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

**Análise temporal da expressão gênica e atividade enzimática,
relacionadas ao estresse oxidativo e proteômica de *Eucalyptus
grandis* inoculados com *Puccinia psidii***

Ivan Miletovic Mozol

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

**Piracicaba
2013**

Ivan Miletovic Mozol
Biólogo

**Análise temporal da expressão gênica e atividade enzimática,
relacionadas ao estresse oxidativo e proteômica de *Eucalyptus*
grandis inoculados com *Puccinia psidii***

Orientador:
Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO LABATE**

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

**Piracicaba
2013**

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

Mozol, Ivan Miletovic

Análise temporal da expressão gênica e atividade enzimática, relacionadas ao estresse oxidativo e proteômica de *Eucalyptus grandis* inoculados com *Puccinia psidii* / Ivan Miletovic Mozol.- - Piracicaba, 2013.
121 p: il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2013.

1. Eucalipto 2. Ferrugem 3. PCR em tempo real 4. Proteoma I. Título

CDD 634.9734
M939a

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

*À minha família e
à todos aqueles que,
de alguma forma,
fazem parte da minha vida.*

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Carlos Alberto Labate pela oportunidade e orientação.

Às pessoas mais importantes para mim - pai, mãe, Tael, Carola e Rico – que apesar de não terem me ajudado diretamente, indiretamente sempre me deram apoio e torceram para tudo isso dar certo.

Aos amigos Felipinho e Ilarinha pela amizade e por toda ajuda e paciência durante todo o trabalho.

À Camilinha, que mesmo distante, se mantém sempre presente, me dando conselhos e me fazendo rir.

À Juliana pelas risadas e descontrações no laboratório, mesmo nos momentos difíceis, e pela grande amizade.

À Thaís pelas inúmeras tentativas de ressuscitar o Synapt para sequenciar minhas proteínas o mais rápido possível.

À Marisângela por toda ajuda nos processos mais chatos deste trabalho.

A toda galerinha do laboratório Max Feffer, que de alguma forma me ajudaram neste trabalho (Carolzinha, Mônica, Lívia, Anas Paulas, Fabrício, Andressa, Mariana, Hana, Janaína, Fernando, Simone e todos os outros que não me lembro agora).

A todos meus amigos da vida, que pelo fato de fazerem parte da minha vida, me ajudaram muito a passar por essa fase (Lucas Lopes, Bruno Weiss, Letícia Grego, Fernandinho, Amanda, Thiago e Fernando, Cí-joga, Renatinha, Fúvia, Rafa, Denise, Guilherme Vilela, Aline Vilela, Quelzinha, Gui Efraim).

A todos meus amigos de dança, que me fazem muito feliz (Lucy, Patrick, Márcio, Aline...).

À Fapesp pelo apoio financeiro.

“O sucesso é ir de fracasso em fracasso sem perder o entusiasmo.”
Winston Churchill

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	13
LISTA DE FIGURAS	15
1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVO.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 O eucalipto e sua importância	21
3.2 <i>Puccinia psidii</i>	21
3.3 Espécies Ativas de Oxigênio e a resposta de defesa da planta a patógenos	23
3.4 O estudo do proteoma.....	24
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Material Vegetal	25
4.2 Coleta dos uredósporos de <i>P. psidii</i> e inoculação do material vegetal.....	25
4.3 Análises de expressão gênica.....	26
4.3.1 Confeção de <i>primers</i>	26
4.3.2 Extração de RNA.....	26
4.3.3 Síntese de cDNA.....	26
4.3.4 RT-qPCR.....	27
4.4 Análise de atividade enzimática	27
4.4.1 Preparo do extrato enzimático.....	27
4.4.2 Quantificação proteica do extrato enzimático.....	27
4.4.3 Análise de Superóxido Dismutase (SOD) em PAGE.....	27
4.4.4 Atividade de Ascorbato Peroxidase (APX)	28
4.5 Análise de Proteoma	28
4.5.1 Extração proteica	28
4.5.2 Quantificação proteica.....	29
4.5.3 Verificação de qualidade do extrato proteico.....	29
4.5.6 Dessalinização das amostras.....	29
4.5.7 Digestão de amostra complexa	30
4.5.8 Purificação.....	30
4.5.9 LC-MS/MS.....	30

4.5.10 Análise dos dados.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1 Avaliação dos sintomas	33
5.2 Confeção de <i>primers</i> e determinação da temperatura de anelamento	33
5.3 Análise de expressão gênica	35
5.3.1 Quitinase.....	35
5.3.2 Ascorbato Peroxidase.....	36
5.3.3 Catalase.....	37
5.3.4 Glutathione Redutase	39
5.3.5 Superóxido dismutase	40
5.3.5.1 Mn Superóxido dismutase	40
5.3.5.2 Cu/Zn Superóxido dismutase.....	41
5.3.5.3 Fe Superóxido dismutase.....	43
5.4 Atividade Enzimática.....	45
5.4.1 Ascorbato Peroxidase.....	45
5.5 Análise de proteômica	46
5.5.1 Extração e quantificação proteica	46
5.5.2 SDS-PAGE	47
5.5.3 Identificação por espectrometria de massas.....	50
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69
REFERÊNCIAS	71
ANEXO	79

RESUMO

Análise temporal da expressão gênica e atividade enzimática, relacionadas ao estresse oxidativo e proteômica de *Eucalyptus grandis* inoculados com *Puccinia psidii*

A floresta plantada de eucalipto representa a maior porcentagem entre as florestas plantadas no Brasil, principalmente para a produção de papel e celulose. Porém, durante todo o seu desenvolvimento, o eucalipto sofre o ataque de diferentes patógenos, e entre eles está o fungo *Puccinia psidii* causador da ferrugem, principal doença do eucalipto em regiões tropicais. Assim, com o intuito de estudar alguns mecanismos de defesa da planta contra a infecção do fungo, este trabalho visou analisar a expressão gênica de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo e a atividade das mesmas; e o proteoma de clones de eucalipto resistentes e suscetíveis, ao longo do processo de infecção, colonização e multiplicação do fungo nas plantas. Foi possível observar diferenças na expressão dos genes em todos os horários estudados, principalmente às 24 horas após inoculação com o fungo. Além disso, com a análise do proteoma pode-se observar algumas proteínas de grande relevância para este trabalho, como algumas relacionadas a estresse oxidativo e a resposta de defesa da planta.

Palavras-chave: Eucalipto; Ferrugem; PCR em tempo real; Proteoma

ABSTRACT

Temporal analysis of gene expression and enzyme activity related to the oxidative stress, and proteomics of *Eucalyptus grandis* inoculated with *Puccinia psidii*

The eucalyptus planted forest represents the major percentage among all planted forests in Brazil, mainly for the production of paper and cellulose. However, during its development, the eucalyptus can be attacked by a large number of different pathogens, like the fungus *Puccinia psidii*, the causer of the eucalyptus rust, main disease that affects the eucalyptus in tropical regions. Thus, in order to study some plant defense mechanisms against the infection of the fungus, this study aimed to analyse the gene expression of some enzymes related to oxidative stress and their activities, and the proteome of resistant and susceptible eucalyptus clones, during the process of infection, colonization and multiplication of the fungus in the plant. We could observe differences in the gene expression at all times studied, mostly at 24 hours after inoculation with the fungus. Besides, with the proteome analysis we could find the very relevant proteins for this study, for instance some proteins related to the oxidative stress and to the plant defense response.

Keywords: Eucalyptus; Rust; Real Time PCR; Proteome

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação dos sintomas	33
Figura 2 – Teste para determinação da temperatura de anelamento.....	34
Figura 3 – Expressão relativa da quitinase	35
Figura 4 – Expressão relativa da APX	36
Figura 5 – Expressão relativa da catalase.....	38
Figura 6 – Expressão relativa de GR.....	39
Figura 7 – Expressão relativa de Mn SOD.....	41
Figura 8 – Expressão relativa de Cu/Zn SOD.....	42
Figura 9 – Expressão relativa de Fe SOD.....	44
Figura 10 – Gel SDS PAGE I.....	48
Figura 11 – Gel SDS PAGE II.....	48
Figura 12 – Gel SDS PAGE III.....	49
Figura 13 – Gel SDS PAGE IV.....	49
Figura 14 – Proteínas zero h.a.i.....	50
Figura 15 – Proteínas 6 h.a.i.....	52
Figura 16 – Proteínas 12 h.a.i.....	55
Figura 17 – Proteínas 18 h.a.i.....	58
Figura 18 – Proteínas 24 h.a.i.....	62
Figura 19 – Proteínas 72 h.a.i.....	65

1 INTRODUÇÃO

As florestas representam uma importante fonte de recursos renováveis, e as florestas plantadas de produção destacam-se por representarem a principal fonte de suprimento de madeira das cadeias produtivas de importantes segmentos industriais, como papel e celulose, móveis, carvão vegetal, entre outros (ABRAF, 2012). A madeira é o quinto produto, em ordem de importância, do comércio mundial (PLOMION et al. 2001) e no Brasil esse setor além de gerar produtos para consumo direto e exportação, gera impostos e emprego para a população (ABIMCI, 2009). Os estados de São Paulo e Minas Gerais possuem as maiores áreas de floresta planta no Brasil, totalizando 40,9% de toda área do setor no país (ABRAF, 2012).

No Brasil, as florestas plantadas de eucalipto são a principal fonte de madeira e as empresas detentoras dessas florestas adotam avançados padrões de manejo, atingindo reconhecimento mundial com os resultados de melhoramento genético (ABRAF 2012). Atualmente, grande parte das florestas plantadas de eucalipto é proveniente de plantios clonais de alta produtividade com adaptação e tolerância a fatores bióticos e abióticos. Devido a esses trabalhos de melhoramento genético, a produção de madeira das florestas de eucalipto, em m³, triplicou nos últimos 30 anos (ABRAF, 2006).

Dessa forma, fica clara a importância das florestas plantadas de eucalipto para a economia brasileira. Sendo assim, espera-se que as plantações sejam as mais produtivas possíveis para suprir as necessidades de mercado, com um valor economicamente viável. Entretanto, ataques de fitopatógenos podem causar prejuízos em seu desenvolvimento, diminuindo, em muitos casos, drasticamente sua produção como é o caso da ferrugem causada por *Puccinia psidii* Winter, a qual ataca órgãos tenros da planta, e apesar de geralmente não mata-la, pode causar grande redução no desenvolvimento do vegetal (LEITE, 2012), indicando que o fungo traz grandes prejuízos à planta; e isso, em grande escala, poderia causar grandes danos à economia do país.

Portanto, estudos sobre a interação planta-patógeno – no patossistema eucalipto-*Puccinia* - tem grande relevância tanto para a seleção de plantas resistentes, quanto para que se consiga fazer cruzamentos para a introdução de resistência, em clones de boa produção, mas com alta suscetibilidade ao patógeno.

Em relação aos poucos estudos já realizados quanto aos mecanismos de resistência de *Eucalyptus* à *P. psidii*, Moon *et al.* (2007), por meio da técnica SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), demonstraram o perfil diferenciado da expressão gênica entre *Eucalyptus grandis* suscetíveis e resistentes expostos ao fungo da ferrugem. Dentre os diferencialmente expressos, genes relacionados ao estresse oxidativo, como a superóxido dismutase e catalase, foram mais expressos em plantas suscetíveis, bem como genes relacionados com a produção de quitinases. Entretanto detalhes da expressão desses genes, ao longo do processo de infecção de *E. grandis* por *P. psidii*, continua sendo uma incógnita. Assim, com este trabalho, pretendeu-se saber se há diferenças na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo entre plantas resistentes e suscetíveis; se há diferença, como ela varia nos diferentes horários de desenvolvimento do fungo na planta; além de verificar se há diferenças no proteoma das plantas infectadas após a inoculação.

2 OBJETIVO

O presente trabalho objetivou estudar os seguintes genes em eucalipto, ao longo do processo de infecção e colonização do fungo, relacionados ao estresse oxidativo: Cu/Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD, Catalase, Peroxidase, Glutathione reductase; e um gene não relacionado ao estresse oxidativo, mas provavelmente importante na defesa da planta, a quitinase.

Para isso, realizamos ensaios bioquímicos para análise de atividade enzimática, e análises de expressão gênica, através da técnica de RT-qPCR.

Ademais, para verificar se houve diferenças no proteoma das plantas ao longo do processo de infecção, colonização e multiplicação do patógeno *Puccinia psidii*, objetivou-se fazer uso da técnica MudPit, utilizada para a separação e identificação de misturas complexas de proteínas e peptídeos, por cromatografia líquida 2D seguida de espectrometria de massas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O eucalipto e sua importância

O gênero *Eucalyptus*, pertencente à família Myrtaceae (sub-família Leptospermoidae), e hoje, através de características fenológicas, como tipo de inflorescência, botão floral e frutos, são conhecidas mais de 700 diferentes espécies de eucalipto (SCHUMACHER et al., 2005), podendo ser encontradas formas arbustivas ou de grande porte.

Devido ao seu rápido crescimento e relativo baixo custo de produção, atualmente a área de floresta plantada de eucalipto e híbridos é de cerca de 4,8 milhões de hectares. Esse material é utilizado para reflorestamento, produção de carvão vegetal, madeira para construção civil e celulose. Além disso, a madeira do eucalipto também é utilizada para fabricação de móveis e lenha; e das folhas podem se extrair óleos essenciais (ABRAF, 2012). A indústria de papel e celulose é responsável pelo plantio de cerca de 1,7 milhões de hectares, produzindo aproximadamente 14 milhões de toneladas de celulose de fibra curta e 9,9 milhões de toneladas de papel, o que representa parte significativa do PIB no país (BRACELPA, 2012). Devido aos projetos de melhoramento e seleção de clones, a produtividade média das espécies de eucalipto aumentou significativamente nos últimos anos e o Brasil está entre os principais produtores mundiais de celulose, sendo considerado referência para o setor, por produzir grande quantidade de celulose em área relativamente pequena (100.000 ha para 1 mi ton. Anual, contra 300.000 ha na península Ibérica e 720.000 ha na Escandinávia).

No entanto, o grande aumento de áreas de monocultura favoreceu o aparecimento de algumas doenças que causam sérios prejuízos à produção de mudas em jardins clonais e áreas reflorestadas, como por exemplo, a ferrugem causada pelo fungo *Puccinia psidii* Winter. Esse fungo parece ter sua origem nas Mirtáceas da América do Sul, sendo muito agressivo para algumas espécies economicamente importantes de *Eucalyptus* spp. (COUTINHO et al., 1998), o que é um dado muito preocupante, pois, atualmente já é encontrado no centro de origem do gênero *Eucalyptus* (CARNEGIE e LIDBETTER, 2012).

