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

**Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em
resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do
raquitismo-das-soqueiras**

Giselle de Carvalho

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

**Piracicaba
2012**

Giselle de Carvalho
Bióloga

Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras

Orientador:

Prof. Dr. **RICARDO ANTUNES DE AZEVEDO**

Co-orientador:

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

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

**Piracicaba
2012**

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

Carvalho, Giselle de

Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras / Giselle de Carvalho. - Piracicaba, 2012.

144 p: il.

Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2012.

1. Bactéria fitopatogênicas 2. Cana-de-açúcar 3. Detecção por patógenos
4. Estresse oxidativo 5. Interação planta-microrganismos 6. Proteômica
7. Raquitismo das soqueiras 8. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDD 633.61
C331a

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

Dedico ao meu bem maior, meu ponto de força e equilíbrio, meus exemplos de vida e perseverança... minha família, Paí, Mãe, Eca, Mari e meus sobrinhos Rafael e Milena... pelo amor incondicional...

AGRADECIMENTOS

Aos mestres que me acompanharam nessa jornada, Ricardo Antunes de Azevedo e Luis Eduardo Aranha Camargo, cada qual à sua maneira, em diferentes etapas, contribuindo essencialmente para minha formação.

Ao professor Ricardo, expresso minha eterna gratidão por ter me recebido em seu laboratório desde o mestrado, por ter me dado a liberdade de seguir com as minhas escolhas, por confiar em meu trabalho, pela atenção, conselhos, amizade e pelo exemplo de profissionalismo.

Ao professor Luis Eduardo Aranha, muito obrigada por me receber em seu laboratório e por ser o grande idealizador desse projeto, por sua tamanha dedicação e cuidado, pela troca de conhecimento durante as longas conversas que enriqueceram grandemente minha formação, pela amizade, pela orientação, pelas parcerias estabelecidas e, por fim, por me auxiliar na construção do pensamento científico.

À professora Cláudia Barros Monteiro-Vitorello, pelas experiências compartilhadas, pela prontidão em sempre me auxiliar, por ser uma grande incentivadora da minha carreira científica, pela grande contribuição e sugestões ao meu projeto e pela amizade.

À professora Maeli Melloto da UTA (University of Texas at Arlington) pela oportunidade de vivência e aprendizado no exterior, pelo incentivo e valiosas sugestões ao meu trabalho. Também agradeço por ter sido bem recebida em seu laboratório e pelo coleguismo do seu grupo.

À Salete Gaziola, pelo incentivo, atenção e auxílio sempre que precisei em todas as fases dessa caminhada. Você é uma pessoa importante que me acompanhou desde meus primeiros passos na ESALQ e que tem me incentivado à seguir em frente.

À professora Monalisa Sampaio Carneiro, pela colaboração e material vegetal concedido.

Não poderia deixar de citar os funcionários e professores do Departamento de Genética, os quais estiveram presentes em todos os momentos, facilitando em muito meu caminho.

Agradeço enormemente aos meus amigos, pessoas especiais, àqueles que passaram de maneira mais rápida nessa jornada, outros, que me acompanharam até o final... mas nenhum é mais ou menos importante e sim, foram essenciais em cada etapa para que eu chegasse até aqui. Sem citar nomes, com receio de algum esquecimento, acredito que eu consiga representar no meu dia a dia a importância que cada um representa em minha vida... Poder contar com alguém quando precisei, isso faz a caminhada valer a pena! Vocês são fundamentais em minha vida! Minha eterna gratidão!

E finalmente, agradeço à ESALQ/USP, por permitir que eu faça parte da sua gloriosa história, à CAPES pelo apoio a pesquisa e ao CNPq e à FAPESP pelo apoio a pesquisa e concessão de bolsas de estudo.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"

(Albert Einstein)

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 QUANTIFICAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i> VIA PCR EM TEMPO REAL.....	21
Resumo	21
Abstract.....	23
2.1 Introdução	25
2.2 Desenvolvimento	26
2.2.1 Materiais e Métodos	26
2.2.1.1 Estirpes bacterianas, cultivo e extração de DNA bacteriano	26
2.2.1.2 Desenho de primers, reações de qPCR em tempo real e testes de especificidade do fragmento.....	28
2.2.1.3 Quantificação temporal de Lxx em variedades de cana-de-açúcar	29
2.2.2 Resultados	33
2.2.2.1 Desenho de <i>primers</i> , testes de especificidade e identidade do fragmento gerado nas reações de qPCR	33
2.2.2.2 Quantificação de Lxx em plantas de cana-de-açúcar	37
2.2.3 Discussão	40
2.3 Conclusões.....	43
Referências	43
3 ANÁLISE PROTEÔMICA DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA À COLONIZAÇÃO POR <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	47
Resumo	47
Abstract.....	49
3.1 Introdução	51
3.2 Desenvolvimento	53
3.2.1 Materiais e Métodos	53
3.2.1.1. Material vegetal, cultivo de Lxx, desenho experimental e inoculação das plantas	53
3.2.1.2 Extração de proteínas do cartucho foliar de cana-de-açúcar	55
3.2.1.3 Análise da qualidade e perfil protéico por SDS-PAGE.....	55
3.2.1.4 Precipitação de proteínas	56
3.2.1.5 Eletroforese bidimensional (2D-DIGE – <i>Differential Gel Electrophoresis</i>).....	56
3.2.1.6 Análises de imagem e estatística realizadas para o géis 2D-DIGE	57
3.2.1.7 Sequenciamento de proteínas	60
3.2.1.8 Análises bioinformáticas	60
3.2.1.9 <i>Heat map</i>	61
3.2.2 Resultados	61
3.2.2.1 Material vegetal	61
3.2.2.2 Extração de proteínas de cartucho foliar de cana-de-açúcar	62
3.2.2.3 Análise protéica em SDS-PAGE	62
3.2.2.4 Eletroforese bidimensional - 2D-DIGE	62
3.2.2.5 Comparação de conjuntos de proteínas que apresentaram diferenças em abundância em função do tempo	67
3.2.2.6 <i>Heat map</i> das proteínas diferencialmente expressas entre os 30 e 60 DAI.....	77
3.2.2.7 Identificação de proteínas ortólogas em <i>Arabidopsis</i> , arroz e cana-de-açúcar.....	78
3.2.2.8 Classificação funcional e vias metabólicas afetadas pelo crescimento de Lxx	80
3.2.2.9 Rede de interação de proteínas	82

3.2.3 Discussão	85
3.3 Conclusões	101
Referências	101
4 RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA À COLONIZAÇÃO POR <i>Leifsonia xyli</i> subsp. <i>xyli</i>	113
Resumo	113
Abstract	115
4.1 Introdução	117
4.2 Desenvolvimento	119
4.2.1 Materiais e Métodos	119
4.2.1.1. Material vegetal, cultivo de Lxx, desenho experimental e inoculação das plantas	119
4.2.1.2 Extração e quantificação de proteínas do cartucho foliar de cana-de-açúcar	119
4.2.1.3 Quantificação de compostos associados à resposta antioxidante	120
4.2.1.4 Atividade das enzimas antioxidantes	121
4.2.1.4.1 Enzimas antioxidantes avaliadas em PAGE	121
4.2.1.4.2 Enzimas antioxidantes avaliadas em espectrofotômetro	123
4.2.2 Resultados e Discussão	125
4.2.2.1 As variedades de cana-de-açúcar apresentaram diferentes níveis de estresse oxidativo ao longo dos tempos avaliados	126
4.2.2.2 A resposta ao estresse oxidativo apresentou a ativação de vias enzimáticas diferenciais para as duas variedades estudadas	128
4.2.2.3 Manutenção do estado redox e sinalização celular ao estresse oxidativo	135
4.3 Conclusões	141
Referências	141

RESUMO

Análise do proteoma e do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, agente causal do raquitismo-das-soqueiras

A cana-de-açúcar, é atualmente a cultura mais plantada no estado de São Paulo, apresentando grande importância no setor agrícola. Assim como qualquer outra cultura, é hospedeira de uma série de patógenos que podem limitar sua produção. A bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é o agente causal do raquitismo-das-soqueiras (RSD) em cana-de-açúcar cujo o principal sintoma é a redução acentuada do crescimento observada em plantas adultas. Essa doença é de difícil diagnose pois a evolução dos sintomas é lenta devido à natureza fastidiosa da bactéria. Lxx pode ser considerada como um endófito obrigatório que cresce a níveis patogênicos nos tecidos da planta dependendo de estímulos bióticos e abióticos. Devido à importância da cultura e aos danos ocasionados pela Lxx, este trabalho apresentou dois enfoques principais: o primeiro foi o desenvolvimento de um protocolo para quantificação de Lxx em tecido de cana-de-açúcar por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real; o segundo foi o estudo da interação entre cana-de-açúcar e Lxx, em busca de uma melhor compreensão da evolução desse processo através da identificação de proteínas que apresentaram alteração em abundância ao longo do tempo em função da colonização pela bactéria em duas variedades de cana (RB835486 e SP80-3280) e em seguida enfatizando o sistema antioxidante nesta relação. Para isso, foram desenvolvidos primers específicos para detecção de Lxx que permitiram quantificar baixos níveis bacterianos em tecido foliar, revelando diferenças entre variedades segundo a cinética do crescimento bacteriano. Plantas com diferentes títulos bacterianos obtidas mediante inoculação artificial ou não foram submetidas à análise proteômica por meio da técnica de 2D-DIGE, uma vez que para o RSD, os danos estão relacionados à alta colonização de Lxx em seus tecidos. Os resultados alcançados com o sequenciamento de proteínas que apresentaram alteração em abundância revelaram que, em plantas da variedade RB835486 observou-se repressão de proteínas da via de estresse oxidativo e metabolismo primário, em contraste com a variedade SP80-3280, que apresentou aumento da abundância de proteínas relacionadas à via de estresse oxidativo, ambas para o mesmo tratamento, em plantas não inoculadas artificialmente. Já em plantas inoculadas com Lxx foram identificadas alterações na abundância de proteínas relacionadas ao crescimento da planta, ciclo celular, vias de sinalização celular e hormonal, esses resultados são consistentes com o principal sintoma da doença, o raquitismo, pois indica que as alterações temporais observadas na expressão de proteínas relacionadas com o aumento do título de Lxx *in planta* podem resultar em alterações do equilíbrio hormonal e menor crescimento da planta. Alguns resultados observados com a análise bioquímica corroboram com os dados acima descritos, pois a variedade RB835486 apresentou uma resposta precoce ao estresse oxidativo e mostrou maior controle do crescimento bacteriano, o que pode estar relacionado ao balanço de ERO's (espécies reativas de oxigênio) utilizadas pelo metabolismo como sinalizador celular na interação planta-patógeno. Em contraste, a variedade SP80-3280, em sua maioria, apresentou indução da atividade de enzimas antioxidantes mais tardiamente, momento em que a bactéria Lxx apresentou os maiores títulos de crescimento.

Palavras-chave: PCR em tempo real; Cana-de-açúcar; Detecção de patógenos; Proteômica; 2D-DIGE; Estresse oxidativo; Interação planta-microorganismo

ABSTRACT

Proteome and antioxidant system analysis of sugarcane in response to *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease

Sugarcane is currently the most grown crop in the state of São Paulo, with great importance in the agricultural sector. Like every crop, sugarcane is host to a number of pathogens that may limit its production. The fastidious bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) is the causal agent of ratoon stunting in sugarcane (RSD), which the main symptom is a sharp reduction in growth observed in adult plants, this disease is difficult to diagnose because the evolution is slow due to nature of fastidious bacteria. Lxx can be considered as an obligatory endophyte that grows at pathogen levels in plant tissues depending on biotic and abiotic stimuli. Due to the importance of culture and the damage caused by the Lxx, this work presents two main approaches: the first one was the development of a protocol for the quantification of Lxx in sugarcane tissue by quantitative real time PCR; the second one was to study the interaction between sugarcane and *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* aiming to a better understanding of the evolution of this process, identifying alterations in abundance of proteins over time depending on the bacterial colonization in the two varieties of sugarcane (RB835486 and SP80-3280) and then, emphasizing the antioxidant system in this relationship. Thus, we developed specific primers that enabled Lxx quantification at low bacterial levels in leaf tissue. The assay showed differences among sugarcane varieties according to the kinetics of bacterial growth. Plants that presented different titers of bacteria were obtained by artificial inoculum or not were selected to proteomic analysis by 2D-DIGE technique, since for RSD, the damage is related to high colonization in plant tissues. The identification of sugarcane proteins revealed that for variety RB835486 were observed a repression of stress proteins and proteins related to primary metabolism, in contrast with SP80-3280 variety, which it was identified high abundance of proteins of oxidative stress pathway, in not inoculated plants, for both varieties. However in inoculated plants it was identified a change in the abundance of proteins related to plant growth, cell cycle, cell signaling and hormonal pathways. These results corroborate with the main symptom of the disease, ratoon, and suggest that temporal changes in expression of sugarcane cited proteins by increasing title of Lxx can result in hormonal imbalance and the decrease of plant growth. The major part of biochemistry analyzes corroborate with previous data obtained in proteomic approach. The RB835486 variety showed an early response to oxidative stress and suggests a greater control of bacterial growth in its tissues, which may be related to the balance of ERO's in signaling metabolism in plant pathogen interaction. While the SP80-3280, showed a later induction of antioxidant enzymes, when the bacterium Lxx had the highest titer of bacteria.

Keywords: Real-time PCR; Sugarcane; Pathogen detection; Proteomics; 2D-DIGE; Oxidative stress; Plant-microbe interaction

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp) e suas lavouras continuam em expansão. A área plantada com essa cultura no país compreende 8,6 milhões de hectares, com uma safra estimada de 602 milhões de toneladas para 2012/13 e destaque para o Estado de São Paulo, que representa 51,66% da área total cultivada (CONAB, 2012). O setor sucroalcooleiro também faz do Brasil o principal país do mundo a implantar, em larga escala, um combustível renovável alternativo ao petróleo.

Entre os fatores importantes que afetam a produção de cana-de-açúcar e consequentemente resultam na redução de biomassa e dos seus subprodutos está a severidade de algumas doenças. No Brasil já foram detectadas a presença de 40 das 177 doenças em cana-de-açúcar provocadas por fungos, bactérias, vírus e micoplasmas encontradas ao redor do mundo. Entre as bacterioses, destaca-se a *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), agente causal do raquitismo-das-soqueiras (RSD, *Ratoon Stunting Disease*), considerada uma das doenças mais importantes da cultura, por estar distribuída em todas as regiões produtoras ao redor do mundo (IGLESIA et al., 2003) e causar prejuízos de mais de 30% de perdas em biomassa em variedades suscetíveis (BRUMBLEY et al., 2006).

A bactéria Lxx coloniza os vasos de xilema planta, é corineforme, gram positiva, aeróbica e fastidiosa (GILLASPIE et al., 1981). A sua disseminação se dá por instrumentos de corte usados na colheita (facão e colhedoras) quando o caldo vegetal contaminado adere à superfície dos instrumentos e propicia a infecção para as demais plantas (COMSTOCK, 2002), além da via de disseminação através de material propagativo, uma vez que a bactéria coloniza as células tronco do tecido meristemático (BAILEY, 1977). O sequenciamento do genoma da Lxx, publicado em 2004 (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004), forneceu informações importantes a respeito da sua fisiologia, entre outros aspectos, e possibilitou o estudo de novos tópicos relacionados à interação desse patógeno com seu hospedeiro, possibilitando a aplicação de novas abordagens para a compreensão desse patossistema.

O raquitismo-das-soqueiras, como o próprio nome diz, é caracterizado pela redução do crescimento das plantas, evidenciado principalmente pelos sintomas externos de encurtamento dos entrenós e colmos com diâmetro reduzido e mais curtos (GAO et al., 2008). Os sintomas internos se caracterizam pela presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas, em decorrência da deposição de gomas ou formação de tiloses nos feixes do xilema e coloração rosada próximo ao meristema apical de plantas jovens (IGLESIA, 2003). Porém, os sintomas do RSD não são típicos, podendo ser facilmente confundidos com outros fatores bióticos ou abióticos. Entre os

bióticos, os sintomas podem estar ligados à doenças provocadas por outros patógenos vasculares como *Fusarium moniliforme*, *Colletotrichum falcatum*, *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum* e *Erwinia herbicola* (TOKESHI, 1997) e entre os abióticos, confundidos com problemas de práticas culturais, umidade inadequada e deficiência nutricional (COMSTOCK, 2002). Ainda, a agressividade da doença é mais pronunciada em condições de déficit hídrico (COMSTOCK, 2002). Atualmente, as formas de controle da doença baseiam-se em manejo varietal e tratamento térmico dos toletes em fase de pré-plantio, entretanto, sabe-se que o último procedimento não é capaz de erradicar a bactéria dos tecidos (COMSTOCK et al., 1996; BRUMBLEY et al., 2006, URASHIMA; GRACHET, 2012), apresentando escapes que servem como fonte de inóculo e disseminação da doença nos canaviais.

Nesse contexto, um dos objetivos do presente trabalho foi o desenvolvimento de uma metodologia de detecção precoce e monitoramento do crescimento de Lxx *in planta*, o que é particularmente importante para a RSD, por se tratar de uma doença de difícil diagnose no campo. Para isso, utilizou-se o conhecimento de sequências únicas de Lxx (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004) para desenho de primers e utilização da técnica de qPCR em tempo real para quantificação da bactéria ao longo do tempo. A escolha da técnica deveu-se em função de sua alta sensibilidade, rapidez, além da possibilidade de estimar o número de células de Lxx nos tecidos da planta.

Considerando que maiores danos do RSD estão diretamente relacionados à alta colonização de Lxx nos tecidos vegetais (DAVIS et al, 1988; McFARLANE, 2002), esse trabalho também teve por objetivo avaliar alterações na abundância de proteínas (proteoma) em plantas inoculadas (alto título) ou não com a bactéria (baixo título) ao longo do tempo. Entre as técnicas disponíveis atualmente para o estudo de proteínas em larga escala, a eletroforese bidimensional (2D-PAGE) é considerada a base da “Ciência Proteômica” e a abordagem mais comumente utilizada para revelar o proteoma de células, tecidos e organismos (QUIRINO et al., 2010; MARTINS DE SOUZA et al., 2008). A técnica de 2D-DIGE (*Two-dimensional Difference Gel Electrophoresis*) é uma variação do 2D-PAGE que apresenta alta acurácia, sensibilidade e reprodutibilidade em comparação com a metodologia convencional (CHENG et al., 2010).

Diante do crescente número de trabalhos dedicados ao sequenciamento de genomas e análise de transcritoômicas, entre outras “ômicas”, a aplicação da proteômica no estudo de interações planta-patógeno oferece uma visão relacionada à expressão e regulação do nível de proteínas durante o processo de evolução da interação (MEHTA et al., 2008). Alguns trabalhos enfocam o estudo da sinalização celular através da utilização de moléculas elicitoras, como exemplo, células em suspensão tratadas com flagelina e quitina (PECK et al. 2001). Outros

estudos abordam apenas a análise do perfil protéico do patógeno quando submetidos à extratos de plantas hospedeiras. Atualmente, muitos trabalhos relatam o estudo da interação *in planta* e abordam os dois lados da interação, embora, qualquer enfoque anteriormente descrito apresentar grande contribuição para o entendimento do processo como um todo.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ERO's) desempenham papel fundamental em vários processos desencadeados na interação planta-patógeno, caracterizando-se como a primeira linha de defesa das plantas contra o ataque de agentes bióticos (MENDOZA, 2011). Portanto, devido à relevância desse sistema na regulação de uma complexa rede de transdução de sinais, o estudo do sistema antioxidante da planta em resposta à colonização por Lxx caracterizou-se como mais um objetivo do presente trabalho. Para tanto, foram analisadas a atividade de algumas enzimas que compõem o sistema antioxidante bem como a produção de alguns compostos não-enzimáticos relacionados à esse sistema de defesa. As ERO's podem atuar no reforço da parede celular, apresentar ação direta sobre o microrganismo, estar envolvidas nas rotas dos hormônios como ácido salicílico, ácido jasmônico e etileno e também atuar como mensageiras secundárias na cascata de transdução de sinais ou diretamente na ativação de genes de defesa e de proteção celular (TORRES, 2010).

Referências

- BAILEY, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, p. 55-56, 1977.
- BRUMBLEY, S.; PETRASOVITS, L.; HERMANN, S.; YOUNG, A.; CROFT, B. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 35, n. 6, p. 681-689, 2006.
- COMSTOCK, J. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2002.
- COMSTOCK, J.C.; SHINE, J.M.Jr.; DAVIS, M.J.; DEAN, J.L. Relationship between resistance to *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* colonization in sugarcane and spread of ratoon stunting disease in the field. **Plant disease**, Saint Paul, n. 80, p. 704-708. 1996.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). Estimativa de produção de cana-de-açúcar safra 2011/2012. **UDOP**, Araçatuba. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/conteudos>. Acesso em: 04 maio 2012.
- DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalk of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 722-727, 1988.

GAO, S.; PAN, Y.; CHEN, R.; CHEN, P.; ZHANG, H.; XU, L. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, New York, v. 10, n. 4, p. 334-340, 2008.

GILLASPIE, A. G. et al. Isolation and pathogenicity of the ratoon stunting disease
IGLESIA, A. Review of ratoon stunting disease of sugarcane (*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*) **Revista Protección Vegetal**, Havana, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2003.

MARTINS DE SOUZA, D.; OLIVEIRA, B.M.; CASTRO-DIAS, E.; WINCK, F.V.;
HORIUCHI, R.S.O.; BALDASSO, P.A.; CAETANO, H.T.; PIRES, N.K.D.; MARANGONI, S.;
NOVELLO, J.C. The untiring search for the most complete proteome representation: reviewing the methods. **Briefings in Functional Genomics and Proteomics**, London, v. 4, p. 312-321, 2008.

MCFARLANE, S.A. The relationship between extent of colonisation by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and yield loss in different sugarcane varieties. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 76, p. 281-284, 2002.

MEHTA, A.; BRASILEIRO, A. C.; SOUZA, D. S.; ROMANO, E.; CAMPOS, M. A.; GROSSI-DE-SA, M. F.; SILVA, M. S.; FRANCO, O. L.; FRAGOSO, R. R.; BEVITORI, R.; ROCHA, T. L. Plant-pathogen interactions: what is proteomics telling us? **FEBS Journal**, Cambridge, v. 275, n. 15, p. 3731-46, 2008.

MENDOZA, M. Oxidative burst in plant-pathogen interaction. **Biotecnología Vegetal**, Santa Clara, n. 2, p. 67-75, 2011.

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

PECK, S.C.; NUHSE, T.S.; HESS, D.; IGLESIAS, A.; MEINS, F.; BOLLER, T. Directed proteomics identifies a plant-specific protein rapidly phosphorylated in response to bacterial and fungal elicitors. **Plant Cell**, Rockville, v. 13, p. 1467-1475, 2001.

QUIRINO, B.F.; CANDIDO, E.S.; CAMPOS, P.F.; FRANCO, O.L.; KRUGER, R.H. Proteomic approaches to study plant-pathogen interactions. **Phytochemistry**, Oxford, v. 7, p. 351-362, 2010.

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

URASHIMA, A.S.; GRACHET, N.G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p.57-54, 2012.

