p. 461-477, 2012.

LI, W.F.; SHEN, K.; HUANG, Y.K.; WANG, X.Y.; LUO, Z.M.; YING, X.M.; YIN, J.; MA, L.; SHAN, H.L.; ZHANG, R.Y. PCR detection of ratoon stunting disease pathogen and natural resistance analysis in sugarcane core germplasms. **Crop Protection**, London, v. 53, p. 46-51, 2013.

LIU, J.; XU, L.; GUO, J.; CHEN, R.; GRISHAM, M.P.; QUE, Y. Development of loop-mediated isothermal amplification for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-8, 2013.

LIU, R.; CHEN, L.; JIA, Z.; LÜ, B.; SHI, H.; SHAO, W.; DONG, H. Transcription factor AtMYB44 regulates induced expression of the ethylene insensitive2 gene in *Arabidopsis* responding to a harpin protein. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Sain Paul, v. 24, n. 3, p. 377-389, 2011.

LOGEMANN, E.; WU, S.C.; SCHRODER, J.; SCHMELZER, E.; SOMSSICH, I.E.; HAHLBROCK, K. Gene activation by UV light, fungal elicitor or fungal infection in *Petroselinum crispum* is correlated with repression of cell cycle-related genes. **The Plant Journal**, Oxford, v. 8, n. 6, p. 865-876, 1995.

LÓPEZ-MAURY, L.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 9, p. 583-593, 2008.

LORENZO, O.; PIQUERAS, R.; SÁNCHEZ-SERRANO, J.J.; SOLANO, R. Ethylene response factor1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, n. 1, p. 165-178, 2003.

- LOUKEHAICH, R.; WANG, T.; OUYANG, B.; ZIAF, K.; LI, H.; ZHANG, J.; LU, Y.; YE, Z. SpUSP, an annexin-interacting universal stress protein, enhances drought tolerance in tomato. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 63, n. 15, p. 5593-5606, 2012.
- MACKEY, D.; MCFALL, A.J. MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 61, n. 6, p. 1365-1371, 2006.
- MAGAREY, R.C.; SUMA, S.; IRAWAN, K.L.S.; ALLSOPP, P.G. Sik na binatang bilong suka - diseases and pests encountered during a survey of *Saccharum* germplasm 'in the wild' in Papua New Guinea. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Brisbane, v. 24, p. 219-227, 2002.
- MARAMOROSCH, K. Electron microscopy of ratoon stunted sugar cane: microorganisms in xylem. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 77, n. 3, p. 270-274, 1973.
- MARCHIVE, C.; LÉON, C.; KAPPEL, C.; COUTOS-THÉVENOT, P.; CORIO-COSTET, M.F.; DELROT, S.; LAUVERGEAT, V. Over-expression of WRKY1 in grapevines induces expression of jasmonic acid pathway-related genes and confers higher tolerance to the downy mildew. **PLOS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013.
- MARZLUFF, W.F.; DURONIO, R.J. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 14, n. 16, p. 692-699, 2002.
- MATTON, D.P.; CONSTABEL, P.; BRISSON, N. Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 14, n. 5, p. 775-783, 1990.
- McFARLANE, S. The relationship between extent of colonisation by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and yield loss in different sugarcane varieties. **Proceedings of The South African Sugar Technologist's Association**, Durban, v. 76, p. 281-284, 2002.
- MENGES, M.; HENNIG, L.; GRUISSEM, W.; MURRAY, J.A.H. Cell Cycle-regulated gene expression in *Arabidopsis*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 44, p. 41987-42002, 2002.
- MILLS, L.; LEAMAN, T. M.; TAGHAVI, S. M.; SHACKEL, L.; DOMINIAK, B.C., TAYLOR, P.W.J.; FEGAN, M.; TEAKLE, D. S. *Leifsonia xyli*-like bacteria are endophytes of grasses in eastern Australia. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 30, n. 2, p. 145-151, 2001.
- MIRNICS, K.; MIDDLETON, F.A.; LEWIS, D.A.; LEVITT, P. Analysis of complex brain disorders with gene expression microarrays: schizophrenia as a disease of the synapse. **Trends in Neurosciences**, Cambridge, v. 24, n. 8, p. 479-486, 2001.
- MITSUDA, N.; SEKI, M.; SHINOZAKI, K.; OHME-TAKAGI, M. The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. **Plant Cell**, Rockville, v. 17, n. 11, p. 2993-3006, 2005.

MIURA, K.; ASHIKARI, M.; MATSUOKA, M. The role of QTLs in the breeding of high-yielding rice. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 16, n. 6, p. 319-326, 2011.

MIZUKAMI, Y.; FISCHER, R.L. Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 2, p. 942-947, 2000.

MOHR, P.G.; CAHILL, D.M. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in *Arabidopsis* infected with *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **Functional & Integrative Genomics**, Berlin, v. 7, n. 3, p. 181-191, 2007.

MONTEIRO-VITORELLO, C.B.; CAMARGO, L.E.; VAN SLUYS, M.A.; KITAJIMA, J.P.; TRUFFI, D.; DO AMARAL, A.M.; HARAKAVA, R.; DE OLIVEIRA, J.C.; WOOD, D.; DE OLIVEIRA, M.C.; MIYAKI, C.; TAKITA, M.A.; DA SILVA, A.C.; FURLAN, L.R.; CARRARO, D.M.; CAMAROTTE, G.; ALMEIDA, N.F.JR, CARRER, H.; COUTINHO, L.L.; EL-DORRY, H.A.; FERRO, M.I.; GAGLIARDI, P.R.; GIGLIOTI, E.; GOLDMAN, M.H.; GOLDMAN, G.H.; KIMURA, E.T.; FERRO, E.S.; KURAMAE, E.E.; LEMOS, E.G.; LEMOS, M.V.; MAURO, S.M.; MACHADO, M.A.; MARINO, C.L.; MENCK, C.F.; NUNES, L.R.; OLIVEIRA, R.C.; PEREIRA, G.G.; SIQUEIRA, W.; DE SOUZA, A.A.; TSAI, S.M.; ZANCA, A.S.; SIMPSON, A.J.; BRUMBLEY, S.M.; SETÚBAL, J.C. The genome sequence of the Gram positive sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 17, n. 8, p. 827-836, 2004.

MOREY, J.S.; RYAN, J.C.; DOLAH, F.M. Microarray validation: factors influencing correlation between oligonucleotide microarrays and real-time PCR. **Biological Procedures Online**, Waterloo, v. 8, p. 175-193, 2006.