3.2 *Puccinia psidii*

Puccinia psidii Winter é um fungo pertencente à família Pucciniaceae, ordem

Uredinales (ferrugens), a qual possui cerca de 160 gêneros e mais de 3000 espécies relatadas, e à classe Basidiomycetes (Urediniomycetes) (ALEXOPOULOS, 1996). Este fungo é o único patógeno conhecido capaz de causar a ferrugem em eucalipto (COUTINHO et al., 1998). Foi primeiramente descrito por Winter (1884) em *Psidium guajava* L., porém, no Brasil, sua primeira descrição foi realizada por JOFFILY (1944); sendo atualmente descrita em várias espécies de mirtáceas, em diversos países das Américas e ilhas caribenhas (RAYACHHETRY et al., 2001).

Mais comumente são relatadas infecções pelo fungo, em plantas jovens com menos de 2 anos de idade, viveiros e jardins clonais, sendo que a ferrugem ataca geralmente órgãos tenros, como primórdios foliares, terminais de galhos e haste principal da planta (FIGUEIREDO, 2001).

Após 2 a 4 dias da infecção com os uredósporos, os primeiros sintomas começam a ser visíveis, sendo que a primeira evidência do ataque é o aparecimento de pequenos pontos amarelos, principalmente na face abaxial das folhas. Após aproximadamente 3 a 5 dias, os pontos evoluem para pústulas cheias de uredósporos, que aumentam de diâmetro com o tempo (FERREIRA, 1983). Em pouco tempo ocorre a liberação dos esporos e infecções secundárias na planta, principalmente em folhas, pecíolos e ramos (FERREIRA, 1983). Por ser um fungo biotrófico, que depende de seu hospedeiro para completar seu ciclo de vida, *P. psidii* raramente mata a planta, porém seus ataques podem ser desastrosos, diminuindo o crescimento das plantas jovens em até 60% (DIANESE et al., 1984).

Os estágios iniciais da doença na planta estão relacionados com a temperatura, umidade e intensidade luminosa durante o processo de infecção (TESSMANN et al., 2001). Para que ocorra a germinação dos esporos, deve haver uma alta umidade, e temperatura entre 15 e 25°C. Exposição à luz nos primeiros estágios da infecção inibe a germinação dos uredósporos (RUIZ et al., 1989).

Atualmente, a forma mais empregada para o controle do patógeno é a utilização de materiais resistentes ou de crescimento rápido, neste caso para que as plantas fiquem menos tempo expostas ao patógeno, já que acima de 2 a 3 metros de altura, o micro clima é desfavorável para o desenvolvimento da doença (ZAUZA, 2007), ou então o plantio em épocas do ano desfavoráveis para a proliferação das doenças. Há alguns fungicidas capazes de controlar o patógeno, porém são mais utilizados em jardins clonais, devido ao seu alto custo (ALFENAS et al., 1989) e

também pela logística de pulverização de grandes áreas com plantas altas.

3.3 Espécies Ativas de Oxigênio e a resposta de defesa da planta a patógenos

As interações planta-patógeno se dividem em dois tipos: as compatíveis (planta suscetível e patógeno virulento) e as incompatíveis (planta resistente e patógeno avirulento) (RESENDE et al. 2003).

As interações incompatíveis induzem uma série de respostas de defesa na planta, as quais levam a um colapso localizado de células, conhecido como reações de hipersensibilidade (HR) (STASKAWICZ et al., 1995). Nessas HR's há a produção de intermediários reativos de oxigênio, conhecidos como "*Reactive oxygen species*" (ROS), como o superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HEGEDUS et al., 2001), entre outros. As ROS são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, porém em grande concentração se tornam tóxicas às células (MOLLER, 2001). Assim, mecanismos de proteção foram sendo desenvolvidos pelas plantas, durante o processo de evolução, para detoxificar as células dessas espécies reativas de oxigênio.(RESENDE et al., 2003).

As enzimas superóxido dismutases e catalases são as enzimas antioxidantes mais eficientes para esse propósito. Enquanto a primeira catalisa a reação de dismutação do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em H_2O_2 e O_2 , a segunda converte esse H_2O_2 em H_2O e O_2 . (YU et al., 2005). Além dessas, outras enzimas têm grande importância na resistência da planta ao estresse oxidativo, como as peroxidases e a glutathione redutase. As peroxidases catalisam a reação entre um agente redutor e H_2O_2 , produzindo um composto oxidado e água, além de ter um papel importante na biossíntese de parede celular (CAMPA, 1991), o que, por sua vez, pode ser um importante mecanismo para barrar a entrada do fungo na planta. A glutathione redutase possui várias funções dentro da célula, porém, quando direcionada aos cloroplastos e mitocôndrias, podem atuar no combate às ROS's, especialmente $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 (GRATÃO, et al. 2005).

As quitinases são enzimas não relacionadas ao estresse oxidativo em eucalipto, porém tem importante papel na resistência destes à *P. psidii*, pois parece ter participação tanto na produção de elicitores fúngicos (MUNCH-GARTHOFF et al., 1997), quanto hidrolisando parede celular fúngica (MOHAMMADI et al., 2002).

3.4 O estudo do proteoma

A proteômica é o estudo em larga escala das proteínas, as verdadeiras efetoras das funções celulares. Envolve o isolamento sistemático, identificação, quantificação e sequenciamento de proteínas em uma organela, célula ou tecido de um organismo, como também a determinação de seu estado de ativação, interação, alteração e suas propriedades através de tecnologias que geram grande quantidade de dados sobre estrutura e sequência com enorme precisão e rapidez, permitindo o estudo de todo o proteoma de um tecido (Celedon, 2006).

O proteoma de uma espécie é muito mais complexo que seu genoma, pois os genes possuem apenas sequências codificadoras, enquanto as proteínas podem ser analisadas de acordo com sequência, estrutura, funções bioquímicas e fisiológicas, localização intra e extracelular, influência de modificações químicas e o mais importante, a interação com outras moléculas. Possui grande importância no estudo de sistemas biológicos complexos e dinâmicos, pois permitem o estudo de um grande número de proteínas que influenciam diretamente na bioquímica celular e fornece uma análise apurada do estado biológico ou mudanças sistêmicas ao longo do crescimento, desenvolvimento e resposta a fatores ambientais (CHEN e HARMON, 2006).

A técnica de eletroforese bidimensional, ainda hoje é o método mais difundido para o estudo do proteoma, porém, devido a problemas de separação de algumas classes proteicas (BAE *et al.* 2003), outras técnicas começaram a ser utilizadas. Uma dessas técnicas é a chamada MudPit, a qual utiliza cromatografia 2D de separação dos peptídeos por duas colunas ligadas em tandem, uma de troca catiônica e uma de fase reversa (YATES *et al.*, 2009), acopladas diretamente em um espectrômetro de massas.

O espectrômetro de massas é um equipamento capaz de medir a relação massa/carga (m/z) de íons no vácuo. A partir disso, é capaz de determinar massas moleculares com muita precisão, permitindo que a composição de uma determinada amostra seja determinada, que no caso da proteômica, se trata de um conjunto de peptídeos provenientes de um grupo de proteínas digeridas (TWYMAN, 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Vegetal

Em testes realizados no laboratório, dois clones, um resistente (R4) e um susceptível (S4) à ferrugem (LEITE, 2012), provenientes de BRASUZ1- clone de *E. grandis* da empresa Suzano Papel e Celulose - foram selecionados para os estudos. Os clones foram mantidos em condições de sombreamento, utilizando sombrite de 50%, sem controle de temperatura e umidade.

4.2 Coleta dos uredósporos de *P. psidii* e inoculação do material vegetal

Os uredósporos de material suscetível M09 (clone muito suscetível à ferrugem) foram coletados com auxílio de um pincel macio. Somente a área das pústulas foi raspada e os uredósporos coletados em placa de Petri. Aos uredósporos foram adicionados 600 mL de água acrescida de 0,5% (v/v) de tween 20, deixados sob agitação branda por 15 minutos. A contagem dos uredósporos foi feita com o auxílio de câmara de Neubauer e a concentração ajustada a 10^5 uredósporos/mL, para ser utilizada como inóculo.

Plantas resistentes e susceptíveis foram acomodadas em uma câmara de crescimento e sobre estas foram aspergidos os 600 mL da solução contendo uredósporos (10^5 uredósporos/mL), aproximadamente 50 mL por planta em ambas as faces das folhas dos clones. As plantas foram cobertas com sacos plásticos transparentes para manter a umidade satisfatória nas superfícies foliares, e então mantidas no escuro por 24 horas a 19°C ($\pm 2^\circ\text{C}$). Decorrido esse período, as mudas foram submetidas à luminosidade com fotoperíodo de 12 horas de luz ($170 \mu\text{mol}$ s de fótons fotossinteticamente ativos $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e 12 horas de escuro. Em seguida, as mudas foram descobertas durante o período de luz e cobertas durante o período de escuro, sendo irrigadas duas vezes ao dia com água e solução nutritiva comercial (2g/L), tomando-se o cuidado de não molhar as folhas inoculadas.

Para a execução dos experimentos de expressão gênica e atividade enzimática, foram coletadas folhas das plantas, nos intervalos de 0, 6 (formação do apressório), 12 (penetração do patógeno), 18 (provável resposta de defesa), 24 (formação do haustório) e 72 (formação de hifas secundárias) horas após inoculação (h.a.i.) (LEITE, 2012), congeladas imediatamente em nitrogênio líquido, e mantidas a -80°C até o início das análises.

4.3 Análises de expressão gênica

4.3.1 Confeção de *primers*

Os *primers* foram confeccionados utilizando-se ferramentas de bioinformática como o programa primer3 e as sequências acessadas através de consultas em bancos de dados de ESTs do NCBI e dados do sequenciamento do genoma do eucalipto (<http://www.phytozome.net/eucalyptus.php>).

Após a confecção dos *primers*, a qualidade dos mesmos foi testada, quanto à formação de dímeros, através da ferramenta “*Oligo analysis tool*” hospedada na página da internet www.operon.com.

Com os *primers* já sintetizados, um teste para determinação de temperatura de anelamento dos mesmos foi realizado, com uma reação de síntese de cDNA em em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems, com temperaturas de anelamento iguais a 57°C e 60°C, utilizando-se o One-step RT-PCR kit – Affymetrix/USB, com algumas modificações no protocolo sugerido pelo fabricante. Foram utilizados 2 µL de mRNA e 0,5 µL de cada *primer* e o volume final de cada reação foi reduzido de 50 µL a 13 µL, sem prejuízo na síntese, confirmados por testes anteriores no laboratório.

Terminada a síntese, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2%, e coradas com brometo de etídio, para verificar se os tamanhos dos fragmentos eram compatíveis com os fragmentos preditos pelos *primers*.

4.3.2 Extração de RNA

O material vegetal congelado a -80° C foi macerado em nitrogênio líquido e as amostras utilizadas para a extração do RNA total, utilizando-se o método de ZENG e YANG, (2002). Os Poly(A) mRNAs foram purificados com auxílio do Dynabeads mRNA Purification kit de acordo com o descrito pelo fabricante (Invitrogen), e eluídos em 50 µL de água Milli-Q tratada com DEPC a 1%.

4.3.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado em termociclador GeneAmp® PCR System 9700 – Applied Biosystems, utilizando-se o SuperScript™ One-step RT- PCR with Platinum® *Taq* (Invitrogen) em uma reação de 12.5 µL, contendo 4 µL do mRNA eluído, 1µL (10µM) de cada par de *primers* específicos, 6.25 µL do tampão de reação (2X) e

0.25 µL do tampão contendo a enzima RT/Platinum *Taq*. Somente 10 ciclos foram utilizados, a título de pré-amplificação para início das reações de RT-qPCR.

4.3.4 RT-qPCR

As reações de análise de PCR quantitativo foram realizadas com o kit SYBR Green real-time RT-PCR SuperMix-UDG, em termociclador IQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad), em programa com 40 ciclos, e temperaturas de anelamento iguais a 57°C e 60°C de acordo com os *primers* utilizados.

4.4 Análise de atividade enzimática

4.4.1 Preparo do extrato enzimático

O extrato enzimático foi preparado de acordo com a metodologia descrita por ALFENAS et al. (1991) com algumas modificações. A aproximadamente 1,5g de material vegetal macerado em nitrogênio líquido com PVPP foram adicionados 3 mL de tampão de extração contendo 0,034M de fosfato de sódio dibásico, 0,2M de sacarose, 2,56% de PVP-40, 3mM de DTT, 5,7 mM de ácido ascórbico, 2,6 mM de bissulfito de sódio, 0,2% de B-mercaptoetanol e 1% de PEG-6000. Após homogeneizada, a mistura foi colocada em microtubos e centrifugada a 16.000g, 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi recuperado e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises.

4.4.2 Quantificação proteica do extrato enzimático

A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando-se o kit comercial de quantificação de proteínas da BioRad (Protein Assay catálogo: 500-0006).

As concentrações proteicas foram determinadas através de comparação com curva padrão de BSA.

4.4.3 Análise de Superóxido Dismutase (SOD) em PAGE

A atividade de SOD foi determinada visualmente em gel de eletroforese de poliacrilamida (12%) segundo descrito por Beauchamp e Fridovich (1971) e modificado por Azevedo et al. (1998), em sistema mini Protean (BioRad). O gel possuía 1,5 mm de espessura, 6,5 cm de altura e 7 cm de largura. A corrida foi

realizada a 4°C, com corrente constante de 15mA por gel. O tampão utilizado na corrida era 5x concentrado, composto de 25 mM de Tris e 192 mM de glicina, com pH 8,5. Para corrida, o tampão era diluído para 1x e reutilizado por até 3 vezes. Foram utilizados 10 µL de solução padrão de SOD e 20µg de proteína em cada poço do gel.

Após a corrida para separação proteica, os géis foram tratados de acordo com Gomes-Junior et al. (2006), para determinação de atividade da SOD. Primeiramente os géis foram lavados rapidamente em água deionizada à temperatura ambiente. Após isso, foram mantidos sob agitação branda em solução contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroazul de tetrazólio(NBT) e 0,3 % de TEMED, por 30 minutos, seguido de lavagem com água deionizada e exposição à luz. Com isso ocorreu foto-oxidação do gel, o qual obteve uma coloração púrpura, exceto nas regiões onde ocorreu atividade enzimática da SOD, promovendo uma revelação negativa. Para cessar a reação, os géis foram mergulhados em solução de ácido acético 7% por 15 minutos. Passado esse tempo, foram documentados em Image Scanner III – GE.

4.4.4 Atividade de Ascorbato Peroxidase (APX)

A atividade da APX foi determinada conforme descrito por Gomes-Junior et al. (2007), com modificações. O meio de reação era composto por 690 µL de tampão fosfato de potássio 80 mM, pH 7,5, 100 µL de ascorbato 5 mM, 100 µL de EDTA 1 mM, 100 µL de H₂O₂ 1 mM e 10 µL do extrato protéico. A atividade da APX foi determinada pelo monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 290 nm, a 30 °C, durante 60 segundos, em espectrofotômetro Hitachi modelo U-3300. Os valores de atividade foram expressos em µmol/minuto/mg de proteína.