2 QUANTIFICAÇÃO DA COLONIZAÇÃO DE CANA-DE-AÇÚCAR POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* VIA PCR EM TEMPO REAL

Resumo

Leifsonia xyli subsp. *xyli* é o agente causal do raquitismo-das-soqueiras (RSD) da cana-de-açúcar. Trata-se de uma doença de difícil diagnose, uma vez que a evolução de seu principal sintoma, o encurtamento dos entrenós, é lenta devida à natureza fastidiosa da bactéria. Além disto, este sintoma não é único ao RSD, uma vez que pode ser causado por outros fatores de natureza abiótica. Este trabalho descreve o desenvolvimento de um protocolo para quantificação de Lxx em tecido de cana de açúcar por meio da técnica de PCR quantitativo em tempo real. Primers foram desenvolvidos a partir de um gene específico de Lxx e utilizados para estabelecer uma curva padrão que correlaciona valores de Ct com massas de DNA da bactéria e números de células. Os primers mostraram-se específicos para Lxx quando testados com 18 isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar e com *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*. O protocolo foi utilizado para quantificar a bactéria em tecido foliar de plantas de duas variedades (RB835486 e SP80-3280) de cana inoculadas e não inoculadas com Lxx em três tempos após a inoculação (30, 45 e 60 dias). A bactéria foi detectada tanto em plantas não inoculadas como em inoculadas de ambas as variedades, porém em diferentes títulos, expressos na forma de número de células bacterianas/100 ng de DNA vegetal. Em plantas da variedade RB, detectaram-se títulos semelhantes de Lxx aos 60 dias tanto em plantas inoculadas (140,2 células) como em não inoculadas (130,7), entretanto, o título bacteriano aumentou mais precocemente em plantas inoculadas com a bactéria. Já em plantas da variedade SP, aos 60 dias detectou-se uma diferença de cerca de 25 vezes no título entre plantas inoculadas (21,4 células) e não inoculadas (535,7 células). O protocolo de PCR em tempo real aqui relatado mostrou ser específico para Lxx e permitiu quantificar baixos níveis bacterianos em tecido foliar. Ademais, revelou diferenças entre variedades segundo a cinética do crescimento bacteriano. Esse protocolo pode ser empregado para indexar material vegetal em programas de quarentena e também para avaliar a resistência de cultivares.

Palavras-chave: PCR em tempo real; qPCR; Cana-de-açúcar; Detecção de patógenos

2 QUANTIFICATION OF SUGARCANE COLONIZATION BY *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* BY REAL TIME PCR

Abstract

Leifsonia xyli subsp. *xyli* is the causal agent of ratoon stunting disease (RSD) of sugarcane. This is a disease of difficult diagnosis, considering that the development of its major symptom, i.e., shortening of the internodes, is slow due to fastidious behavior of Lxx. Moreover, this symptom is not specific of RSD and might be caused by other abiotic factors. This study describes the development of a protocol for the quantification of Lxx in sugarcane tissues by real time quantitative PCR. Primers were designed based on the sequence of an Lxx-specific gene and used to define a standard curve that correlates Ct values with Lxx DNA masses and cell numbers. Primers were shown to be specific for Lxx when tested on 18 bacterial endophytic isolates of sugarcane and on *Leifsonia xyli* subsp. *cynodontis*. The protocol was used to quantify Lxx in leaf tissue of plants from two sugarcane varieties (RB835486 and SP80-3280) inoculated or not with the bacterium in three times after inoculation (30, 45 and 60 days; DAI). Lxx was detected both in inoculated and non-inoculated plants of the two varieties but in different titers expressed as the number of Lxx cells /100 ng of plant DNA. In plants of the RB835486 variety the bacterial titers at 60 DAI was similar between inoculated (140.2 cells) and non-inoculated (130.7 cells) treatments. However, in inoculated plants the bacteria grew faster. In contrast, in plants of SP80-3280, a 25-fold difference in titers was detected between not inoculated (21.4 cells) and inoculated (535.7 cells) plants at 60 DAI. The qPCR protocol was specific for Lxx and was able to quantify the bacterium in low titers in leaf tissue. Furthermore, it also detected differences between varieties related to the kinetics of bacterial growth. This protocol can be used to index plant material for quarantine purposes as well as to assess the resistance levels of cultivars.

Keywords: Real time PCR; qPCR; Sugarcane; Pathogen detection

2.1 Introdução

Estimativas de danos causados por doenças dependem de métodos que permitam a quantificação de patógenos *in planta* e que apresentem alta sensibilidade e especificidade, sobretudo em casos de microrganismos que colonizam o sistema vascular e que não causam sintomas específicos. A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é fastidiosa, habita o xilema de cana-de-açúcar e é o agente causal do raquitismo-das-soqueiras (RSD, do inglês *Ratoon stunting disease*), doença cujos danos estão diretamente relacionados à quantidade de bactéria nos tecidos da planta (DAVIS et al, 1988; McFARLANE, 2002). O sintoma mais evidente do raquitismo, como o nome implica, é um subdesenvolvimento da planta, caracterizado pela redução de seu porte e pelo encurtamento dos entrenós. Internamente, os sintomas se caracterizam pela presença de pontuações avermelhadas abaixo dos nós e coloração rosada próximo ao meristema apical de plantas jovens (STEINDL, 1961; PAN et al, 1998). No entanto, estes sintomas não são típicos, podendo ser facilmente confundidos com doenças provocadas por outros patógenos vasculares, além de serem influenciáveis por condições ambientais (TOKESHI, 1980).

Atualmente, o RSD é encontrado em plantios em todo mundo, sendo responsável por mais de 30% de perdas em biomassa em variedades suscetíveis (BRUMBLEY et al., 2006). Nos Estados Unidos, na África do Sul, na Austrália e no Brasil, por exemplo, foram relatadas perdas da ordem de 33% (GRISHAM, 1991), 41% (BAILEY e BECHET, 1997), 37% (YOUNG e BRUMBLEY, 2004) e 21% (CHAGAS e MATSUOKA, 1988), respectivamente. Um estudo comparativo entre variedades inoculadas com Lxx mostrou que as perdas variam em função do genótipo da planta (GAGLIARDI e CAMARGO, 2009) e de acordo com as condições ambientais, sendo particularmente mais evidentes em situações de déficit hídrico (COMSTOCK, 2002).

Os métodos de detecção de Lxx mais utilizados incluem o exame direto por microscopia de contraste de fase (GILLASPIE et al., 1973) e o uso de técnicas de detecção imunológica, como *fluorescent antibody direct-count on filters* (FADCF) (DAVIS, 1985), *dot-blot enzyme immunoassay* (DB-EIA) (HARRISON, DAVIS, 1988), *evaporative-binding enzyme immunoassay* (EB-EIA) (CROFT et al., 1994), e *tissue-blot enzyme immunoassay* (TB-EIA) (HARRISON, DAVIS, 1988). No entanto, estas técnicas não possuem a sensibilidade necessária para detectar o patógeno quando presente em baixo título em tecidos vegetais (LÓPEZ et al., 2009). Desta forma, a reação de PCR convencional usando *primers* específicos tem sido o método mais sensível usado na detecção de Lxx (FEGAN et al., 1998; PAN et al., 1998; GAO et al., 2008). Porém, esta técnica não fornece uma estimativa precisa da quantidade de bactéria

presente no material analisado, além de necessitar de procedimentos extras, como visualização dos amplicons em gel de agarose.

O PCR em tempo real, ao contrário, apresenta alta sensibilidade e maior rapidez, além de permitir quantificar o patógeno em material vegetal com base na relação entre valores de Ct (*cycle threshold*) e de quantidades conhecidas de massas de DNA do organismo alvo (D'HAENE et al., 2010). Grisham et al. (2007) adaptaram esta técnica para a quantificação precoce de Lxx em tecidos de folha de três variedades inoculadas ou não de cana e com diferentes graus de resistência a Lxx com base em *primers* desenhados a partir da região ITS. O método detectou a bactéria em plantas a partir de três meses de idade após a inoculação. Os autores também analisaram as mesmas amostras por TB-EIA e concluíram que este teste só foi capaz de detectar a bactéria após a formação de colmos maduros, cerca de sete meses após o plantio.

Este trabalho desenvolveu um novo protocolo para detecção e quantificação de Lxx por PCR quantitativo em tempo real e avaliou o crescimento da bactéria em plântulas de duas variedades inoculadas de cana-de-açúcar. O procedimento, diferente do publicado para o mesmo organismo (GRISHAM et al., 2007), baseou-se em *primers* concebidos a partir de sequências genômicas únicas de Lxx cuja especificidade foi testada em reações com DNA da subespécie *L. x. subsp. cynodontis*, que é endófito de gramíneas, e de isolados bacterianos endofíticos de cana-de-açúcar. O conhecimento da sequência genômica completa de Lxx (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004) permitiu estabelecer uma relação entre valores de Ct e o número de células bacterianas presentes na amostra.

2.2 Desenvolvimento

2.2.1 Materiais e Métodos

2.2.1.1 Estirpes bacterianas, cultivo e extração de DNA bacteriano

Estirpes bacterianas: utilizou-se a estirpe CTCB07 de Lxx para a inoculação de plantas e também como controle positivo em reações de qPCR. A especificidade dos *primers* foi testada com a estirpe DSMZ46306 de *Leifsonia xyli subsp. cynodontis* (Lxc) e com estirpes de bactérias endofíticas isoladas de colmos de variedades comerciais de cana coletadas no Departamento de Artigas (Uruguai). Estas foram isoladas após desinfestação superficial dos colmos por imersão em álcool 70% seguida de imersão em hipoclorito de sódio 4% e lavagem em água destilada. Pequenos pedaços de colmos foram macerados e 100 µL de uma suspensão diluída (10^{-5}) em

solução de 0,9% NaCl foram plaqueados em meio MscNew modificado ou DYGS (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004, RODRIGUES NETO et al. 1986) e incubados por 20 dias a 30°C. Dezoito isolados com aspectos culturais diferenciados foram selecionados para os testes de especificidade. A identidade dos isolados foi determinada pelo seqüenciamento parcial do gene 16S rDNA usando os *primers* P027F e 1378R, segundo as condições de amplificação de Kuklinsky-Sobral et al. (2004).

Cultivo das bactérias: os isolados de bactérias endofíticas foram cultivados em meio DYGS, ao passo que Lxx e Lxc foram cultivadas em meio MscNew modificado (MONTEIRO-VITORELLO et al. 2004). Este meio foi originalmente descrito por Davis *et al.* (1984) e modificado por Monteiro-Vitorello et al. (2004) que incorporaram os aminoácidos metionina e cisteína à composição. O meio foi composto por 8,0 g de peptona de soja, 0,2g MgSO₄. 7H₂O, 13 mL de K₂HPO₄ 0,1M, 87 mL de KH₂PO₄ 0,1M, 30 mL de solução de 0,1% de hemina bovina em NaOH 0,05M e 900 mL de água. No caso de preparo de meio sólido, adicionou-se 17g/L de ágar de milho e 4g/L de ágar bacteriológico. Após o ajuste do pH para 7,5 com NaOH 1M, o meio foi esterilizado por autoclavagem e, após seu resfriamento, foi adicionado de 100 mL (10% v/v) de uma solução esterilizada em filtro de 0,22 µm (Millipore®) contendo 5,0 g de glicose (Merck), 0,5g de cisteína (Sigma), 2,0g de albumina bovina (Inlab) – fração V e 0,5 g de metionina (Vetec). O inóculo de Lxx foi preparado transferindo-se um loop de células cultivadas em meio MscNew sólido modificado para 50 mL de meio de cultura líquido. A cultura foi incubada a 28 °C por 8 dias sob agitação de 150 rpm até atingir a densidade óptica (DO) de 0,8. Três alíquotas de 100 µL foram diluídas em série, semeadas em meio de cultura sólido e incubadas a 28 °C por cerca de 20 dias até que as colônias se tornassem visíveis afim de que fosse possível contá-las.

Extração de DNA bacteriano: cinquenta mL de culturas líquidas em fase log de crescimento (DO = 0,8) foram centrifugados a 12.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado 3 vezes em solução de NaCl 1M e tampão T₁₀E₁₀ (10 mM tris 10mM EDTA – pH 8,0). As células foram ressuspensas em 8,25 mL de solução SET (NaCl 75mM, EDTA 25mM, tris-base 20mM – pH 7,5) adicionada de 1 mg/mL de lisozima e incubadas a 37oC por 2 horas. A suspensão foi adicionada de 1/10 volume de SDS contendo 0,5 mg/mL de proteinase K e incubada a 55oC por 2 horas. Em seguida, foi adicionado 1/3 de volume de NaCl 5M e 1 volume de clorofórmio e o homogeneizado foi incubado a temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugado a 5000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado de 1 volume de isopropanol gelado para a precipitação do DNA. O DNA foi

suspendido em 60 µL de tampão TE pH 8,0 e a digestão do RNA foi feita com 0,5 ug/µL de RNase por 1 hora a 37°C. Após a digestão, o ácido nucléico foi quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® 1000 – Thermo Scientific).

2.2.1.2 Desenho de primers, reações de qPCR em tempo real e testes de especificidade do fragmento

Desenho de *primers*: pares de *primers* foram desenhados com os softwares *Primer 3 V.4* (Rozen et al., 2000) e *Primer Express V 3.0* (Applied Biosystems) a partir de sequências de genes preditos únicos de Lxx, cujas sequências não apresentaram similaridade a outras depositadas no GenBank (ORFans). As sequências foram alinhadas à sequências com alguma similaridade depositadas no GenBank através da opção “*somewhat similar sequences*” do software BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e as regiões similares foram mascaradas a fim de serem desconsideradas durante o desenho dos *primers*. A complementaridade entre os *primers* foi avaliada com os softwares *NetPrimer* (Premier Biosoft International; www.premierbiosoft.com/netprimer) e *GeneRunner* (www.generunner.net).

Reação de qPCR em tempo real: as reações foram realizadas em termociclador 7500 FAST (Applied Biosystems) usando o kit Platinum SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen) conforme as recomendações do fabricante. As reações consistiram de 12,5 µL de tampão de amplificação SuperMix, 0,5 µL de uma solução 10 µM de cada *primer*, 0,5 µL de uma solução 2,5 µM da referência interna de fluorescência ROX, 9 µL de água livre de nuclease (IDT) e 2 µL de DNA em diferentes concentrações conforme a aplicação. O protocolo de amplificação foi de um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos e um ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 95°C/10s e 60°C/30s e um ciclo final à 72°C/5min. Para efeito de comparações, também foram realizadas reações com os *primers* Lxx202F/ Lxx331R conforme descrito por Grisham et al. (2007) (dados não apresentados). A curva de dissociação foi calculada de acordo com os parâmetros *default* do equipamento.

Os testes de especificidade dos *primers* foram realizados com 0,01 ng de DNA das estirpes bacterianas, uma vez que ensaios anteriores definiram que essa foi a maior concentração de DNA de Lxx encontrada em plantas sintomáticas da variedade CB49-260, que é altamente suscetível a Lxx (dados não apresentados).

Uma curva padrão que relaciona diferentes massas do DNA de Lxx e valores de Ct (*Cycle threshold*) foi obtida utilizando 10 ng, 1 ng, 0,1 ng, 0,01 ng, 1 pg, 0,1 pg e 0,01 pg de

DNA de Lxx por reação. Estas massas correspondem respectivamente a $3,8 \times 10^6$, $3,8 \times 10^5$, $3,8 \times 10^4$, $3,8 \times 10^3$, 380, 38 e 3,8 células de Lxx, levando-se em conta as massas moleculares dos quatro nucleotídeos e que a estirpe CTCB07 possui um único cromossomo com 2.584.158 pb e 68% GC e não possui plasmídeo (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004).

Confirmação da identidade do fragmento gerado nas reações de qPCR: nove produtos da reação de qPCR escolhidos aleatoriamente entre amplicons de amostras das variedades RB835486 e SP80-3280 coletadas antes e 60 dias após a inoculação, bem como de amplicons gerados a partir de amostras de DNA de Lxx foram resolvidos em gel de agarose 0,8% e purificados com o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (GE Healthcare, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos foram quantificados em espectrofotômetro e sequenciados em aparelho ABI 3100 (Applied Biosystems) com o kit *ET Dye-terminators*. As sequências foram editadas com o uso do software Sequencher 3.0 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, EUA) e submetidas a uma busca no GenBank através do algoritmo BLASTN (ALTSCHUL et al., 1990).

2.2.1.3 Quantificação temporal de Lxx em variedades de cana-de-açúcar

Material vegetal: foram utilizadas as variedades RB835486 e SP80-3280. Toletes de três gemas foram tratados termicamente por imersão em água a $50,5^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e cortados em toletes de uma gema com o auxílio de uma guilhotina previamente desinfestada em solução de amônia quaternária (Quatermon® 0,1% - Chemitec). Posteriormente, o material foi imerso em solução fungicida (Metiltiofan 90g/100L) e plantado em vasos de 0,5L (Figura 2.1) contendo substrato Basaplant (Base). Plantas foram selecionadas aos 30 dias após o plantio com base no vigor e tamanho, a fim de reduzir a variação entre plantas e transplantadas para vasos de 22,5L (3 plantas/vaso) contendo substrato composto por uma mistura de 2:1 (solo:substrato Basaplant) adicionada de 2g/L do adubo granulado Basacote (3M) de formulação 15-8-12 (Figura 2.2).

Figura 2.1 - Tratamento térmico em “Tanquinho Copersucar” (1); desinfecção da guilhotina (2); tratamento com fungicida (3); pré-plantio das gemas (4) e (5)

Figura 2.2 - Instalações do experimento de em casa de vegetação

Inoculação e desenho experimental: o experimento foi conduzido em casa de vegetação sob irrigação controlada por gotejamento durante o período de 20/07/2009 a 29/10/2009. As plantas foram inoculadas sete dias após o transplantio por meio do corte da parte aérea na altura de dois cm da base com o auxílio de lâminas de bisturi estéreis perfuração do tecido remanescente com agulhas estéreis (três perfurações/planta) e deposição de 50 μL do inóculo na superfície do corte (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Inoculação de plantas de cana-de-açúcar com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

O experimento compreendeu 12 tratamentos (Tabela 2.1): 2 variedades x 2 condições de inoculação (inoculada com Lxx ou inoculada com meio de cultura estéril) x 3 tempos de coleta (30, 45 e 60 dias após a inoculação) (Figura 2.4) e três repetições dispostos em um delineamento de blocos ao acaso. Cada repetição foi constituída de um vaso com três plantas. As reações de qPCR em tempo real foram realizadas para cada planta individualmente e a média dos valores de Ct das plantas de cada repetição foi usada nas análises estatísticas. Todas as plantas foram analisadas no tempo 0 (antes da inoculação) com a finalidade de avaliar se estavam previamente infectadas com Lxx.

Tabela 2.1 – Códigos e descrições dos tratamentos utilizados na análise de qPCR em tempo real

Variedade	Tempo de coleta (dias)	Descrição do tratamento	Código do tratamento
RB835486	30	inoculação com meio	RB MI ₃₀
		inoculação com Lxx	RB LxxI ₃₀
	45	inoculação com meio	RB MI ₄₅
		inoculação com Lxx	RB LxxI ₄₅
	60	inoculação com meio	RB MI ₆₀
		inoculação com Lxx	RB LxxI ₆₀
SP80-3280	30	inoculação com meio	SP MI ₃₀
		inoculação com Lxx	SP LxxI ₃₀
	45	inoculação com meio	SP MI ₄₅
		inoculação com Lxx	SP LxxI ₄₅
	60	inoculação com meio	SP MI ₆₀
		inoculação com Lxx	SP LxxI ₆₀

Figura 2.4 - Esquema do experimento de quantificação de Lxx via qPCR em tempo real

Extração de DNA vegetal: a extração de DNA foi realizada com o kit Invisorb® (Invitek) a partir de cerca de 75 mg de tecido de cartucho foliar macerados em almofariz na presença de nitrogênio líquido e transferidos para um tubo *eppendorf* de 1,5 mL. A extração se deu de acordo com as recomendações do fabricante exceto pela inclusão de uma etapa de digestão das amostras com 1mg/mL de lisozima (Sigma) após a etapa inicial de separação de material vegetal. O DNA foi suspenso em 80µL de água isenta de nuclease (IDT) e quantificado em aparelho NanoDrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA). Sua integridade foi verificada em gel de agarose a 1%.

Determinação da concentração de DNA total de cana-de-açúcar a ser utilizada em reações de qPCR: a quantidade ótima de DNA vegetal usada nas reações de qPCR foi determinada pela análise da eficiência das reações de qPCR usando 200 ng, 100 ng e 50 ng de DNA extraído de plantas das variedades RB835486 e SP80-3280 escolhidas aleatoriamente entre os tratamentos aos 30 e 60 DAI. As reações de qPCR foram realizadas como descrito anteriormente.

Quantificação de Lxx *in planta*: as reações foram realizadas como descrito anteriormente utilizando o par de *primers* selecionado e a quantidade ótima de DNA vegetal determinada. Cada reação de qPCR foi conduzida em duplicata (réplica técnica), totalizando $n=18$ reações (3 plantas x 3 repetições x 2 réplicas técnicas) por tratamento. Já para o tempo zero (T_0), o número de plantas analisadas foi de $n=216$, que corresponde ao número total de plantas do experimento.

Análises de dados: os valores de Ct foram primeiramente transformados para número de células de Lxx com base na curva padrão mencionada acima e esta variável foi utilizada em análises de comparação de médias pelo teste de Tukey.

2.2.2 Resultados

2.2.2.1 Desenho de *primers*, testes de especificidade e identidade do fragmento gerado nas reações de qPCR

As ORFans escolhidas foram: Lxx00990 (gi:50954001), Lxx12610 (gi:50954920), Lxx12650 (gi:50954924) e Lxx12950 (gi:50954950) (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Sequências de *primers* utilizados para testes de quantificação de Lxx por meio de qPCR

ORF	Sequências de <i>primers</i>	Tamanho do fragmento (pb)
Lxx990	1) Lxx990F - 5'-CTGCAGATTCCTGCTCACCT-3' Lxx990R - 5'-TCGGGGATCGTGTACGAATA-3'	150
	2) Lxx990F1 - 5'-GGACATTCCTGCTCACCTCT-3' Lxx990R1 - 5'-TCGGGGATCGTGTACGAATA-3'	148
Lxx12610	3) Lxx12610F - 5'-GGTAGAGCCCTTCGTCGTC-3' Lxx12610Rc - 5'-TGCAGCTTCACATCGGAGGG-3'	124
	4) Lxx12610F1 - 5'-ATGAACCCGTAGAGGTCAGC-3' Lxx12610R1 - 5'-GCAGAGCACATGCTTTCAGA-3'	134
Lxx12650	5) Lxx12650F1- 5'-TCTTCACCTCGCCCATCTTC-3' Lxx12650R1- 5'-CCCATCCGGCATAGCTACTG-3'	138
	6) Lxx12650F2- 5'-AACGAAGCCCGAGAACATC-3' Lxx12650R2- 5'-AGACGTCGGAACAACAGCTT-3'	100
Lxx12950	7) Lxx12950F1- 5'-GCACATCGATCTGGAAAAAAGG-3' Lxx12950R1- 5'-CCGCAGTCTCACGCATACC-3'	106
	8) Lxx12950F2-5'-ATCGATCTGGAAAAAAGGCATGT-3' Lxx12950R2- 5'-GCAGTCTCACGCATACCG-3'	100

Os pares de *primers* 1, 2 e 4 não apresentaram boa reação de amplificação, a julgar pela análise das curvas de dissociação que indicaram formação de dímeros e aoCorrência de amplificações inespecíficas (Figura 2.5A). Já o par 3, apesar de sua especificidade (visualizado na forma de um único pico na curva de *dissociação*), também resultou na formação de dímeros ou de outras interações entre os *primers*, especialmente em amostras com baixo título de Lxx (Figura 2.5B). Os pares 5, 6, 7 e 8 apresentaram especificidade e ausência de formação de dímeros (Figuras 5C, 5D). Entretanto, os pares 5, 6 e 8 foram excluídos, pois resultaram em produtos de amplificação quando testados com DNA de Lxc, muito embora somente sob condições de alta concentração de DNA bacteriano (dados não apresentados). Desta forma, o par de *primers* 7 (Lxx12950F1/R1) foi escolhido para estudos subsequentes. Este par não resultou em amplificações quando testado em isolados endofíticos (Figura 2.6), cujas identidades inferidas estão na tabela 2.3 e representam 11 gêneros. A temperatura de dissociação do fragmento gerado por este par é de 84,5°C.