MUTHIAH, M.; RAMADASS, A.; AMALRAJ, R.S.; PALANIYANDI, M.; RASAPPA, V. Expression profiling of transcription factors (TFs) in sugarcane X *Colletotrichum falcatum* interaction. **Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology**, New Delhi, v. 22, n. 3, p. 286-294, 2013.

NGARUIYA, P.N.; SHIPTON, W.A.; COVENTRY, R. Ratoon stunting disease of sugarcane as influenced by environmental stressors. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Brisbane, v. 27, p. 324-333, 2005.

NI, D.A.; SOZZANI, R.; BLANCHET, S.; DOMENICHINI, S.; REUZEAU, C.; CELLA, R.; BERGOUNIOUX, C.; RAYNAUD, C. The *Arabidopsis* MCM2 gene is essential to embryo development and its over-expression alters root meristem function. **New Phytologist**, Malden, v. 184, n. 2, p. 311-322, 2009.

NOCKER, S.; LUDWIG, P. The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. **BMC Genomics**, London, v. 4, n. 50, p. 1-23, 2003.

NOLE-WILSON, S.; TRANBY, T.L.; KRIZEK, B.A. AINTEGUMENTA-like (AIL) genes are expressed in young tissues and may specify meristematic or division-competent states. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 57, n. 5, p. 613-628, 2005.

OLIVEIRA, R.A.; COELHO, P.A.; SUNKEL, C.E. The condensin I subunit Barren/CAP-H is essential for the structural integrity of centromeric heterochromatin during mitosis. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 25, n. 20, p. 8971-8984, 2005.

OLORIZ, M.I.; GIL, V.; ROJAS, L.; PORTAL, O.; IZQUIERDO, Y.; JIMÉNEZ, E.; HOFTE, M. Sugarcane genes differentially expressed in response to *Puccinia melanocephala* infection: identification and transcript profiling. **Plant Cell Reports**, Berlin, v. 31, n. 5, p. 955–969, 2012.

PAN, Y.B.; GRISHAM, M.P.; BURNER, D.M.; DAMANN JR, K.E.; WEI, Q. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 3, p. 285-290, 1998.

PELOSI, C.S.; LOURENÇO, M.V.; SILVA, M.; SANTOS, A.Z.; FRANÇA, S.C.; MARINS, M. Development of a Taqman real-time PCR assay for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 38, n. 4, p. 343-345, 2013.

PEROCHON, A.; ALDON, D.; GALAUD, J.P.; RANTY, B. Calmodulin and calmodulin-like proteins in plant calcium signaling. **Biochimie**, Paris, v. 93, n. 12, p. 2048-2053, 2011.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFFLE, L. Relative Expression Software Tool (REST©) for group wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v. 1, n. 9, p. 30-39, 2002.

PFAFFL, M.W.; TICHOPAD, A.; PRGOMET, C.; NEUVIANS, T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. **Biotechnology Letters**, Dordrecht, v. 26, n. 6, p. 509–515, 2004.

PENG, H.P.; CHAN, C.S.; SHIH, M.C.; YANG, S.F. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 126, n. 2, p. 742-749, 2001.

PIETERSE, C.M. J.; LEON-REYES, A.; VAN DER ENT, S.; VAN WEE, S.C.M. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**, London, v. 5, p. 308-316, 2009.

PLANCHAIS, S.; GLABB, N.; INZÉ, D.; BERGOUNIOUX, C. Chemical inhibitors: a tool for plant cell cycle studies. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 476, n. 1, p. 78-83, 2000.

PONTE, E.C.; SILVEIRA, S.F.; CARNEIRO JR., J.B.; LIMA, R.M.P. Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, p. 313-321, 2010.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick-prep of genomic DNA from gram-positive bacteria. **Trends in Genetics**, Cambridge, v. 11, n. 6, p. 217-218, 1995.

POZO, J.C.; LOPEZ-MATAS, M.A.; RAMIREZ-PARRA, E.; GUTIERREZ, C. Hormonal control of the plant cell cycle. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 123, n. 2, p. 173–183, 2005.

PRE, M.; ATALLAH, M.; CHAMPION, A.; DE VOS, M.; PIETERSE, C.M.J.; MEMELINK, J. The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 147, n. 3, p. 1347–1357, 2008.

PURANIK, S.; SAHU, P.P.; SRIVASTAVA, P.S.; PRASAD, M. NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 369–381, 2012.

QI, W.; SUN, F.; WANG, Q.; CHEN, M.; HUANG, Y.; FENG, Y.Q.; LUO, X.; YANG, J. Rice Ethylene-Response AP2/ERF factor OsEATB restricts internode elongation by down-regulating a gibberellin biosynthetic gene. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 157, n. 1, p. 216–228, 2011.

QIN, X.; ZEEVAART, J.A.D. Overexpression of a 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene in *Nicotiana plumbaginifolia* increases abscisic acid and phaseic acid levels and enhances drought tolerance. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, n. 2, p. 544–551, 2002.

RAMAKERS, A.C.; RUIJTERA, J.M.; DEPREZA, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 339, n. 1, p. 62–66, 2003.

RAMOS, A.T.M. **Avaliação da cinética populacional de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em resposta a fatores do hospedeiro e do ambiente**. 2012. 86 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. **Censo varietal 2012**. Disponível em: <pmgca.dbv.cca.ufscar.br/dow/RevistaCensoVarietal202012.pdf>. Acesso em: 05 jun. 2014.

REICHHELD, J.P.; VERNOUX, T.; LARDON, F.; VAN MONTAGU, M.; INZÉ, D. Specific checkpoints regulates plant cell cycle progression in response to oxidative stress. **The Plant Journal**, Oxford, v. 17, n. 6, p. 647–656, 1999.

ROACH, B.T.; JACKSON, P.A. Screening sugar cane clones for resistance to ratoon stunting disease. **Sugar Cane**, Saint Paul, v. 2, n. 6, p. 2–12, 1992.

ROCHA, F.R. **Identificação e análise funcional de genes relacionados à transdução de sinais na cana-de-açúcar**. 2006. 181 p. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ROCHA, F.R.; PAPINI-TERZI, F.S.; NISHIYAMA, M.Y.; VENCIO, R.Z; VICENTINI, R.; DUARTE, R.D.; DE ROSA, V.E.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.H; RODRIGUES, F.A; ULIAN, E.C.; ZINGARETTI, S.M. GALBIATTI, J.A.; ALMEIDA, R.S.; FIGUEIRA, A.V.O.; HEMERLY, A.S.; SILVA-FILHO, M.C.; MENOSSI, M.; SOUZA, G.M. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, p. 1-22, 2007.