4.5 Análise de Proteoma

4.5.1 Extração proteica

A extração proteica ocorreu de acordo com Hurkman e Tanaka (1986), com algumas modificações. Primeiramente, 500mg de material vegetal foi macerado em nitrogênio líquido e acondicionado em microtubo, onde foi adicionado 1mL de tampão de extração [0,5M Tris-HCl pH 7,5; 0,7M sacarose; 0,1M cloreto de potássio; 50mM EDTA; 1mM PMSF; 2%(v/v) β-mercaptoetanol e 1%(m/v) PVPP], e mantido sob agitação, em gelo, por 30 minutos. Após isso, foram adicionados 0,6mL

de solução fenólica saturada em Tris-HCl pH 7,5 e mantido, novamente, sob agitação em gelo por 30 minutos, seguida de centrifugação por 30 minutos a 10.000g e 4°C. O sobrenadante foi recolhido e todo o processo (exceto maceração do material) foi repetido mais três vezes.

Depois da última centrifugação, o sobrenadante foi coletado em novo microtubo, e a ele adicionados 1,5mL de acetato de amônio 0,1M em metanol 100%, e mantidos a -20°C de 16 a 18 horas, para precipitação das proteínas e em seguida submetido a centrifugação por 20 minutos a 16.000g e 4°C. Terminada esta etapa, seguiram-se etapas de lavagem do *pellet* duas vezes com acetona 100% a -20°C e uma com metanol 100% a -20°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco em dissecador, a 4°C, por 24 horas, e ressuspensos em tampão de solubilização (7M ureia, 2M tiureia, 10mM DTT e 0,4% v/v Triton X-100).

4.5.2 Quantificação proteica

Como no item 3.4.2.

4.5.3 Verificação de qualidade do extrato proteico

Para se verificar a qualidade do extrato produzido, géis de eletroforese SDS-PAGE de acrilamida a 12% foram confeccionados. A ele foram adicionados 5µg de proteína por amostra, e submetidos a voltagem constante de 70 volts. Terminada a corrida, os géis foram transferidos para solução fixadora [40% (v/v) etanol e 10% (v/v) ácido acético], por uma hora, para evitar a mobilidade das proteínas. Após a fixação, os géis foram mergulhados em solução corante de *Comassie Blue G250*, por 18 horas, de acordo com o protocolo de Candiano *et al.*, (2004).

4.5.6 Dessalinização das amostras

A dessalinização foi realizada utilizando-se colunas *Vivaspin 500* (Amicon-millipore) para troca do tampão de solubilização, por tampão bicarbonato de amônio 50mM e pH8,5 (AmBic), seguindo as normas do fabricante. Primeiramente a coluna foi hidratada com água deionizada e centrifugada a 10.000g. Após isso, 50 µg de proteína foram adicionados na coluna juntamente com 300µL de tampão AmBic e centrifugada até atingir o volume de 100µL. Este passo foi realizado 3 vezes, e terminada a última centrifugação, as amostras foram recolhidas da coluna e

armazenadas em microtubos até a digestão.

4.5.7 Digestão de amostra complexa

Aos 50 µg de proteínas foram adicionados 25 µL de 2% (v/v) *RapiGest SF* seguido de incubação por 15 minutos a 80°C. Em seguida, as amostras foram reduzidas adicionando-se 2,5 µL 100 mM ditioneitol (DTT), e mantidas por 30 minutos a 60°C. Após redução, foram alquiladas com a adição de 2,5 µL de 100 mM iodoacetamida (IAA), e mantidas no escuro, à temperatura ambiente, por 30 minutos. Assim, as amostras estavam prontas para digestão, por 16 horas, com 10 µL de solução 50ng/µL de tripsina, a 37°C. O bloqueio da tripsina se deu com o acréscimo de 10 µL de 5% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA), e incubação a 37°C por 90 minutos. Para finalizar, as amostras foram centrifugadas 30 minutos a 14.000g e 6°C, e o sobrenadante transferido para outro tubo e reduzido em concentrador à vácuo (Concentrador 5301, *Eppendorf*).

4.5.8 Purificação

Às amostras secas a vácuo, foram adicionados 50 µL de solução 0,1% TFA e separadas em 5 tubos com 10 µL cada. Após isso foram purificadas utilizando micro colunas de fase reversa (*Reverse phase Zip-Tip C18, Millipore*). Para isso, as colunas foram equilibrada em solução A [100% acetonitrila (ACN), 0,1% (v/v) TFA], solução B [50% (v/v) ACN:H₂O, 0,1% (v/v) TFA] e solução C [100% H₂O, 0,1% (v/v) TFA], respectivamente. Após o equilíbrio, as amostras proteicas puderam ser ligadas à coluna, seguindo-se lavagem com solução D [95% H₂O, 5% (v/v) metanol, 0,1% (v/v) TFA]. Para a eluição dos peptídeos, 10µL de solução B foram aspirados e acondicionados em tubos *vial*, seguido de nova concentração a vácuo.

4.5.9 LC-MS/MS

As amostras foram ressuspendidas em 32 µL de solução de formiato de amônio 20mM pH10, acrescida de 8µL de padrão interno *Phosphorylase* (P00489) 100fmol/µL.

Os peptídeos foram sequenciados em um espectrômetro de massas *Synapt G2 HDMS* (Waters), acoplado ao sistema UPLC *NanoAcquity*, com tecnologia 2D (Waters, Manchester, UK). Na primeira dimensão, os peptídeos foram separados

com uma coluna XBridge BEH 130, C18, 5 μ m (300 μ m x 50mm), através do gradiente 3 a 85% de solvente B [0,1%(v/v) ácido fórmico em ACN], a fluxo de 3,2 μ L/min. Na sequência os peptídeos eluíram por uma coluna HSS T3 1,8 μ m (75 μ m x 150mm).com um gradiente de 3 a 45% B com um fluxo de 350 μ L/min.

Para todas as análises, o espectrômetro de massas operou no modo “V”, com poder de resolução típico mínimo de 12500. O espectrômetro de massas foi calibrado com [Glu1] fibrinopeptídeo B (GFP) humana a 200 fmol. μ L⁻¹ e a mesma solução foi empregada para o "lock mass" utilizando-se o íon de dupla carga com uma amostragem a cada 30 segundos. Os experimentos foram realizados no modo MSE (análise independente de dados) que consiste na aquisição alternada, entre espectros obtidos à baixa (3 eV) e alta (15-50 eV) energia de colisão, aplicadas ao módulo trap do ‘T-wave’ CID, em presença de gás argônio, que produz íons precursores e produtos em sequência. O tempo de varredura foi de 0,8 segundos em cada modo, no intervalo de m/z entre 50 e 2000.

4.5.10 Análise dos dados

Os espectros de massas foram processados utilizando o *software ProteinLynx GlobalServer* versão 2.5, e os arquivos foram contratados com banco de dados EGRANDIS, específico para a planta do estudo, e as proteínas identificadas tiveram suas funções determinadas através do banco de dados UniProt (www.uniprot.org).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos sintomas

Após coletar as amostras, as plantas inoculadas foram mantidas em câmaras de crescimento por 12 dias para avaliação dos sintomas. A figura 1 mostra uma planta R3 e uma S4 escolhidas aleatoriamente, para a avaliação.

Figura 1 –Avaliação dos sintomas: **A** – planta suscetível S4 após 12 dias de inoculação **B** – planta resistente após 12 dias de inoculação

Pode-se observar pelas imagens que as plantas responderam à inoculação como esperado, ou seja, as plantas suscetíveis apresentando os sintomas da doença, como pontos de esporulação do fungo esparsos em ambas as faces da folha; e as resistentes sem estes sintomas, apresentando apenas pequenos sinais de ataque do patógeno, visualizados como pequenas manchas cloróticas.

5.2 Confecção de *primers* e determinação da temperatura de anelamento

As sequências dos *primers* utilizados e os tamanhos de fragmentos produzidos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Tabela de *primers*

Primer	Sequências	Tamanho (pb)
1. Cu/Zn superóxido dismutase (Cu/Zn SOD)	F: AAGCAGATTCCTCTCACTGG R: CTGAAGACCGATGATACCG	153
2. Fe superóxido dismutase (Fe SOD)	F: ACGAGACGAGGAAGAAGAGA R: CCAGGAAGAAGAAGAAGACG	104
3. Mn superóxido dismutase (Mn SOD)	F: GCCAGCGAAGTGTATGAGA R: GAGACCAGATGAACGCAGA	288
4. Catalase (Cat)	F: GGAGAGGCGAAGCAGTAGA R: GAGCACCGTAGTTGGTTGTC	181
5. Peroxidase (Perox)	F: TGGACTACCAATCCTCTCATT R: CAACCTTCATACCGCAATC	251
6. Glutathiona redutase (GR)	F: TGTTCCATCTGCTGTGTTCT R: CCCAAGGACTCTGTTTGTTT	193
7. Quitinase (Quit)	F: CCTCGCATTCTCAATAAGT R: CCACAGATAGTCCGCTACG	217

Após o teste para determinar a temperatura de anelamento, ficou determinado experimentalmente, que todos os *primers* possuem esta igual a 57°C, exceto os *primers* para Fe SOD e Cat, para os quais a temperatura utilizada é de 60°C, pois a 57°C a reação se tornou inespecífica para os fragmentos esperados. A Figura 2 mostra um gel de agarose com os fragmentos formados.

Figura 2 – Teste para determinação da temperatura de anelamento: gel de agarose a 2% com fragmentos de reação de síntese de cDNA

5.3 Análise de expressão gênica

5.3.1 Quitinase

Dois estudos já documentaram que a quitinase possui um importante papel na defesa do eucalipto à *Puccinia psidii*, podendo agir tanto como uma molécula indutora (MUNCH-GARTHOFF et al. 1997), desencadeando uma resposta de defesa, quanto como um fungicida (MOHAMMADI et al 2002), hidrolisando a parede celular do fungo.

A análise da expressão gênica das plantas mostrou que a quitinase foi preferencialmente expressa nas plantas suscetíveis em zero e 6 horas após a inoculação (h.a.i.) com o fungo. Às 24 h.a.i., se mostrou preferencialmente expressa nas plantas resistentes. Nos outros horários não houve diferença significativa na expressão deste gene. A expressão da quitinase pode ser observada na figura 3.

Figura 3 – Expressão relativa da quitinase: plantas suscetíveis, em relação às resistentes. (*) estatisticamente significativos

Sobre a expressão preferencial em zero e 6 h.a.i. nos clones suscetíveis, é possível que essas plantas tenham uma expressão naturalmente maior, visto que a zero h.a.i. o fungo acabou de entrar em contato com as plantas, o que dificilmente pode ter causado uma resposta na expressão. E com o passar do tempo, com o desenvolvimento do fungo nas plantas, o genótipo resistente tem a expressão aumentada, superando a do genótipo suscetível em 24 h.a.i., para combater o avanço do fungo através da hidrólise da parede celular fúngica, o que não acontece

nas plantas suscetíveis. Esses resultados são reforçados por Moon et al. (2007), que em estudos realizados com eucalipto infectado com *P. psidii* em campo, verificaram que a expressão de quitinase, obtida através da técnica SAGE, foi preferencial em plantas resistentes, em estágio mais avançado da doença, visto que a coleta do material foi feita após a aparição dos sintomas, provavelmente agindo como um fungicida.

5.3.2 Ascorbato Peroxidase

Os resultados de expressão gênica da enzima Ascorbato Peroxidase (APX) mostram que não houve diferenças significativas na expressão desse gene para os tempos 6, 12, 18, 24 e 72 horas após inoculação (h.a.i.). Somente em zero hora pode-se observar expressão diferencial deste gene nas plantas suscetíveis, como mostra a figura 4, o que pode ser uma característica inerente ao genótipo.

Figura 4 – Expressão relativa da APX: plantas suscetíveis, em relação às resistentes.
(*) estatisticamente significativos

A enzima APX, possui um importante papel na destoxificação da célula, em relação à degradação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em água e O_2 . Possui grande afinidade a essa molécula, da ordem de micro molar, sendo possivelmente responsável por um fino ajuste do controle no combate de espécies ativas de oxigênio (EAOs) (MITTLER, 2002).

Estudos já mostraram que H_2O_2 é produzido na célula, tanto em presença de indutores, quanto com a presença de patógenos (DESIKAN et al., 1996), e também

que possui um importante papel relacionado a sinalização durante resposta de hipersensibilidade (HR) (GRANT e LOAKE, 2000), levando à morte celular programada (MCP) (DESKIAN et al., 2000). Porém, o que se observa em plantas inoculadas no laboratório, em estágio avançado da doença, como visto da figura 1 do item 4.1, não há regiões necróticas características da MCP. Além disso, Moon *et al.* (2007), em estudos utilizando a técnica SAGE, não encontraram genes R clássicos relacionados à defesa, os quais interagem com genes de virulência do patógeno, levando a uma HR, o que deixou em dúvida sobre a real existência de indução desta para conter o avanço do fungo.

Assim, os resultados obtidos evidenciam que a expressão similar do gene, desde as primeiras horas após inoculação, se deve, possivelmente, ao fato de nos dois genótipos esse gene ser expresso para degradação do excesso de H_2O_2 , o que também explica a não aparição de regiões com MCP. Ademais, Deskian et al. (1998) mostraram que para que haja MCP, o tempo de exposição da célula ao H_2O_2 deve ser de no mínimo 1 hora, e que tempos menores que este inibem a MCP. E isso reforça o fato da APX ter valores de expressão parecidos nos dois genótipos, para o combate ao peróxido de hidrogênio, a partir das primeiras horas de contato das plantas com o fungo.

5.3.3 Catalase

Os resultados da expressão gênica da catalase mostram igual expressão nas plantas resistentes e suscetíveis, em todos os horários, exceto às 24 h.a.i., no qual se mostrou preferencialmente expressa no clone resistente (Figura 5).

Figura 5 – Expressão relativa da catalase: plantas suscetíveis, em relação a plantas resistentes
(*) estatisticamente significativo

A catalase é uma enzima que catalisa a reação do H_2O_2 em água e O_2 , e está relacionada com a resposta da planta a estresses ambientais (OKSANEN *et al.*, 2003). Porém, Moon *et al.* (2007) consideram que esta enzima pode estar relacionada ao combate ao estresse oxidativo causado pela invasão do patógeno, e também à sinalização da invasão do patógeno no hospedeiro, pois na análise da expressão gênica em plantas sob ataque de *P. psidii*, a catalase se mostrou preferencialmente expressa em plantas resistentes, como no presente trabalho.

Corroborando os resultados encontrados, Doke (1985) e Doke *et al.* (1994) mostraram que quando há o ataque de um patógeno na planta, ocorrem duas explosões oxidativas sucessivas, sendo a primeira muito rápida e a segunda somente após algumas horas após a inoculação. E o mais interessante de se observar é o fato desses autores mostrarem que a segunda explosão ocorre somente quando há uma interação incompatível entre planta e patógeno, na qual o hospedeiro é resistente ao ataque, reforçando ainda mais o fato da análise da expressão da catalase deste trabalho (Figura 5) ter se apresentado maior em clones resistentes, comparando-se com suscetíveis, às 24 h.a.i..