Figura 2.5 – Exemplos de curvas de dissociação (melt curve) e de amplificação (amplification plot) para pares de *primers* desenhados com base em sequências de ORFans de Lxx

Tabela 2.3 - Identidade de isolados endofíticos bacterianos de cana de açúcar utilizados em testes de especificidades de *primers* inferida com base na sequência do gene 16S rDNA

Código isolado	Identificação – 16S rDNA	gi number
DL1	<i>Aeromicrobium erythreum</i>	219857218
DL3/DL7	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>	300253181
DN6	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	357979447
DN10	<i>Curtobacterium</i> sp.	190351676
DT2	<i>Shinella</i> sp.	325464749
DT9	<i>Enterococcus avium</i>	359805240
ML7	<i>Methylobacterium</i> sp.	218534203
ML8	<i>Microbacterium testaceum</i>	20799376
MT2/MT11	<i>Acidomonas methanolica</i>	359803089
MT5	<i>Agrobacterium</i> sp.	332715333
MT7	<i>Gluconacetobacter</i> sp.	152032358
MT8	<i>Brevundimonas</i> sp.	312839664
ML1/ML3/ML	<i>Microbacterium</i> sp.	325560596
MT6	<i>Microbacterium hominis</i>	307075236

Figura 2.6 - Teste de especificidade dos *primers* Lxx12950F1/R1 com isolados endofíticos de cana de açúcar e com Lxc. Colunas 1 e 2 – Lxx (10 ng e 0,01 ng), coluna 3 – Lxc (0,01 ng), colunas 4 a 21 – isolados endofíticos descritos na tabela 2.3, coluna 22 – controle negativo, M – marcador de tamanho de DNA (1 kb DNA plus ladder)

As curvas de amplificação com concentrações serialmente diluídas de DNA de Lxx podem ser visualizadas na figura 2.7A. A análise das curvas de dissociação derivadas de cada amostra confirmou a temperatura de melting esperada do amplicon de 84,5°C (dados não apresentados). A relação entre valores de Ct e massa de DNA de Lxx foi estabelecida de maneira precisa ($R^2 = 99,8 \%$) e foi expressa pela equação $y = -3,391x + 20,052$ (Figura 2.7B), onde y corresponde ao Ct e x ao log da massa de DNA (ng) de Lxx. O valor da inclinação da reta corresponde a uma eficiência de reação de 97,2%.

Figura 2.7 – (A) Perfis de amplificação de reações contendo massas conhecidas de DNA de Lxx (10ng - 100fg) com o par de *primers* Lxx12950F1/R1, representadas por duplicatas experimentais (linhas vermelhas e amarelas); (B) curva padrão de correlação entre concentrações conhecidas da massa de DNA e número de células de Lxx com valores de C_t . Barras verticais em B indicam desvios padrões da média (média= valores médios de C_t obtidos para cada concentração, com o uso de duplicata técnica em todas as placas utilizadas para o experimento de quantificação de Lxx *in planta*)

2.2.2.2 Quantificação de Lxx em plantas de cana-de-açúcar

Determinação da concentração de DNA total de cana-de-açúcar utilizada em reações de qPCR: a concentração de DNA que resultou em melhor desempenho de amplificação foi a de 100 ng (Figura 2.8), uma vez que em reações com 200 ng de DNA a reação atingiu a fase de platô mais precocemente e em reações com 50 ng não foram observadas amplificações em algumas amostras (dados não apresentados).

Figura 2.8 – Curvas de amplificação com 200ng (1), 100 (2) e 50ng (3) de DNA genômico de cana-de-açúcar

Quantificação temporal de Lxx nas variedades RB835486 e SP80-3280: A temperatura média e umidade relativa do ar registradas durante o experimento foram de 25,5°C e 58%, respectivamente. A viabilidade do inóculo de Lxx foi confirmada pelo plaqueamento e contagem de UFC, a qual resultou em 10^5 células/ml para uma DO=0,8 (dados não apresentados). Valores máximos e mínimos de Ct, média da massa de DNA de Lxx e média do número de células de Lxx para todos os tratamentos estão representados na tabela 2.5. Constatou-se a presença da bactéria em todas as plantas antes da inoculação (amostras T_0) mesmo após os toletes terem sido submetidos a tratamento térmico. No entanto, o título bacteriano neste tempo foi semelhante entre as duas variedades, sendo que a média de células/100 ng DNA total de tecido vegetal foi de 19,2 ($\pm$ 2,9) e 17,2 ($\pm$ 2,5), para plantas das variedades RB835486 e SP80-3280, respectivamente.

O número de células de Lxx aumentou com o decorrer do tempo, tanto para o tratamento inoculado quanto para o não inoculado, em ambas as variedades (Figura 2.9). Em plantas inoculadas apenas com o meio, observou-se aumento significativo no número de células somente para a variedade RB835486, 60 dias após a inoculação em relação ao momento T_{30} (RB MI₃₀). Já em plantas inoculadas, observou-se aumento significativo nos títulos bacterianos aos 60 dias, em ambas as variedades em relação a T_{30} . No entanto, o título bacteriano final foi maior na variedade SP80-3280, cerca de 4 vezes maior do que em plantas da variedade RB835486.

Figura 2.9 – Log do número de células de Lxx detectadas em 100ng de DNA total de cana-de-açúcar via qPCR para as variedades RB835486 (A) e SP80-3280 (B) em três tempos de coleta – 30, 45 e 60 dias após a inoculação - e tratamentos inoculado com o meio e inoculado com Lxx. As barras representam o erro padrão da média ($n= 18$ reações - 3 plantas x 3 repetições x 2 réplicas técnicas). Médias dentro de cada tratamento (inoculado com o meio e inoculado com Lxx), seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de Tukey

Tabela 2.5 – Amplitude dos valores de Ct, massa média de DNA de Lxx (ng)/100 ng de DNA total e número médio de células/100 ng de DNA total de plantas das variedades RB835486 e SP80-3280 inoculados com Lxx ou com meio aos 30, 45 e 60 dias após a inoculação

Variedade	Tratamento	Valores de Ct		Massa de DNA de Lxx (ng)/100 ng de DNA total	Número de células de Lxx/100 ng de DNA total
		Min	Max		
RB835486	RB MI ₃₀	34,24	36,77	$6,34 \times 10^{-6}$	2,5
	RB LxxI ₃₀	33,55	37,18	$1,84 \times 10^{-5}$	7,3
	RB MI ₄₅	35,27	36,34	$1,45 \times 10^{-5}$	5,7
	RB LxxI ₄₅	31,97	35,56	$5,30 \times 10^{-5}$	32,7
	RB MI ₆₀	30,52	34,87	$3,32 \times 10^{-4}$	130,7
	RB LxxI ₆₀	30,61	33,42	$3,56 \times 10^{-4}$	140,2
SP80-3280	SP MI ₃₀	33,08	36,65	$1,78 \times 10^{-5}$	7,0
	SP LxxI ₃₀	34,04	35,97	$1,13 \times 10^{-5}$	4,5
	SP MI ₄₅	34,67	36,02	$2,30 \times 10^{-5}$	9,2
	SP LxxI ₄₅	30,25	36,31	$3,82 \times 10^{-5}$	45,9
	SP MI ₆₀	32,94	36,32	$5,39 \times 10^{-4}$	21,4
	SP LxxI ₆₀	27,13	36,55	$1,37 \times 10^{-3}$	535,7

2.2.3 Discussão

Os métodos de detecção de Lxx evoluíram a partir de testes de microscopia e sorologia para o PCR convencional. Entretanto, este último método, embora eficaz na detecção, não fornece estimativas precisas do número de células presentes no tecido vegetal. No caso do raquitismo, a quantificação precisa de Lxx é importante, pois existe uma estreita correlação entre quantidade de bactéria e perdas na produção (DAVIS et al., 1988; McFARLANE, 2002). Desta forma, o desenvolvimento de um protocolo de quantificação de Lxx por meio de PCR em tempo real pode ser eficazmente utilizado para discernir genótipos de cana-de-açúcar que sejam mais resistentes à colonização pela bactéria e que, consequentemente, sejam menos afetados em produção (GRISHAM et al., 2007).

Este trabalho desenvolveu um protocolo de quantificação de Lxx em tecido foliar de cana-de-açúcar diferente do relatado por Grisham et al. (2007). Para uma quantificação confiável de patógenos em tecidos vegetais, algumas variáveis precisam ser controladas. Entre estas se encontram a boa qualidade do ácido nucléico (SCHENA et al., 2004) e o uso de uma quantidade de DNA de tecido que permita a quantificação precisa e confiável do organismo alvo, quantidade esta baseada em limites mínimos detectáveis (CANKAR et al., 2006;

D'HAENE et al., 2010). No presente estudo, o método de extração de DNA utilizado levou em consideração a natureza gram-positiva da bactéria e envolveu o emprego de lizosima e proteinase, que são enzimas comumente usadas na extração de DNA de bactérias deste grupo (POSPIECH e NEUMANN, 1995). Ainda foram avaliadas a quantidade e a qualidade do DNA vegetal utilizado na reação por meio de espectrofotometria e corrida em gel de agarose.

Foram avaliados *primers* desenvolvidos a partir de informações do genoma de Lxx. O par Lxx 12950F1/Lxx12950R1 apresentou ótima eficiência de reação e especificidade, pois não resultou em amplificações quando testado em isolados bacterianos endofíticos de cana de açúcar e também em um isolado de *L.x. subsp. cynodontis*. Também foram testadas as concentrações de 50, 100 e 200 ng de DNA total em diluições realizadas para a mesma amostra biológica. A concentração de 50 ng não amplificou em amostras não inoculadas e com baixo título e isso pode gerar resultados de “falso negativo” (LÓPEZ et al., 2009). Com o uso de 200 ng, a reação atingiu a fase de platô mais precocemente, o que indica que a amplificação estava em estado sub-ótimo devido à limitação dos reagentes e à competição dos produtos gerados com os *primers* disponíveis. Isso gera diferentes valores de *slope* para cada curva de amplificação e por isso interfere na eficiência da mesma (CANKAR et al., 2006). Portanto, a concentração de 100 ng foi a escolhida como a ideal. Grisham et al. (2007) reportaram o uso 1 µL de DNA total de folha de cana-de-açúcar como molde da reação para detecção de Lxx ao passo que Pan et al. (1998) estudaram a detecção de Lxx em fluido de cana-de-açúcar e também citam a utilização de 1 µL de DNA total como molde da reação de PCR convencional. Porém, dada a importância de usar uma concentração conhecida de DNA na reação, em ambos os trabalhos esta falta de padronização pode ter gerado falsos negativos.

Com relação à quantificação de Lxx *in planta*, a primeira constatação do experimento foi a detecção de Lxx em todas as plantas no tempo T₀, antes da inoculação, indicando que o tratamento térmico dos toletes não foi capaz de erradicar as células de Lxx. Muito embora seja conhecido que o procedimento não seja 100% eficiente (DAMANN e BENDA, 1983; COMSTOCK et al., 1996; BRUMBLEY et al., 2006, URASHIMA; GRACHET, 2012), o tratamento térmico de material vegetal é um dos métodos de controle preconizado para Lxx. O fato de Lxx ter sido detectada em 100% das plantas deste estudo, no entanto, aponta que a termoterapia foi ineficiente como agente erradicante. Uma das explicações para isso é que estudos anteriores que recomendaram a técnica se basearam em avaliações com métodos serológicos como DB-EIA e TB-EIA que, como comentado no início, são menos sensíveis que a técnica de PCR em tempo real. Outra possibilidade é que a eficiência da técnica é variável em função da variedade de cana. Grisham et al. (2007) também detectaram amostras

positivas em plantas provenientes de toletes tratados termicamente por meio desta técnica, embora em uma frequência bem mais baixa que nesse trabalho. Alguns fatores podem ter contribuído para isso, como o método de extração de DNA utilizado, que não utilizou lisozima e proteinase, e pela não padronização da concentração de DNA total utilizada nas reações.

A quantificação de Lxx nas duas variedades indicou dinâmicas distintas de crescimento da bactéria. Aos 30 dias após a inoculação, ambas as variedades apresentaram número similar de células para os tratamentos inoculado com o meio e com Lxx. Entretanto, ao final dos 60 dias, a população bacteriana atingiu o mesmo número de células em plantas da variedade RB835486 independente da inoculação, seja para a condição inoculada ou não (média de 135 células). Isto indica que o título final de Lxx não foi modificado em função da inoculação. Já na variedade SP80-3280 tal situação não foi verificada, uma vez que o título bacteriano variou significativamente ao longo do tempo somente em plantas inoculadas com Lxx. Os dados sugerem, portanto, que na ausência de algum fator que altere o título bacteriano, neste ensaio representado pela inoculação, a variedade SP se comporta como resistente em relação à variedade RB, uma vez que consegue manter os níveis endofíticos de Lxx sob controle. No entanto, quando o título é alterado por algum estímulo, a variedade SP se mostra mais suscetível, pois seus títulos finais foram mais elevados do que em RB (cerca de 3,8 vezes maior). Desta forma, o emprego da técnica permitiu avaliar precocemente a cinética da colonização de plantas por Lxx e permitiu identificar comportamentos distintos das variedades quando submetidas a diferentes condições. O uso de qPCR com essa finalidade foi sugerido por Schena et al. (2004), uma vez que esta técnica é capaz de detectar pequenas mudanças de títulos antes da aparição de sintomas.

A maior mudança de título bacteriano observada nesse trabalho foi da ordem de apenas 30 vezes em um período de 30 dias (de 17,2 para 535,7 células/100 ng de DNA total) em plantas inoculadas de SP80-3280 e ilustra o conhecido comportamento fastidioso da bactéria. A título de comparação com uma bactéria não-fastidiosa, como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, o título desta bactéria quando inoculada em um genótipo suscetível de *Phaseolus vulgaris* chega atingir níveis da ordem de 10^8 UFC/ml a apenas 5 dias após a inoculação (GODFREY et al., 2010). No trabalho de Oliveira et al. (2002), os autores desenvolveram um ensaio para detecção de *Xylella fastidiosa* em planta via qPCR e o maior número de células observado foi de 374 células/mg de tecido em plantas de laranjeira 'Pera', 8 meses após a inoculação, o que também reflete o comportamento de seu comportamento fastidioso.

O ensaio de qPCR em tempo real desenvolvido neste estudo permitiu detectar um mínimo de aproximadamente 38 células de Lxx em amostras de 100ng de DNA total de planta. Atualmente não existem relatos sobre o limite de detecção de Lxx para técnicas baseadas em DNA em termos de número de células, dado que se trata de uma bactéria de difícil isolamento e crescimento em meio de cultura (GAO et al., 2008). No entanto, o protocolo aqui descrito pode ser usado para quantificação de Lxx mesmo que em baixas concentrações no tecido e pode ser usado precocemente para ranquear variedades de acordo com a dinâmica de crescimento e colonização da bactéria, já que as perdas na produção estão associadas a títulos elevados de Lxx (DAVIS et al., 1988; MCFARLANE, 2002). Outra aplicação seria na indexação de material vegetativo. A aplicação dessa técnica para essa finalidade tem sido relatada para diversas outras culturas como no trabalho de Oliver et al. (2008) para o patossistema trigo e *Stagonospora nodorum*, para detecção de patógenos em quarentena, como também sugerido por Montes-Borrego et al. (2011) em um trabalho com detecção de *Peronospora arborens* em plantas assintomáticas e em estoques comerciais de sementes.

2.3 Conclusões

O desenvolvimento do ensaio de detecção e monitoramento de Lxx *in planta* se mostrou específico e eficiente em detectar precocemente o patógeno em amostras com baixo título bacteriano, principalmente por se tratar de uma bactéria fastidiosa e de difícil diagnose.

A técnica pode ser usada para monitorar a evolução do título bacteriano em tecidos vegetal o que, por sua vez, pode ser usado para ranquear variedades para resistência à colonização por Lxx.

Referências

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 215, p. 403–410, 1990.
- BAILEY, R. A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, p. 55-56, 1997.
- BRUMBLEY, S.; PETRASOVITS, L.; HERMANN, S.; YOUNG, A.; CROFT, B. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 35, n. 6, p. 681-689, 2006.

CANKAR, K.; STEBIH, D.; DREO, T.; ZEL, J.; GRUDEN, K. Critical points of DNA quantification by real-time PCR - effects of DNA extraction method and sample matrix on quantification of genetically modified organisms. **BMC Biotechnology**, London, v. 6, n.1, p. 37, 2006.

CHAGAS, P.R.R.; MATSUOKA, S. Medidas de controle do raquitismo da soqueira. **Brasil Açucareiro**, São Paulo, v. 106, n.1, p. 40-44, 1988.

COMSTOCK, J. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2002.

D'HAENE, B.; VANDESOMPELE, J.; HELLEMANS, J. Accurate and objective copy number profiling using real-time quantitative PCR. **Methods**, San Diego, v. 50, p. 262–270, 2010.

DAMANN, K.E.; BENDA, G.I.A. Evaluation of commercial heat-treatment methods for control of ratoon stunting disease of sugarcane. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 67, 96–967, 1983.

DAVIS, M. J. Direct-count techniques enumerating *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* which causes ratoon stunting disease of sugarcane. **Phytopathology**, Saint Paul, v.75, p.1226-1231, 1985.

DAVIS, M.J. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* instalk of sugarcane cultivars differing insusceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 78, p. 722-727, 1988.

DAVIS, M.J.; GILLASPIE, A.G.; VIDAVER, A.K.; HARRIS, R.W. *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis* subsp. nov. *pathogens* that cause ratoon stunting disease of sugarcane and bermudagrass stunting disease. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Spencers Wood, v. 34, p.107–117, 1984.

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

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

GAO, S.; PAN, Y.; CHEN, R.; CHEN, P.; ZHANG, H.; XU, L. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, New York, v. 10, n. 4, p. 334-340, 2008.

GILLASPIE, A.G.; DAVIS, R.E.; WORLEY, J.F. Diagnosis of ratoon stunting disease based on the presence of a specific microorganism. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 57, p. 987–990, 1973.

GODFREY, S. A. C.; MANSFIELD, J. W.; CORRY, D. S.; LOVELL, H. C.; JACKSON, R. W.; ARNOLD, D. L. Confocal imaging of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* colony development in bean reveals reduced multiplication of strains containing the genomic island PPHGI-1. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v.23, p. 1294-1302, 2010.

GRISHAM, M. P. Effect of ratoon stunting disease on yield of sugarcane grown in multiple three-year plantings. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, p.337-340, 1991.

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

HARRISON; A., N.; DAVIS; J., M. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, p. 6, 1988.

KUKLINSKY-SOBRAI, J.; ARAUJO, W.L. et al. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, Malden, v. 6, n.12, p. 1244-1251, 2004.

LOPEZ, M. M.; LLOP, P.; OLMOS, A.; MARCO-NOALES, E.; CAMBRA, M.; BERTOLINI, E. Are molecular tools solving the challenges posed by detection of plant pathogenic bacteria and viruses? **Current Issues in Molecular Biology**, Hethersett, v. 11, n.1, p. 13-46, 2009.

MCFARLANE, S.A. The relationship between extent of colonisation by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and yield loss in different sugarcane varieties. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v.76, p. 281-284, 2002.

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

MONTES-BORREGO, M.; MUÑOZ-LEDESMA, F. J.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R. M.; LANDA, B. B. Real-time PCR quantification of *Peronospora arborescens*, the opium poppy downy mildew pathogen, in seed stocks and symptomless infected plants. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 95, p. 143-152, 2011.

OLIVEIRA, A. C.; VALLIM, M. A.; SEMIGHINI, C. P.; ARAÚJO, W. L.; GOLDMAN, G. H.; MACHADO, M. A. Quantification of *Xylella fastidiosa* from Citrus Trees by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n.10, p. 1048-1054, 2002.

OLIVER, R. P.; RYBAK, K.; SHANKAR, M.; LOUGHMAN, R.; HARRY, N.; SOLOMON, P. S. Quantitative disease resistance assessment by real-time PCR using the *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem as a model. **Plant Pathology**, Dordrecht, v. 57, n 3, p. 527-532, 2008.

PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M. A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the Causal Bacterium of Sugarcane Ratoon Stunting Disease. **Plant Disease**, Saint Paul v. 82, n.3, p. 285-290, 1998.

POSPIECH, A.; NEUMANN, B. A versatile quick preparation of genomic DNA from Gram positive bacteria. **Trends in Genetics**, London, v. 11, p. 217- 218, 1995.

RODRIGUES, N.J.; MALAVOLTA, J.R.; VICTOR, O. Meio simples para isolamento e cultivo de *Xanthomonas campestris* pv. *citri* Tipo B. **Summa Phytolpathologica**, Botucatu, v. 2, p. 16, 1986.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.J IN KRAWETZ, S. AND MISENER, S. (Eds.). **Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology**, Totowa, p. 365–386, 2000.

SCHENA, L.; NIGRO, F.; IPPOLITO, A.; GALLITELLI, D. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.110, n. 9, p. 893-908, 2004.

STEINDL, D.R.L. Ratoon stunting disease. In: MARTIN, J.P.; ABBOT, E.V.; HUGES, C.G. (Ed). **Sugarcane disease of the world**. Amsterdam, v.1, p. 433-459, 1961.

TOKESHI, H. Doenças da cana-de-açúcar. In: GALLI, F. In: **Manual de fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1980. v.2, cap. 12, p.141-206. 1980.

URASHIMA, A.S.; GRACHET, N.G. Métodos de detecção de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* e efeito da termoterapia na brotação das gemas de diferentes variedades de cana-de-açúcar. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 37, p.57-54, 2012.

YOUNG, A. J.; BRUMBLEY, S.M. Ratoon stunting disease: history, management and current research. In: **Sugarcane pathology**. Enfield: Science Publishers, 2004. v.3, cap. 6, p.97-124.

3 ANÁLISE PROTEÔMICA DE CANA DE AÇÚCAR EM RESPOSTA À COLONIZAÇÃO POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Resumo

A bactéria fastidiosa *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é o agente causal do raquistismo-das-soqueiras em cana-de-açúcar cujo o principal sintoma é a redução acentuada do crescimento observada em plantas adultas. Lxx pode ser considerada como um endófito obrigatório que cresce a níveis patogênicos nos tecidos da planta dependendo de estímulos bióticos e abióticos. O presente estudo objetivou identificar, em duas variedades de cana (RB835486 e SP80-3280), proteínas cujas abundâncias foram alteradas ao longo do tempo em função da colonização pela bactéria. Foram analisadas plântulas oriundas de toletes de uma gema naturalmente infectados com Lxx as quais foram inoculadas ou não com Lxx a fim de se obter plantas com diferentes títulos bacterianos. As proteínas foram extraídas do cartucho foliar aos 30 e 60 dias após a inoculação e seus volumes determinados pela técnica 2D-DIGE. Estes volumes foram comparados dentre plantas inoculadas e não inoculadas das duas variedades pelo módulo BVA (Biological Variation Analysis) do software DeCyder. Ao todo, foram detectados cerca de 2500 spots, dos quais 128 apresentaram variação em abundância em ao menos um dos contrastes analisados. Destes, 66 variaram tanto em plantas inoculadas como em não inoculadas e, portanto, não foram incluídas na análise. Já 62 proteínas apresentaram variação especificamente em plantas inoculadas ou não inoculadas e foram analisadas por MALDI-TOF-TOF-MS/MS a fim de determinar suas identidades. O número de proteínas que apresentaram variações em abundância foi bem menor na variedade RB comparada a SP, o que se explica uma vez que o título bacteriano aos 60 DAI foi menor nesta variedade, independente da inoculação. Entre plantas desta variedade, no entanto, foram observadas alterações específicas em 17 proteínas somente em plantas não inoculadas, com perfil geral de repressão para proteínas da via de estresse e metabolismo primário. Já em plantas inoculadas não foram detectadas proteínas exclusivas para esse grupo, o que pode ser explicado devido ao crescimento de Lxx ter ocorrido mais rápido nos tecidos e consequentemente, a resposta de defesa da planta também ter sido precoce, antes dos 60 dias. Para a variedade SP80-3280, em plantas não inoculadas, cujo título bacteriano não variou ao longo do tempo analisado, foram detectadas 5 proteínas exclusivas, representadas, em sua maior parte, por proteínas da via de estresse oxidativo. Já em plantas inoculadas, onde o título bacteriano aumentou cerca de 25 vezes mais em relação às plantas não inoculadas, o número de proteínas exclusivas foi bem maior (37) e suas categorias funcionais mais diversas. Em especial, foram indentificadas alteração na abundância de proteínas relacionadas ao crescimento da planta (TCTP, 2G4 associada à proliferação) e ciclo celular (cliclina) e aumento de proteínas das vias de sinalização celular e hormonal provavelmente relacionadas ao ABA e JA (proteína G). O conjunto de resultados obtidos, principalmente para a variedade SP80-3280, é consistente com o principal sintoma da doença, o raquitismo, pois indica que as alterações temporais observadas na expressão de proteínas relacionadas com o aumento do título de Lxx podem resultar em alterações do equilíbrio hormonal e menor crescimento da planta.