ROCKETT, J.C.; HELLMANN, G.M. Confirming microarray data--is it really necessary? **Genomics**, San Diego, v. 83, n. 4, p. 541-9, 2004.

RODRIGUES, C.M.; SOUZA, A.A. de; TAKITA, M.A.; KISHI, L.T.; MACHADO, M.A. RNA-Seq analysis of *Citrus reticulata* in the early stages of *Xylella fastidiosa* infection reveals auxin-related genes as a defense response. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 676-689, 2013.

RUSHTON, P.J.; SOMSSICH, I.E.; RINGLER, P.; SHEN, Q.J. WRKY transcription factors. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 247-258, 2010.

SABELLI, P.A.; BURGESS, S.R.; KUSH, A.K.; YOUNG, M.R.; SHEWRY, P.R. cDNA cloning and characterisation of a maize homologue of the MCM proteins required for the initiation of DNA replication. **Molecular & General Genetics**, Berlin, v. 252, n. 1, p. 125-136, 1996.

SCHALLER, A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. **Planta**, Berlin, v. 220, n. 2, p. 183-197, 2004.

SAMBROOK, J.; MACCALLUM, P.; RUSSEL, D. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 3rd ed. New York: Cold Springs Harbour Press, 2001. 446 p.

SAKUMA, Y.; LIU, Q.; DUBOUZET, J.G.; ABE, H.; SHINOZAKI, K.; YAMAGUCHI-SHINOZAKI, K. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 290, n. 3, p. 998-1009, 2002.

SANDHU, S.K.; GOSAL, S.S.; THIND, K.S.; UPPAL, S.K.; SHARMA, B.; MEETA, M.; SINGH, K.; CHEEMA, G.S. Field performance of micropropagated plants and potential of seed cane for stalk yield and quality in sugarcane. **Sugar Tech**, New York, v. 11, n. 1, p. 34-38, 2009.

SAUTER, M.; RZEWUSKI, G.; MARWEDEL, T.; LORBIECKE, R. The novel ethylene-regulated gene OsUsp1 from rice encodes a member of a plant protein family related to prokaryotic universal stress proteins. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 379, p. 2325-2331, 2002.

SCHENK, P.M.; CARVALHAIS, L.C.; KAZAN, K. Unraveling plant-microbe interactions: can multi-species transcriptomics help? **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 177-184, 2012.

- SCHULER, M.A. The role of cytochrome P450 monooxygenases in plant-insect interactions. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 112, n. 4, p. 1411-1419, 1996.
- SCHULER, M.A.; WERCK-REICHHART, D. Functional genomics of P450s. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v. 54, p. 629–667, 2003.
- SEGURA, A.; MORENO, M.; MOLINA, A.; GARCÍA-OLMEDO, F. Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 435, n. 2, p. 159-162, 1998.
- SEILER, C.; HARSHAVARDHAN, V.T.; RAJESH, K.; REDDY, P.S.; STRICKERT, M.; ROLLETSCHEK, H.; SCHOLZ, U.; WOBUS, U.; SREENIVASULU, N. ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 2615–2632, 2011.
- SENTHIL-KUMAR, M.; MYSORE, K.S. Nonhost resistance against bacterial pathogens: retrospectives and prospects. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 51, p. 407-427, 2013.
- SHAH, P.; SWIATLO, E. A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 4-16, 2008.
- SHANNON, P.; MARKIEL, A.; OZIER, O.; BALIGA, N.S.; WANG, J.T.; RAMAGE, D.; AMIN, N.; SCHWIKOWSKI, B.; IDEKER, T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome Research**, New York, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.
- SHARMA, N. **Role of bHLH93 in controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana***. 2011. 137 p. Dissertation (Doctor of Philosophy) - Faculty of the Graduated School, University of Texas, Austin, 2011.
- SHARONI, A.M.; NURUZZAMAN, M.; SATOH, K.; SHIMIZU, T.; KONDOH, H.; SASAYA, T.; CHOI, I.R.; OMURA, T.; KIKUCHI, S. Gene structures, classification and expression models of the AP2/EREBP transcription factor family in rice. **Plant Cell Physiology**, Kyoto, v. 52, n. 2, p. 344-360, 2011.
- SHI, L.; SUTTER, B.M.; YE, X.; TU, B.P. Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 21, n. 12, p. 1982-1990, 2010.
- SHORESH, M.; YEDIDIA, I.; CHET, I. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. **Phytopathology**, Ithaca, v. 95, n. 1, p. 76-84, 2005.
- SIDDIQUI, N.U.; RUSYNIAK, S.; HASENKAMPF, C.A.; RIGGS, C.D. Disruption of the *Arabidopsis* SMC4 gene, AtCAP-C, compromises gametogenesis and embryogenesis. **Planta**, Berlin, v. 223, n. 5, p. 990–997, 2006.

SIDDIQUI, N.U.; STRONGHILL, P.E.; DENGLER, R.E.; HASENKAMPF, C.A.; RIGGS, C.D. Mutations in *Arabidopsis* condensin genes disrupt embryogenesis, meristem organization and segregation of homologous chromosomes during meiosis. **Development**, Cambridge, v. 130, n. 14, p. 3283–3295, 2003.

SILVA, T.G.E.R. **Raquitismo da soqueira de cana-de-açúcar: transmissão do patógeno via sementes e avaliação quantitativa de seu controle através da termoterapia de toletes**. 2013. 86 p. Dissertação (Mestre em Fitopatologia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

SILVER, N.; BEST, S.; JIANG, J.; THEIN, S.L. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. **BMC Molecular Biology**, London, v. 7, n. 33, p. 1-14, 2006.

SONG, S.; QI, T.; FAN, M.; ZHANG, X.; GAO, H.; HUANG, H.; WU, D.; GUO, H.; XIE, D. The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. **PLoS Genetics**, San Francisco, v. 9, n. 7, p. 1-19, 2013.

SORIA-GUERRA, R.E.; ROSALES-MENDOZA, S.; CHANG, S.; HAUDENSHIELD, J. S.; PADMANABAN, A.; RODRIGUEZ-ZAS, S.; HARTMAN, G. L.; GHABRIAL, S. A.; KORBAN, S. S. Transcriptome analysis of resistant and susceptible genotypes of *Glycine tomentella* during *Phakopsora pachyrhizi* infection reveals novel rust resistance genes. **Theoretical Applied Genetics**, Berlin, v. 120, n. 7, p. 1315-1333, 2010.