5.3.4 Glutationa Redutase

Algumas substâncias antioxidantes, não enzimáticas, podem atuar na limpeza da célula contra as EAOs. Uma dessas substâncias é a glutathione (GSH) (APEL e HIRT, 2004), a qual se oxida, se transformando em glutathione oxidada (GSSG), no combate às EAOs.

Para se ter uma boa desintoxicação, a célula deve possuir uma alta relação GSH:GSSG, e isso é conseguido através da glutathione redutase (GR), a qual na presença de NADPH como poder redutor, reduz GSSG a GSH (ASADA e TAKASHI, 1987; TSUGANE *et al.*, 1999).

Neste estudo, a expressão gênica de GR se apresenta significativamente maior no clone suscetível a zero e 6 h.a.i., e às 24 h.a.i., no clone resistente, como mostra a figura 6.

Figura 6 – Expressão relativa de GR: plantas suscetíveis, em relação a resistentes (*) estatisticamente significativos

Em resposta a estresses bióticos e abióticos, há um aumento na produção das enzimas redutoras de GSSG, como a GR, e também nos níveis de GSH na célula (NOCTOR *et al.*, 2002; VANACKER *et al.*, 2000). Creissen *et al.* (1999) mostraram, em estudos com plantas transgênicas, com reduzido nível de GSH, que essas eram hipersensíveis ao estresse oxidativo, comparadas com o genótipo selvagem, evidenciando a grande importância da GR na produção de GSH a partir de GSSG.

Assim, observando-se os resultados, pode-se inferir que no clone resistente, com o desenvolvimento do fungo, há uma maior produção de EAOs, tanto para combate ao fungo, quanto para sinalização do ataque, o que por sua vez causa um maior gasto de antioxidantes como o GSH, necessitando de uma maior expressão de GR para reduzir o GSSG produzido em GSH novamente. Já nos clones suscetíveis, é possível que o fungo dribble esta linha de defesa, provocando uma menor produção de EAOs pela planta, a qual gasta menos GSH no combate ao estresse oxidativo, necessitando de menos GR para a redução do GSSG.

5.3.5 Superóxido dismutase

As superóxido dismutases (SOD) são as primeiras enzimas a atuarem no combate das células às EAOs (ALSCHER *et al.*, 2002). Essas enzimas catalisam a formação de H_2O_2 a partir do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) (MCCORD e FRIDOVICH, 1969), o qual tem a produção aumentada na presença de estresses bióticos e abióticos (GILL e TUTEJA, 2010). Assim, as SOD possuem grande importância na proteção dos tecidos vegetais contra as EAOs (ALSCHER *et al.*, 2002). Essas enzimas são classificadas de acordo com o metal cofator, ou localização celular (KLIEBENSTEIN *et al.*, 1998). Este trabalho analisou a expressão gênica das três formas da enzima separadamente (itens 4.3.5.1, 4.3.5.2 e 4.3.5.3).

5.3.5.1 Mn Superóxido dismutase

A Mn SOD, como o próprio nome diz, utiliza manganês como cofator. Esta enzima é encontrada nas mitocôndrias e peroxissomos (DEL RIO *et al.*, 2002). Os resultados de sua expressão estão representados na figura 7. Nos tempos zero, 6 e 12 h.a.i., não houve diferença significativa de expressão entre os clones resistentes e suscetíveis. Nos tempos 18, 24 e 72 h.a.i., a expressão se mostrou preferencial nos clones resistentes.

Figura 7 – Expressão relativa de Mn SOD: clones suscetíveis, em relação a clones resistentes
(*) Estatisticamente significativos

Em trabalho recente, Cvetkovska *et al.* (2013), estudando tabaco inoculado com duas bactérias patogênicas diferentes, uma mostrando interação compatível com o hospedeiro (manifestação da doença) e outra com interação incompatível (sem manifestação da doença), mostraram que quando a planta foi inoculada e mostrou uma interação incompatível planta-hospedeiro, houve um constante aumento na produção do radical superóxido nas mitocôndrias, e que essa explosão oxidativa não foi observada quando a interação era compatível e a doença se manifestava. Isso está de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pois os clones resistentes, apresentando uma interação incompatível com *P. psidii*, pode ter a produção de radical superóxido aumentada em virtude do estresse, podendo ter uma maior expressão de Mn SOD, em relação ao clone suscetível, para combate a esta EAO. Como no estudo acima citado, é possível que esta explosão oxidativa não tenha ocorrido nos clones suscetíveis, por terem apresentado interação compatível, em razão da expressão deste gene ser menor.

5.3.5.2 Cu/Zn Superóxido dismutase

As Cu/Zn SODs são as SODs mais abundantes em folhas verdes, podendo ser encontradas tanto no citosol, quanto nos cloroplastos (DEL RIO *et al.*, 2002). Essas enzimas utilizam cobre e zinco como cofatores (ALSCHER *et al.*, 2002). A

expressão do gene codificante desta enzima, neste trabalho, se apresentou estatisticamente mais elevada em plantas suscetíveis nos tempos 12 e 72 h.a.i., e somente no tempo 24 h.a.i. se mostrou mais elevada nos clones resistentes, como pode ser observado na figura 8.

Figura 8 – Expressão relativa de Cu/Zn SOD: clones suscetíveis em relação a clones resistentes
(*) estatisticamente significantes

Há na literatura poucos trabalhos sobre expressão gênica de Cu/Zn SOD em plantas sob estresse biótico. Porém sabe-se que tanto sob estresse biótico, quanto abiótico, há um incremento na expressão deste gene, devido à grande produção de radicais superóxido, formados para defesa e sinalização do ataque nas plantas. Kardish *et al.* (1994) disseram que a maquinaria fotossintética é muito suscetível aos danos causados por radicais superóxido produzidos no fotossistema II, e que tem a produção aumentada em condições de estresse, fazendo-se necessária a ação da Cu/Zn SOD para manutenção da integridade do processo.

Alguns estudos ainda mostram a importância da Cu/Zn SOD para a resistência de plantas a danos causados por estresse oxidativo. Sen Gupta *et al.* (1993) mostraram que plantas de tabaco transgênico que superexpressavam o gene desta enzima apresentaram maior resistência aos danos causados por estresse foto oxidativo.

Sobre o estresse biótico, estudos mostram que há um aumento, ao longo do tempo, da expressão de Cu/Zn SOD em planta infectadas, em relação às não

infectadas. Além disso, este aumento quando a planta foi infectada com patógeno avirulento, comparando-se com um virulento (Jagadeeswaran *et al.*, 2009).

Com isso, percebe-se a grande importância da Cu/Zn SOD no combate ao estresse oxidativo em diversas situações. Porém, com os resultados mostrados neste estudo, pode-se concluir somente que nos tempos 12 e 72 h.a.i. houve, possivelmente, uma maior produção de radicais superóxidos na folha dos clones suscetíveis, culminando em uma maior expressão do gene da Cu/Zn SOD; e o mesmo só ocorreu às 24 h.a.i. nos clones resistentes. Agora, para saber como foi a variação da expressão ao longo do tempo, e o porquê do aumento de radicais superóxido nesses horários, mais experimentos são necessários.

5.3.5.3 Fe Superóxido dismutase

As Fe SOD são enzimas estruturalmente semelhantes às Mn SOD, mas não possuem relação alguma com Cu/Zn SOD. Estudos filogenéticos evidenciam que as primeiras podem ter evoluído a partir de um ancestral comum, enquanto a última pode ter evoluído independentemente (CHEN; LIU, 1996). As Fe SOD são encontradas em um grupo limitado de espécies vegetais, e se situam dentro dos cloroplastos (FERREIRA *et al.*, 2002; ALSCHER *et al.*, 2002).

Neste trabalho, a expressão do gene da Fe SOD se mostrou significativamente mais expresso em plantas suscetíveis à *P. psidii*, em todos os tempos estudados, como pode ser observado na figura 8.

Figura 9 – Expressão relativa de Fe SOD: clones suscetíveis em relação a clones resistentes (*) estatisticamente significantes

Por estar contida dentro dos cloroplastos, a Fe SOD possui um importante papel na integridade desta organela em condições de estresse, visto que ela tem grande risco de sofrer danos causados pela toxicidade do oxigênio, pois O_2 pode ser fotorreduzido a O_2^- , por elétrons do fotossistema I (MEHLER, 1951). Os radicais superóxido são formados naturalmente pelo metabolismo da planta, mas possui sua produção aumentada quando a planta é submetida a estresse (POLLE, 2001).

Myouga *et al.* (2008), verificaram que transgênicos de *Arabidopsis* que superexpressavam genes de Fe SOD eram mais tolerantes ao estresse produzido pela aplicação de metilviologênio, substância indutora de produção de O_2^- . Além disso, os mesmos autores puderam observar que em mutantes que não expressavam o gene da Fe SOD possuíam cloroplastos anômalos, não possuindo as estruturas membranosas normais.

Outro trabalho que mostra a importância da Fe SOD para estabilidade cloroplastidial foi conduzido por Camp *et al.*, (1996). Com este trabalho, os autores observaram que em plantas de tabaco transgênicas que superexpressavam o gene para a Fe SOD, tiveram os cloroplastos protegidos do dano causado pelo estresse oxidativo obtido através da aplicação com metilviologênio.

Contrastando esses trabalhos, McKersie *et al.*, (2000) verificaram que em alfafa transgênica, a superexpressão da Fe SOD provou um aumento na sobrevivência dos indivíduos no inverno, mas não detectaram melhora na tolerância ao estresse oxidativo fotossintético.

Com isso, observa-se que a Fe SOD possui um importante papel manutenção da integridade celular, podendo interferir em processos essenciais como a fotossíntese, que por sua vez afeta todo o organismo. Porém, inferir causas para aumento ou diminuição de expressão através de trabalhos com diferentes tipos de estresse, pode ser tendencioso ao erro, pois cada tipo de estresse parece causar respostas diferentes nas plantas, quanto à expressão deste gene.

Assim, a partir dos resultados obtidos por este trabalho, pode-se observar que há uma maior expressão da Fe SOD em plantas suscetíveis, em todos os horários, visto que provavelmente nessas plantas, a produção de radicais superóxido foi aumentada dentro dos cloroplastos. No entanto, por meio destes resultados, as causas deste possível aumento em clones suscetíveis e a menor expressão do gene nas plantas resistentes continuam desconhecidas.

Com exceção das enzimas APX e Fe SOD, todas as outras mostraram uma maior expressão, às 24 h.a.i., em plantas resistentes. De acordo com LEITE (2012), nesta etapa, em plantas suscetíveis, já é possível se observar, através de microscopia de fluorescência, a célula mãe do haustório produzida pelo fungo. Esta célula dará origem ao haustório, importante estrutura para colonização do mesmo na planta, pois a sua membrana possui uma relação muito específica com a membrana plasmática do hospedeiro, mudando suas propriedades, fazendo com que aquela membrana perca a capacidade de controle de fluxo de nutriente, passando a nutrir células do patógeno (MEHROTRA E AGGARWAL, 2003).

Assim, os resultados acima, juntamente com os resultados de expressão gênica deste trabalho indicam que 24 horas após a infecção do fungo é um ponto muito importante no processo de defesa da planta contra a colonização do patógeno.

5.4 Atividade Enzimática

5.4.1 Ascorbato Peroxidase

Para analisar os dados de APX, foi realizado um teste t, com 5% de significância. Com isso, observa-se que a atividade da APX, comparando-se o clone

suscetível com o resistente, não mostrou diferenças significativas em nenhum dos horários estudados, como mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Atividade enzimática de Ascorbato peroxidase

Tempo (h.a.i.)	Atividade média (nmol/min/mg proteína)	
	R	S
0	771,6 ± 166	536,8 ± 214
6	698,1 ± 141	662,9 ± 119
12	679,0 ± 337	494,4 ± 108
18	464,8 ± 128	451,5 ± 259
24	390,6 ± 196	246,5 ± 35
72	391,9 ± 92	400,0 ± 55

Boava *et al.* (2009), em estudos com atividade de peroxidase em dois clones de eucalipto, um resistente e um suscetível, fizeram inoculações nas plantas com esporos de *P. psidii* e testaram algumas substâncias como possíveis indutores de resistência do eucalipto ao fungo. Com este trabalho, mostraram que após serem tratadas previamente com essas substâncias, as plantas tiveram significativo aumento na atividade de peroxidase após a inoculação com o patógeno. Porém, ao se fazer a inoculação com as plantas sem a prévia aplicação dos possíveis indutores, não foi verificada diferença significativa na atividade da enzima comparando-se os clones em estudo, e isso vai de acordo com os resultados obtidos neste trabalho, mostrando que nas condições deste experimento, a atividade da APX possivelmente não varia entre plantas resistentes e suscetíveis, em resposta à *P. psidii*.

5.5 Análise de proteômica

Apesar desta etapa do trabalho ainda não estar concluída, até a presente data, resultados preliminares promissores já foram obtidos, quanto à extração e quantificação das proteínas totais.

5.5.1 Extração e quantificação proteica

Da mesma forma que os outros experimentos, a análise do proteoma foi constituída por um tratamento resistente e um suscetível, com 3 repetições biológicas cada (R3.1, R3.2, R3.3 e S4.1, S4.2, S4.3, respectivamente).

Como a adaptação do protocolo de extração para um menor volume ainda não tinha sido tentada no laboratório, não se sabia ao certo a eficácia do método.

Porém esta foi confirmada com a quantificação em espectrofotômetro, devido à grande quantidade de proteína obtida, por microlitro de extrato proteico. Para a quantificação, foi confeccionada uma curva padrão, utilizando-se BSA bovino.

O resultado da quantificação está representado na tabela 3.

Tabela 3. Quantificação proteica: resultado da quantificação proteica por espectrofotometria

Amostra	[] (mg.mL⁻¹)	Amostra	[] (mg/mL)
R1 0h	13,9	R1 18h	12,9
R2 0h	12,9	R2 18h	10,7
R3 0h	12,6	R3 18h	12,2
S1 0h	10,9	S1 18h	10,5
S2 0h	13,9	S2 18h	12,4
S3 0h	13,5	S3 18h	10,3
R1 6h	8,6	R1 24h	11,6
R2 6h	8,6	R2 24h	13,9
R3 6h	9,7	R3 24h	13,5
S1 6h	10,3	S1 24h	12,6
S2 6h	9,6	S2 24h	13,9
S3 6h	7,9	S3 24h	14,3
R1 12h	11,5	R1 72h	11,6
R2 12h	10,1	R2 72h	12,0
R3 12h	9,7	R3 72h	11,8
S1 12h	12,2	S1 72h	11,1
S2 12h	10,5	S2 72h	11,3
S3 12h	11,5	S3 72h	11,3

5.5.2 SDS-PAGE

Para verificar qualidade da extração, géis SDS-PAGE foram confeccionado com todas as amostras. Uma extração que resulta em proteínas de qualidade possui um padrão eletroforético limpo, sem rastros durante a corrida, mostrando que a amostra não foi degradada durante todo o processo. Todas as amostras deste trabalho apresentaram este padrão, confirmando a eficácia do método utilizado e a boa qualidade das amostras para os próximos passos do processo. Os perfis eletroforéticos podem ser vistos nas figuras 9, 10, 11 e 12.