Palavras-chave: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Proteômica; 2D-DIGE; Raquitismo-das-soqueiras

3 SUGARCANE PROTEOMICS IN RESPONSE TO *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* COLONIZATION

Abstract

The fastidious bacterium *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* is the *causal agent of the ratoon stunting* disease (RSD) of sugarcane whose main symptom is a marked growth reduction observable in adult plants. Lxx might be considered an obligate endophyte that reaches pathogenic titers in plant tissues depending on biotic and abiotic stimuli. The objective of the present study was to investigate temporal changes in protein abundances of two sugarcane varieties (RB835486 and SP80-3280) in response to Lxx growth. Plantlets from one eyed-sets naturally infected with Lxx were mock-inoculated or inoculated with a bacterial suspension in order to obtain plants with contrasting bacterial titers. Proteins were extracted 30 and 60 days after inoculation (DAI) from leaf whorls and their volumes were determined by 2D-DIGE approach. Protein volumes were compared within treatments over time by the Biological Variation Analysis module of the DeCyder software. Overall, 2500 spots were detected of which 128 showed variations in abundance in at least one of the contrasts. Among these, 66 varied in both mock and Lxx-inoculated plants and were not included in analysis. The remaining 62 proteins were detected either in mock or in inoculated plants and were identified by MALDI-TOF-TOF-MS/MS. In plants of RB, the number of proteins with altered abundance was smaller than in SP, which could result from the fact that the bacterial titer at 60 DAI was also smaller, regardless of the inoculation with Lxx. Variations in a total of 17 proteins were observed only in mock-inoculated plants, and those were mainly involved in responses to stress and primary metabolism. However, no variation was detected exclusively in plants inoculated with Lxx, which could be due to the faster growth of Lxx that could have triggered plant responses before 60 DAI. Five proteins mostly related to oxidative stress responses were exclusively detected in mock-inoculated plants of SP80-3280 in which the bacterial titer remained unaltered between 30 and 60 DAI. In inoculated plants, in contrast, bacterial titers increased about 25 times more than in mock inoculated plants and this correlated with a higher and functionally more diverse number of unique proteins (37) that displayed altered abundances over time. In particular, changes were identified in proteins related to plant growth (TCTP - *translationally-controlled tumor protein* and proliferation-associated protein 2G4), cell cycle (cyclin), signaling (G protein) and hormonal pathways (ABA and JA). The results, particularly for the SP80-3280, are consistent with the main symptom of the disease, indicating that temporal changes in protein expression associated with increased bacterial titers could result in altered hormonal balance and reduced plant growth.

Keywords: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*; Proteomics; 2D-DIGE; Ratoon Stunting Disease

3.1 Introdução

A bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) é o agente causal do raquitismo-das-soqueiras da cana-de-açúcar (RSD, do inglês *Ratoon stunting disease*), doença que está distribuída em todas as regiões produtoras do mundo (GAO et al., 2008) e se caracteriza como uma das mais importantes da cultura (IGLESIA, 2003). A disseminação do patógeno se dá por instrumentos de corte usados na colheita (facão e colheitadeiras) quando o caldo vegetal contaminado adere à superfície dos instrumentos e propicia a infecção para as demais plantas (COMSTOCK, 2002). Outra via importante de disseminação é através de material propagativo, já que a bactéria coloniza as células tronco do tecido meristemático (BAILEY, 1977). O principal dano da doença é a perda em biomassa que resulta do reduzido porte das plantas e pode variar de 5% a mais de 30% em relação a plantas saudáveis em variedades suscetíveis (BRUMBLEY et al., 2006). O sintoma externo mais evidente é o encurtamento dos entrenós, que pode ser observado somente em plantas adultas (GAO et al., 2008). Já os sintomas internos se caracterizam pela presença de pontuações ou vírgulas avermelhadas abaixo dos nós e pela coloração rosada próximo ao meristema apical de plantas jovens (PAN et al., 1998; IGLESIA, 2003). Entretanto, trata-se de uma doença de difícil diagnose, uma vez que estes sintomas não são específicos e podem ser facilmente confundidos com doenças provocadas por outros patógenos ou por deficiências nutricionais.

Lxx é uma bactéria gram positiva, de crescimento fastidioso e que coloniza sistemicamente a planta, desde a raiz até as células do meristema apical. Sua distribuição, no entanto, é irregular, variando de acordo com o tecido e a idade da planta. Os títulos bacterianos são mais elevados nos colmos do que nas folhas e aumentam de acordo com a idade da planta (BAILEY e BECHET, 1995). Um estudo de diversidade genética conduzido com 108 isolados de Lxx de nove países produtores de cana demonstrou que não existe divergência genética entre as cepas estudadas, sugerindo que a relação cana x Lxx foi estabelecida recentemente (YOUNG et al., 2006). Esta parece ser uma hipótese plausível, já que Lxx não foi encontrada no centro de diversidade de *Saccharum officinarum*, a Nova Guiné, em um levantamento de doenças realizado por um grupo internacional de patologistas em 2002 (MAGAREY et al., 2002). O genoma de Lxx possui um elevado número de genes preditos como pseudogenes, sugerindo a ação de um processo de “decaimento genômico” (MONTEIRO-VITORELLO et al., 2004). Segundo estes autores, este processo poderia ser o responsável pelo restrito nicho ecológico da bactéria, já que até o momento desconhecem-se hospedeiros alternativos ou insetos vetores e por não existirem relatos de seu isolamento a partir de solo. Fato intrigante é que a bactéria é rotineiramente detectada em plantas

assintomáticas (GRISHAM; PAN; RICHARD, 2007) e que o dano que causa às plantas é em função de sua concentração nos tecidos vegetais (BAILEY, 1977; DAVIS et al., 1988; MCFARLANE, 2002). O crescimento de Lxx dentro da planta é modulado tanto por fatores do hospedeiro como do ambiente. Entre os primeiros estão o background genético da variedade e a idade da planta (BAILEY, 1977; DAVIS et al., 1988). Já entre os segundos, embora pouco estudados, destaca-se a temperatura. O crescimento de Lxx *in planta* é maior em temperaturas amenas (ao redor de 25°C) do que em temperaturas excessivamente altas, entre 30-35°C (TEAKLE e RYAN, 1992). O estresse hídrico parece ser outro fator determinante, já que os sintomas são mais expressivos durante períodos de seca (COMSTOCK, 2002).

Face aos aspectos biológicos apresentados acima, Lxx pode ser vista como um organismo endofítico obrigatório (HARDOIM; VAN OVERBEEK; ELSAS, 2008) de cana-de-açúcar que pode se tornar um patógeno pendente a interação de fatores bióticos e abióticos, o que corrobora a hipótese de Brumbley et al. (2006) de que Lxx possivelmente evoluiu de bactérias endofíticas de *Saccharum spontaneum*. Neste sentido, Lxx se comporta como outras bactérias fastidiosas do sistema vascular de plantas, como *Herbaspirillum rubrisubalbicans* da própria cana-de-açúcar, *Xylella fastidiosa* e *Spiroplasma citri* de citrus e ‘*Candidatus* phytoplasma mali’ de macieira (JAMES et al., 1997; ALVES et al., 2004; MELLO et al., 2010; BARIC et al., 2011), que são detectadas em baixos níveis em plantas assintomáticas e em altos níveis em plantas com sintomas. Este comportamento dual endofitismo/parasitismo e sua modulação por fatores do meio e do hospedeiro também se estende para fungos (SCHULZ; BOYLE, 2005) e é um dos aspectos mais intrigantes das relações entre plantas e microrganismos. Desta forma, a compreensão de como a planta responde durante uma relação desta natureza deve contribuir para o entendimento dos mecanismos evolutivos que levam microrganismos a se especializarem como patógenos de plantas.

Nesse contexto, o objetivo desse trabalho foi investigar as mudanças na expressão de proteínas de plantas colonizadas com baixo e alto título de Lxx na tentativa de reproduzir uma condição de crescimento endofítico e outra de crescimento patogênico. Quais proteínas se apresentam diferencialmente expressas em resposta ao crescimento parasítico de Lxx? Para isso, foram utilizadas plantas inoculadas e não inoculadas com Lxx, nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação, uma vez que foram detectadas diferenças significativas no título bacteriano entre os tratamentos do binômio tempo *versus* inoculação (Capítulo 2).

3.2 Desenvolvimento

3.2.1 Materiais e Métodos

3.2.1.1. Material vegetal, cultivo de Lxx, desenho experimental e inoculação das plantas

Material vegetal: foram utilizadas as variedades RB835486 e SP80-3280. Tratam-se das mesmas variedades utilizadas para o desenvolvimento do primeiro capítulo e suas características estão descritas no item 2.2.1.3.

Cultivo de Lxx: utilizou-se a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) estirpe CTCB07. As condições de cultivo de Lxx já foram descritas no primeiro capítulo no item 2.2.1.2.

Desenho experimental e inoculação das plantas: este estudo valeu-se de alguns tratamentos do experimento conduzido para o desenvolvimento do primeiro capítulo, cujos detalhes experimentais estão descritos no item 2.2.1.3. Entretanto, para a análise de proteínas diferencialmente expressas foram escolhidos apenas os tempos de 30 e 60 dias após a inoculação. Desta forma, as análises compreenderam 8 tratamentos (Tabela 1; Figura 1): 2 variedades x 2 condições de inoculação (inoculada com o meio de cultura ou com Lxx) x 2 tempos (30 e 60 dias após a inoculação). Os tratamentos foram repetidos três vezes (réplicas biológicas), sendo que cada repetição foi constituída de um vaso com três plantas. Os vasos foram dispostos em um delineamento de blocos ao acaso.

Tabela 3.1 – Códigos e descrições dos tratamentos utilizados na análise proteômica

Variedade	Tempo de coleta (dias)	Descrição do tratamento	Código do tratamento
RB835486	30	inoculação com meio	RB MI ₃₀
		Inoculação com Lxx	RB LxxI ₃₀
	60	inoculação com meio	RB MI ₆₀
		Inoculação com Lxx	RB LxxI ₆₀
SP80-3280	30	inoculação com meio	SP MI ₃₀
		Inoculação com Lxx	SP LxxI ₃₀
	60	inoculação com meio	SP MI ₆₀
		Inoculação com Lxx	SP LxxI ₆₀

Figura 3.1 - Representação do experimento de proteômica, representando as variedades (RB83 5486 e SP80-3280) e tempos de coleta (30 e 60 dai – dias após a inoculação)

3.2.1.2 Extração de proteínas do cartucho foliar de cana-de-açúcar

As proteínas foram extraídas de 0,5 g de tecido macerado em 10 mL de tampão de extração (10% p/v de ácido tricloroacético e 0,7% v/v de 2-mercaptoetanol em acetona). O material foi cuidadosamente homogeneizado e as proteínas precipitadas por 2h a -20°C. Os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12.000 g a -20°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com 0,7% (v/v) de 2-mercaptoetanol em acetona, seguido de nova precipitação e centrifugação. O *pellet* foi seco a 4°C em dessecador e ressuspendido conforme Amalraj et al. (2010) em tampão de solubilização contendo 7 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% (p/v) de CHAPS, 2% (v/v) de *pharmalyte* (ou *IPG buffer*) e 0,3% de DTT. O *pellet* foi solubilizado em tampão de solubilização na proporção de 33 mg *pellet*/1 mL de tampão. A solução foi incubada a 37°C por 1h e agitada em vortex por 2 minutos a intervalos de 15 minutos. Uma alíquota foi utilizada para quantificação total de proteínas pelo método de Bradford (1976) utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão. As concentrações protéicas foram expressas em mg proteína/mL de extrato protéico.

3.2.1.3 Análise da qualidade e perfil protéico por SDS-PAGE

Este procedimento foi conduzido como descrito por Laemmli (1970). Para a confecção de um mini gel de resolução (10% de acrilamida) foram utilizados 2,5 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (pH 8,9), 100 µL de SDS 10% e 5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (10%). O gel de empacotamento foi elaborado com 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM (pH 6,7), 50 µL de SDS 10% e 2,75 mL de água e polimerizado com 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (10%). A eletroforese foi conduzida a temperatura ambiente sob corrente constante de 15 mA/placa com tampão de corrida 5X concentrado (25 mM Tris, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina e 1% de SDS 10%). Foram aplicados 4 µL de padrão BenchMark - Protein Ladder (Invitrogen) e 30 µg de proteína de cada amostra experimental. Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Blue (0,5 g de Coomassie Blue R-250 em 500 mL de solução descorante) por 12 horas e posteriormente repassados para a solução descorante (400 mL de metanol p.a. e 70 mL de ácido acético glacial em um volume final 1000 mL completado com água destilada) até a visualização das proteínas.

3.2.1.4 Precipitação de proteínas

As proteínas foram precipitadas em solução de metanol com acetato de amônio 0,1 M a - 20°C por 12 horas. Utilizou-se a proporção de 1.200 µL de solução precipitante para 300 µL de amostra protéica. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se metanol 80% ao *pellet* e os tubos foram mantidos a - 20°C por 1 hora. Os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se acetona 80% ao *pellet* e os tubos foram mantidos a - 20°C por 1 hora. Os tubos foram novamente centrifugados a 12.000 rpm por 30 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* foi seco a 4°C em dessecador por 1 dia e armazenado em 100 µL de etanol.

3.2.1.5 Eletroforese bidimensional (2D-DIGE – *Differential Gel Electrophoresis*)

Os *pellets* protéicos foram solubilizados em tampão para análise em gel 2D (30 mM Tris-HCl, pH 8.8, contendo 7 M uréia, 2 M tiouréia e 4% CHAPS) e as proteínas foram quantificadas com o kit “*Bio-Rad protein assay*”, conforme instruções do fabricante (BioRad). Trinta microgramas de proteína de cada amostra foram homogeneizadas em 1 µL de fluoróforo diluído. Proteínas de plantas inoculadas com o meio foram marcadas com *Cy3-red* e de plantas inoculadas com Lxx com *Cy5-blue*. Proteínas de um controle interno (*IS- Internal Standard*) constituído por uma mistura equimolar de todas as amostras do experimento foram marcadas com *Cy2-yellow*. O uso de um padrão interno aumenta a acurácia na quantificação de *spots* entre géis e permite maior flexibilidade nas análises estatísticas, pois permite reduzir a variação experimental. Ademais, o uso deste controle elimina a necessidade de replicatas experimentais de géis (ALBAN et al., 2003). A reação de marcação com os fluoróforos deu-se no escuro por 30 min e foi parada pela adição de 1 µL de 10 mM de lisina seguida de incubação no gelo e no escuro por 15 min.

Em cada gel foram comparados perfis protéicos de plantas inoculadas com o meio contra os de plantas inoculadas com Lxx, num mesmo tempo após a inoculação (2 tratamentos) mais a inclusão do IS. Os tratamentos foram agrupados em géis de acordo com o esquema apresentado na Tabela 2. Às misturas de proteínas foram adicionados o tampão de amostra para gel 2D – 2X (8 M uréia, 4% CHAPS, 20 mg/ml DTT, 2% pharmalytes e “traços” de azul de bromofenol), 100 µL de solução para a fita IPG (*Immobilized pH gradient*) e tampão de rehidratação (7 M urea, 2

M tiouréia, 4% CHAPS, 20 mg/ml DTT, 1% pharmalytes e “traços” de azul de bromofenol) em um volume final de 250 μ L. As amostras foram homogeneizadas por agitação em vortex e rapidamente centrifugadas antes de serem aplicadas na fita de focalização.

A focalização isoeétrica deu-se em fitas IPG de pH 3-10 de acordo com o protocolo da Amersham BioSciences. Após a focalização, as fitas foram incubadas em solução de equilíbrio 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, contendo 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, traços de azul de bromofenol e 10 mg/ml de DTT) por 15 minutos sob leve agitação. As fitas foram lavadas sob leve agitação com solução de equilíbrio 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8,8, contendo 6 M uréia, 30% glicerol, 2% SDS, traços de azul de bromofenol e 45 mg/ml DTT) por 10 min. Os géis SDS-PAGE correram à temperatura de 15°C. Foram utilizados 25 μ g de proteína/amostra por corrida.

Tabela 3.2 – Composição de géis 2D-DIGE segundo os tratamentos comparados em cada gel

Gel	Comparações	Repetição	Tratamento - Cy 3	Tratamento - Cy 5
1	RB MI ₃₀ x RB Lxx ₃₀	Rep. 1	RB MI ₃₀	RB Lxx ₃₀
2		Rep. 2	RB MI ₃₀	RB Lxx ₃₀
3		Rep. 3	RB MI ₃₀	RB Lxx ₃₀
4	RB MI ₆₀ x RB Lxx ₆₀	Rep. 1	RB MI ₆₀	RB Lxx ₆₀
5		Rep. 2	RB MI ₆₀	RB Lxx ₆₀
6		Rep. 3	RB MI ₆₀	RB Lxx ₆₀
7	SP MI ₃₀ x SP Lxx ₃₀	Rep. 1	SP MI ₃₀	SP Lxx ₃₀
8		Rep. 2	SP MI ₃₀	SP Lxx ₃₀
9		Rep. 3	SP MI ₃₀	SP Lxx ₃₀
10	SP MI ₆₀ x SP Lxx ₆₀	Rep. 1	SP MI ₃₀	SP Lxx ₃₀
11		Rep. 2	SP MI ₃₀	SP Lxx ₃₀
12		Rep. 3	SP MI ₃₀	SP Lxx ₃₀

3.2.1.6 Análises de imagem e estatística realizadas para o géis 2D-DIGE

Imagens dos géis foram geradas em um scanner *Thyphoon TRIO* (Amersham BioSciences) em comprimentos de onda de 530 nm para Cy2, 590 nm para Cy3 e 680 nm para Cy5. As imagens foram analisadas com o uso do software *Image Quant* (v.6.0, GE Healthcare) e a padronização e análise estatística dos volumes de cada proteína foram feitas pelo módulo *Biological Variation Analysis* (BVA) do software *DeCyder* (v.6.5, GE Healthcare).

Num primeiro passo, as imagens dos géis foram sobrepostas, de modo a identificar, num mesmo gel, os mesmos spots protéicos de amostras diferentes. De maneira análoga, em géis

diferentes, spots de uma mesma proteína foram identificados pela sobreposição da melhor imagem de um gel (imagem master) dos spots do padrão interno (IS). O volume de cada proteína foi então determinado para cada imagem de gel medindo-se a quantidade de pixels do spot subtraído de um valor de *background*, valor este que corresponde ao décimo percentil da curva de distribuição de pixels do spot. Os volumes assim compensados foram então padronizados dividindo-os pelos volumes normalizados dos respectivos spots protéicos do padrão interno. Os volumes normalizados são obtidos seguindo um algoritmo baseado no método dos quadrados mínimos que ajusta a curva de distribuição dos volumes padronizados a uma distribuição normal. Este procedimento determina um coeficiente de ajuste “C” que é multiplicado ao valor dos spots do IS. Finalmente, o valor do logaritmo dos volumes padronizados, comumente referido como “log da abundância padronizada” e expresso pela equação (i) abaixo foi o valor utilizado na análise estatística.

$$Ri' = \log_{10}(V2i/V1i') \quad (i)$$

Onde Ri' corresponde ao log do volume padronizado do spot i do tratamento, $V2i$ corresponde ao volume compensado do spot i do tratamento e $V1i'$ ao volume normalizado do spot correspondente do padrão interno (IS)

Valores Ri' de cada proteína de diferentes tratamentos foram testados pelo teste t de Student assumindo um nível de significância de $P = 0,05$. Outra variável considerada foi o valor r (*ratio*), que representa o logaritmo da razão dos volumes padronizados Ri' de uma dada proteína entre dois tratamentos. Essa razão é dada pela fórmula (ii). Como critério de significância, foram considerados valores de $r \geq 1,3$ ou $\leq -1,3$. Desta forma, variações em abundância de proteínas que atenderam aos dois critérios estatísticos foram interpretadas como resultantes de diferenças entre tratamentos.

$$r = \log_{10} (R2i/R1i) \quad (ii)$$

Onde r = razão de abundâncias padronizadas Ri' , $R2$ = abundância padronizada média da proteína i do tratamento 2 e $R1$ = abundância padronizada média da proteína i do tratamento 1

Os contrastes de médias de tratamentos definidos *a priori* estão representados na figura 3.2 e tabela 3.3. Os contrastes de 1 a 4 compararam valores de R_i' entre os 30 e 60 dias em plantas inoculadas com Lxx ou com meio de cultura de uma mesma variedade. Para efeito de cálculo do valor r , em todos os contrastes o numerador da equação ii (R2) foi representado pelos valores de abundâncias aos 60 DAI e o denominador (R1) pelos valores aos 30 DAI. Desta forma, valores positivos indicaram aumento da abundância da proteína ao longo do tempo e negativos indicaram sua diminuição. Já o contraste 5 (Figura 3.2) comparou perfis protéicos entre plantas inoculadas com Lxx e inoculadas com o meio de cultura, independente da variedade e do tempo após a inoculação. Procedeu-se com o estudo de contrastes entre tratamentos inoculado com o meio e com Lxx ao longo do tempo (MI_{60} vs MI_{30} e $LxxI_{60}$ vs $LxxI_{30}$) pois o objetivo foi analisar mudanças em abundâncias de proteínas que ocorrem ao longo do tempo (30 dias) em função de variações em títulos bacterianos verificada neste período. Em plantas não inoculadas da variedade RB, a variação do título bacteriano foi semelhante ao de plantas inoculadas, ao passo que em plantas de SP, a variação foi significativamente maior (25 vezes) em plantas inoculadas (capítulo 2). O período de tempo analisado foi escolhido em função dos resultados do ensaio de quantificação da bactéria e reflete o crescimento fastidioso da bactéria *in planta*.