SOUZA, A.A.; TAKITA, M.A.; COLETTA-FILHO, H.D.; CAMPOS, M.A.; TEIXEIRA, J.E.C.; TARGON, M.L.P.N.; CARLOS, E.F.; RAVASI, J.F.; FISCHER, C.N.; MACHADO, M.A. Comparative analysis of differentially expressed sequence tags of sweet orange and mandarin infected with *Xylella fastidiosa*. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 3, p. 965-971, 2007.

SWIATEK, A.; LENJOU, M.; VAN BOCKSTAELE, D.; INZÉ, D.; VAN ONCKELEN, H. Differential effect of jasmonic acid and abscisic acid on cell cycle progression in tobacco BY-2 cells. **Plant Physiology**, Lancaster, v. 128, n. 1, p. 201-211, 2002.

SWIATEK, A.; AZMI, A.; STALS, H.; INZÉ, D.; VAN ONCKELEN, H. Jasmonic acid prevents the accumulation of cyclin B1;1 and CDK-B in synchronized tobacco BY-2 cells. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 572, n. 1, p. 118–122, 2004.

TARAYRE, S.; VINARDELL, J.M.; CEBOLLA, A.; KONDOROSI, A.; KONDOROSI, E. Two classes of the CDh1-type activators of the anaphase-promoting complex in plants: novel functional domains and distinct regulation. **Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 2, p. 422-434, 2004.

TAYLOR, P.M. J.; PETRASOVITS, L.A.; VAN DER VOLD, R.; BIRCH, R.G.; CROFT, B. J.; FEGAN, M.; SMITH, G.R.; BRUMBLEY, S.M. Development of PCR-based markers for detection of *Leifonia xyli* subsp. *xyli* in fibrovascular fluid of infected sugarcane plants. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 32, p. 367-375, 2003.

TEAKLE, D.S.; RYAN, C.C. The effect of high temperature on the sugar cane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, in vitro and in vivo. **Sugar Cane**, Saint Paul, v. 6, p. 5–6, 1992.

TEAKLE, D.S.; APPLETON, J.M.; STEINDL, D.R.L. An anatomical basis for resistance of sugar cane to ratoon stunting disease. **Physiological Plant Pathology**, London, v. 12, n. 1, p. 83-91, 1978.

TENA, G.; BOUDSOCQ, M.; SHEEN, J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 14, n. 5, p. 519–529, 2011.

TKACZUK, K.L.; SHUMILIN, I.A.; CHRUSZCZ, M.; EVDOKIMOVA, E.; SAVCHENKO, A.; MINOR, W. Structural and functional insight into the universal stress protein family. **Evolutionary Applications**, Oxford, v. 6, n. 3, p. 434-449, 2013.

TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-açúcar. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 185–196.

TORNERO, P.; CONEJERO, V.; VERA, P. Identification of a new pathogen-induced member of the subtilisin-like processing protease family from plants. **The Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 272, n. 22, p. 14412-14419, 1997.

TORRES, M.A. ROS in biotic interactions. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 138, n. 4, p. 414-429, 2010.

TORRES, M.A.; DANGL, J.L.; JONES, J.D.G. Arabidopsis gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v. 99, n. 9, p. 517-522, 2002.

TUTEJA, N.; TRAN, N.Q.; DANG, H.Q.; TUTEJA, R. Plant MCM proteins: role in DNA replication and beyond. **Plant Molecular Biology**, Dordrecht, v. 77, n. 6, p. 537-545, 2011.

ULLAH, H.; CHEN, J.G.; TEMPLE, B.; BOYES, D.C.; ALONSO, J.M.; DAVIS, K.R.; ECKER, J.R.; JONES, A.M. The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. **Plant Cell**, Rockville, v. 15, p. 393–409,

UNIÃO DAS INDÚSTRIAS DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Notícias do setor sucroalcooleiro**. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/noticia/871626920312979436/liderancas-do-setor-sucroenergetico-cobram-politicas-publicas/>>. Acesso em: 10 ago. 2014.

UNTERGASSER, A.; NIJVEEN, H.; RAO, X.; BISSELING, T.; GEURTS, R.; LEUNISSEN, J. A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic Acids Research**, London, v. 35, p. 71-74, 2007.

URASHIMA, A.S.; GRACHET, N.G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, n. 1, p. 57-64, 2012.

URASHIMA, A.S.; MARCHETTI, L.B.L. Incidence and Severity of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* Infection of Sugarcane in Sao Paulo State, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 161, n. 7, p. 478-484, 2013.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, London, v.3, n. 7, p. 1-7, 2002.

VARTAPETIAN, A.B.; TUZHIKOV, A.I.; CHICHKOVA, N.V.; TALIANSKY, M.; WOLPERT, T.J. A plant alternative to animal caspases: subtilisin-like proteases. **Cell Death and Differentiation**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 1289-1297, 2011.

VÊNCIO, R.Z.; KOIDE, T. HTself: self-self based statistical test for low replication microarray studies. **DNA Research**, Tokyo, v. 12, n. 3, p. 211-214, 2005.

YANG, Y. H.; DUDOIT, S.; LUU, P.; LIN, D. M.; PENG, V.; NGAI, J.; SPEED, T.P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. **Nucleic acids research**, London, v. 30, n. 4, p. 1-15, 2002.

YOUNG, A.; BRUMBLEY, S. Ratoon stunting disease of sugarcane: history, management and current research. In: RAO, G.P.; SAUMTALLY, A.S.; ROTT, P. (Ed.). **Sugarcane pathology: bacterial and nematodes diseases**. New York: Enfield Science Publ., 2004. p. 97-124.

YOUNG, A.J.; PETRASOVITS, L.A.; CROFT, B.J.; GILLINGS, M.; BRUMBLEY, S.M. Genetic uniformity of international isolates of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane. **Australasian Plant Pathology**, Clayton, v. 35, n. 5, p. 503–511, 2006.

YU, L.; CASTILLO, L.P.; MNAIMNEH, S.; HUGHES, T.R.; BROWN, G.W. A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 17, n. 11, p. 4736–4747, 2006.

WALTERS, D. Resistance to plant pathogens: possible roles for free polyamines and polyamine catabolism. **New Phytologist**, Malden, v. 159, n. 1, p. 109-115, 2003.