Figura 10 – Gel SDS PAGE I: Separação de todas amostras do tempo zero h.a.i. e resistentes do tempo 6 h.a.i.

Figura 11 – Gel SDS PAGE II: Separação de amostras suscetíveis do tempo 6 h.a.i. e todas do tempo 12 h.a.i.

Figura 12 – Gel SDS PAGE III: Separação de todas amostras do tempo 18 h.a.i. e resistentes do tempo 24 h.a.i.

Figura 13 – Gel SDS PAGE IV: Separação de amostras suscetíveis do tempo 24 h.a.i. e todas do tempo 72 h.a.i.

Devido à boa qualidade do extrato proteico, os protocolos de dessalinização, digestão e purificação das amostras foram feitos na sequência.

5.5.3 Identificação por espectrometria de massas

Terminadas estas etapas, as amostras estavam prontas para identificação por espectrometria de massas. Porém, até o momento foi somente possível realizar a separação nas colunas de primeira e segunda dimensão sem que houvesse o fracionamento em função do pH na primeira coluna. Esse próximo passo da análise ainda será realizado.

Porém, já se pode verificar uma diferença no perfil proteico, comparando os clones resistentes e suscetíveis, nas condições desse experimento. No total, comparando todas as plantas resistentes e suscetíveis, em todos os horários, foram identificadas 95 proteínas diferentes, sendo que dessas, 13 apareceram somente no clone resistente e 24 no suscetível.

Dentro de cada horário, também foram verificadas diferenças no perfil proteico. Para facilitar a visualização, estes resultados serão apresentados em forma de diagramas de Venn (figuras 13, 14, 15, 16, 17 e 18) seguidos pelas respectivas tabelas com apresentação das proteínas identificadas (tabelas 4, 5, 6, 7, 8, e 9).

Zero h.a.i.:

Figura 14 – Proteínas zero h.a.i.: proteínas identificadas zero hora após inoculação

Tabela 4 – Proteínas únicas zero h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo zero hora após inoculação (Continua)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.K02606.2	PACid 23604207 2 cys peroxiredoxin	560,8832	2,666667	Enzima Antioxidante
	Eucgr.J02030.7	PACid 23600067 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	2371,759	5	Ativação da RubisCO
	Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	1390,974	2	ATP sintase de membrana mitocondrial
	Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	244,8495	5	Metabolismo de H ₂ O ₂
Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 bisphosphate carboxylase oxygenase activase	4834,7104	4	Ativação da RubisCO
	Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	1047,5881	4	Enzima antioxidante
	Eucgr.G03042.3	PACid 23588828 60s acidic ribosomal protein	976,1397	2	Proteína ribossomal
	Eucgr.K02283.3	PACid 23603840 glutamine synthetase	1358,5024	3	Atividade de Ligase (amônia – glutamina)
	Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	342,31165	6	Degradação de glicina
	Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransfera se	342,2207	6	Metabolismo do ácido cafeico
	Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	310,4866	4	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena

Tabela 4 – Proteínas únicas zero h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo zero hora após inoculação (Conclusão)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	442,3155	2	Doador de elétrons para o citocromo c
	Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	272,8714	3	Redução de NADP a NADPH
	Eucgr.E01261.2	PACid 23577988 predicted protein Populus trichocarpa	233,1429	8	-----
	Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	157,4381	9	ATP sintase
	Eucgr.J00023.3	PACid 23597669 heat shock cognate 70 kda expressed	147,9791	5	Estabilização de proteínas pré-existent e dobramento de novas proteínas
	Eucgr.F03557.1	PACid 23584686 catalase isozyme 1 isoform 1	142,6371	7	Metabolismo de H ₂ O ₂

6 h.a.i.:

Figura 15 – Proteínas 6 h.a.i.: proteínas identificadas 6 horas após inoculação

Tabela 5 – Proteínas únicas 6 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 6 horas após inoculação (Continua)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.J01234.2	PACid 23599205 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	3627,428	4	Ativação da RubisCO
	Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	909,2432	2	ATP sintase de membrane mitocondrial
	Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	361,1625	4	Enzima antioxidante
	Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	347,21408	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	388,06775	2	Doador de elétrons para o citocromo c
	Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	125,9353	4,5	Controla taxa de alongamento durante síntese proteica
	Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	86,2211	3	Envolvida na resposta de defesa
Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	11511,165	7	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	6946,69	4	Estabilidade do fotossistema II

Tabela 5 – Proteínas únicas 6 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 6 horas após inoculação (Continuação)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	6116,4746	2	Estabilidade do fotossistema II
	Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	4150,009	6	Ativação da RubisCO
	Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	1110,6848	1	Ligação de íon fosfato
	Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	1358,9456	7	-----
	Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	1022,3848	5	Mediação da transferência de elétrons entre PSI e PSII
	Eucgr.C03347.1	PACid 23572777 germin like protein	727,7046	2	Defesa da planta
	Eucgr.K01508.1	PACid 23603016 methionine synthase	542,8712	11	Atividade de metil- transferase
	Eucgr.F01077.1	PACid 23581738 light harvesting complex ii protein lhcb3	570,42236	2	Estruturação de moléculas
	Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	561,68634	5	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal PACid 23607169 5	390,39456	5	-----
	Eucgr.L02470.1	methylnetetrahydrop teroylglutamate homocysteine methyltransferase	266,34143	1	Formação de metionina
	Eucgr.F01413.2	PACid 23582096 glycolate oxidase	591,59204	8	Atividade de oxidorreductase
	Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	280,98465	4	Ligação de fosfato piroxidal
	Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	399,2234	7	Metabolismo do ácido cafeico

Tabela 5 – Proteínas únicas 6 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 6 horas após inoculação (Conclusão)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	218,1583	3	Redução de NADP a NADPH
	Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	191,9829	4	Metabolismo de H ₂ O ₂
	Eucgr.F03557.1	PACid 23584686 catalase isozyme 1 isoform 1	163,871	5	Metabolismo de H ₂ O ₂

12 h.a.i.:

Figura 16 – Proteínas 12 h.a.i.: proteínas identificadas 12 horas após inoculação

Tabela 6 – Proteínas únicas 12 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 12 horas após inoculação (Continua)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.K02283.3	PACid 23603840 glutamine synthetase	899,5724	3	Atividade de Ligase (amônia – glutamina)
	Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprote in	854,1008	1	Ligação de íon fosfato

Tabela 6 – Proteínas únicas 12 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 12 horas após inoculação (Continuação)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.K02606.2	PACid 23604207 2 cys peroxiredoxin	540,3661	3	Enzima antioxidante
	Eucgr.K01508.1	PACid 23603016 methionine synthase	233,59984	8	Atividade de metil- transferase
	Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	202,22525	3	Redução de NADP a NADPH
	Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	156,9175	4	-----
	Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	205,33781	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.J00023.3	PACid 23597669 heat shock cognate 70 kda expressed	90,739105	6	Estabilização de proteínas pré-existentes e dobramento de novas proteínas
	Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	103,815	6	Envolvida na resposta de defesa
	Eucgr.L01770.1	PACid 23606647 luminal binding protein	44,39425	2	Montagem de proteínas multiméricas no retículo endoplasmático
Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3246,836	2	Estabilidade do fotossistema II
	Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin PACid 23596515	1131,5281	5	Enzima antioxidante
	Eucgr.I01808.1	unknown Populus trichocarpa	978,3093	7	-----

Tabela 6 – Proteínas únicas 12 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 12 horas após inoculação (Continuação)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.G03042.3	PACid 23588828 60s acidic ribosomal protein	743,3051	2	Proteína ribossomal
	Eucgr.H00087.1	PACid 23589416 naringenin chalcone synthase	489,1849	3	Catalisa reação de produção de naringenin- chalcone
	Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	473,63785	4	Catalisa processos fotoquímicos no PSII
	Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	378,64008	4	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	534,12805	4	Doador de elétrons para o citocromo c
	Eucgr.K03281.1	PACid 23604997 40s ribosomal protein s20 2 like	317,2409	1	Componente da subunidade menor do ribossomo
	Eucgr.B03013.1	PACid 23568241 ribulose biphosphate carboxylase small chain 3b precursor isco small subunit 3b	383,4871	4	Subunidade menor da RubisCO
	Eucgr.G03060.1	PACid 23588848 chlorophyll a b binding	413,24506	6	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.J00242.1	PACid 23597962 chloroplast sedoheptulose biphosphatase	243,43344	3	Participa do ciclo pentose- fosfato
	Eucgr.J00613.1	PACid 23598416 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydr opteroyltrigluta mate homocysteine	229,5473	8	Formação de metionina

Tabela 6 – Proteínas únicas 12 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 12 horas após inoculação (Conclusão)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.B03593.2	PACid 23568960 rubisco subunit binding protein beta	147,23181	8	Ligação das subunidades da RubisCO
		PACid 23566868 quercetin 3 o methyltransfer ase 1			
	REVERSE3915 3	Reversed Sequence 39153	212,94405	3	-----

18 h.a.i.:

Figura 17 – Proteínas 18 h.a.i.: proteínas identificadas 18 horas após inoculação

Tabela 7 – Proteínas únicas 18 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 18 horas após inoculação (Continua)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	623,272	3	ATP sintase de membrana mitocondrial
	Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	615,2533	10	
	Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	277,95465	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	353,47156	3	Doador de elétrons para o citocromo c
	Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	140,03947	6	Metabolismo de H ₂ O ₂
	Eucgr.L02470.1	PACid 23607169 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	114,3801	2	Formação de metionina
	Eucgr.I01374.1	PACid 23595938 triosephosphate isomerase	229,77124	5	Interconversão de dihydroxyacetone phosphate e D-glyceraldehyde 3-phosphate
	Eucgr.D00322.1	PACid 23574102 chlorophyll a b binding	16036,171	6	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.J02030.3	PACid 23600063 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	2563,6	5	Ativação da RubisCO
	Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	482,5668	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.I01326.2	PACid 23595883 plastidic aldolase	357,7245	5	Frutose-bifosfato aldolase
	Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	254,12387	4	Catalisa processos fotoquímicos no PSII

Tabela 7 – Proteínas únicas 18 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 18 horas após inoculação (Continuação)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	223,67264	4	Ligação de fosfato piroxidal Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.G03060.2	PACid 23588849 chlorophyll a b binding	194,4825	2	
	Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	162,7827	2	Redução de NADP a NADPH
	Eucgr.B02634.1	PACid 23567846 PREDICTED uncharacterized protein LOC100242197 Vitis vinifera	115,7665	2	-----
	Eucgr.F02905.3	PACid 23583831 udp glucose pyrophosphorylase	108,20649	7	Síntese de nucleotide sugars
	Eucgr.H00144.2	PACid 23589484 harpin binding protein 1	105,2299	4	Molécula estrutural
	Eucgr.I01423.3	PACid 23596001 hydroxypyruvate reductase	103,9195	3	Degradação de produto tóxico da degradação de tartarato
	Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	98,3477	4	Envolvida na resposta de defesa
	REVERSE36879	Reversed Sequence 36879	93,9766	2	-----
	Eucgr.A02606.1	PACid 23564551 upf0554 protein c2orf43 homolog	86,0445	5	-----
	Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	85,9086	4	Controla taxa de alongamento durante síntese proteica
	REVERSE32019	Reversed Sequence 32019	77,9476	6	-----
Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.J02030.6	PACid 23600066 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	5559,227	7	Ativação da RubisCO
	Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	6277,3955	3	Estabilidade do fotossistema II

Tabela 7 – Proteínas únicas 18 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 18 horas após inoculação (Conclusão)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.F04099.3	PACid 23585351 chlorophyll a b binding	4442,8687	4	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.C03347.1	PACid 23572777 germin like protein	2161,4255	2	Defesa da planta
	Eucgr.K01508.1	PACid 23603016 methionine synthase	951,9294	9	Atividade de metil- transferase
	Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	747,178	5	Metabolismo do ácido cafeico
	Eucgr.C03812.2	PACid 23573187 thioredoxin dependent peroxidase	814,4241	4	Eliminação de peróxidos
	Eucgr.E04053.1	PACid 23580342 atp synthase gamma chain	383,6548	5	Subunidade de ATP sintase
	Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	303,9009	10	Subunidade de ATP sintase
	Eucgr.B03593.2	PACid 23568960 rubisco subunit binding protein beta	171,7459	8	Ligação das subunidades da RubisCO
	Eucgr.A01933.1	PACid 23563745 cell division protein	171,37021	8	Montagem do aparato para divisão celular
	Eucgr.A02126.2	PACid 23563979 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydrop teroyltriglutamate homocysteine	232,29175	10	Formação de metionina

24 h.a.i.:

Figura 18 – Proteínas 24 h.a.i.: proteínas identificadas 24 horas após inoculação

Tabela 8 – Proteínas únicas 24 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 24 horas após inoculação (Continua)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	1056,2731	2	ATP sintase de membrane mitochondrial
	Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	514,6892	4	Mediação da transferência de elétrons entre PSI e PSII
	Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	400,7202	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.K01517.1	PACid 23603022 methionine synthase	92,48315	4	Atividade de metil- transferase
	Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	164,36395	3	Controla taxa de alongamento durante síntese proteica
Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.J02030.3	PACid 23600063 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	4579,577	8	Ativação da RubisCO

Tabela 8 – Proteínas únicas 24 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 24 horas após inoculação (Continuação)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.J01234.2	PACid 23599205 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	3916,1316	3	Ativação da RubisCO
	Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3721,8892	4	Estabilidade do fotossistema II
	Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3456,159	2	Estabilidade do fotossistema II
	Eucgr.F04099.3	PACid 23585351 chlorophyll a b binding	1242,4365	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	879,4868	1	Ligação de íon fosfato
	Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	449,95297	5	Ligação de fosfato piroxidal
	REVERSE12385	Reversed Sequence 12385	367,13104	3	-----
	Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	265,2009	5	-----
	Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	218,54971	5	Catalisa processos fotoquímicos no PSII
	Eucgr.E01261.2	PACid 23577988 predicted protein Populus trichocarpa	247,49617	7	-----

Tabela 8 – Proteínas únicas 24 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 24 horas após inoculação (Conclusão)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.J02030.7	PACid 23600067 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	3570,5415	7	Ativação da RubisCO
	Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	743,5329	4	Enzima antioxidante
	Eucgr.G03060.2	PACid 23588849 chlorophyll a b binding	340,0459	4	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.A00095.1	PACid 23561828 PREDICTED fructokinase 2 Vitis vinifera	204,58734	4	Mantém fluxo de carbono na formação de amido
	Eucgr.E04053.1	PACid 23580342 atp synthase gamma chain	104,901596	4	Subunidade de ATP sintase
	Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	123,7009	10	Subunidade de ATP sintase
	Eucgr.I01423.3	PACid 23596001 hydroxypyruvate reductase	117,71506	5	Degradação de produto tóxico da degradação de tartarato

72 h.a.i.:

Figura 19 – Proteínas 72 h.a.i.: proteínas identificadas 72 horas após inoculação

Tabela 9 – Proteínas únicas 72 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 72 horas após inoculação (Continua)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Resistente	Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 bisphosphate carboxylase oxygenase activase	1310,4965	3	Ativação da RubisCO
	Eucgr.K02283.3	PACid 23603840 glutamine synthetase	553,67737	3	Atividade de Ligase (amônia – glutamina)
	Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	198,141	3	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.J02030.4	PACid 23600064 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	1374,1653	5	Ativação da RubisCO
	Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	130,99374	2	-----

Tabela 9 – Proteínas únicas 72 h.a.i.: proteínas encontradas somente em um dos tratamentos, para o tempo 72 horas após inoculação (Conclusão)

Tratamento	Acesso	Descrição	Score	nº Peptídeos	Função
Suscetível	Eucgr.J02030.7	PACid 23600067 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	1561,2335	4	Ativação da RubisCO
	Eucgr.J01234.2	PACid 23599205 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	1607,7969	2	Ativação da RubisCO
	Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	1033,2632	4	Estabilidade do fotossistema II
	Eucgr.B03593.2	PACid 23568960 rubisco subunit binding protein beta	65,76105	4	Ligação das subunidades da RubisCO
	Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	282,85352	4	Ligação das moléculas de clorofila no complexo antena
	Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	174,48656	4	Possível inibição da RubisCO ativase
	Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	106,71345	4	Controla taxa de alongamento durante síntese proteica

É importante ressaltar que por não ter sido feito o fracionamento dos peptídeos na coluna da primeira dimensão, não foi possível realizar a quantificação relativa ao padrão interno dos mesmos para estudos comparativos de expressão das proteínas entre os clones R3 e S4. Além disso, somente as proteínas mais abundantes foram identificadas, como por exemplo as proteína do complexo da Rubisco, envolvidas diretamente do processo fotossintético. No entanto, podem-se

observar algumas proteínas de grande relevância para este trabalho, relacionadas ao estresse oxidativo, ou à resposta de defesa da planta.