Figura 3.2 - Contrastes de médias (setas) de tratamentos definidos para identificar proteínas de cana-de-açúcar diferencialmente expressas durante interação com Lxx

Tabela 3.3 – Contrastes de médias de tratamentos usados para identificar proteínas diferencialmente expressas de cana-de-açúcar em resposta à infecção por Lxx

Contrastes	Descrição dos contrastes
1	$RB\ MI_{60}/RB\ MI_{30}$
2	$RB\ LxxI_{60}/RB\ LxxI_{30}$
3	$SP\ MI_{60}/SP\ MI_{30}$
4	$SP\ LxxI_{60}/SP\ LxxI_{30}$
5	$(SP\ LxxI_{30} + SP\ LxxI_{60} + RB\ LxxI_{30} + RB\ LxxI_{60})/(SP\ MI_{30} + SP\ MI_{60} + RB\ MI_{30} + RB\ MI_{60})$

3.2.1.7 Sequenciamento de proteínas

Proteínas selecionadas para sequenciamento foram resolvidas em um gel preparativo (250 µg de proteína) e coradas com Coomassie Blue coloidal. Uma imagem do gel foi gerada em scanner Typhoon (GE Healthcare) e sobreposta às imagens dos géis DIGE com auxílio do software DeCyder versão 6.5 (GE Healthcare) para identificação das proteínas de interesse e sua retirada do gel com um aparelho Ettan Spot Picker – (GE Healthcare). Os *spots* protéicos foram secos, hidratados e digeridos em tampão de digestão contendo tripsina (*Trypsin Gold*, Promega) a 37°C. Os peptídeos foram extraídos do gel em tampão TFA sob agitação, desalinizados usando colunas C-18 Zip-tips (Millipore), misturados com matriz CHCA (alfa-ciano-4-ácido hidroxicinâmico) e analisados por MALDI-TOF-MS (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry) e TOF/TOF tandem MS/MS no sistema AB SCIEX TOF/TOF^{TM} 5800 (AB SCIEX). Cerca de dez a vinte peptídeos mais abundantes de cada amostra (excluindo peptídeos autolíticos da tripsina e outros íons com *background* conhecido) foram submetidos à fragmentação e análise de espectrometria de massa em tandem.

As etapas descritas nos itens 3.2.1.4 ao 3.2.1.6 foram realizadas pela empresa Applied Biomics (CA, EUA) (<http://www.appliedbiomics.com/>).

3.2.1.8 Análises bioinformáticas

Os espectros peptídicos foram submetidos a buscas em banco de dados usando os softwares GPS Explorer e MASCOT (www.matrixscience.com) para identificar proteínas com padrões espectrais semelhantes cujas sequências estão depositadas no National Center for Biotechnology Information (NCBI^{nr}). *Hits* com intervalo de confiança (IC) acima de 95% foram considerados significativos e, dentre estes, o de maior valor de escore foi escolhido para análises bioinformáticas. Aqueles com IC abaixo de 95% também foram incluídos nas análises, mas foram considerados como de baixa confiança. Estas análises também foram realizadas pela empresa Applied Biomics (CA, EUA).

As proteínas diferencialmente expressas assim identificadas foram classificadas em categorias funcionais de acordo com a classificação utilizada para analisar sequências expressas identificadas de cana-de-açúcar (VETTORE et al., 2003) baseada na anotação funcional do COG-NCBI (*Clusters of Orthologous Groups – National Center for Biotechnology Information*), excluindo-se a categoria de proteínas putativas.

Proteínas diferencialmente expressas específicas para um dado contraste foram determinadas comparando-se os conjuntos de proteínas de cada contraste com auxílio de um diagrama de Venn. Proteínas ortólogas a estas foram identificadas em *Arabidopsis*, arroz e cana-de-açúcar por meio de buscas nos bancos TAIR (The Arabidopsis Information Resource - <http://www.arabidopsis.org/>), TIGR-Rice Genome (The Institute for Genomic Research - <http://blast.jcvi.org/euk-blast/index.cgi?project=osa1>) e SUCEST-FUN (sucest-fun.org/) com auxílio da ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990). As proteínas com os maiores *escores* em *Arabidopsis thaliana* foram localizada em vias metabólicas por meio do software MapMan (THIMM et al., 2004). As proteínas ortólogas identificadas em arroz foram utilizadas para gerar uma rede funcional probabilística das proteínas de cana envolvidas na resposta à colonização por Lxx por meio da rede RiceNet (LEE et al., 2011). Por fim, a análise de interação individual de proteínas com possíveis alvos também foi avaliada pelo software STRING (SZKLARCZYK et al., 2011).

3.2.1.9 Heat map

Os valores de ratio (ii) foram utilizados para gerar um *heat map* para as proteínas diferencialmente expressas específicas para um dado contraste de médias (Figura 3.9). O mapa foi obtido com o uso do software DanteR (POLPITIYA et al., 2008).

3.2.2 Resultados

3.2.2.1 Material vegetal

De acordo com os dados relativos à quantificação de Lxx via qPCR (discutidos no capítulo 2), foram detectadas diferenças significativas no título bacteriano entre plantas avaliadas aos 30 e 60 DAI (dias após a inoculação). Entretanto, a dinâmica de crescimento foi diferente para as duas variedades quando comparados os tratamentos inoculado ou não com a bactéria. Para a variedade RB835486 houve desenvolvimento semelhante da bactéria ao longo do tempo e o número de células detectadas ao final de 60 DAI foi de 130,7 e 140,2/100 ng DNA total, para plantas não inoculadas (RBM_I₆₀) e inoculadas com Lxx (RBLxx_I₆₀), respectivamente. Já na variedade SP80-3280, ao contrário, o título aumentou significativamente ao longo do tempo

somente em plantas inoculadas (SPLxxI₆₀) comparado a plantas não inoculadas (SPMI₆₀) atingindo títulos de 535,7 e 21,4/100 ng DNA total, respectivamente.

3.2.2.2 Extração de proteínas de cartucho foliar de cana-de-açúcar

A quantidade de proteínas extraídas pelo método TCA/Acetona foi satisfatória e a concentração variou entre 1,0 e 2,10 mg/mL (ou de 2 a 4 mg/g de tecido fresco), suficientes para o uso em géis 2D-PAGE.

3.2.2.3 Análise protéica em SDS-PAGE

O método de extração possibilitou recuperar e solubilizar proteínas em uma grande amplitude de massa molecular, o que resultou em boa resolução das proteínas (Figura 3.3). Desta forma, a análise em SDS-PAGE evidenciou a boa qualidade dos extratos protéicos necessária às análises de 2D-DIGE.

Figura 3.3 – Perfil protéico em SDS-PAGE das variedades RB83-5486 (A) e SP80-3280 (B), inoculadas com meio (MI) ou com Lxx (Lxx) aos 30 ou 60 dias após a inoculação. O padrão de massa molecular (P) corresponde à albumina de soro bovino

3.2.2.4 Eletroforese bidimensional - 2D-DIGE

A análise de proteínas por 2D-DIGE possibilitou resolução satisfatória de cerca de 2.500 proteínas. Uma análise visual das imagens dos géis (Figura 3.4) revelou *spots* protéicos com boa definição, distribuição e reprodutibilidade. Vale ressaltar que os dois primeiros géis de cada linha

representam as imagens dos perfis protéicos de plantas inoculadas apenas com o meio de cultura (a) e inoculadas com Lxx (b), geradas nos comprimentos de ondas dos fluoróforos respectivos a cada tratamento. A terceira imagem (c) corresponde à sobreposição destas duas primeiras imagens à de uma terceira gerada no comprimento de onda do fluoróforo correspondente ao padrão interno (Cy2). A mesma qualidade de resolução de *spots* foi observada para a variedade SP80 3280 (Figura 3.5).

Após o processamento das imagens e cálculos estatísticos com base nos volumes padronizados de cada proteína, foi possível detectar 128 proteínas com alteração significativa em abundância em ao menos um dos contrastes (Tabela 3.4; Figura 3.6). Para estas proteínas, o valor de $R1'$ variou de 0,0071 a 0,048. Já os valores de razão de abundância r variaram de -2,5 a +2,56. Entre essas 128 proteínas, foram escolhidas as proteínas exclusivas de cada contraste, os quais incluem: inoculado com o meio (MI_{60} vs MI_{30}) e inoculado com Lxx ($LxxI_{60}$ vs $LxxI_{30}$), e aquelas que foram compartilhadas dentro desses contrastes, porém, presentes nas duas variedades representando respostas conservadas entre os dois genótipos, para análise de comparação entre grupos, totalizando 62 proteínas.

Figura 3.4 – Imagens de géis 2D-DIGE para a variedade de cana-de-açúcar RB83 5486. (a), (b) e (c) representam os tratamentos inoculado com o meio (MI), inoculado com Lxx (LxxI) e sobreposição (a) + (b) + IS (*Internal Standard*), respectivamente. 1, 2 e 3 são replicatas biológicas do tratamento 30 DAI (dias após a inoculação) e 4, 5, e 6 do tratamento 60 DAI (dias após a inoculação). Proteínas diferencialmente expressas podem ser evidenciadas pelas variações em cor nos *spots*

Figura 3.5 - Imagens de géis 2D-DIGE para a variedade de cana-de-açúcar SP80-3280. (a), (b) e (c) representam os tratamentos inoculado com o meio (MI), inoculado com Lxx (LxxI) e sobreposição (a) + (b) + IS (*Internal Standard*), respectivamente. 1, 2 e 3 são replicatas biológicas do tratamento 30 DAI (dias após a inoculação) e 4, 5, e 6 do tratamento 60 DAI (dias após a inoculação). Proteínas diferencialmente expressas podem ser evidenciadas pelas variações em cor nos *spots*

Figura 3.6 – Figura de gel 2D-DIGE identificando a localização dos 128 *spots* detectados com diferentes abundâncias para os contrastes estudados

Figura 3.7 - Representação da análise de *spots* no software DeCyder, com exemplo de um *spot* marcado em azul no gel (em cima à esquerda) e o detalhe da imagem tridimensional de seu volume (em baixo à esquerda). À direita, exemplo de gráfico e tabela da análise dos dados

3.2.2.5 Comparação de conjuntos de proteínas que apresentaram diferenças em abundância em função do tempo

A figura 3.8 ilustra o número de proteínas que apresentaram variação em abundância entre 30 e 60 DAI (dias após a inoculação) em plantas inoculadas ou não com Lxx para cada variedade. Foram identificadas 66 (17+13+34+2) e 48 (13+34+1) proteínas em plantas não inoculadas e inoculadas da variedade RB835486, respectivamente, ao passo que na variedade SP80-3280 foram identificadas, respectivamente nas mesmas condições, 60 (2+5+19+34) e 91 (34+19+37+1) proteínas.

Trinta e quatro proteínas foram identificadas tanto em plantas inoculadas como em não inoculadas com Lxx em ambas as variedades. De maneira análoga, foram identificadas proteínas que apresentaram comportamento semelhante, porém específico para variedades, sendo 13 na RB e 19 na SP. Estas proteínas (34+13+19) não foram incluídas na análise, já que as variações em suas abundâncias ocorreram independentemente da inoculação com a bactéria e provavelmente representam variações que ocorrem em função do desenvolvimento da planta.

Considerando o conjunto de proteínas cujas abundâncias foram alteradas em função da inoculação, foi possível notar acentuada diferença entre as variedades. No caso da RB835486, 19 proteínas foram detectadas exclusivamente em plantas não inoculadas e apenas 1 o foi em plantas inoculadas, ao passo que na SP80-3280 a situação se inverteu; um maior número de proteínas (38 proteínas) sofreu alteração em seu perfil exclusivamente em plantas inoculadas em comparação a plantas não inoculadas com Lxx (7 proteínas). A diferença, além de quantitativa, também foi qualitativa, pois das proteínas detectadas em plantas inoculadas, apenas uma foi comum a ambas as variedades e, de maneira recíproca, apenas duas foram comuns a plantas não inoculadas de ambas as variedades. Portanto, ao todo, considerando as duas variedades, 62 proteínas tiveram suas abundâncias alteradas ao longo do tempo unicamente em plantas inoculadas ou não inoculadas com *Leifsonia*, compreendendo um conjunto de proteínas responsivas à colonização pela bactéria. Estas foram analisadas por espectrometria de massas e submetidas a análises bioinformáticas (Tabela 3.5).

Proteínas da variedade RB835486 com variações em abundâncias ao longo do tempo em função da inoculação com Lxx: a maior porcentagem das 19 proteínas da variedade RB cujos volumes foram alterados entre 30 e 60 DAI unicamente em plantas não-inoculadas com Lxx, pertenceu às classes de resposta ao estresse (4 ou 23,5%), bioenergética (23,5%) e de metabolismo de proteínas (17,6%) e de aminoácidos (17,6%) (Figura 3.8, grupos A e B). Entre as proteínas de estresse cujos volumes foram reduzidos destacaram-se uma catalase (-1,71), uma proteína de resistência do tipo NBS-LRR (-2,06), uma proteína alergênica Bet V I, (-1,57) (Tabela 3.4, grupo A) e uma proteína de ligação à clorofila a-b (-2) (Tabela 3.4, grupo B). Entre as proteínas envolvidas em metabolismo de aminoácidos, foram detectadas duas isoformas de metionina sintase (-2,32 e -2,5) e uma metilnetetrahidrofolato (MTHFR) (-1,53), que atuam na via de síntese de metionina e cisteína, respectivamente. Entre proteínas que tiveram seus volumes aumentados, encontraram-se proteínas envolvidas no metabolismo protéico, como a subunidade alfa do proteassomo (+1,35), a enzima E2 de conjugação à ubiquitina (+1,34), uma proteína rica em glicina de ligação ao RNA (+1,38) (Tabela 3.4, grupo A) e uma proteína hipotética (1,46) (Tabela 3.4, grupo B). A única proteína que apresentou variação em volume em plantas inoculadas desta variedade foi uma ATP sintase (-1,49) (Tabela 3.4, grupo F). Por outro lado, não

foram observadas proteínas exclusivas para o tratamento inoculado com Lxx (Figura 3.8 grupo G).

Proteínas da variedade SP80-3280 com variações em abundâncias ao longo do tempo em função da inoculação com Lxx: entre as 7 proteínas que apresentaram variação em abundância em função do tempo em plantas da variedade SP não inoculadas com a bactéria, a maior porcentagem pertenceu às classes de resposta ao estresse (60%) e de bioenergética (20%) (Figura 3.8, grupo C+B). Entre as proteínas de estresse encontraram-se 2 isoformas de glutationa-s-transferase (+1,83 e 2,02) e uma proteína de resistência do tipo não-TIR-NBS-LRR (+1,76). Para a classe de bioenergética, a enzima isocitrato dehidrogenase apresentou redução em volume (-1,3) (Tabela 3.4, grupo C). Já em plantas inoculadas com Lxx, além do maior número (38) a funcionalidade das proteínas foi mais diversificada, incluindo as categorias de bioenergética (24,3%), metabolismo de proteínas (21,6%), resposta ao estresse (18,9%) e outras classes em menor porcentagem (Figura 3.8, grupo E+ F). Merecem destaque dentro da categoria de resposta ao estresse, proteínas similares a fenilalanina amônia liase (+1,31), durrinase (+1,44), uma subunidade beta da proteína G (+1,7), anexina (+1,39), trealose fosfatase (+1,51) e trealose-6-fosfato sintase (+1,5) (Tabela 3.4, grupo E). Na categoria de bioenergética, a modulação foi positiva para boa parte das proteínas, como sacarose sintase (+1,74), sacarose fosfato sintase (+1,56), aldolase citoplasmática (-1,84), álcool desidrogenase (+1,53), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (+1,85), ATP sintase mitocondrial (+1,68) (Tabela 3.4, grupo E) e uma ATP sintase com menor abundância (-1,45) (Tabela 3.4, grupo F). Para a categoria de metabolismo de proteínas foram detectadas uma proteína de ligação à poli-A (+1,66), RNA helicase dependente de ATP (+1,63), eIF-4A (-1,54), protease 26S (+1,54), subunidade alfa proteassomo 20S (+1,52), proteína de ligação ao RNA rica em glicina (+1,9) e curiosamente, 2 isoformas do fator 5A de iniciação da tradução, uma superexpressa (+1,4) e uma reprimida (-2,69) (Tabela 3.4, grupo E).

Comparação global: o contraste de médias dos volumes normalizados de cada proteína realizado entre tratamentos inoculado com o meio vs inoculado com Lxx, independente do tempo e da variedade (contraste 5, Figura 3.2) identificou 3 proteínas, sendo uma proteína desconhecida que apresentou aumento de abundância (+1,48) que não foi detectada em outros contrastes estudados. Entre as proteínas com diminuição de abundância encontram-se uma proteína similar à

calreticulina (-1,57) e um fator de iniciação da tradução – eIF-5A (-1,68), sendo que estas também foram detectadas em plantas de variedade SP80-3280 inoculadas com Lxx (SPLxxI₆₀ vs SPLxxI₃₀), inclusive, observou-se o mesmo padrão de repressão para o fator eIF-5A.

Figura 3.8 – Diagrama de Venn representando o número de proteínas com diferentes abundâncias identificadas entre os tempos 30 e 60 DAI em plantas não inoculadas e inoculadas com Lxx, para as variedades RB83 5486 e SP80-3280. (a) esquema dos contrastes de médias utilizados para gerar os dados apresentados em (b)

Tabela 3.4 – Identificação, dados de expressão (razão: inoculado com Lxx/inoculado com o meio) e categorização funcional das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8 (continua)

Ident. grupo ^a	spot no. ^b	gi/NCBI	UniprotKB /Swiss-Prot	Identificação	Espécie	ratio ^c	p value (t-teste)	Categoria funcional	Score/ Mascot	No. peptídeos
A	6	18483235	Q8W0Q7	metionina sintase1	<i>Sorghum bicolor</i>	-2,32	0,017	Metabolismo de aminoácidos	722	22
	8	18483235	Q8W0Q7	metionina sintase2	<i>Sorghum bicolor</i>	-2,5	0,0087	Metabolismo de aminoácidos	909	20
	12	121615560	A2IBN5	fenilalanina amônia-liase1	<i>Saccharum officinarum</i>	-1,59	0,042	Resposta ao estresse	453	16
	15	222625457	B9FA11	proteína hipotética osj_11897	<i>Oryza sativa</i> Japonica Group	-1,43	0,031	Metabolismo de lipídeos, ácidos graxos e isoprenóides	210	8
	33	162459521	Q9SE94	metilenotetrahidrofolato redutase 1	<i>Zea mays</i>	-1,53	0,034	Metabolismo de aminoácidos	370	17
	48	120564801	A1Z0J9	proteína de resistência do tipo NBS-LRR	<i>Saccharum officinarum</i>	-2,06	0,0015	Resposta ao estresse	34	7
	49	1345683	P18123	catalase isoenzima 3		-1,71	0,019	Resposta ao estresse	540	13
	62	48478779	Q6ENV5	ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar SP-80-3280	-1,75	0,0073	Bioenergética	111	11
	72	257209019	C7IVU6	proteína desconhecida1	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570	-1,86	0,017	não classificada	52	13
	101	226528403	B6TDE0	oxiredutase p1 dependente de NADP	<i>Zea mays</i>	-1,36	0,0007	Bioenergética	154	9
	102	195659557	B6UIR3	UDP-glicurônico ácido decarboxilase 1	<i>Zea mays</i>	-1,38	0,039	Bioenergética	640	18
	105	1854376	P93782	sacarose-fosfato sintase2	<i>Saccharum officinarum</i>	-1,56	0,035	Bioenergética	18	6
	125	255579983	B9SXX7	proteassoma (subun. alfa)	<i>Ricinus communis</i>	+1,35	0,0052	Metabolismo de proteínas	422	8

Tabela 3.4 – Identificação, dados de expressão (razão: inoculado com Lxx/inoculado com o meio) e categorização funcional das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8

(continuação)										
Ident. grupo ^a	spot no. ^b	gi/NCBI	UniprotKB /Swiss-Prot	Identificação	Espécie	ratio ^c	p value (t-teste)	Categoria funcional	Score/ Mascot	No. peptídeos
A	135	255540299	B9RAI9	adenilato kinase	<i>Ricinus communis</i>	+1,34	0,0044	Metabolismo de nucleotídeos	155	9
	171	162460312	Q5XLE0	proteína alergênica BET V I	<i>Zea mays</i>	-1,57	0,033	Resposta ao estresse	231	6
	180	226491078	B6T1X2	enzima E2 N de conjugação a ubiquitina	<i>Zea mays</i>	+1,34	0,0012	Metabolismo de proteínas	437	9
	182	6911144	Q9M6A0	proteína rica em glicina de ligação ao RNA	<i>Catharanthus roseus</i>	+1,38	0,0027	Metabolismo de proteínas	76	3
B	2	242090629	C5YYC3	proteína hipotética SORBIDRAFT_09g021240	<i>Sorghum bicolor</i>	+1,46 ^d / +1,38 ^e	0,038 ^d / 0,044 ^e	não classificada	361	16
	136	115786	P06671	proteína de ligação à clorofila a-b		-2 ^d / -2,45 ^e	0,012 ^d / 0,012 ^e	Resposta ao estresse	288	5
C	77	226499486	B4FN97	isocitrato desidrogenase 2	<i>Zea mays</i>	-1,3	0,039	Bioenergética	634	15
	116	300681372	D8L851	proteína hipotética conservada2	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570	+1,48	0,019	não classificada	20	4
	144	121484440	A1Z0K0	proteína de resistência do tipo não-TIR-NBS-LRR	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar NCo 376	+1,76	0,027	Resposta ao estresse	31	10
	145	162464281	Q9FQC7	glutathione s-transferase1	<i>Zea mays</i>	+1,83	0,046	Resposta ao estresse	621	15
	146	162464281	Q9FQC7	glutathione s-transferase2	<i>Zea mays</i>	+2,02	0,026	Resposta ao estresse	472	13
E	4	741983	P49036	sacarose sintase		+1,74	0,035	Bioenergética	312	17
	9	18483235	Q8W0Q7	metionina sintase3	<i>Sorghum bicolor</i>	-1,99	0,011	Metabolismo de aminoácidos	575	17
	14	121615560	A2IBN5	fenilalanina amônia-liase2	<i>Saccharum officinarum</i>	+1,31	0,036	Resposta ao estresse	550	17

Tabela 3.4 – Identificação, dados de expressão (razão: inoculado com Lxx/inoculado com o meio) e categorização funcional das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8

(continuação)										
Ident. grupo ^a	spot no. ^b	gi/NCBI	UniprotKB /Swiss-Prot	Identificação	Espécie	ratio ^c	p value (t-teste)	Categoria funcional	Score/ Mascot	No. peptídeos
E	17	226499084	B6SHH4	lisil-tRNA sintetase	<i>Zea mays</i>	+1,6	0,041	Metabolismo de RNA e transcrição	236	13
	19	1737492	P93616	proteína de ligação a poli(A)	<i>Triticum aestivum</i>	+1,66	0,032	Metabolismo de proteínas	54	4
	20	1854376	P93782	sacarose-fosfato sintase1	<i>Saccharum officinarum</i>	+1,56	0,0065	Bioenergética	35	14
	36	226490993	B6TRQ7	fator 19 de splicing do pré-mRNA	<i>Zea mays</i>	+1,38	0,025	Metabolismo de RNA e transcrição	103	9
	46	49259431	Q41290	durrinase	<i>Sorghum bicolor</i>	+1,44	0,024	Resposta ao estresse	213	12
	65	143456603	Q0JM17	RNA helicase 56 dependente de ATP		+1,63	0,037	Metabolismo de proteínas	268	12
	66	293331089	B6TDT1	subunidade 6B protease reguladora do proteassoma 26S	<i>Zea mays</i>	+1,85	0,014	Bioenergética	571	20
	67	162457732	Q9SP22	calreticulina 2	<i>Zea mays</i>	-1,38	5,40E-02	Comunicação celular/transdução de sinais	294	12
	69	257209026	C7IVV3	Endo-1,4-b-glucanase	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar R570	+1,87	0,023	Bioenergética	35	10
	71	100801654	Q1H977	S-adenosilmetionina sintetase	<i>Oryza rufipogon</i>	-1,59	0,021	Metabolismo de aminoácidos	627	20
	74	281484410	D2KK99	trealose-6-fosfato sintase	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	+1,5	0,0055	Bioenergética	34	4
	76	195542171	B5AKW1	fator de iniciação da tradução (eIF-4A)	<i>Pennisetum glaucum</i>	-1,54	0,026	Metabolismo de proteínas	419	16
	78	226491029	B6TBW4	proteína 2G4 associada a proliferação	<i>Zea mays</i>	+1,56	0,015	Metabolismo de RNA e transcrição	94	8