WANG, L.; TSUDA, K.; SATO, M.; COHEN, J.D.; KATAGIRI, F.; GLAZEBROOK, J. *Arabidopsis* CaM binding protein CBP60g contributes to MAMP-induced SA accumulation and is involved in disease resistance against *Pseudomonas syringae*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 2, p. 1-14, 2009.

WANG, X.; BASNAYAKE, B.M.V.S.; ZHANG, H.; LI, G.; LI, W.; VIRK, N.; MENGISTE, T.; SONG, F. The *Arabidopsis* ATAF1, a NAC transcription factor, is a negative regulator of defense responses against necrotrophic fungal and bacterial pathogens. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 22, n. 10, p. 1227-1238, 2009.

WEISSHAAR, B.; JENKINS, G.I. Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 1, n. 3, p. 251–257, 1998.

WU, Q.; XU, L.; GUO, J.; SU, Y.; QUE, Y. Transcriptome profile analysis of sugarcane responses to *Sporisorium scitaminea* infection using solexa sequencing technology. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, p. 1-9, 2013.

WYSOCKA-DILLER, J.W.; HELARIUTTA, Y.; FUKAKI, H.; MALAMY, J.E.; BENFEY, P.N. Molecular analysis of SCARECROW function reveals a radial patterning mechanism common to root and shoot. **Development**, Cambridge, v. 127, n. 3, p. 595-603, 2000.

ZAHUR, M.; MAQBOOL, A.; IFRAN, M.; BAROZAI, M.Y.; RASHID, B.; RIAZUDDIN, S.; HUSNAIN, T. Isolation and functional analysis of cotton universal stress protein promoter in response to phytohormones and abiotic stresses. **Molecular Biology**, New York, v. 43, n. 4, p. 628-635, 2009.

ZEKARIAS, Y.; YIREFU, F.; BAISSA, T.; TAFESSE, A.; MENGISTU, L. Effect of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* concentration on yields of four sugarcane varieties in the sugarcane plantations of Ethiopia. **Ethiopian Journal of Science and Technology**, Bahir Dar, v. 3, n. 2, p. 25-30, 2012.

ZHANG, Z.L.; OGAWAB, M.; FLEETA, C.M.; ZENTELLAA, R.; HUA, J.; HEOC, J.O.; LIMC, J.; KAMIYAB, Y.; YAMAGUCHIB, S.; SUNA, T. SCARECROW-LIKE 3 promotes gibberellin signaling by antagonizing master growth repressor DELLA in *Arabidopsis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 108, n. 5, p. 2160-2165, 2011.

ZHONG, R.; DEMURA, T.; YEA, Z.H. SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. **Plant Cell**, Rockville, v. 18, n. 11, p. 3158–3170, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continua)

SAS	Functional category	Group	Gene	30 DAI	60 DAI
SCEQRT2026F02.g	Cell cycle	1	Structural maintenance of chromosome 2	0,41	
SCCCCL4005H10.g			Structural maintenance of chromosome 4	0,35	
SCRFAM1026H03.g			Cyclin1	0,37	
SCJLLR2013B12.g			Minichromosome maintenance protein 3 - 3	0,36	
SCCCRZ1C01E03.g			Minichromosome maintenance protein 4	0,35	
SCEPCL6029D04.g			cyclin B	0,29	
SCACLR1128F01.g			Microtubule-associated protein RP/EB family member 3	0,38	
SCJFRZ2006F07.g			Mitotic spindle checkpoint protein MAD2	0,40	
SCJLLR1103B02.g			Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase superfamily protein	0,32	
SCEPAM1023G10.g			Mitotic spindle checkpoint component MAD3	0,35	
SCACLR1057B10.g			Cyclin-dependent protein kinase CDKB1;1	0,41	
SCACAM2042F03.g			Cyclin A	0,33	
SCJLLR1033H06.g			cyclin B2	0,37	
SCSGHR1071A09.g			Non-SMC condensin I complex subunit H	0,36	
SCUTLR1058G02.g			Cyclin III	0,34	
SCBFAM2021A04.g			Kinesin-like protein	0,35	
SCQGLR1019E01.g			Microtubule-associated protein RP/EB family	0,39	
SCRLAM1013A12.g			65-kDa microtubule-associated protein 5	0,33	
SCUTHR1065C09.g			Syntaxin-related protein KNOLLE	0,36	
SCEQLR1029C07.g			Targeting protein for Xklp2	0,43	
SCCCLB1023D02.g			Minichromosome maintenance protein 5	0,38	
SCVPLB1016G07.g			Patellin-5	0,44	
SCCCLR1C05C04.g			Minichromosome maintenance protein 7	0,36	0,28
SCJLRZ1023B07.g			Minichromosome maintenance protein 2	0,39	0,29
SCEPCL6029A03.g			Minichromosome maintenance protein 6 - 2	0,32	0,27
SCCCLR1072B11.g			Minichromosome maintenance protein 3 - 1	0,34	0,29
SCEZRZ1012E01.g			Mini-chromosome maintenance complex-binding protein-like	0,39	0,27
SCMCRT2086D06.g			Chromatin assembly factor 1 subunit B	0,45	0,30
SCEPCL6019G04.g			Condensin subunit 1		0,32
SCCCLR2002B11.g			Minichromosome maintenance protein 3 - 2		0,30
SCCCRZ2003E03.g			Centromeric protein E		0,34
SCUTFL3075D03.g			Type A cyclin		0,30
SCVPHR1090D08.g			Minichromosome maintenance protein 6 - 1		0,29
SCEPAM1018H01.g	Cytoskeleton	1	kinesin		0,42
SCACLR1127F03.g			Kinesin-4	0,33	
SCJLRT2050F05.g			Kinesin family member C2/C3	0,40	
SCCCRZ1C01E04.g			125 kDa kinesin-related protein - 2	0,48	