As peroxirredoxinas formam uma família de proteínas que destoxicam as células dos peróxidos (LIM, *et al.*, 1993). Entre elas está a enzima 2-cys-peroxiredoxin, a qual é uma enzima antioxidante redutora de peróxidos presente nos cloroplastos (CHAE, *et al.*, 1994). Estudos com *Arabidopsis* transgênicas demonstraram que esta enzima é responsável por proteger o cloroplasto contra o estresse oxidativo (DIETZ *et al.*, 2002). Outra peroxirredoxina encontrada foi a thioredoxin-dependent peroxidase, responsável pela manutenção da atividade de glutamina sintetase e da integridade do DNA (CHAE *et al.*, 1994; KIM *et al.*, 1988).

Outra enzima relacionada ao estresse oxidativo, identificada nos clones estudados é a catalase, a qual é responsável pelo metabolismo de H_2O_2 , que é tem a produção aumentada sob condições de estresse (OKSANEN *et al.*, 2003).

Visto que as plantas deste trabalho estavam em condições de estresse biótico, era esperado um aumento das EAOs, e consequentemente, um aumento nas enzimas que metabolizam essas substâncias, as quais evitariam um possível dano no tecido vegetal. Como essas duas enzimas foram encontradas, só é reforçada a hipótese de que realmente ocorre um aumento na produção de EAOs na planta, ao serem inoculadas com o patógeno.

Outra proteína interessante de ter sido encontrada é a BED finger-nbs-lrr, a qual participa da resposta de defesa em plantas, e por isso pode estar relacionada como a infecção do eucalipto com *P. psidii*.

Relacionada à resistência da planta, podemos também citar a proteína germin-like, a qual pode estar relacionada com a defesa em plantas, de acordo com estudos de Vallelian-Bindschedler *et al.* (1998).

Em anexo encontram-se tabelas com todas as proteínas identificadas.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados obtidos neste trabalho é possível concluir que há diferenças na expressão de enzimas relacionadas ao estresse oxidativo, em *Eucalyptus grandis*, ao longo do processo de infecção, colonização e multiplicação do fungo *Puccinia psidii*, comparando-se clones resistentes com suscetíveis. Essas mudanças podem ter ocorrido em consequência de uma resposta de defesa da planta ao patógeno, ou de uma via de sinalização da invasão do mesmo. Porém, para alguns genes, como Cu/Zn SOD e Fe SOD, mais estudos são necessários para se chegar a uma conclusão mais concreta.

Além disso, através dos dados de proteômica, conclui-se que também houve diferenças entre os clones resistentes e suscetíveis. Apesar de somente ter sido feita a separação em primeira dimensão, para as condições desse trabalho, já foi possível observar proteínas únicas nos tratamentos resistente e suscetível em todos os horários observados. Com a fragmentação e separação em segunda dimensão é esperado encontrar um grande número de outras proteínas únicas, além daquelas diferencialmente expressas, que podem contribuir muito no avanço dos estudos de interação eucalipto-*Puccinia*. Para se obter uma melhor visão de como o processo de infecção com o fungo está afetando a expressão gênica, atividade enzimática e proteoma da planta, seria interessante a realização de experimentos de time-course, para se ter uma ideia das mudanças ao longo do tempo e não dentro de cada tempo estudado.

REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C. J. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: Wiley, 1996, 696p.
- ALSCHER, R. G.; ERTURK N.; HEATH L. S. Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, **Journal of experimental botany**, Oxford, v.53, p.1331–1341, 2002.
- ALFENAS, A. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: UFV, 1991, 242p.
- ALFENAS, A. C.; DEMUNER, N. L.; BARBOSA, M. M. A ferrugem e as opções de controle. **Correio Agrícola**. São Paulo, v.1, p.18-20, 1989.
- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant enzymes to transfer from elevated carbon dioxide to air and ozone fumigationn, in leaves and roots of wild-type and catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, n.2, p. 280-292, 1998.
- BAE, S. H.; HARRIS, A. G.; HAINS, P. G.; CHEN, H.; GARFIN, D. E.; HAZELL, S. L.; PAIK, Y. K.; WALSH, B. J.; CORDWELL, S. J. Strategies for the enrichment and identification of basic protein in proteome projects. **Proteomics**, Weinheim, v.3, p.568-579, 2003.
- BOAVA, L. P.; KUHN, O. J.; PASCHOLATI, S. F.; DI PIERO, R. M.; FURTADO, E. L. Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.36, p.168-172, 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid sensitive method for the quantification of microgramquantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v.72, p.248-254, 1976,
- CAMP, W. V.; CAPIAU, K.; MONTAGU, M. V.; INZÉ, D.; SLOOTEN, L. Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing fe-superoxide dismutase in chloroplasts. **Plant Physiology**, Lancaster, v.112, p.1703-1714, 1996.

CAMPA, A. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function, In: EVERSE, J.; EVERSE, K. E.; GRISHAM, M. B. **Peroxidases in Chemistry and Biology**, Boca Raton, 1991. p. 25-47.

CANDIANO, G.; BRUSCHI, M.; MUSANTE, L.; SANTUCCI, L.; GHIGGERI, G. M.; CARNEMOLLA, B.; ORECCHIA, P.; ZARDI, L.; RIGHETTI, P. G. Blue silver: a very sensitive colloidal Comassie G-250 staining for proteome analysis. **Electrophoresis**, New York, v.25, p.1327-1333, 2004.

CARNEGIE, A. J.; LIDBETTER, J. R. Rapidly expanding host range of *Puccinia psidii* sensu lato in Australia. **Australasian Plant Pathology**, Murdoch, v.41, p.13–29, 2012.

CELEDÓN, P. A. F. **Identificação de proteínas da região cambial de *Eucalyptus grandis* por eletroforese bidimensional e espectrometria de massas**. 2006. 112p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

CHAE, H. Z.; CHUNG, S. J.; RHEE, S. G. Thioredoxin-dependent peroxide Reductase from yeast. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.269, p.27670–27678, 1994.

CHAE, H. Z.; ROBISON, K.; POOLE, L. B.; CHURCH, G.; STORZ, G.; RHEE, S. G. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. **Proceedings of the National Academy of Science**, Washington DC, v.91, p.7017–7021, 1994.

CHEN, H.Y.; LIU, W.Y. The molecular evolution of superoxide dismutase based on its distribution and structure. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, Beijing, v. 23, n. 5, p. 408-413, 1996.

CHEN, S.; HARMON, A. C. Advances in plant proteomics. **Proteomics**, Weinheim, v.6, p.5504-5516, 2006.

COUTINHO, T. A.; WINGFIELD, M. J.; ALFENAS, A. C.; CROUS, P. D. Eucalyptus rust: a disease with the potential for serious implications. **Plant Disease**, St Paul, v.82, p.819-825, 1998.

CVETKOVSKA, M.; ALBER, N. A.; VANLERBERGHE, G. C. The signaling role of a mitochondrial superoxide burst during stress, **Plant Signaling & Behavior**, Austin, v.8, p.161-166, 2013.

DEL RIO, L.A.; CORPAS, F.J.; SANDALIO, L.M.; PALMA, J.M.; GOMEZ, M.; BARROSO, J.B. Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 372, p. 1255-1272, 2002.

DESKIAN, R., HANCOCK, J. T., COFFEY, M. J., NEIL, S. J. Generation of active oxygen in elicited cells of *Arabidopsis thaliana* is mediated by a NADPH oxidase-like enzyme. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, London, v.382, p. 213-217, 1996.

DESKIAN, R., REYNOLD, A., HANCOCK, J. T., NEIL, S. J. Hairpin and hydrogen peroxide both initiate programmed cell death but have differential effects on gene expression in *Arabidopsis* suspension cultures. **Biochemical Journal**, London, v. 330, p. 115-120, 1998.

DESKIAN, R., NEIL, S. J., HANCOCK, J. T. Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. **Free Radical Biology and Medicine**, Los Angeles, v.28, p. 773-778, 2000.

DIANESE, J. C.; MORAES, T. S. A.; SILVA, A. R. Response of Eucalyptus species to Field infection by *Puccinia psidii*. **Plant Disease**, St Paul, v.68, p.314-316, 1984.

DIETZ, K. J.; HORLING, F.; KÖNIG, J.; BAIER, M. The function of the chloroplast 2-cysteine peroxiredoxin in peroxide detoxification and its regulation. **Journal of experimental botany**. Oxford, v.53, p.1321-1329, 2002.

DOKE, N. NADPH-dependent oxygen generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. **Physiological Plant Pathology**, Berlin, v.27, p.311-322, 1985.

DOKE, N., MIURA, Y., SANCHEZ, L. M., KAWAKITA, K. Involvement of superoxide in signal transduction: response to attack by pathogens, physical and chemical shocks, and UV radiation, In: FOYER, C. H.; MULLINEAUX, P. M. **Causes of photo oxidative stress and amelioration of defense systems in plants**, Boca Ranton, 1994. Chap. 3, p.177-197.

FERREIRA, F. A. Eucalyptus rust. **Revista Árvore**, Viçosa, v.7, p.91-109, 1983.

FERREIRA, R.R.; FORNAZIER, R.F.; VITÓRIA, A.P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. **Journal of Plant Nutrition**, Philadelphia, v. 25, n. 2, p. 327-342, 2002.

FIGUEIREDO, M. B. Doenças fúngicas emergentes em grandes culturas. **Biológico**, São Paulo, v.63, n.1, p.29-32, 2001.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants, **Plant physiology and biochemistry**, Paris, v.48, p.909–930, 2010.

GRANT, J. J., LOAKE, J. G. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. **Plant Physiology**, Lancaster, v.124, p. 21-29, 2000.

GRATÃO, P. L.; POLLE, A.; LEA, P. J.; AZEVEDO, R. A. Making the life of heavy metal-stressed plants a little easier. **Functional Plant Biology**, London, v.5, n. 2, p.122-127, 2005.

HEGEDUS, A.; ERDEI, S.; HORVÁTH, G. Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. **Plant Science**, Chicago, v.160, p.1085-1093, 2001.

JAGADEESWARAN, G.; SAINI, A.; SUNKAR, R. Biotic and abiotic stress down-regulate miR398 expression in *Arabidopsis*. **Planta**, Berlin, v.229, p.1009-1014, 2009.

KARDISH, N.; MAGAL, N.; AVIV, D.; GALUN, E. The tomato gene for the chloroplastic Cu,Zn superoxide dismutase: regulation of expression imposed in transgenic tobacco plants by a short promoter. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v.25, p.887-897, 1994.

KIM, K.; KIM, I. H.; LEE, K. Y.; RHEE, S. G.; STADTMAN, E. R. The isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.263, p.4704–4711, 1988.

KLIEBENSTEIN, D. J.; MONDE, R. A.; LAST, R. L. Superoxide dismutase in *Arabidopsis*: an eclectic enzyme family with disparate regulation and protein localization. **Plant physiology**, Waterbury, v.118, p.637–650, 1998.

LEITE, T. F. **Estabelecimento de um patossistema modelo e análise da interação molecular planta-patógeno entre *Eucalyptus grandis* e *Puccinia psidii* Winter por meio da técnica de RNA-Seq.** 2012. 160p. Tese (Doutorado em Ciências), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

MCCORD, J.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein), **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v.244, p. 6049–6055, 1969.

McKERSIE, B. D.; MURNAGHAM, J.; JONES, K. S.; BOWLEY, S. R. Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 122, p.1427–1437, 2000.

MEHLER, A.H. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II.Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. San Antonio v.33, p.339–351, 1951.

MEHROTRA, R. S.; AGGARWAL, A. **Plant Pathology**, New Deli. 2003. p.846.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in PlantScience**, Kidlington, v. 7, n. 9, p. 405–410, 2002.

MOHAMMADI, M.; ROOHPARVAR, R.; TORABI, M. Induced chitinase activity in resistant wheat leaves inoculated with an incompatible race of *Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*, the causal agent of yellow rust disease. **Mycopathologia**, Albany, v.154, p.119-126, 2002.

MOLLER, I. M. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. **Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v.52, p.561-591, 2001.

MOON, D.H.; SALVATIERRA, G.R.; CALDAS, D.G.G.; GALLO DE CARVALHO, M.C.C.; CARNEIRO, R.T.; FRANCESCHINI, L.M.; ODA, S.; LABATE, C.A. Comparison of the Expression Profiles of Susceptible and Resistant *Eucalyptus grandis* exposed to *Puccinia psidii* Winter using SAGE. **Functional Plant Biology**, Collingwood, v.34, n.11, p.1010-1018, 2007.

MUNCH-GARTHOFF, S.; NEUHAUS, J. M.; BOLLER, T.; KEMMERLING, B.; KOGELE, K. H. Expression of beta-1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5- or Sr24-specified race-specific rust resistance. **Planta**, Berlin, v.201, p.235-244, 1997.