Tabela 3.4 – Identificação, dados de expressão (razão: inoculado com Lxx/inoculado com o meio) e categorização funcional das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8

(continuação)

Ident. grupo ^a	spot no. ^b	gi/NCBI	UniprotKB /Swiss-Prot	Identificação	Espécie	ratio ^c	p value (t-teste)	Categoria funcional	Score/ Mascot	No. peptídeos
E	79	300681488	D8L9M8	prot. que contém domínio de reconhecimento do RNA	<i>Triticum aestivum</i>	+1,91	0,017	Metabolismo de RNA e transcrição	74	5
	81	300681390	D8L867	proteína conservada1 hipotética	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	+1,74	0,03	não classificada	35	7
	84	257209017	C7IVU4	ciclina H-1	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	-1,39	0,026	Dinâmica celular	36	7
	86	218157	Q40676	Aldolase citoplasmática	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	-1,84	0,039	Bioenergética	234	6
	88	162461095	P93629	Álcool desidrogenase classe-3	<i>Zea mays</i>	+1,53	0,0092	Bioenergética	180	7
	89	226505536	B4FTV9	subunidade S10B protease reguladora do proteassoma 26S	<i>Zea mays</i>	+1,54	0,048	Metabolismo de proteínas	131	11
	90	327179627	F2WTR1	Gliceraldeído-3-fosfato-deidrogenase	<i>Saccharum hybrid cultivar</i>	+1,85	0,043	Bioenergética	83	6
	108	149392178	P49027	Proteína G (subun. beta)	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	+1,7	0,0091	Comunicação celular/transdução de sinais	275	3
	110	24899397	Q8H7M3	proteína r40c1	<i>Oryza sativa Japonica Group</i>	+1,44	0,026	Resposta ao estresse	91	2
	118	162459667	Q43863	anexina p33	<i>Zea mays</i>	+1,39	0,047	Resposta ao estresse	533	20
	121	192910896	B3TLX5	ATP sintase mitocondrial (cadeia gama)	<i>Elaeis guineensis</i>	+1,68	0,017	Bioenergética	209	7
	124	300681396	D8L873	trealose-fosfatase	<i>Saccharum hybrid cultivar R570</i>	+1,51	0,023	Resposta ao estresse	45	8
	142	162463728	Q9FER4	proteassoma 20S (subun. alfa)	<i>Zea mays</i>	+1,52	0,025	Metabolismo de proteínas	154	8

Tabela 3.4 – Identificação, dados de expressão (razão: inoculado com Lxx/inoculado com o meio) e categorização funcional das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8 (conclusão)

Ident. grupo ^a	spot no. ^b	gi/NCBI	UniprotKB /Swiss-Prot	Identificação	Espécie	ratio ^c	p value (t-teste)	Categoria funcional	Score/Masco	No. peptídeos
E	148	242062756	C5Y090	proteína hipotética sorbidraft_04g030280	<i>Sorghum bicolor</i>	+1,43	0,012	Transporte	106	12
	158	195656275	B6UE22	proteína de tumor controlada na tradução (TCTP)	<i>Zea mays</i>	+1,42	0,038	Desenvolvimento e crescimento da planta	310	8
	168	162458009	P80639	fator de iniciação da tradução (eIF-5a)_1	<i>Zea mays</i>	-2,69	0,0038	Metabolismo de proteínas	356	11
	169	162458009	P80639	fator de iniciação da tradução (eIF-5a)_2	<i>Zea mays</i>	+1,4	0,042	Metabolismo de proteínas	422	10
	174	254030297	F6KNQ6	ciclofilina	<i>Saccharum officinarum</i>	+1,38	0,028	Resposta ao estresse	259	8
	179	37903393	Q6XNL1	proteína tipo 14-3-3	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar CP65-357	+2,56	0,0044	Comunicação celular/transdução de sinais	41	9
	183	10799202	Q9FUD5	proteína rica em glicina de ligação ao RNA2	<i>Sorghum bicolor</i>	+1,9	0,0085	Metabolismo de proteínas	245	6
	186	195612340	B6ST17	proteína do tipo NHP2	<i>Zea mays</i>	+1,37	0,0072	Metabolismo de RNA e transcrição	92	3
F	31	48478769	Q6L3A1	ATP sintase (subun. alfa)	<i>Saccharum hybrid</i> cultivar	-1,49 ^d / -1,45 ^e	0,034 ^d / 0,034 ^e	Bioenergética	66	7

^a Diagrama de Venn – ver figura 3.8

^b Ver figura 3.6

^c (-) menor abundância; (+) maior abundância

^d Contraste RBMI₆₀ vs RBMI₃₀

^e Contraste SPMI₆₀ vs SPMI₃₀

Tabela 3.5 – Proteínas com diferentes abundâncias identificadas entre plantas inoculadas com Lxx independente do tempo e da variedade

Contraste	spot no. ^b	gi/NCBI	UniprotKB /Swiss-Prot	Identificação	Espécie	ratio ^c	p value (t-teste)	Categoria funcional	Score/ Mascot	No. peptídeos
(SP LxxI30 + SP LxxI60+ RB LxxI30 + RB LxxI60) <i>versus</i> (SP MI30 + SP MI60 + RB MI30 + RB MI60)	67	162457732	Q9SP22	calreticulina 2	<i>Zea mays</i>	-1,57	2,00E- 07	Comunicação cellular/ transdução de sinal	294	12
	155	257209015	C7IVU2	<i>Oryza sativa</i> proteína desconhecida AAP03421	<i>Saccharum</i> hybrid cultivar R570	+1,48	0,009	não classificada	35	12
	168	162458009	P80639	fator de iniciação da tradução (eIF-5A)_1	<i>Zea mays</i>	-1,68	0,0014	Metabolismo de proteínas	356	11

^a Ver figura 3.6^b (-) menor abundância; (+) maior abundância

3.2.2.6 *Heat map* das proteínas diferencialmente expressas entre os 30 e 60 DAI

De acordo com a figura 3.9, o agrupamento das proteínas segundo os valores de *ratio* (*r*) (Tabela 3.4) permitiu identificar 4 grupos principais de proteínas com dinâmicas de abundância distintas. De maneira geral, as maiores alterações foram observadas para proteínas pertencentes aos contrastes da variedade RB835486 inoculadas com o meio e SP80-3280 inoculadas com Lxx, o que corrobora com o resultado apresentado no diagrama de Venn (Figura 3.8). Isso pode ser visualizado tanto pela intensidade quanto pela mudança na cor do mapa. O grupo I claramente agrupou proteínas que, em maior parte, aumentaram em abundância em plantas inoculadas da variedade SP80-3280 e incluem proteínas como ciclofilina, trealose-6-fosfato sintase, trealose fosfatase, proteína de tumor controlada na tradução (TCTP), fenilalanina amônia-liase (PAL) e duas subunidades (alfa e S10B) do proteossoma. O grupo II incluiu proteínas cuja variação também foi mais evidente nestas plantas, mas que, ao contrário, tiveram sua abundância diminuída. Estas incluem proteínas como ciclina e enzima E2N de conjugação da ubiquitina. No grupo III foram incluídas proteínas, em sua maioria, com menor abundância nos contrastes da variedade RB835486 e maior abundância nos contrastes da variedade SP80-3280 e ilustram diferentes respostas entre os dois genótipos, como durrinase e duas subunidades (20S e 6B protease) do proteossoma. O grupo IV inclui proteínas com perfil geral de menor abundância no contraste de plantas da variedade RB835486 inoculadas com o meio como metionina sintase, entretanto, também inclui proteínas com menor abundância no constraste que avalia plantas inoculadas com Lxx da variedade SP80-3280, como a calreticulina.

Figura 3.9 – *Heat map* representando as proteínas diferencialmente expressas entre os 30 e 60 DAI (dias após a inoculação), para as variedades RB83 5486 e SP80-3280. Verde representa o perfil de proteínas que foram reprimidas e em vermelho, proteínas que foram super expressas

3.2.2.7 Identificação de proteínas ortólogas em *Arabidopsis*, arroz e cana-de-açúcar

Na tabela 3.6 estão representados os números de acessos das proteínas ortólogas para *Arabidopsis thaliana*, arroz e número do *cluster* do SUCEST correspondentes às proteínas identificadas unicamente em plantas inoculadas ou não inoculadas de cada variedade (Figura 3.8b - grupos A, C e E).

Tabela 3.6 – Identificação e ortologia das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8

							(continua)
Ident. grupo ^a	Spot no. ^b	gi number (NCBI)	Identificação	locus <i>Arabidopsis thaliana</i>	locus <i>Oriza sativa</i>	no. Cluster SUCEST	
A	6	18483235	Metionina Sintase1	AT5G17920	LOC_Os12g42876	SCCCCL4015F02.g	
	8	18483235	Metionina Sintase2	AT5G17920	LOC_Os12g42876	SCCCCL4015F02.g	
	12	121615560	Fenilalanina amônia-Liase1	AT2G37040	LOC_Os02g41630	SCJLRT1013C01.g	
	15	222625457	proteína hipotética OsJ_11897	-	LOC_Os05g06300	SCQGLR1041A10.g	
	33	162459521	Metilenetetrahidrofolato Redutase 1	AT2G44160	LOC_Os03g60090	SCEZRZ1012F05.g	
	48	120564801	proteína de resistência do tipo NBS-LRR	AT3G14470	LOC_Os06g49390	SCEPAM2014D05.g	
	49	1345683	Catalase isoenzima 3	AT1G20630	LOC_Os02g02400	SCCCLR1048H09.g	
	62	48478779	Ribulose-1,5-bisfosfato Carboxilase/Oxigenase	ATCG00490	LOC_Os10g21280	SCJFLR1073E09.g	
	72	257209019	proteína desconhecida1	-	LOC_Os03g52700	SCEPFL4175F08.g	
	101	226528403	Oxiredutase P1 dependente de NADP	AT5G17000	LOC_Os04g41960	SCEQLR1029D06.g	
	102	195659557	UDP-glicurônico ácido Decarboxilase 1	AT2G28760	LOC_Os03g16980	SCCCRZ2001D09.g	
	105	1854376	Sacarose-fosfato Sintase2	AT1G04920	LOC_Os01g69030	SCCCLR1C06G07.g	
	125	255579983	proteassoma (subun. alfa)	AT5G66140	LOC_Os08g43540	SCJFRZ2010D05.g	
	135	255540299	Adenilato Kinase	AT5G63400	LOC_Os11g20790	SCCCRZ2003B04.g	
	171	162460312	proteína alergênica Bet v I	AT1G24020	LOC_Os04g39150	SCRUFL1015B05.g	
	180	226491078	enzima E2 N de conjugação a ubiquitina	AT1G16890	LOC_Os01g48280	SCCCLR1C03B03.g	
	182	6911144	proteína rica em glicina de ligação ao RNA1	AT4G13850	LOC_Os03g46770	SCQSLB1049H01.g	
C	77	226499486	Isocitrato Dehidrogenase 2	AT1G65930	LOC_Os05g49760	SCCCCL4017A09.g	
	116	300681372	proteína hipotética conservada2	-	LOC_Os05g19050	-	
	144	121484440	proteína de resistência do tipo não-TIR-NBS-LRR	AT3G07040	LOC_Os11g11960	SCRULB1059F07.g	
	145	162464281	Glutathione S-Transferase1	AT2G47730	LOC_Os03g04240	SCVPLR2012H12.g	
	146	162464281	Glutathione S-Transferase2	AT2G47730	LOC_Os03g04250	SCVPLR2012H12.g	
E	4	741983	Sacarose Sintase	AT3G43190	LOC_Os03g28330	SCCCRZ1002G07.g	
	9	18483235	Metionina Sintase3	AT5G17920	LOC_Os12g42876	SCCCCL4015F02.g	
	14	121615560	Fenilalanina amônia-Liase2	AT2G37040	LOC_Os02g41630	SCJLRT1013C01.g	
	17	226499084	Lisil-tRNA Sintetase	AT3G11710	LOC_Os03g38980	SCMCLR1053H06.g	
	19	1737492	proteína de ligação a poli(A)	AT1G49760	LOC_Os09g02700	SCBGLR1023H10.g	
	20	1854376	Sacarose-fosfato Sintase1	AT1G04920	LOC_Os01g69030	SCCCLR1C06G07.g	
	36	226490993	fator 19 de splicing do pré-mRNA	AT2G33340	LOC_Os10g32880	SCCCLR1080G12.g	
	46	49259431	Durrinase	AT5G44640	LOC_Os04g39880	SCCCLB1004E10.g	
	65	143456603	RNA helicase 56 dependente de ATP	AT5G11170	LOC_Os01g36890	SCRFLR1034B02.g	
	66	293331089	subunidade 6B protease reguladora do proteassoma 26S	AT5G58290	LOC_Os02g21970	SCCCLR1077D09.g	
	67	162457732	calreticulina 2	AT1G56340	LOC_Os07g14270	SCEPLR1051D05.g	
	69	257209026	Endo-1,4-b-Glucanase	AT5G49720	LOC_Os03g52630	SCUTLR2030G02.g	
	71	100801654	S-adenosilmetionina Sintetase	AT1G02500	LOC_Os05g04510	SCCCLR1001G06.g	
	74	281484410	Trealose-6-fosfato Sintase	AT1G60140	LOC_Os05g44100	SCEZRZ1015H08.g	
	76	195542171	fator de iniciação da tradução (eIF-4A)	AT3G19760	LOC_Os01g45190	SCCCLR1066A08.g	
	78	226491029	proteína 2G4 associada a proliferação	AT3G51800	LOC_Os05g28280	SCCCCL3004H02.b	
	79	300681488	prot. que contém domínio de reconhecimento do RNA	AT1G43190	LOC_Os01g64770	SCCCCL4012D10.g	
	81	300681390	proteína hipotética conservada1	AT1G73970	LOC_Os02g03090	SCSFAD1070E02.g	
	84	257209017	ciclina H-1	AT5G27620	LOC_Os03g52750	SCAGLR2011H09.g	
	86	218157	Aldolase citoplasmática	AT2G36460	LOC_Os10g08022	SCCCCL3120C03.g	
	88	162461095	Álcool Deidrogenase classe-3	AT5G43940	LOC_Os02g57040	SCCCLR1066H09.g	
	89	226505536	subunidade S10B protease reguladora do proteassoma 26S	AT1G45000	LOC_Os02g10640	SCCCLR1022E06.g	

Tabela 3.6 – Identificação e ortologia das proteínas diferencialmente expressas apresentadas no diagrama de Venn da Figura 3.8

(conclusão)						
Ident. grupo ^a	Spot no. ^b	gi number (NCBI)	Identificação	locus		no. Cluster SUCEST
				<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>locus Oriza sativa</i>	
E	90	327179627	Gliceraldeído-3-fosfato-Deidrogenase	AT3G04120	LOC_Os02g38920	SCCCLR1001E06.g
	108	149392178	proteína de ligação à guanina (subun. beta)	AT1G18080	LOC_Os01g49290	SCACLR2007C03.g
	118	162459667	anexina p33	AT5G10230	LOC_Os06g11800	SCCCRZ2004A11.g
	121	192910896	ATP Sintase mitocondrial (cadeia gama)	AT2G33040	LOC_Os10g17280	SCJFLR1013C03.g
	124	300681396	Trealose-fosfatase	AT4G39770	LOC_Os10g40550	SCVPCL6064B03.g
	142	162463728	proteassoma 20S (subun. alfa)	AT2G05840	LOC_Os03g08280	SCCCLR1001B04.g
	148	242062756	proteína hipotética SORBIDRAFT_04g030280	AT5G13450	LOC_Os06g43850	SCCCLR1072A03.g
	158	195656275	proteína de tumor controlada na tradução	AT3G16640	LOC_Os11g43900	SCCCLR2001G09.g
	168	162458009	fator de iniciação da tradução (eIF-5A)_1	AT1G13950	LOC_Os07g40580	SCCCLR1C02A02.g
	169	162458009	fator de iniciação da tradução (eIF-5A)_2	AT1G13950	LOC_Os07g40580	SCCCLR1C02A02.g
	174	254030297	ciclofilina	AT2G21130	LOC_Os02g02890	SCCCLR2001G06.g
	179	37903393	proteína tipo 14-3-3	AT5G38480	LOC_Os08g33370	SCCCRZ1001D02.g
	183	10799202	proteína rica em glicina de ligação ao RNA2	AT4G13850	LOC_Os03g46770	SCQSLB1049H01.g
	186	195612340	proteína do tipo NHP2	AT5G20160	LOC_Os03g13800	SCCCCL3080G05.g

^a Diagrama de Venn – ver figura 3.8^b Ver figura 3.6

3.2.2.8 Classificação funcional e vias metabólicas afetadas pelo crescimento de Lxx

As proteínas que apresentaram variação em abundância em cada variedade, segundo os contrastes da figura 3.9, foram incluídas em uma figura que ilustra a visão geral do metabolismo da planta em resposta ao crescimento de Lxx. Para a variedade RB835486 observou-se que o metabolismo foi, em geral, regulado negativamente para proteínas envolvidas nas vias do metabolismo de aminoácidos, fenilpropanóides e compostos fenólicos, ciclo de Calvin, metabolismo de carbono e síntese de sacarose (Figura 3.10a), ao passo que para a variedade SP80-3280, a maioria das vias foi regulada positivamente, como as vias de metabolismo de sacarose, trealose e celulose e cadeia transportadora de elétrons (Figura 3.10b). Essa figura evidencia diferentes respostas para as variedades estudadas.

Figura 3.10 – Vias metabólicas afetadas em resposta ao crescimento de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para as variedades RB835486 (a) e SP80-3280 (b). A legenda em barras indica o razão de expressão, azul para superexpressão e vermelho para repressão

3.2.2.9 Rede de interação de proteínas

Redes de interações funcionais contendo as 200 melhores predições do ranking foram construídas para o contraste entre plantas das duas variedades inoculadas com o meio estéril (Figura 3.11 e Figura 3.12a), e para plantas da variedade SP80-3280 inoculadas com Lxx (Figura 3.12b). Não foram avaliadas proteínas de plantas inoculadas da variedade RB, já que não foram identificadas proteínas exclusivas para esse contraste (Figura 3.8, grupo G). No primeiro caso (RBMI₆₀ vs RBMI₃₀), a rede evidenciou uma resposta coordenada, uma vez que a maioria das proteínas foi alocada em pontos centrais da rede (Figura 3.11). A interação de proteínas da variedade SP também revelou uma resposta coordenada, mas somente em plantas inoculadas em resposta ao aumento do título bacteriano (SPLxxI₆₀ vs SPLxxI₃₀) (Figura 3.12b). Já em plantas onde a variação no título foi baixa (SPMI₆₀ vs SPMI₃₀), não se observou uma resposta integrada entre as proteínas (pontos vermelhos).

Figura 3.11 – Rede de interação de proteínas para o grupo de proteínas exclusivas identificadas no contraste RBMI₆₀ vs RBMI₃₀. As proteínas identificadas em cada contraste estão marcadas com cor vermelha e as proteínas preditas que interagem com essas estão marcadas em verde. A rede de interação foi obtida através de proteínas ortólogas em arroz com o uso da ferramenta *RiceNet*

Figura 3.12 – Rede de interação de proteínas para o grupo de proteínas exclusivas identificadas nos contrastes (a) SPMI₆₀ vs SPMI₃₀ e (b) SPLxxI₆₀ vs SPLxxI₃₀. As proteínas identificadas em cada contraste estão marcadas com cor vermelha e as proteínas preditas que interagem com essas estão marcadas em verde. A rede de interação foi obtida através de proteínas ortólogas em arroz com o uso da ferramenta *RiceNet*

3.2.3 Discussão

Em uma definição ampla, organismos endofíticos são aqueles que vivem dentro de plantas (HARDOIM et al., 2008) estabelecendo relações cujos extremos podem ser benéficos (simbiose mutualística) ou maléficos (simbiose antagônica) à hospedeira. No entanto, entre estes extremos há organismos que podem ser facilmente isolados do interior de plantas, mas cuja presença em seu interior não acarreta alterações evidentes sugestivas de parasitismo ou mutualismo. Estes casos são comumente tratados como casos de neutralismo. Interessante é que, neste grupo, não raramente são encontrados fungos e bactérias sabidamente fitopatogênicas, o que indica claramente que o status da relação do endófito com a planta é transitório e dependente de inúmeros fatores (SCHULZ; BOYLE, 2005; ROSENBLUETH; MARTÍNEZ-ROMERO, 2006; PIROFSKI; CASADEVALL, 2012). Este é o caso de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), dado que coloniza endofiticamente a planta sem causar danos quando em baixos títulos em seus tecidos (DAVIS et al., 1988). Os mecanismos responsáveis pela alteração do status de sua relação com a hospedeira ainda são pouco compreendidos, mas envolvem estresse hídrico e idade da planta (HARRISON et al., 1988; COMSTOCK, 2002).

Considerando que os maiores danos causados pelo raquitismo estão relacionados com altos títulos de Lxx *in planta*, este trabalho avaliou o contexto de proteínas de cana cujas abundâncias variaram em função de variações no título bacteriano ao longo de 30 dias. O objetivo foi o de caracterizar a resposta da planta durante variações esperadas numa relação endofítica e durante variações esperadas em relações parasíticas, quando o título bacteriano é aumentado em relação aos títulos endofíticos. No primeiro caso, portanto, avaliou-se o perfil protéico de plantas não inoculadas e, no segundo, o de plantas inoculadas com Lxx.

A análise de interactoma de grupos específicos de proteínas revelou que, em plantas da variedade RB835486, proteínas exclusivas foram alocadas em pontos centrais da rede de interação e ilustram uma resposta coordenada da planta em resposta ao crescimento de Lxx. Já para a variedade SP80-3280, grandes diferenças foram observadas em plantas com alto e baixo título de Lxx. Proteínas de diversas categorias funcionais foram recrutadas em resposta ao alto crescimento de Lxx ilustrando uma resposta integrada das mesmas e consistentes com alterações em processos envolvidos no crescimento da planta, ao passo que, em plantas com baixo título de Lxx isso não foi observado.

Para a variedade RB835486 foram detectados títulos semelhantes de Lxx ao final de 60 DAI tanto em plantas inoculadas como em não inoculadas. Entretanto, a dinâmica de crescimento foi mais rápida nas primeiras (capítulo 2), uma vez que o inóculo inicial foi maior. Esse fato pode explicar a não detecção de alterações em abundâncias de proteínas

exclusivas a estas plantas, já que as maiores alterações podem ter ocorrido antes dos 60 dias após a inoculação, que foi um dos tempos em que foi feita a análise proteômica. Portanto, nesta variedade, o tempo de comparação ideal entre plantas inoculadas e não inoculadas deveria ter sido aos 45 DAI. De qualquer modo, mesmo com esta limitação, foi possível identificar, em plantas não inoculadas, reduções em abundâncias de proteínas relacionadas ao estresse e aumento em proteínas pertencentes à classe de metabolismo de proteínas.

Na variedade SP80-3280, onde houve variação significativa ao longo do tempo no título de Lxx em plantas inoculadas com a bactéria em relação a plantas não inoculadas, observaram-se alterações em abundâncias de proteínas envolvidas em vários processos metabólicos, em especial aquelas envolvidas em respostas a estresse e no crescimento vegetativo. Em seu conjunto, estas alterações são consistentes com o principal sintoma da doença, o raquitismo. Esta resposta, no entanto, não foi verificada em plantas não inoculadas da mesma variedade, mas que sustentavam níveis endofíticos de Lxx. Não obstante, mesmo neste segundo caso foram detectadas mudanças, embora em número bem menor, em proteínas ligadas ao metabolismo basal, como aquelas ligadas ao sistema de resposta antioxidante, o que é consistente com o relatado para outras plantas colonizadas por endofíticos (TORRES, 2010).