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)				
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI 60 DAI
SCCCCL3001D11.g	Cytoskeleton	1	Microtubule-associated protein TORTIFOLIA1-like	0,38
SCRLAM1009B07.g			Microtubule binding protein Tangled1	0,46
SCJLFL1052C01.g			125 kDa kinesin-related protein - 1	0,39
SCCCLB1002E02.g	DNA metabolism	1	Phosphoribosyltransferases	0,40
SCRFLR2038C05.g			Histone H4 - 1	0,46
SCJFRZ1006B02.g			Transcription factor A mitochondrial	0,34
SCRFAM1028B07.g			Transcription factor jumonji (jmc) domain-containing protein	0,41
SCCCLB1004H09.g			DNA repair protein RAD51 homolog A	0,37
SCCCLR2002D04.g			Histone H4 - 2	0,35
SCCCLR2C02C12.g			Histone H2A - 2	0,39
SCBGLR1002A12.g			DNA topoisomerase II	0,34
SCVPRZ2036F02.g			Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit - 2	0,39 0,32
SCJFST1011F10.g			DNA polymerase III	0,34
SCMCLR1125B04.g			Origin recognition complex subunit 6	0,25
SCEQAM2037D06.g			Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit - 1	0,28
SCCCLR1C02F08.g			Replication protein A 32 kDa subunit	0,28
SCRUFL1021B04.g			Histone acetyltransferase type B	0,34
SCVPFL1140D05.g			DNA repair helicase RAD5	0,23
SCBFST3135H08.g			Histone H2A - 1	0,32
SCEZLB1005H06.g	Defense	1	Defensin	0,36
SCCCLR1C03F08.g			LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase ERECTA	0,29
SCRLFL1005F10.g	Lipid metabolism	1	Anter-specific proline-rich protein APG	0,35
SCSGHR1068B07.b			GDSL esterase/lipase	0,24
SCVPRZ2038F04.g	Nucleotide metabolism	1	Omega-3 fatty acid desaturase - 1	0,34
SCEZAM2031E09.g			Deoxyuridine 5'-triphosphate nucleotidohydrolase	0,41
SCRLAM1010C03.g	Others	1	Protein CHUP1 chloroplastic-like	0,39
SCEPCL6023E10.g			EH domain containing protein	0,37 - 1,35
SCSBAD1052E10.g			ATP binding protein	0,44
SCCCFL5062D05.g			Tetratricopeptide repeat domain - 1	0,32
SCEPAM2012H05.g			OB fold nucleic acid binding domain containing protein	0,42
SCJLLR1104H07.g			Early nodulin-like protein 3-like	0,26
SCBGLR1114H02.g			Lamin-like protein	0,38 0,26
SCEPAM2015E05.g			Plantacyanin	0,43 0,39
SCQSFL1123E07.g			Aldehyde dehydrogenase family protein	0,26

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)				
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI 60 DAI
SCCCAD1001F12.g	Others	1	RAD3-related DNA helicase	0,28
SCSGFL1079D12.g			Cyclopropane fatty acyl phospholipid synthase	0,18
SCCCRZ2003H11.g	Protein metabolism	1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 I	0,43
SCRLAM1006G07.g			E3 ubiquitin-protein ligase SINAT3-like	0,46
SCSFAD1107B01.g			DnaJ/Hsp40	0,38 0,32
SCBFLR1039G02.g	Signal transduction	1	Serine/threonine-protein kinase - 2	0,48
SCQSLR1061C02.g			Rac GTPase activating protein - 1	0,37
SCRUFL1112G02.b			Serine/threonine-protein kinase - 1	0,37
SCCCAM2004F12.g			Protein kinase domain containing protein	0,37
SCJLFL4099D04.g			Rac GTPase activating protein - 2	0,33
SCCCLR2003E06.g			Protein kinase	0,37
SCQSLR1040B09.g	Transcription regulation	1	ISWI chromatin remodeling complex ATPase ISW1 - 2	0,41
SCEQAM2039A10.g			Scarecrow-like protein	0,34
SCJFAM1066A06.g			ISWI chromatin remodeling complex ATPase ISW1 - 3	0,37
SCSGFL1079A03.g			Tesmin/TSO1-like CXC domain - 2	0,48
SCBFLR1039G11.g			Tesmin/TSO1-like CXC domain - 1	0,34
SCQGFL4078E12.g			Calmodulin binding protein	0,35
SCJFRZ2031F06.g			Heat stress transcription factor B-4b	0,44
SCJLRZ1020B01.g			Growth-regulating factor 3	0,32
SCCCFL4089D04.g			DNA polymerase alpha subunit B	0,30
SCAGCL6012F06.g			Homeobox-leucine zipper protein ROC3	0,26
SCJFLR1013F11.g			Histone chaperone ASF1	0,28
SCQSLR1061H12.g	Transport	1	Charged multivesicular body protein 2A	0,40
SCRFHR1006A11.g			Peptide transporter PTR2	0,32
SCCCLB1026C11.g	Transposable element-related	1	Transposon protein	0,30
SCAGLR2033H02.g	Unknown	1	Oleosin Zm-I 16 kDa	0,27
SCBGLR1096F11.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g034460	0,43
SCRLAD1136F04.g			Uncharacterized LOC100831114	0,39
SCJLFL1054B04.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_06g023300	0,45
SCRUFL4020B03.g			Uncharacterized protein DDB_G0287975	0,46
SCCCLR1066B11.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g037720	0,40
SCRLFL1004F10.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g007940	0,42
SCEPAM1021B02.g			Proteophosphoglycan 5	0,37
SCQGLR2032B01.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g042590	0,40

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)				
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI 60 DAI
SCSGAM2075E07.b	Unknown	1	Hypothetical protein SORBIDRAFT_05g001370	0,35
SCMCCL6027E12.g			Unknown - 4	0,32
SCSGFL1083D07.g			hypothetical protein SORBIDRAFT_05g022560	0,33
SCUTRZ2023G10.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g027980	0,37
SCBGLR1027F10.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g002670	0,56
SCVPLR2012B02.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g008530	0,37
SCCCFL8001C08.g			Hypothetical protein ZEAMMB73_516122	0,38
SCBFLR1005H01.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g006350	0,35
SCBGAM1093E09.g			Uncharacterized LOC100838770	0,34 1,79
SCBGFL5077B07.g			Unknown - 3	0,29 0,28
SCPIRT3021H05.g	Carbohydrate metabolism	2	Glucosyltransferase	0,26
SCCCLB1021E06.g			Granule-bound starch synthase	0,34
SCCCFL5096D07.g	Transcription regulation	2	Transcription factor PCF5	0,20
SCJFLR1013D05.g			Homeobox-leucine zipper protein ROC1	0,32
SCEPAM1018C05.g			Transcription factor PCF7	0,30
SCCCAD1003G07.g			Homeobox-leucine zipper protein ROC7	0,32
SCSGFL5C03H04.g			ISWI chromatin remodeling complex ATPase ISW1 - 1	0,23
SCRFLR1034G09.g			Serine/arginine repetitive matrix protein 1	0,31
SCACLR1130H08.g			Zinc finger protein - 2	0,21
SCRURT3061D05.g			Transcription factor bHLH61	0,25
SCEPAM2013B12.g	Transport	2	Peroxisomal membrane protein	0,34
SCCCLB1003E01.g	Unknown	2	Cortical cell-delineating protein	0,28 0,15
SCVPAM1055E12.g			SelT/selW/selH selenoprotein domain containing protein	0,35
SCBFFL1144D08.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g040750	0,22
SCSGFL5C03A09.g			Uncharacterized LOC100823323	0,28
SCQGLB1029D12.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g007160	0,25
SCEPAM1017A12.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g008000	0,34
SCBFSB1045A05.g			Hypothetical protein ZEAMMB73_084392	0,25
SCCCFL4089H04.g			Unknown - 1	0,27