MYOUGA, F.; HOSODA, C.; UMEZAWA, T.; IIZUMI, H.; KUROMORI, T.; MOTOHASHI, R.; SHONO, Y.; NAGATA, N.; IKEUCHI, M.; SHINOZAKI, K. A Heterocomplex of iron superoxide dismutases defends chloroplast nucleoids against oxidative stress and is essential for chloroplast development in *Arabidopsis*. **The Plant Cell**, Waterbury, v. 20, p.3148–3162, 2008.

OKSANEN, E., HAIKKIO, E., SOBER, J., KARNOSKY, D. F. Ozone-induced H₂O₂ accumulation in field-grown aspen and birch is linked to foliar ultrastructure and peroxisomal activity. **New Phytologist**, Lancaster, v.161, p.791-799, 2003.

PLOMION, C.; LEPROVOST, C.; STOKES, A. Wood formation in trees. **Plant Physiology**, Lancaster, v.123, p.1513-1523, 2001.

POLLE, A. Dissecting the superoxide dismutase-ascorbate-glutathione pathway in chloroplasts by metabolic modeling. Computer simulations as a step towards flux analysis. **Plant Physiology**, Waterbury, v.126, p.445–462. 2001.

RESENDE, M. L. V.; SALGADO, S. M. L.; CHAVES, Z. M. Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. **Fitopatologia Brasileira**. Brasília, v.28, p.123-130, 2003.

RUIZ, R. A. R.; ALFENAS, A. C.; FERREIRA, F. A.; DO VALE, F. X. R. The influence of temperature, time foliar wetness and light intensity on the infection of *Puccinia psidii* in eucalypts. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.14, p.55-64, 1989.

SCHUMACHER, M. V.; CALIL, F. N.; VOGEL, H. L. M. **Silvicultura Aplicada**, Santa Maria: UFSM, 2005. 98p.

SEN GUPTA, A.; HEINEN, J. L.; HOLADAY, A. S.; BURKE, J. J.; ALLEN, R. D. Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that over-express chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington DC, v.90, p.1629-1633, 1993.

STASKAWICZ, B. J.; AUSUBEL, F. M.; BAKER, B. J.; ELLIS, J. G.; JONES, J. D. G. Molecular genetics of plant disease resistance, **Science**, Washington, v.268, p.661-667, 1995.

TESSMANN, D. J.; DIANESE, J. C.; MIRANDA, A. C.; CASTRO, L. H. R.; Epidemiology of a neotropical rust (*Puccinia psidii*): Periodical analysis of the temporal progress in a perennial host (*Syzygium jambos*). **Plant Pathology**, London, v.50, n.6, p. 725-731, 2001.

TWYMAN, R. M. **Principles of Proteomics**, Cambridge: BIOS Scientific Publishers, 2004. 241p.

VALLELIAN-BINDSCHEDLER, L.; MÖSINGER, E.; MÉTRAUX, J. P.; SCHWEIZER, P. Structure, expression and localization of a germin-like protein in barley (*Hordeum vulgare* L.) that is insolubilized in stressed leaves. **Plant Molecular Biology**, Zurich, v. 37, p. 297-308, 1998.

XAVIER, A. A.; ALFENAS, A. C.; MATSUOKA, K.; HODGES, C. S. Infection of resistant and susceptible *Eucalyptus grandis* genotypes by urediniospores of *Puccinia psidii*. **Australasian Plant Pathology**, Calyton, v.30, n.3, p.277-281, 2001.

YATES, J. R.; RUSE, C. I.; NAKORCHEVSKY, A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. **Annual Review of Biomedical engineering**, Palo Alto, v.11, p.49-79, 2009.

YU, C.; HUNG, K. T.; KAO, C. H. Nitric oxide reduces Cu toxicity and Cu-induced NH_4^+ accumulation in rice leaves. **Plant Physiology**, Rockville, v.162, p.1319-1330, 2005.

ZAUZA, E. A. V. **Epidemiologia da ferrugem do eucalipto e resistência genética**. 2007. 67p. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2007.

ZENG, Y.; YANG, T. RNA isolation from highly viscous samples rich in polyphenols and polysaccharides. **Plant Molecular Biology Reporter**, New York, v.20, p.417-417, 2002.

ANEXO

ANEXO A

Tabela 10 – Proteínas de clones resistentes zero h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	11759,816	5,3333335
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	8345,073	5,3333335
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	3459,4265	10,666667
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	8287,72	4
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	2923,3652	6
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2641,7708	2,6666667
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	3388,1917	5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1162,22	4
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3028,9084	2
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	831,7949	4

Tabela 10 – Proteínas de clones resistentes zero h.a.i. (continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	1051,6083	3
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	607,2293	4,6666665
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	814,1489	8
Eucgr.F04099.3	PACid 23585351 chlorophyll a b binding	829,4999	2,5
Eucgr.K02606.2	PACid 23604207 2 cys peroxiredoxin	560,88324	2,6666667
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	596,7851	5,3333335
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	451,45172	4,5
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	314,73047	5,6666665
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	277,3577	3,3333333
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	478,598	3
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	408,4271	2
Eucgr.K02786.2	PACid 23604417 elongation factor chloroplastic like	148,12852	4
Eucgr.I00241.1	PACid 23594778 actin	145,7579	3
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	282,73853	4

Tabela 10 – Proteínas de clones resistentes zero h.a.i. (conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	181,47327	8,666667
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	154,38126	3,5
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	104,12204	5
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	10033,105	7
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	9899,701	9
Eucgr.J02030.7	PACid 23600067 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	2371,759	5
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	1758,156	4
Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	1390,974	2
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1517,49	6
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	1087,3042	6,5
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	331,07285	4
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	244,8495	5

ANEXO B

Tabela 11 – Proteínas de clones suscetíveis zero h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	12957,16	4,3333335
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	10369,659	5,6666665
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase small subunit	12042,734	5,6666665
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	9385,185	6,6666665
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase small subunit	8714,579	6,3333335
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	5762,8755	4
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	4397,595	10
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	4394,0996	6,3333335
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 bisphosphate carboxylase oxygenase activase	4834,7104	4,3333335
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3983,777	2

Tabela 11 – Proteínas de clones suscetíveis zero h.a.i.		(continuação)	
protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1902,9257	3,3333333
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	1699,4552	10,666667
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	1829,856	5
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2188,919	3
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1764,7865	4,5
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	1236,7369	2,6666667
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	1214,0692	6
Eucgr.F04099.3	PACid 23585351 chlorophyll a b binding	1344,6982	3
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1300,2906	5,3333335
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	953,5551	6
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	1125,7229	5
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	909,51337	4,6666665
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	1047,5881	3,5
Eucgr.G03042.3	PACid 23588828 60s acidic ribosomal protein	976,1397	2

Tabela 11 – Proteínas de clones suscetíveis zero h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.K02283.3	PACid 23603840 glutamine synthetase	1358,5024	2,5
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	597,48975	8,666667
Eucgr.I00241.1	PACid 23594778 actin	712,2517	5,5
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	596,4898	7
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	740,2121	3,6666667
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	399,97055	10,333333
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	342,31165	5,6666665
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	399,21494	4,3333335
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	5077,955	4,5
Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	342,2207	5,5
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	358,88058	3,6666667
Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	310,4866	4

Tabela 11 – Proteínas de clones suscetíveis zero h.a.i.. (conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	442,31558	2
Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	272,8714	3
Eucgr.K02786.2	PACid 23604417 elongation factor chloroplastic like	186,2913	4,3333335
Eucgr.E01261.2	PACid 23577988 predicted protein Populus trichocarpa	233,14296	8
Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	157,43814	8,5
Eucgr.J00023.3	PACid 23597669 heat shock cognate 70 kda expressed	147,9791	5
Eucgr.F03557.1	PACid 23584686 catalase isozyme 1 isoform 1	142,63715	7
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	235,27051	4,5
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	104,0302	4

ANEXO C

Tabela 12 – Proteínas de clones resistentes 6 h.a.i.. (continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	11383,999	4
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	10497,715	5,3333335
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	11777,18	4,3333335
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	6905,504	4,3333335

Tabela 12 – Proteínas de clones resistentes 6 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01234.2	PACid 23599205 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	3627,428	3,5
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	4211,4463	5
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3640,8123	2
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	2583,387	5,3333335
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2069,7131	3,6666667
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1782,5162	6,3333335
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1579,5967	6,3333335
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1203,0234	5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	734,4285	3,3333333
Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	909,2432	2
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	876,563	3,3333333
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	736,80084	8
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	318,91843	5
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	361,1625	4
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	260,60312	4,3333335
Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	347,21408	2,3333333
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	457,52026	3,6666667
Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	235,98425	3

Tabela 12 – Proteínas de clones resistentes 6 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	162,12144	4,5
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	215,0216	2,3333333
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	262,9032	3
Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	388,06775	2
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	163,24593	7,3333335
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	239,86017	4,3333335
Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	125,9353	4,5
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	86,2211	3
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	960,62396	3,5
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	526,9649	2

ANEXO D

Tabela 13 – Proteínas de clones suscetíveis 6 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	13283,745	3,6666667
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	11015,886	4,3333335
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	12011,181	5,3333335
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	11511,165	6,3333335

Tabela 13 – Proteínas de clones suscetíveis 6 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	7422,4243	4,6666665
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	6946,69	4
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	5829,1235	4,3333335
Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	6116,4746	1,5
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	3865,2668	8,666667
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	4425,388	5,6666665
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	5639,243	2,5
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	4150,009	6
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2855,4517	1,5
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1688,454	5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1274,8375	4
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	1285,9088	7,6666665

Tabela 13 – Proteínas de clones suscetíveis 6 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	952,2508	3,3333333
Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	1110,6848	1
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1396,518	5
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	1097,0696	5,5
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	1358,9456	7
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	1022,3848	5
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	937,59607	3
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	860,3311	4
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	755,7511	6,5
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	814,614	7,5
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	643,89606	2,6666667
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	674,153	8
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	557,87396	13,5

Tabela 13 – Proteínas de clones suscetíveis 6 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.C03347.1	PACid 23572777 germin like protein	727,7046	1,5
Eucgr.K01508.1	PACid 23603016 methionine synthase	542,8712	11
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	535,4614	5,5
Eucgr.F01077.1	PACid 23581738 light harvesting complex ii protein lhcb3	570,42236	1,5
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	402,7262	4,5
Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	561,68634	4,5
Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	379,93945	4
Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	390,39456	5,5
Eucgr.L02470.1	PACid 23607169 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	266,34143	1
Eucgr.F01413.2	PACid 23582096 glycolate oxidase	591,59204	7,5
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	280,98465	4
Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	399,2234	6,5
Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	218,1583	2,5
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	191,9829	3,5

ANEXO E

Tabela 14 – Proteínas de clones resistentes 12 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	12563,378	4,3333335
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	12174,094	4,6666665
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	9471,661	6,6666665
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	7829,932	4,6666665
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	3116,5059	5
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3839,5393	2
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	3322,4617	9,666667
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	3425,6296	3,6666667
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	2863,552	5,6666665
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	1759,6926	4,5
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	973,5623	4
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1783,2277	6,3333335
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1218,1552	5
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	791,625	3,6666667
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	1137,7767	3,6666667
Eucgr.K02283.3	PACid 23603840 glutamine synthetase	899,5724	2,5

Tabela 14 – Proteínas de clones resistentes 12 h.a.i. (continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	810,71533	8,333333
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	474,9738	4,666665
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	495,33994	2,666667
Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	854,1008	1
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	518,21106	4
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	518,3011	5,333335
Eucgr.K02606.2	PACid 23604207 2 cys peroxiredoxin	540,3661	3
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methylnetetrahydropteroyltri glutamate homocysteine	244,33257	7,666665
Eucgr.K01508.1	PACid 23603016 methionine synthase	233,59984	7,333335
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	296,74063	3,333333
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	263,38126	3,5
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	203,61403	5
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	255,56062	3,666667

Tabela 14 – Proteínas de clones resistentes 12 h.a.i. (conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	231,7704	4,6666665
Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	202,22525	3
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	314,4596	5,6666665
Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	156,9175	3,6666667
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	195,17169	5,5
Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	205,33781	2,3333333
Eucgr.K02786.2	PACid 23604417 elongation factor chloroplastic like	106,407394	4
Eucgr.J00023.3	PACid 23597669 heat shock cognate 70 kda expressed	90,739105	6
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	103,815	5,5
Eucgr.L01770.1	PACid 23606647 luminal binding protein	44,39425	2
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	8201,492	7
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	1065,6229	3
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	864,1783	5
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	251,98831	3,5
Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	146,58615	4

ANEXO F

Tabela 15 – Proteínas de clones suscetíveis 12 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	11823,543	4,6666665
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	11112,257	6,3333335
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	9501,929	6,3333335
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	10152,456	6,6666665
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	8943,681	6,3333335
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	6436,3438	6
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	4379,4473	6
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	4754,4194	2
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3652,6616	4,5
Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3246,836	1,5
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	3564,7454	5

Tabela 15 – Proteínas de clones suscetíveis 12 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesA VG
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	2944,2253	10,333333
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	1374,0796	5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1607,4492	4
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1748,5856	5,6666665
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	1468,5656	6
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2211,5657	2,6666667
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	981,61505	6
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1464,0773	4,3333335
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	1131,5281	5
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	1044,764	9,666667
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	1102,436	5,6666665
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	789,3531	8,333333
Eucgr.I01808.1	PACid 23596515 unknown Populus trichocarpa	978,3093	7

Tabela 15 – Proteínas de clones suscetíveis 12 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	678,1723	11
Eucgr.G03042.3	PACid 23588828 60s acidic ribosomal protein	743,3051	1,5
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	865,549	3,6666667
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	598,5368	3
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	622,25714	3,6666667
Eucgr.H00087.1	PACid 23589416 naringenin chalcone synthase	489,1849	2,5
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	436,74802	7,3333335
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	484,488	7
Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	473,63785	4
Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	378,64008	4
Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	534,12805	3,5
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	428,77914	4,6666665
Eucgr.K02786.2	PACid 23604417 elongation factor chloroplastic like	307,1184	3,5

Tabela 15 – Proteínas de clones suscetíveis 12 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	339,275	4
Eucgr.K03281.1	PACid 23604997 40s ribosomal protein s20 2 like	317,2409	1
Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	379,21594	5,5
Eucgr.B03013.1	PACid 23568241 ribulose biphosphate carboxylase small ch.a.i.n 3b precursor isco small subunit 3b	383,4871	4
Eucgr.G03060.1	PACid 23588848 chlorophyll a b binding	413,24506	5,5
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	351,01254	4
Eucgr.J00242.1	PACid 23597962 chloroplast sedoheptulose biphosphatase	243,43344	3
Eucgr.J00613.1	PACid 23598416 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	229,5473	7,5
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	188,67856	5,5
Eucgr.B03593.2	PACid 23568960 rubisco subunit binding protein beta	147,23181	7,5
Eucgr.B01747.2	PACid 23566868 quercetin 3 o methyltransferase 1	233,72977	4
Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	202,32285	7

Tabela 15 – Proteínas de clones suscetíveis 12 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	220,9592	4,5
REVERSE39153	Reversed Sequence 39153	212,94405	3