Como diferentes vias metabólicas foram alteradas em função do crescimento de Lxx para as duas variedades, serão apresentadas e discutidas as principais alterações observadas dentro de categorias funcionais específicas para cada variedade e sua relação no contexto do raquitismo-das-soqueiras.

Proteínas com alterações em abundância para a variedade RB835486

Proteínas de resposta ao estresse oxidativo e defesa

Plantas da variedade RB835486 inoculadas apenas com o meio apresentaram um perfil de repressão para algumas proteínas envolvidas na resposta a estresses, as quais incluem PAL, CAT e uma proteína alergênica Bet V I, e também em uma proteína análoga a gene de resistência do tipo NBS-LRR. Por outro lado, houve aumento de abundância de uma proteína de ligação ao RNA rica em glicina. Estas alterações, ainda que discretas, sugerem que o crescimento endofítico de Lxx interfere no metabolismo da planta e isso corrobora com a hipótese de que não existem relações neutras entre microrganismos e plantas e sim, um antagonismo balanceado de acordo com o proposto por Schulz e Boyle (2005) para interação com fungos endofíticos.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) é um processo inevitável derivado do metabolismo aeróbico, o qual é estritamente controlado pelo sistema de defesa antioxidante da célula (GRATÃO et al., 2005; WANG et al., 2011). Entretanto, uma variedade de estresses bióticos e abióticos podem causar um desequilíbrio na produção de ERO's e desencadear um estado de estresse oxidativo ou “sinalização oxidativa”, uma vez que estas também funcionam como mensageiras secundárias na regulação do metabolismo (FOYER; NOCTOR, 2005). Nesse sistema, que inclui enzimas como CAT e GST, existem muitas similaridades na resposta à infecção por patógenos e organismos simbiotes e se caracteriza como uma das primeiras linhas de defesa das plantas (TORRES, 2010). Portanto, era de certa forma esperado que enzimas desta classe fossem detectadas neste ensaio. A enzima CAT é responsável pela quebra de H_2O_2 em oxigênio e água e juntamente com a enzima superóxido dismutase (SOD) consistem na primeira linha de combate às ERO's (GRATÃO et al., 2005). Observou-se menor abundância de CAT e isso pode ser explicado pela ação de interação com hormônios vegetais que por sua vez podem reprimir a ação de enzimas do sistema antioxidante (TORRES, 2010). Outra explicação seria a de que, nesse momento analisado, a baixa abundância de CAT pode levar a um acúmulo na produção de H_2O_2 , que por sua vez, desempenha um papel fundamental na ativação da resposta de defesa da planta, considerando ainda que o H_2O_2 é uma molécula sinalizadora com importante papel no metabolismo celular. Por isso, em determinados momentos da interação, enzimas como CAT e APX podem ser suprimidas (CLARK et al., 2000). Ainda, as plantas possuem plasticidade quanto à resposta ao estresse oxidativo e mais de uma enzima pode atuar na detoxificação do H_2O_2 , como APX (ascorbato peroxidase) e GPX (guaiacol peroxidase) (RIZHSKY et al., 2002) e apesar da observação da baixa abundância de CAT, essas outras enzimas poderiam estar atuando na detoxificação do H_2O_2 sem necessariamente ser resultado de síntese *de novo*, o que poderia ter sido detectado em nossa análise, mas muito provavelmente pela modificação na sua cinética de ação enzimática. Ainda e devido justamente a existência de outras peroxidases, podemos sugerir que possivelmente a CAT não tenha neste caso uma atuação preferencial, mas sim outras peroxidases. Estudos bioquímicos relacionados diretamente à atividade de enzimas do sistema antioxidante serão abordados no próximo capítulo.

A enzima PAL é o componente inicial da via dos fenilpropanóides, compostos que são amplamente utilizados pelas plantas como parte de seu arsenal de defesa antimicrobiana, por exemplo, na produção de fitoalexinas (DIXON, 2001) e da lignina, a qual pode atuar como uma barreira física contra o crescimento de patógenos. Um estudo realizado com tabaco

revelou que plantas que superexpressam PAL produziram altos níveis de ácido clorogênico (CGA) e exibiram reduzida susceptibilidade à infecção pelo fungo *Cercospora nicotianae* (SHADLE et al., 2003). Outro estudo também identificou aumento da atividade de PAL em resposta em células de tabaco (TBY-2) em resposta ao contato com exopolissacarídeos (EPS) purificados de *Pseudomonas syringae* pv. *ciccaronei* e *Pseudomonas savastoni* pv. *nerii*, sugerindo a ativação desse mecanismo de defesa em ataque de patógenos (DE PINTO et al., 2003). Em geral, observa-se a indução da PAL em resposta à infecção por patógenos, entretanto, dependendo da fase da interação, seu descréscimo também pode ser observado (RAMAMOORTHY; RAGUCHANDER; SAMIYAPPAN, 2002). A redução da abundância da PAL pode propiciar o crescimento do patógeno, ao passo que, inversamente, a sua manutenção em níveis elevados pode impedir o seu desenvolvimento.

Também se detectou diminuição da abundância da proteína Bet V I. Essa proteína pertence à família de proteínas ubíquas relacionadas a patogênese (PR-10), a qual é produzida em resposta a vários patógenos, entretanto, sua função em plantas não é bem compreendida (RADAUER; LACKNER; BREITENEDER, 2008). Estudos sobre a evolução sugerem que essa proteína possui uma estrutura capaz de se ligar a compostos hidrofóbicos e de baixo peso molecular, tais como moléculas de lipídeos (MUÑOZ et al., 2010). Outro estudo sobre sua estrutura revelou que essa proteína possui um sítio de ligação ao deoxicolato, um composto estruturalmente similar aos brassinoesteróides, sugerindo o envolvimento no transporte desses hormônios em plantas e a correlação com a sinalização do crescimento e desenvolvimento da planta (MARKOVIC – HOUSLEY ET AL., 2003). Os genes de resistência de plantas (genes R) podem ser classificados em oito grupos de acordo com a organização dos motivos de aminoácidos e seus domínios transmembrana. As regiões repetidas ricas em leucina (LRRs) representam componentes importantes no reconhecimento-especificidade do patógeno e estão presentes na maioria das proteínas R e algumas também possuem componentes como sítios de ligação a nucleotídeos (NBS - *nucleotide-binding site*) (GURURANI et al., 2012). Cerca de 10 genes R já foram identificados por conferir resistência à plantas em infecção por bactérias, entretanto, para a maioria das doenças, a genética da resistência é menos tangível. Nesse trabalho foi identificado uma proteína do tipo NBS-LRR e por se tratar de um grupo reconhecidamente envolvido na resistência de plantas, sugere-se uma melhor investigação *in silico* desse achado. Desta forma, a regulação negativa destas três últimas proteínas de defesa sugere a ação de efetores produzido por Lxx.

Proteínas ricas em glicina (GRPs - *glycine-rich proteins* ou GR-RBPs - *glycine-rich RNA-binding proteins*) são incluídas como um grupo de PR-proteínas ainda não classificadas,

visto que também são induzidas em resposta à infecção por patógenos (SACHETTO-MARTINS et al., 2000; WOLOSHEEN et al., 2011). Em um estudo realizado com *Arabidopsis thaliana* foi identificado que o efector HopU1 de *Pseudomonas syringae* é uma enzima mono-ADP-ribosiltransferase que possui como alvo uma GRP7 e que, plantas defectivas na produção de GRP7 são mais suscetíveis ao patógeno. A ação desse efector modifica a estrutura da proteína e interfere na habilidade desta em se ligar ao RNA, afetando o metabolismo de RNA e a ativação do sistema de defesa da planta (FU et al., 2007). Ainda, o envolvimento do gene GRP7 de *A.thaliana* também tem sido descrito em diferentes processos biológicos, tais como: germinação de sementes, resposta ao frio, abertura e fechamento estomático (KIM et al., 2008), ciclo circadiano (SHÖNING et al., 2007) e florescimento (STREITNER et al., 2008). Outro trabalho reportou a identificação de um fragmento de cDNA de *Sorghum bicolor* como uma GRP responsiva à estresse salino, luz e ABA. Os níveis do transcrito aumentaram quatro e sete vezes em tratamento com NaCl (500 mM) e ABA (10 µM), respectivamente, sugerindo um importante papel regulador para essas situações de estresse (ANEETA et al., 2002). Por se tratar de membro de um vasto grupo de proteínas envolvidas em resposta a diferentes estresses, faz-se necessário uma melhor caracterização do envolvimento da GR-RBP identificada nesse trabalho. Entretanto, sugere-se que a alteração em sua abundância seja consequência de um estresse imposto pelo crescimento endofítico de Lxx.

Metabolismo de proteínas

Foram identificados aumentos em abundância de duas proteínas ligadas ao sistema de degradação via proteossoma 26S, uma subunidade alfa do proteossoma e uma enzima E2 de conjugação da ubiquitina. O sistema de ubiquitinação de proteínas possui um importante papel em respostas mediadas por hormônios (SANTNER; ESTELLE, 2010) bem como na percepção da luz, estrutura da cromatina, ataque de patógenos e regulação de processos de desenvolvimento da planta (VIEIRA, 2009). Ubiquitina é um polipeptídeo com 76 aminoácidos que pode ser ligada covalentemente a uma proteína e marcada para a via de degradação - proteossoma 26S (KAUFMANN et al., 2011). Devido ao seu importante papel na sinalização, o proteossoma é alvo dos efetores HopM1 e AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. HopM1 interfere no tráfico de vesículas que carregam proteínas de defesa para a membrana plasmática e envia o fator AtMIN7 (ARF- *Auxin response factors*) para degradação via proteossoma. Plantas que não possuem AtMIN7 são extremamente suscetíveis à bactéria (NOMURA; MELOTTO; HE, 2005).

Não surpreendente, patógenos de plantas e animais podem se beneficiar de seus hospedeiros quando regulam o sistema de degradação de proteínas via proteossoma 26S. O melhor exemplo disso é a produção da fitotoxina coronatina sintetizada pela bactéria *Pseudomonas syringae*, a qual imita estruturalmente o ácido jasmônico (JA-Ile). Uma vez que a coronatina entra nas células do hospedeiro, ela se liga à proteína COI1 F-box para promover o *turnover* dos repressores do JAZ (CHINI et al., 2007; THINES et al., 2007). Esse super estímulo da via de sinalização do JA é vantajoso para o crescimento do patógeno (VIESTRAS, 2009), uma vez que a ativação da via do JA provoca a abertura do estômato e colonização pela bactéria (MELOTTO et al., 2006). Outro exemplo de efector que atua nessa via é a siringolina A (SylA) produzida por *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, a qual é capaz de interagir covalentemente com os 3 sítios catalíticos ($\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$) da subunidade 20S do proteossoma e inibir a sua ação (GROLL et al., 2008). Pesquisas atuais têm demonstrado a importância da ação de alguns efetores no sistema proteossoma 26S, entretanto, à exceção da coronatina, o conhecimento sobre seus alvos é ainda limitado (KOLODZIEJEK et al., 2011). O aumento da abundância de proteínas relacionadas a essa via em cana de açúcar infectada com Lxx sugere o direcionamento de alvos para a degradação que estão sendo modulados pelo crescimento da bactéria *in planta*.

Proteínas com alterações em abundância para a variedade SP80-3280

Ressalta-se que para essa variedade foram identificadas poucas proteínas responsivas ao baixo crescimento de Lxx relacionadas principalmente à via de estresse oxidativo e defesa da planta, em contraste, um amplo grupo de proteínas foi modulada em resposta ao alto crescimento de Lxx *in planta*.

Proteínas de resposta ao estresse oxidativo e defesa

Para essa variedade foram identificadas proteínas com maior abundância relacionadas a essa via, tanto em plantas não inoculadas (duas isoformas de GST e uma proteína de resistência do tipo não TIR-NBS-LRR) como em inoculadas (PAL, durrinase, endo 1,4 β -glucanase, proteína rica em glicina de ligação ao RNA, trealose-6-fosfato sintase e trealose fosfatase). O perfil de aumento de abundância é condizente com o esperado tanto numa situação de estresse oxidativo, como no aumento de proteínas relacionadas à patogênese (PR-proteínas).

A GST é uma enzima responsável pela conjugação de compostos xenobióticos com a glutatona e a sua indução é uma marca na sinalização da interação, além de atuar na

regulação da expressão de genes de defesa (BALL et al., 2004; GHELFI et al., 2011). Em plantas com baixo crescimento da bactéria observou-se aumento em abundância de 2 isoformas de GST, fato também relatado para estudo da interação entre arroz e o endofítico *Azoarcus* sp. (MICHÉ et al., 2006), folhas de *Arabidopsis thaliana* em resposta a inoculação com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (GULLNER e KÖMIVES, 2002) e *Alternaria brassicola* (MUKHERJEE et al., 2010). A ativação do sistema antioxidante é uma resposta esperada em plantas colonizadas por bactérias endofíticas, o que corrobora com a hipótese do antagonismo balanceado entre microrganismos e hospedeiros, previamente discutido (TORRES, 2010). Ainda, sabe-se que as ERO's são reguladores positivos na sinalização do fluxo de Ca^{2+} e juntos coordenam processos relacionados à expansão celular e desenvolvimento da planta (FOREMAN et al., 2003). Isso indica uma ligação com a identificação de uma calreticulina em plantas que apresentaram alto crescimento de Lxx, proteína relacionada ao fluxo de cálcio que será posteriormente abordada. Também foi identificada uma proteína de resistência (R) do tipo não TIR-NBS-LRR. As proteínas pertencentes à classe TIR possuem um domínio com homologia aos receptores Toll e interleucina de mamíferos, já as não-TIR não são tão bem definidas, entretanto, a maioria apresenta um domínio do tipo *α -helical coiled-coil* (DEYOUNG; INNES, 2006; GURURANI et al., 2012). Da mesma forma que foi identificada uma proteína de resistência para outra variedade, sugere-se uma investigação mais aprofundada dessa proteína, uma vez que esta classe está diretamente relacionada ao conhecimento e resistência de plantas à patógenos.

O aumento na abundância de proteínas como PAL, endo- β -glucanase, durrinase, proteína rica em glicina de ligação ao RNA refletem na ativação do sistema de defesa da planta. As endo- β -glucanases são enzimas pertencentes à família PR-2 e assim como as demais famílias de proteínas relacionadas à patogênese são notoriamente conhecidas como induzidas em resposta à infecção por patógenos. Diversas PR- proteínas foram induzidas na interação entre tomate e *Fusarium oxysporum* (REP et al., 2002), frutos de tomate e TMV (CASADO-VELA et al., 2006) e folhas de arroz infectadas com *Magnapothe grisea* (KIM et al., 2004). Curiosamente, Cantú et al. (2008) relatou a repressão de isoformas de quitinases e endo- β -glucanases em plantas sintomáticas para a morte súbita do citros e os autores também sugerem que o agente causal pode estar inibindo o sistema de defesa da planta.

A enzima durrinase é uma beta-glucosidase cianogênica que hidrolisa a durrina para a produção de fídroximandelonitrila o qual subsequentemente é dissociado em HCN livre e p-hidroxibenzaldeído (CICEK; ESEN, 1998). Beta-glucosídeos cianogênicos têm sido relatados

como compostos envolvidos na defesa de plantas contra patógenos e herbivoria devido à ação tóxica do HCN (PRASAD e DHANYA, 2011). O trabalho de Nielsen et al. (2006) demonstra a importância da atividade da durrinase, em plantas de sorgo transgênicas, na redução da colonização pelo fungo *Blumeria graminis*. Entretanto, trabalhos recentes discutem o papel da produção de compostos cianogênicos e o aumento da susceptibilidade das plantas, já que a sua produção pode prejudicar a resposta de defesa da planta pela inibição da produção de fitoalexinas (MOLLER, 2010). Dessa forma, a indução dessa enzima em plantas que apresentaram maior crescimento de Lxx sugere a ação de um efector e a inibição do sistema de defesa desse genótipo.

Ainda em plantas com alto crescimento de Lxx observou-se aumento de abundância de duas enzimas da biossíntese de trealose. A trealose é um dissacarídeo comumente sintetizado em muitos organismos, útil como fonte de carbono e proteção contra resposta ao estresse, além de atuar no particionamento do carbono (VANDESTEENE et al., 2010). Em analogia à síntese de sacarose, a biossíntese de trealose envolve a geração da trealose-6-fosfato (T6P) pela ação da enzima trealose-6-fosfato sintase (TPS) e a subsequente defosforilação de T6P em trealose e fosfato inorgânico pela ação da enzima trealose-6-fosfato fosfatase (TPP) (DEBAST et al., 2011).

Intrigantemente, esse composto tem sido relatado como um regulador negativo do crescimento quando proveniente de fonte externa (DELATTE et al., 2011). Portanto, sugere-se que o aumento da abundância dessas enzimas está ligado ao estresse causado pelo crescimento parasítico de Lxx e uma relação com a regulação do crescimento da planta. Além disso, muitos estudos reportam a conexão entre o composto T6P e a sinalização por ABA, como o reportado por Gómez et al. (2010), em que mutantes de *Arabidopsis* com alelos fracos para *tps1* são hipersensíveis ao ABA e o grau de sensibilidade correlacionado com a redução da quantidade de T6P. Para uma revisão sobre a ligação entre açúcar, sinalização e desenvolvimento da planta ler Eveland e Jackson (2011). Outra observação interessante está relacionada ao acúmulo preferencial de trealose em células da fase G0 (fase estacionária) de *Saccharomyces cerevisiae* o qual leva à manutenção das células em estado quiescente, demonstrando uma estreita relação com a regulação do ciclo celular (SHI et al., 2010).

Metabolismo de proteínas

Foram detectadas três proteínas com aumento em abundância (subunidade 6B protease, subunidade S10B, subunidade alfa do proteossoma 20S) relacionadas ao sistema de degradação via proteossoma 26S e alteração de três fatores de iniciação da tradução (eIF-

eukaryotic initiation factors), um eIF4A (menor abundância) e um eIF5A identificado 2 vezes, sendo um com menor e outro com maior abundância em plantas com elevado crescimento de Lxx. O processo de tradução é modulado por vários estímulos externos como hormônios, fatores de crescimento, disponibilidade de nutrientes e estresse, e a regulação desse mecanismo está ligado à progressão do ciclo celular e crescimento da célula (MATHEWS et al. 2007). É o processo que envolve maior gasto energético para a célula, por isso, o seu controle corre no início e é regulado por fatores de iniciação da tradução (eIF's).

O fator eIF4A foi detectado em menor abundância e isso pode estar relacionado à inibição do crescimento e ciclo celular. Em analogia a um estudo com células de fibroblastos de humanos, a superexpressão do eIF4E induz a proliferação celular, ao passo que a sua repressão é um novo alvo no estudo do controle do câncer (MAMANE et al., 2007). Estudos moleculares recentes com genes de resistência recessiva a vírus de RNA têm revelado que plantas suscetíveis possuem mutações nos genes de eIF's, o que mostra a importância desse mecanismo para o estabelecimento da doença (PIRON et al., 2010). Em *Arabidopsis thaliana* existem 3 isoformas de eIF5A, cada uma codificada por diferentes genes e com diferentes perfis de expressão, sugerindo regulações distintas que podem justificar o fato encontrado nesse estudo. Em plantas superiores pouco se sabe sobre o papel da eIF5A além de iniciador da tradução, entretanto, um estudo realizado com o mutante *fbr12* de *Arabidopsis thaliana* indicou que esse fator é fundamental para o crescimento e desenvolvimento da planta através da regulação do ciclo celular. Esse mutante produz um fenótipo extremo de nanismo com tamanho número substancialmente reduzido de órgãos adultos e o gene *FBR12* codifica uma proteína funcional do tipo eIF5A (FENG et al., 2007). Nesse caso, a observação de redução de abundância para o fator eIF5A pode estar relacionado com a diminuição do ciclo celular e crescimento da planta e contribuir com o fenótipo do raquitismo.

Sinalização e regulação do metabolismo

Foram identificadas proteínas com maior abundância que incluem uma proteína similar à subunidade beta ($G\beta$) da proteína G de adesão à guanina, de uma ciclofilina, de uma proteína do tipo 14-3-3 e diminuição de uma calreticulina em função do aumento do título bacteriano. A proteína G heterotrimérica é composta pelas subunidades α , β e γ ($G\alpha\beta\gamma$) as quais são ativadas por receptores de membranas denominados GPCRs (*G protein-coupled receptors*) (OKAMOTO et al., 2009). O trabalho de Liu et al. (2007) identificou uma proteína G em *Arabidopsis* como um receptor de ABA. Segundo o modelo, o receptor GCR2 se liga ao

ABA resultando na dissociação da subunidade alfa ($G\alpha$) das subunidades $G\beta\gamma$, e essa dissociação é responsável pela ativação da via de sinalização mediada por ABA. Esse fato corrobora com a hipótese proposta por Monteiro-Vitorello et al. (2004), de que Lxx é capaz de produzir um análogo de ABA e por isso observou-se aumento de uma subunidade da proteína G. Em adição ao seu papel de sinalizador do ABA, mutantes de *Arabidopsis thaliana* para a subunidade $G\alpha$, codificada pelo gene *GPA1* exibem um fenótipo consistente com a diminuição do ciclo celular, demonstrando a importância dessa subunidade também como reguladora positiva do ciclo celular (ULLAH et al., 2001). Assmann (2005) também comenta que baixas quantidades de $G\alpha$ acarretam acúmulo de $G\beta\gamma$. Como $G\alpha$ é um regulador positivo do crescimento e existe uma relação de balanço entre essas subunidades, sugere-se que Lxx pode estar modulando negativamente a subunidade $G\alpha$ e por isso detectou-se aumento da subunidade $G\beta$ o que, conseqüentemente, levaria a diminuição na divisão celular. Ainda em *Arabidopsis thaliana*, a subunidade $G\beta$, codificada pelo gene *AGB1*, regula negativamente a sinalização mediada por ABA na germinação de sementes e crescimento pós-germinação (WANG; ZHANG, 2008).

Ciclofilinas pertencem a uma ubíqua família de proteínas que apresentam atividade peptidil-propil cis-trans isomerase e diversas funções, ainda pouco estudadas em plantas (WANG; HEITMAN, 2005). Na interação *Arabidopsis thaliana* e *Pseudomonas syringae* foi identificado que o efector AvrRpt2 é ativado dentro da célula por uma ciclofilina da planta. Uma vez que o efector foi ativado, ele exibe uma função protease capaz de clivar a RIN4, uma proteína que se liga com RPS2 e ativa a defesa da planta (COAKER; FALICK; STASKAWICZ, 2005). Como em nosso estudo detectou-se aumento da abundância de uma ciclofilina em plantas com crescimento elevado de Lxx, sugere-se que ela pode estar mediando a resposta do efector e inibindo o sistema de defesa da planta.

Proteínas do tipo 14-3-3 são proteínas que se ligam a motivos fosfoserina e regulam a atividade de uma ampla gama de alvos via interação proteína-proteína. Seus alvos incluem proteínas envolvidas na transdução de sinais, função da cromatina, transporte de íons e tráfico de vesículas, regulando o desenvolvimento da planta e respostas a estresse (ROBERTS, 2003). Em um trabalho realizado com tomate e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, foi demonstrado que a TFT7 (uma proteína 14-3-3) interage com MAP kinases e disparam o sistema de defesa da planta (OH et al., 2010), assim como, plantas de *Nicotiana benthamiana* com o gene *tft7* silenciado se mostraram comprometidas na resposta de defesa mediada por MAP quinases. O aumento de uma proteína 14-3-3 em resposta ao crescimento de Lxx pode

estar demonstrando a ativação de sistema de defesa da planta mediado por essa proteína, entretanto, o conjunto de outras proteínas que, relativamente comprometem a ativação da defesa podem contribuir para um panorama de geral do sintoma observado para o raquitismo.