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)				
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI 60 DAI
SCVPFL1138B04.g	Cell wall / membrane / envelop biogenesis	3	4-coumarate-CoA ligase	0,50
SCJFRZ2025E05.g	Defense	3	Thaumatococcus-like protein	0,48
SCQSRT1035D12.g			Protease inhibitor	12,86
SCRURT2010A08.g	Transport	3	Mitochondrial 2-oxoglutarate/malate carrier protein-like	0,48
SCAGLR1064B08.g	Transcription regulation	3	AP2/EREBP - 4	0,32
SCJLLR1011D09.g	Aminoacid metabolism	4	Arogenate dehydratase / prephenate dehydratase 6	18,20
SCEZRZ1012F05.g			Methylenetetrahydrofolate reductase 1	7,11
SCMCST1049H08.g			Nicotianamine synthase 3	10,91
SCCCFL4002D04.g	Carbohydrate metabolism	4	Glucose-1-phosphate adenylyltransferase small subunit	8,12
SCCCRZ1003C03.g			Acid phosphatase 1 precursor	24,81
SCMCRT2089E02.g			Pyruvate decarboxylase	21,62
SCMCRZ3065A12.g	Cell wall / membrane / envelop biogenesis	4	Fucosyltransferase	6,35
SCJLRT1006H05.g	Defense	4	Leucine-rich repeats (LRRs)	8,48
SCEPRZ3047D01.g			LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	8,20
SCSGAM1094D05.g			Phenylalanine ammonia-lyase	67,44
SCCCCL2001D02.b	Detoxification	4	Peroxidase - 2	13,59
SCCCCL5002F03.g			Cytochrome P450	417,29
SCSBSD1033E10.g			Peroxidase - 4	4,96
SCCCCL4015G04.g			Peroxidase - 3	10,96
SCQSLR1061C11.g	DNA metabolism	4	MATE efflux family protein 1	16,47
SCSFRT2070A10.g	Hormone metabolism	4	Oxidoreductase, 2OG-Fe oxygenase family protein	4,31
SCRFRZ3058E03.b			Abscisic acid 8-hydroxylase 1	12,47
SCQGAM2028D11.g			ACC synthase 2	70,10
SCCCLR1022A02.g			ACC oxidase	178,14
SCCCCL3002B05.b			Indole-3-acetic acid-amido synthetase GH3.8	9,84
SCCCLR1048H03.g			9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase	5,47
SCCCRT1001E01.g			Lipoxygenase	7,38 9,54
SCQSLR1089H10.g	Lipid metabolism	4	Lipid binding protein	6,86
SCEPAM2054B05.g			Phosphatidylinositol ceramide inositolphosphotransferase	10,49

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)					
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI	60 DAI
SCSBAM1085B06.g	Lipid metabolism	4	Omega-3 fatty acid desaturase - 2		5,05
SCMCRT2086A02.g	Nucleotide metabolism	4	Phosphoribosylglycinamide synthetase		9,81
SCAGLR2011D02.g	Others	4	NADPH Respiratory burst oxidase homolog protein B		16,78
SCCCCL3002F05.b			Tetratricopeptide repeat domain - 2		10,72
SCBFAM2117B08.g			Alcohol dehydrogenase 1		14,18
SCCCCL3001B07.b			Pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase - 1		5,60
SCEZRZ1014A06.g			Haloacid dehalogenase-like hydrolase		12,71
SCEZST3151H02.g			Pyrophosphate-fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase - 2		29,88
SCQSST1037D10.g			Universal stress protein A		8,64
SCJFRT1008C09.g			3-ketoacyl-CoA synthase		7,43
SCCCCL3004A08.b			Early nodulin 93		26,78
SCJFRT1010E08.g			3'-N-debenzoyl-2'-deoxytaxol N-benzoyltransferase		8,96
SCQSRT1035G12.g			Universal stress protein (USP) family		11,73
SCJFRT1010D11.g			3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase 1		8,35
SCVPRZ2040D09.g			Pectinesterase		9,98
SCRLLR1059F03.g	Protein metabolism	4	Ubiquitin conjugating enzyme UBC9A		5,37
SCAGLB2046F01.g			Trypsin inhibitor		6,34
SCSBRZ2021F12.g			Basic 7S globulin		12,82
SCJFRZ2009E12.g			Protease		17,79
SCRLLC6030H11.g			Pyrrolidone carboxylate peptidase family protein		7,65
SCBGLR1115B08.g	Signal transduction	4	Receptor Ser/Thr kinase - 1		4,34
SCJLRT1006B11.g			Mitogen-activated protein kinase kinase kinase A		17,93
SCMCRT2108E08.g			Receptor-like protein kinase - 1		5,53
SCRUHR1074H12.g			L-type lectin-domain containing receptor kinase IX.1		5,60
SCEQLB2020F07.g			Receptor-like protein kinase - 2		13,19
SCCCLR1075G12.g			Leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase		7,83
SCCCLR2C02G01.g			Calcium dependent protein kinase		5,42
SCBFRT3095E07.g			Receptor Ser/Thr kinase - 4		27,21
SCVPFL3046E09.b			Zinc(II) purple acid phosphatase		5,55
SCCCCL4005C09.g			Light-inducible protein CPRF2		6,17
SCCCCL3120A10.b			Auxin response factor 12		5,96
SCBFAD1045F11.g			Receptor Ser/Thr kinase - 3		5,81
SCCCRT1001B08.g			Receptor Ser/Thr kinase - 2		9,99