ANEXO G

Tabela 16 – Proteínas de clones resistentes 18 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	12795,277	4,5
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	11246,754	5,875
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	10363,025	7
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	8378,675	4,5
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	13390,753	4
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	5007,2764	4,888889
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	3774,0603	8,363636

Tabela 16 – Proteínas de clones resistentes 18 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 bisphosphate carboxylase oxygenase activase	2565,5881	2,75
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3020,9082	2
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	3319,7458	7,909091
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2934,7488	3,5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1161,5529	4,571429
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1915,3457	4,1666665
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	2949,85	6
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	973,3331	4,428571
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	1192,9407	5,625
Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	623,272	2,6
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	1016,8337	10
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	370,04565	3,2

Tabela 16 – Proteínas de clones resistentes 18 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	932,0131	6,7777777
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	615,2533	9,636364
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	463,7627	3,6
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	389,5443	4,4
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	643,77454	3,4
Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	737,957	1,5
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	473,81973	6
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	272,685	5,5555553
Eucgr.B03930.6	PACid 23569367 cu zn superoxide disumtase	786,6472	2,5
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	242,8186	5
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	316,0293	3,25
Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	277,95465	2,5
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	315,4745	3,5

Tabela 16 – Proteínas de clones resistentes 18 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	353,47156	2,6
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	192,62834	10,615385
Eucgr.K02786.2	PACid 23604417 elongation factor chloroplastic like	108,639755	4,8
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	140,03947	5,1666665
Eucgr.L02470.1	PACid 23607169 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine methyltransferase	114,3801	1,5
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	189,52252	3,25
Eucgr.I01374.1	PACid 23595938 triosephosphate isomerase	229,77124	4,4
Eucgr.D00322.1	PACid 23574102 chlorophyll a b binding	16036,171	6
Eucgr.J02030.3	PACid 23600063 ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	2563,6	5
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	971,4827	5

Tabela 16 – Proteínas de clones resistentes 18 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	482,5668	3
Eucgr.I01326.2	PACid 23595883 plastidic aldolase	357,7245	5
Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	249,75288	2,75
Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	254,12387	3,8
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	223,67264	3,8
Eucgr.G03060.2	PACid 23588849 chlorophyll a b binding	194,4825	2
Eucgr.I02340.4	PACid 23597078 ferredoxin nadp leaf chloroplastic like isoform 1	162,7827	2
Eucgr.B02634.1	PACid 23567846 PREDICTED uncharacterized protein LOC100242197 Vitis vinifera	115,7665	2
Eucgr.F02905.3	PACid 23583831 udp glucose pyrophosphorylase	108,20649	7
Eucgr.H00144.2	PACid 23589484 harpin binding protein 1	105,2299	4
Eucgr.I01423.3	PACid 23596001 hydroxypyruvate reductase	103,9195	3
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	98,3477	4
REVERSE36879	Reversed Sequence 36879	93,9766	2

Tabela 16 – Proteínas de clones resistentes 18 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.A02606.1	PACid 23564551 upf0554 protein c2orf43 homolog	86,0445	5
Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	85,9086	4
REVERSE32019	Reversed Sequence 32019	77,9476	6

ANEXO H

Tabela 17 – Proteínas de clones suscetível 18 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	23778,867	5,6666665
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	21319,365	6
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	15952,112	4,3333335
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	12392,652	5,3333335
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	9488,281	4,3333335
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	11287,687	6
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	6983,707	9
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	7342,584	6,6666665
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	7441,401	2,3333333
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	4800,013	4,3333335

Tabela 17 – Proteínas de clones suscetível 18 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	7563,3623	6
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	4929,104	3
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	4041,006	3,3333333
Eucgr.J02030.6	PACid 23600066 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	5559,227	6,6666665
Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	6277,3955	2,5
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	3309,411	4,6666665
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	3709,656	7
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	4597,198	5
Eucgr.F04099.3	PACid 23585351 chlorophyll a b binding	4442,8687	4
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	3080,337	6
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	2653,0535	10
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	2754,5977	3,5
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	2009,4548	4,5
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	1399,6196	4,6666665

Tabela 17 – Proteínas de clones suscetível 18 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	1892,6388	6,5
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	2051,503	7
Eucgr.C03347.1	PACid 23572777 germin like protein	2161,4255	1,5
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	1762,7085	12
Eucgr.K01508.1	PACid 23603016 methionine synthase	951,9294	8,333333
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	945,7873	7
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	925,4072	3,6666667
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	1099,1731	6
Eucgr.K02786.2	PACid 23604417 elongation factor chloroplastic like	866,48065	6,5
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	826,06165	7,5
Eucgr.B01744.1	PACid 23566864 caffeic acid o methyltransferase	747,178	5
Eucgr.B03930.6	PACid 23569367 cu zn superoxide disumtase	790,5119	4
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	653,9741	3,6666667

Tabela 17 – Proteínas de clones suscetível 18 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.C03812.2	PACid 23573187 thioredoxin dependent peroxidase	814,4241	4
Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	928,0853	1
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	440,24118	6
Eucgr.E04053.1	PACid 23580342 atp synthase gamma chain	383,6548	5
Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	303,9009	9,5
Eucgr.B03593.2	PACid 23568960 rubisco subunit binding protein beta	171,7459	7,5
Eucgr.A01933.1	PACid 23563745 cell division protein	171,37021	8
Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	244,54185	3,5
Eucgr.A02126.2	PACid 23563979 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	232,29175	9,5

ANEXO I

Tabela 18 – Proteínas de clones resistentes 24 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	11755,153	6,3333335
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	12905,248	8
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	12404,876	4

Tabela 18 – Proteínas de clones resistentes 24 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	12944,9795	3,6666667
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	8227,714	3,6666667
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	3620,0886	8
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	4160,7837	4,6666665
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	3273,4246	6,3333335
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	2214,8564	4
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2435,1194	2
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1182,504	4,6666665
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	2612,3528	2,3333333
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1836,131	7,3333335

Tabela 18 – Proteínas de clones resistentes 24 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	1665,3	4,5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1179,7214	4
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	1046,7814	4
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	952,9365	7,6666665
Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	1056,2731	1,5
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	562,9237	6,5
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	454,41034	3,5
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	688,8417	5,5
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	361,7788	6
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	852,0031	4,5
Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	572,6839	2,3333333
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	430,36475	3,5
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	514,6892	3,3333333

Tabela 18 – Proteínas de clones resistentes 24 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.I02677.1	PACid 23597456 chlorophyll a b binding	400,7202	3
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	499,5471	2,5
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	301,2908	2,6666667
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	225,19016	3,5
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	275,28568	6,3333335
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	203,95665	10
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	204,4029	3,5
Eucgr.K01517.1	PACid 23603022 methionine synthase	92,48315	4
Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	164,36395	2,5
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	111,9069	3,5

ANEXO J

Tabela 19 – Proteínas de clones suscetíveis 24 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	9201,531	3,3333333
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	6207,923	6
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	12472,827	4,6666665
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	7743,5024	5
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	7275,528	5
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	4034,2458	5,3333335
Eucgr.J02030.3	PACid 23600063 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	4579,577	7,5
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	4568,729	3,5
Eucgr.J01234.2	PACid 23599205 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	3916,1316	3

Tabela 19 – Proteínas de clones suscetíveis 24 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	3425,7805	6,6666665
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3634,377	2
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2701,4753	2,3333333
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3721,8892	3,5
Eucgr.A02039.2	PACid 23563871 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	3456,159	1,5
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	3309,366	10,333333
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1649,472	4,6666665
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1420,189	6,3333335
Eucgr.F04099.3	PACid 23585351 chlorophyll a b binding	1242,4365	3
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	1279,236	2,3333333
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1225,6693	4
Eucgr.I01326.1	PACid 23595882 chloroplast latex aldolase like protein	699,49005	6,6666665

Tabela 19 – Proteínas de clones suscetíveis 24 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	994,3127	9
Eucgr.F03245.1	PACid 23584292 photosystem ii phosphoprotein	879,4868	1
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	546,3381	2,6666667
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	1074,7435	4
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	666,4097	6
Eucgr.B03720.1	PACid 23569105 hop interacting protein thi032	449,95297	4,6666665
REVERSE12385	Reversed Sequence 12385	367,13104	2,5
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	383,42947	3,3333333
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	348,0007	8,666667
Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	265,2009	4,5
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutam ate homocysteine	199,30482	9,666667
Eucgr.E01113.1	PACid 23577830 cytochrome f	387,11707	2,5
Eucgr.A00264.1	PACid 23561978 photosystem ii cp47 protein	218,54971	4,5

Tabela 19 – Proteínas de clones suscetíveis 24 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.E01261.2	PACid 23577988 predicted protein Populus trichocarpa	247,49617	6,3333335
Eucgr.L02773.1	PACid 23607390 mitochondrial glycine decarboxylase complex t protein	259,88785	5
Eucgr.F01793.1	PACid 23582537 glyceraldehyde 3 phosphate	285,07092	6,3333335
Eucgr.F01776.1	PACid 23582512 catalase isozyme 1 like	262,8646	4,3333335
Eucgr.B01163.3	PACid 23566299 glutamine synthetase	338,47165	4,6666665
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	199,27034	5,3333335
Eucgr.J02030.7	PACid 23600067 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	3570,5415	6,5
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	743,5329	4
Eucgr.G03060.2	PACid 23588849 chlorophyll a b binding	340,0459	3,5
Eucgr.A00095.1	PACid 23561828 PREDICTED fructokinase 2 Vitis vinifera	204,58734	3,5
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	216,90271	4
Eucgr.E04053.1	PACid 23580342 atp synthase gamma chain	104,901596	4

Tabela 19 – Proteínas de clones suscetíveis 24 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	93,4421	4
Eucgr.B02878.1	PACid 23568106 atp synthase beta chain	123,7009	10
Eucgr.I01423.3	PACid 23596001 hydroxypyruvate reductase	117,71506	5

ANEXO K

Tabela 20 – Proteínas de clones resistentes 72 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	9876,288	3,3333333
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	9147,569	3,3333333
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	9548,02	6,5
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	9077,608	4,6666665
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	6945,994	3,3333333
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	4328,9546	4,3333335
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	2141,0376	7,3333335
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	2343,5078	2,6666667

Tabela 20 – Proteínas de clones resistentes 72 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	1886,5602	5
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3042,127	2
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	1984,8516	6
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1025,55	3,3333333
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1842,1431	4,5
Eucgr.J01234.1	PACid 23599204 ribulose 1 5 biphosphate carboxylase oxygenase activase	1310,4965	3
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	502,176	2,6666667
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	867,1554	3
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	767,2439	7,3333335
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	601,07745	4
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	747,325	4
Eucgr.K02283.3	PACid 23603840 glutamine synthetase	553,67737	2,5
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	392,7215	3
Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	627,55835	1

Tabela 20 – Proteínas de clones resistentes 72 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	286,1574	4
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	169,63074	4
Eucgr.G00777.1	PACid 23586421 chlorophyll a b binding	198,141	2,3333333
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	186,57825	3,5
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltrigluta mate homocysteine	148,2655	8
Eucgr.J02030.4	PACid 23600064 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	1374,1653	4,5
Eucgr.H02358.8	PACid 23591674 malate glyoxysomal	130,99374	2
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	95,92645	3,5

ANEXO L

Tabela 21 – Proteínas de clones suscetíveis 72 h.a.i.

(continua)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.J01502.2	PACid 23599482 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	6906,388	3
Eucgr.J01502.1	PACid 23599481 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase small subunit	6312,8047	3

Tabela 21 – Proteínas de clones suscetíveis 72 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.D00321.1	PACid 23574101 chlorophyll a b binding	7198,0283	6,5
Eucgr.D00319.1	PACid 23574099 chlorophyll a b binding	7223,3706	5
Eucgr.E02381.1	PACid 23578899 chlorophyll a b binding	7875,473	3,6666667
Eucgr.I02744.1	PACid 23597539 ferredoxin chloroplast	3794,0916	2
Eucgr.B01088.1	PACid 23566205 photosystem i subunit	1597,2705	2,6666667
Eucgr.J02030.7	PACid 23600067 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplastic isoform 2	1561,2335	3,5
Eucgr.J01234.2	PACid 23599205 ribulose biphosphate carboxylase oxygenase activase chloroplast	1607,7969	1,3333334
Eucgr.I01790.1	PACid 23596486 carbonic chloroplastic like isoform 1	2023,9576	4,6666665
Eucgr.I01025.1	PACid 23595525 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	1645,5776	8
Eucgr.F04099.1	PACid 23585349 chlorophyll a b binding	872,478	3,5
Eucgr.K01362.1	PACid 23602874 type iii chlorophyll a b binding protein	1132,9697	3,3333333
Eucgr.A02039.1	PACid 23563870 oxygen evolving enhancer protein chloroplastic like	1033,2632	3,5

Tabela 21 – Proteínas de clones suscetíveis 72 h.a.i.

(continuação)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.A01047.1	PACid 23562782 chlorophyll a b binding	3344,9656	4
Eucgr.J02738.1	PACid 23600870 h transporting atp synthase	797,68396	1,5
Eucgr.D00854.1	PACid 23574601 oxygen evolving enhancer protein chloroplast	667,9172	3,3333333
Eucgr.I01805.2	PACid 23596511 unknown Populus trichocarpa	376,9566	3
Eucgr.F01476.1	PACid 23582167 phosphoglycerate kinase	347,95944	7
Eucgr.K02606.1	PACid 23604206 2 cys peroxiredoxin	365,9364	2,5
Eucgr.A01769.1	PACid 23563555 rieske iron sulphur protein precursor	254,6655	3
Eucgr.E03874.3	PACid 23580167 catechol o methyltransferase	232,11145	2
Eucgr.K00389.1	PACid 23601851 photosystem i reaction center subunit chloroplast	229,8107	2,5
Eucgr.A02126.4	PACid 23563981 vitamin b12 independent methionine 5 methyltetrahydropteroyltriglutamate homocysteine	120,64155	5
Eucgr.F03324.1	PACid 23584387 bed finger nbs lrr resistance protein	115,405304	3,6666667
Eucgr.I01564.1	PACid 23596193 glyceraldehyde 3 phosphate	173,07349	5

Tabela 21 – Proteínas de clones suscetíveis 72 h.a.i.

(conclusão)

protein.Accession	protein.Description	ScoreAVG	PeptidesAVG
Eucgr.B03593.2	PACid 23568960 rubisco subunit binding protein beta	65,76105	3,5
Eucgr.F04417.1	PACid 23585684 auxin binding protein abp19a	650,40466	3
Eucgr.G01726.5	PACid 23587284 chloroplast latex aldolase like protein	410,4105	3,5
Eucgr.K02983.1	PACid 23604660 chlorophyll a b binding	282,85352	3,5
Eucgr.F01413.3	PACid 23582097 peroxisomal 2 hydroxy acid oxidase glo1	174,48656	4
Eucgr.F01462.3	PACid 23582149 eukaryotic translation elongation	106,71345	3,5