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)				
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI 60 DAI
SCJFRZ2015H10.g	Signal transduction	4	L-type lectin-domain containing receptor kinase IX.1-like	6,87
SCQSHR1023B08.g	Transcription regulation	4	AP2/EREBP - 2	2,49
SCAGLR1021G10.g			Protein Knotted1	51,91
SCJFRZ2015E01.g			Jasmonate ZIM motif family protein	3,05
SCCCCL4002B07.g			AP2/EREBP - 3	11,84
SCVPRT2073F02.g			AP2/EREBP - 1	14,96
SCCCLR1068A11.g			Ethylene-responsive transcription factor	5,30
SCJFRT1060C03.g			Ribonuclease H protein	16,62
SCRLAD1097D12.g			Zinc finger protein - 1	8,61
SCVPLR2027D09.g			PLATZ transcription factor	10,38
SCQGST1032D08.g			MYB-like protein	5,62
SCCCRZ1004G12.g			NAC-domain containing protein	6,23
SCCCLR2004B09.g			Transcription factor bHLH96-like	6,57
SCCCCL4001A01.g			WRKY transcription factor	13,96
SCJFRZ2014D05.g	Transport	4	Nodulin-like protein	5,04
SCEQRT1024C07.g			Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump	13,41
SCCCAM1073C01.g			Potassium channel AKT1	6,36
SCCCRT2002G08.g			Sugar transporter SWEET14	11,50
SCSGHR1066C01.g			Sugar transporters	9,55
SCQSHR1020H10.g			Peptide/nitrate transporter	4,06
SCAGLR2018G04.g			RING-H2 finger protein ATL1R	7,52
SCACLR1057A09.g			Copper-exporting ATPase	6,08
SCSFLL4086H05.g			Potassium transporter 1	11,54
SCVPRT2075B11.g	Unknown	4	Vegetative cell wall protein gp1	2,85
SCACRZ3109B12.g			Hypothetical protein	5,91
SCACSD2014F07.g			SORBIDRAFT_06g018810	
SCRLRZ3114C04.g			Unknown - 7	9,46
SCRLLR1110H11.g			Hypothetical protein	8,84
SCSGLV1008C08.g			SORBIDRAFT_07g019990	
SCRURT2006H09.g			2-aminoethanethiol dioxygenase	5,41
SCRUAD1063A04.g			Unknown - 11	7,54
SCQGRZ3014E06.g			Uncharacterized LOC100846035	8,83
SCJFRZ3C04A01.g			Hypothetical protein	5,68
			SORBIDRAFT_01g007470 - 2	
			Hypothetical protein	7,81
			SORBIDRAFT_01g032580	
			Unknown - 6	9,25
			Hypothetical protein	9,53
			SORBIDRAFT_08g016800	
			Hypothetical protein	12,12
			SORBIDRAFT_03g031090	

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(continuação)					
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI	60 DAI
SCSGLV1008B03.g	Unknown	4	Flowering-promoting factor 1-like protein 1	11,42	
SCQSRT2035D11.g			Hypoxia-responsive family protein	7,53	
SCJFLR1073A01.g			Metal ion binding protein	12,89	
SCAGRT2041E02.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g007470 - 1	4,86	
SCQGSD1048C09.g			Unknown - 5	9,08	
SCRFAD1023D02.g			Hypothetical protein ZEAMMB73_392643	11,20	
SCUTRZ3070F02.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_02g031530	9,88	
SCQSLR1090F02.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_01g001260	15,95	
SCMCLR1010D01.g			Polyprotein	13,43	
SCRURT2006B11.g			Unknown - 9	13,38	
SCBGRT1047A08.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g026010	6,64	
SCCCLR1078E02.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_04g031500	11,41	
SCJLRT1023H11.g			Unknown - 8	7,32	
SCJFSB1011G12.g			Unknown - 10	7,07	
SCCCST2004G03.g			Hydroxyproline-rich glycoprotein 1	8,42	
SCQGLR2017A03.g			36.4 kDa proline-rich protein	15,67	
SCQGAD1065H07.g			Auxin-inducible protein	5,95	
SCEQRT2027C06.g			Wound induced protein	10,18	
SCEZRZ3050H04.g			Hypothetical protein ZEAMMB73_013833	15,50	
SCACLR1129A10.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_03g039730	22,95	
SCCCCL3003C03.b			VQ motif family protein	9,72	
SCCCLR1069H11.g	Aminoacid metabolism	5	Methionine synthase	7,69	
SCJFRT1060F11.g	Carbohydrate metabolism	5	Pyruvate phosphate dikinase	2,67	
SCACCL6009A08.g	Cell wall / membrane / envelope biogenesis	5	Cellulose synthase-like protein H1-like	2,54	
SCCCLR1066D07.g	Defense	5	Glycine-rich cell wall structural protein	3,70	
SCCCCL3002F08.b	Detoxification	5	Peroxidase - 1	3,36	
SCAGRT3046D01.g	Hormone metabolism	5	CYP88A8 cytochrome P450	2,68	
SCUTLR2008F03.g	Lipid metabolism	5	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 1	3,07	
SCQGLR2025A05.g	Others	5	Adenylate kinase	2,89	
SCCCFL1097H04.g	Signal transduction	5	WD40-like beta propeller repeat family protein	6,48	

Tabela A1 – Genes diferencialmente expressos em plantas inoculadas em relação as não inoculadas com Lxx aos 30 e 60 DAI. Na tabela os genes estão representados por seus respectivos SAS, categoria funcional, grupo do heat map, nome do gene e razão de expressão

(conclusão)				
SAS	Functional category	Group	Protein name	30 DAI 60 DAI
SCQSLR1090A05.g	Transcription regulation	5	Ethylene-responsive transcription factor 4	3,73
SCSGLV1009H10.b			Ribonuclease T2	4,00
SCSFSD1066D10.g	Translation	5	Translation initiation factor IF-2	3,43 0,41
SCCCCL4004D08.g	Transport	5	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit k	2,92
SCEPSD2005D11.g	Unknown	5	NADH dehydrogenase I subunit M	2,90
SCCCCL4001D06.g			phi-1-like phosphate-induced protein	6,72 16,93
SCQGHR1011A04.g			O-acyltransferase WSD1-like	3,13
SCUTLR1058H04.g			Unknown - 2	4,86
SCJFRT1061G09.g			Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase	3,14
SCJLLR2013D11.g			Hypothetical protein SORBIDRAFT_09g008890	4,69
SCBGLR1114D06.g			Hypothetical protein LOC100275145 precursor	2,69 0,41