Em nosso trabalho, uma proteína foi identificada como uma proteína similar à calreticulina 2 de milho, entretanto, análises de ortologia revelaram maior semelhança a uma calreticulina 1 de *Arabidopsis*. A calreticulina (CRT) é uma chaperona molecular altamente conservada encontrada no lúmen do retículo endoplasmático (RE) de organismos eucariotos e é um regulador positivo de respostas a estresses bióticos e abióticos (JIA et al., 2009). Estudos filogenéticos revelaram que plantas superiores possuem 2 grupos distintos de CRT's: CRT1/CRT2 (também designadas CRT1a/b) e CRT3. Um estudo com *Arabidopsis thaliana* demonstrou que a CRT3 é requerida para o acúmulo de ERF, um receptor padrão responsável pelo reconhecimento de PAMP's e desencadeador da resposta imune da planta. Mutantes nulos (*crt3*) são mais suscetíveis à *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (LI et al., 2009). Já a CRT1 de *Arabidopsis*, a qual complementa a função chaperona e capacidade de estocar Ca^{+2} apresenta uma função chave como aliviador do estresse no RE (CHRISTENSEN et al., 2008). Em adição a isto, existe uma comunicação cruzada entre a via de sinalização mediada por CRT's e sinalização hormonal mediada por ABA, uma vez que em batata, clones deficientes na produção de ABA também apresentaram reduzida expressão de CRT e reduzida capacidade de resposta a estresse salino (SHATERIAN et al., 2005). Devido a diversas funções atribuídas às CRT's, no contexto do raquitismo, parece plausível que a redução dessa proteína esteja ligada à inibição do sistema de defesa da planta. Em cana-de-açúcar, a expressão de uma proteína similar a uma CRT (CA129199) foi aumentada em plantas que receberam MeJA exógeno (ROCHA et al., 2007), o que corrobora com o fato da ligação entre vias de sinalização por ABA e MeJA (KAZAN e MANNERS, 2008).

O crescimento de Lxx e sua relação com a regulação do ciclo celular

A modulação de uma proteína diretamente envolvida com o ciclo celular, a ciclina H-1 foi detectada com menor abundância somente em plantas da variedade SP80-3280 com alto crescimento de Lxx. Ciclinas do tipo H são unidades reguladoras de CAK (*CDK-activating kinases*) que por sua vez interagem com o regulador central do ciclo celular, as CDK's (*cyclin-dependent kinases*). Em um estudo realizado com EST (*Expressed Sequence Tags*) de cana-de-açúcar, ciclinas do tipo H foram preferencialmente expressas em células dos tecidos de raiz, zona de transição raiz/folha, cartucho foliar, primeiro e segundo internódios e em plantas (sem desenvolvimento de folhas e raiz) com interação com

Gluconacetobacter diazotrophicus (ANDRIETTA MÍRIAN et al., 2001), dados coerentes com os encontrados em nosso trabalho, uma vez que foram utilizados tecidos de cartucho foliar. Em um sentido amplo, ciclinas de diversas classes são reguladoras positivas da progressão do ciclo celular (INZE; DE VEYLLDER, 2006), e a baixa abundância dessas proteínas é mais um indício de que um efetor produzido por Lxx pode estar interferindo negativamente no ciclo celular, o que é consistente com os sintomas observados para o raquitismo. A expressão ectópica de uma ciclina D em tricomas de *Arabidopsis* induziu tanto as fases de replicação do DNA quanto a de mitose (SCHNITTGER et al., 2002). Da mesma forma, a superexpressão da ciclina D3 de tabaco (NAKAGAMI et al., 2002) e da ciclina D1 em *Anthriscum majus* (boca-de-dragão) (KOROLEVA et al., 2004) em células em suspensão de tabaco (BY-2) também estimularam a progressão do ciclo celular. Ainda, foi demonstrado que o ABA também possui um papel na regulação do ciclo celular em embriões de café, mantendo as células em fase G1 e inibindo o crescimento do embrião (DA SILVA et al., 2008). Isso também pode estar relacionado à possível ação de um efetor produzido por Lxx que atua na regulação do ciclo celular via o hormônio ABA.

Interferência em processos de crescimento e desenvolvimento da planta

Em plantas da variedade SP80-3280 com alto crescimento de Lxx foram detectadas alterações em proteínas potencialmente relacionadas ao controle do crescimento da planta, sendo uma proteína controlada na tradução associada a tumor (TCTP- *translationally controlled tumor associated protein*) e uma proteína 2G4 associada à proliferação, ambas com maior abundância. Existem poucos relatos sobre a expressão de TCTP em plantas. Observou-se aumento de expressão de uma TCTP em raízes de arroz expostas a alumínio (ERMOLAYEV; WESCHKE; MANTEUFFEL, 2003) e no estudo da interação entre arroz e o elicitor CSB I de *Magnaporthe grisea* (LIAO; LI; WANG, 2009). Nesse último trabalho os autores sugerem que a TCTP pode desempenhar o mesmo papel já descrito para animais que é de atuar como uma proteína inibidora da morte celular programada, entre outros processos envolvidos no crescimento da planta. Em *Arabidopsis thaliana* foi identificado que o gene *AtTCTP* é essencial para o crescimento e desenvolvimento da planta bem como é um regulador da duração do ciclo celular. O estudo de duas linhagens distintas com *knockout* para o gene *AtTCTP* (*tctp-1* e *tctp-2*) demonstrou que plantas homozigotas para esses locus (*tctp*^{-/-}) são letais, ao passo que plantas heterozigotas e *RNAi-AtTCTP* apresentaram fenótipo anão e diminuição da divisão celular. Os autores sugerem que TCTP é um regulador positivo da mitose através do controle da duração do ciclo celular (BRIODES et al., 2010). O aumento

da abundância da TCTP pode estar associado a uma resposta da planta em função da interferência negativa das demais proteínas envolvidas no crescimento e controle do ciclo celular. A função da proteína 2G4 associada à proliferação tem sido bem descrita para humanos (PA2G4 - *proliferation-associated* 2G4), a qual regula negativamente o ciclo celular (MOTA et al., 2009). Um estudo realizado *Arabidopsis thaliana* identificou que o gene *AtCPR* (*Cell Proliferation Related*) codifica para uma proteína com alta homologia à p38-2G4 de rato, que por sua vez, possui alta identidade com a PA2G4 de humanos. A análise de expressão desse gene em células sincronizadas de *Arabidopsis thaliana* revelou que acúmulo do transcrito ocorre preferencialmente nas fases G1 e S, propondo a descoberta de um novo regulador do ciclo celular em *Arabidopsis* (ZHANG et al., 2005). Ainda, os mesmos autores avaliaram a expressão de genes relacionados ao *AtCPR* e identificaram a superexpressão do gene *EXO*, o qual atua posteriormente na regulação do ciclo celular e sabidamente é um regulador negativo desse processo. Portanto, eles sugeriram que, por o *AtCPR* ser modulado pelo *EXO*, também desempenha papel de regulador negativo do avanço do ciclo celular (ZHANG et al., 2005). O aumento da abundância da proteína 2G4 associado ao crescimento de Lxx na planta também pode estar envolvido, em conjunto com outras proteínas já descritas, na modulação negativa do ciclo celular de cana e contribuir para o fenótipo de raquitismo.

Visão geral do metabolismo em resposta ao crescimento de Lxx

A figura 3.13 sumariza os resultados do estudo e esquematiza as respostas de cana-de-açúcar às variações em títulos bacterianos. Observa-se que para a variedade RB835486 todas as proteínas diferencialmente expressas foram detectadas somente em plantas não inoculadas, onde a cinética do crescimento da bactéria foi o equivalente ao de uma situação de crescimento endofítico de Lxx (Figura 3.13a). De acordo com os dados de quantificação de Lxx (capítulo 2), esta variedade apresentou títulos semelhantes de Lxx aos 60 DAI tanto em plantas inoculadas como em não inoculadas (dias após a inoculação), entretanto, a dinâmica de colonização foi diferente entre os tratamentos, sendo observado o crescimento mais rápido para o tratamento inoculado com Lxx. Diante dessa observação, sugere-se que a resposta dessa variedade foi mais rápida para o tratamento inoculado com a bactéria e que, por isso, não foi possível detectar proteínas exclusivas no tratamento 60 vs 30 DAI.

Já na variedade SP80-3280, um maior número de proteínas foi detectado em plantas inoculadas, onde o crescimento foi maior do que em plantas não inoculadas (Figura 3.13b). O perfil de resposta foi praticamente o inverso do verificado na variedade RB, sendo que poucas proteínas foram diferencialmente expressas ao longo do tempo em plantas que apresentaram

baixa variação no título bacteriano (3X), comparado a plantas onde esta variação foi bem maior (25X). Nestas últimas, o número de proteínas que apresentaram alteração em abundância foi bem maior e abrangeu uma maior gama de processos metabólicos. Essa análise mais uma vez confirmou que a resposta para as duas variedades foi regulada diferencialmente e isso pode estar relacionado ao grau de tolerância de cada genótipo. Interessante ressaltar que em ambas as variedades, foi detectado um receptor de ABA (proteína G), o que sugere a participação desta via de sinalização hormonal.

Figura 3.13 – Visão geral dos processos metabólicos e proteínas diferencialmente expressas de cana-de-açúcar envolvidos na resposta à colonização por *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* para as variedades RB835486 (a) e SP80-3280 (b). Proteínas com maior abundância estão marcadas com ↑, enquanto proteínas com menor abundância estão marcadas com ↓. Valores quantitativos estão listados na tabela 3.4.

Uma consideração final diz respeito a qual seria o ganho de Lxx em modular negativamente o crescimento da planta, considerando que se trata de uma bactéria fastidiosa. No caso de Lxx, pode ser interessante manter um antagonismo balanceado com a planta e não

causar a sua morte, haja vista se tratar de um endófito obrigatório. O fato da planta tolerar seu crescimento endofítico não exclui a possibilidade de que fatores internos e externos contribuam para o alto crescimento de *Lxx in planta* e a mudança para um estilo de vida parasítico. Em adição a isto, mas em situações de estresse, *Lxx* provavelmente precisa atingir um alto número de indivíduos para então se perpetuar ao longo dos ciclos de propagação vegetativa da planta.

Desta forma, a estratégia de *Lxx* seria a mesma, porém em sentido oposto, ao de *Rhodococcus fascians*. Esta bactéria também gram-positiva pode estabelecer uma relação tanto epifítica como endoparasítica com seus hospedeiros. No estado parasítico desencadeia um desbalanço hormonal no hospedeiro aliado à produção de citocininas. Interessante, é que a planta parece controlar o crescimento de *R. fascians* e, por outro lado, a bactéria só expressa seus genes de virulência em condições apropriadas, as quais incluem um título mínimo de indivíduos. Com essa estratégia, *R. fascians* induz a formação de novos brotos a partir de meristemas dormentes e altera o metabolismo da planta para a maturação incompleta desse tecido, o que leva o hospedeiro a manter um nicho específico e vantajoso para o crescimento da bactéria (STES et al., 2011).

Outro ponto interessante é que, estudos recentes revelam que a distância entre organismos patogênicos e não-patogênicos têm se estreitado, visto que fungos micorrízicos podem produzir moléculas efetoras para manipular a resposta imune do hospedeiro (KLOPPHOLZ et al., 2011; PLETT et al., 2011) e que o hospedeiro pode controlar a especificidade da interação com espécies do gênero *Rhizobium* mediada por genes R (YANG et al., 2010) indicam que interações mutualísticas e parasíticas envolve princípios notoriamente similares (ZAMIOUDIS e PIETERSE, 2012).

Afinal, qual seria o ganho de *Lxx* em modular negativamente o crescimento da planta, considerando que se trata de uma bactéria fastidiosa? A bactéria fitopatogênica *Rhodococcus fascians* pode estabelecer uma relação epifítica ou endoparasítica com seus hospedeiros e no estado parasítico, desencadeia um desbalanço hormonal no hospedeiro aliado a produção de citocininas. Interessante, é que a planta parece controlar o crescimento de *R. fascians* e, por outro lado, a bactéria só expressa seus genes de virulência em condições apropriadas, as quais incluem um título mínimo de indivíduos. Com essa estratégia, *R. fascians* induz a formação de novos brotos a partir de meristemas dormentes e altera o metabolismo da planta para a maturação incompleta desse tecido o que leva o hospedeiro a manter um nicho específico e vantajoso para o crescimento da bactéria (STES et al., 2011). Nesse e em outros casos de interação planta-microrganismo, como as que envolvem espécies do fungo *Colletotrichum*, a

mudança no estilo de vida do microrganismo (simbiose mutualística → parasítica) é modulada por fatores do hospedeiro e do patógeno (REDMAN et al., 2001) e intrigantemente, fungos patogênicos e não-patogênicos podem ser isolados de plantas assintomáticas (SCHULZ et al., 1999). Em paralelo a essa questão, Lxx pode ser considerada uma endófito obrigatório, isolada de plantas assintomáticas, de crescimento fastidioso e que apresenta um genoma em decaimento. O fato de a planta tolerar seu crescimento endofítico não exclui a possibilidade de que fatores internos e externos contribuam para o alto crescimento de Lxx *in planta* e a mudança para um estilo de vida parasítico. No caso, de Lxx, pode ser interessante manter um antagonismo balanceado com a planta e não causar a sua morte, mas em situações de estresse, Lxx provavelmente precisa atingir um alto número de indivíduos para então se perpetuar ao longo dos ciclos de propagação vegetativa da planta. Outro ponto interessante é que, estudos recentes revelam que a distância entre organismos patogênicos e não-patogênicos têm se estreitado, visto que fungos micorrízicos podem produzir moléculas efetoras para manipular a resposta imune do hospedeiro (KLOPPHOLZ; KUHN; REQUENA, 2011; PLETT et al., 2011) e que o hospedeiro pode controlar a especificidade da interação com espécies do gênero *Rhizobium* mediada por genes R (YANG et al., 2010) indicam que interações mutualísticas e parasíticas envolvem princípios notoriamente similares (ZAMIOUDIS; PIETERSE, 2012).

3.3 Conclusões

O perfil protéico observado para as duas variedades foi diferente em resposta aos mesmos tratamentos, o que indica que a interação é genótipo específica.

As alterações protéicas observadas, principalmente para a variedade SP80-3280, com alto título de Lxx são consistentes com o principal sintoma da doença e explicam, em parte, o raquitismo.

A identificação de proteínas candidatas relacionadas à doença abre caminho para novas pesquisas em busca do melhor entendimento da interação cana – Lxx.

Referências

ALBAN, A.; DAVID, S. O.; BJORKESTEN, L.; ANDERSSON, C.; SLOGE, E.; LEWIS, S.; CURRIE, I. A novel experimental design for comparative two-dimensional gel analysis: Two-dimensional difference gel electrophoresis incorporating a pooled internal standard. **Proteomics**, Weinheim, v. 3, n. 1, p. 36-44, 2003.

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, San Diego, v. 215, p. 403–410, 1990.

ALVES, E.; MARUCCI, C. R.; LOPES, J. R. S.; LEITE, B. Leaf symptoms on plum, coffee and citrus and the relationship with the extent of xylem vessels colonized by *Xylella fastidiosa*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 152, n. 5, p. 291–297, 2004.

AMALRAJ, R.S.; SELVARAJ, N.; VELUSWAMY, G.K.; RAMANUJAN, R.P.; MUTHURAJAN, R.; PALANIYANDI, M.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R.; VISWANATHAN, R. Sugarcane proteomics: establishment of a protein extraction method for 2-de in stalk tissues and initiation of sugarcane proteome reference map. **Electrophoresis**, Malden, v. 31, n.12, p. 1959–1974, 2010.

ANDRIETTA MÍRIAN, H.; ELOY NÚBIA, B.; HEMERLY ADRIANA, S.; FERREIRA PAULO, C. G. Identification of sugarcane cDNAs encoding components of the cell cycle machinery. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.24, n.1-4, p.61-88, 2001.

ANEETA, N. S.; TUTEJA, N.; SOPORY, S.K. Salinity- and ABA-induced up-regulation and light-mediated modulation of mRNA encoding glycine-rich RNA-binding protein from *Sorghum bicolor*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 296, p.1063–1068, 2002.

BAILEY, R. A.; BECHET, O. R. The effect of ratoon stunting disease on the yield and of some South African sugarcane varieties under irrigated and rainfed conditions. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v. 69, p. 74–78, 1995.

BAILEY, R.A. The systemic distribution and relative occurrence of bacteria in sugarcane varieties affected by ratoon stunting disease. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v.51, p. 55–56, 1977.

BALL, L.; ACCOTTO, G.-P.; BECHTOLD, U.; CREISSEN, G.; FUNCK, D.; JIMENEZ, A.; KULAR, B.; LEYLAND, N.; MEJIA-CARRANZA, J.; REYNOLDS, H.; KARPINSKI, S.; MULLINEAUX, P. M. evidence for a direct link between glutathione biosynthesis and stress defense gene expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 9, p. 2448–2462, 2004.

BARIC, S.; BERGER, J.; CAINELLI, C.; KERSCHBAMER, C.; LETSCHKA, T.; DALLA VIA, J. Seasonal colonisation of apple trees by ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’ revealed by a new quantitative TaqMan real-time PCR approach. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 129, n. 3, p. 455–467, 2011.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, San Diego, v. 72, p. 248–254, 1976.

BRIOUDES, F.; THIERRY, A.-M.; CHAMBRIER, P.; MOLLEREAU, B.; BENDAHMANE, M. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 107, n. 37, p. 16384–16389, 2010.

- BRUMBLEY, S.; PETRASOVITS, L.; HERMANN, S.; YOUNG, A.; CROFT, B. Recent advances in the molecular biology of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal organism of ratoon stunting disease. **Australasian Plant Pathology**, Collingwood, v. 35, n. 6, p. 681-689, 2006.
- CANTÚ, M. D.; MARIANO, A. G.; et al. "Proteomic analysis reveals suppression of bark chitinases and proteinase inhibitors in citrus plants affected by the citrus sudden death disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v.98, n.10, p. 1084-1092, 2008.
- CASADO-VELA, J.; SELLÉS, S.; MARTÍNEZ, R. B. Proteomic analysis of tobacco mosaic virus-infected tomato (*Lycopersicon esculentum* M.) fruits and detection of viral coat protein. **Proteomics**, Malden, v. 6, p.196-206, 2006.
- CHINI, A.; FONSECA, S.; FERNANDEZ, G.; ADIE, B.; CHICO, J. M.; LORENZO, O.; GARCIA-CASADO, G.; LOPEZ-VIDRIERO, I.; LOZANO, F. M.; PONCE, M. R.; MICOL, J. L.; SOLANO, R. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. **Nature**, London, v. 448, n. 7154, p. 666-671, 2007.
- CHRISTENSEN, A.; SVENSSON, K.; PERSSON, S.; JUNG, J.; MICHALAK, M.; WIDELL, S.; SOMMARIN, M. Functional characterization of arabidopsis calreticulin1a: a key alleviator of endoplasmic reticulum stress. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 49, n.6, p. 912-924, 2008.
- CICEK, M.; ESEN, A. Structure and Expression of a Dhurrinase (β -Glucosidase) from *Sorghum*. **Plant Physiology**, Rockville, v. 116, n. 4, p. 1469-1478, 1998.
- CLARK, D.; DURNER, J.; NAVARRE, D. A.; KLESSIG, D. F. Nitric oxide inhibition of tobacco catalase and ascorbate peroxidase. **Molecular plant-microbe interactions : MPMI**, Saint Paul, v. 13, n. 12, p. 1380-4, 2000.
- COAKER, G.; FALICK, A.; STASKAWICZ, B. Activation of a phytopathogenic bacterial effector protein by a eukaryotic cyclophilin. **Science**, Washington, v. 308, n. 5721, p. 548-550, 2005.
- COMSTOCK, J. Ratoon stunting disease. **Sugar Tech**, New York, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2002.
- DA SILVA, E. A. A.; TOOROP, P. E.; VAN LAMMEREN, A. A. M.; HILHORST, H. W. M. ABA inhibits embryo cell expansion and early cell division events during coffee (*Coffea arabica* 'Rubi') seed germination. **Annals of Botany**, London, v. 102, n. 3, p. 425-433, 2008.
- DAVIS, M. J.; DEAN, J. L.; HARRISON, N. A. Quantitative variability of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* populations in sugarcane cultivars differing in resistance to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, v.78, p.462- 468, 1988.
- DE PINTO, M. C.; LAVERMICOCCA, P.; EVIDENTE, A.; CORSARO, M. M.; LAZZARONI, S.; DE GARA, L. exopolysaccharides produced by plant pathogenic bacteria affect ascorbate metabolism in *Nicotiana tabacum*. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 44, n. 8, p. 803-810, 2003.

DEBAST, S.; NUNES-NESI, A.; HAJIREZAEI, M. R.; HOFMANN, J.; SONNEWALD, U.; FERNIE, A. R.; BÖRNKE, F. Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. **Plant Physiology**, Rockville, v. 156, n. 4, p. 1754-1771, 2011.

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

DEYOUNG, B. J.; INNES, R. W. Plant NBS-LRR proteins in pathogen sensing and host defense. **Nature Immunology**, New York, v. 7, n. 12, p. 1243-1249, 2006.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, London, v. 411, n. 6839, p. 843-7, 2001.

ERMOLAYEV, V.; WESCHKE, W.; MANTEUFFEL, R. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 54, n. 393, p. 2745-2756, 2003.

EVELAND, A. L.; JACKSON, D.P. Sugars, signalling, and plant development. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, p.1-11, 2001.

FENG, H.; CHEN, Q.; FENG, J.; ZHANG, J.; YANG, X.; ZUO, J. functional characterization of the arabidopsis eukaryotic translation initiation factor 5A-2 that plays a crucial role in plant growth and development by regulating cell division, cell growth, and cell death. **Plant Physiology**, Rockville, v. 144, n. 3, p. 1531-1545, 2007.

FOREMAN, J.; DEMIDCHIK, V.; BOTHWELL, J. H. F.; MYLONA, P.; MIEDEMA, H.; TORRES, M. A.; LINSTAD, P.; COSTA, S.; BROWNLEE, C.; JONES, J. D. G.; DAVIES, J. M.; DOLAN, L. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. **Nature**, London, v. 422, n. 6930, p. 442-446, 2003.

FOYER, C. H.; NOCTOR, G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. **Plant, Cell & Environment**, Malden, v. 28, n. 8, p. 1056-1071, 2005.

FU, Z.Q; GUO, M.; JEONG, B.; TIAN, F.; ELTHON, T.E.; CERNY, R.L.; STAIGER, D.; ALFANO, J.R. A type III effector ADP-ribosylates RNA-binding proteins and quells plant immunity. **Nature**, London, v.447, p. 284-289, 2007.

GAO, S.; PAN, Y.; CHEN, R.; CHEN, P.; ZHANG, H.; XU, L. Quick detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* by PCR and nucleotide sequence analysis of PCR amplicons from Chinese *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* isolates. **Sugar Tech**, New York, v. 10, n. 4, p. 334-340, 2008.

GHELFI, A.; GAZIOLA, S.A.; CIA, M.C.; CHABREGAS, S.M.; FALCO, M.C.; KUSER-FALCÃO, P.R.; AZEVEDO, R.A. Cloning, expression, molecular modelling and docking analysis of glutathione transferase from *Saccharum officinarum*. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 159, p. 267-280, 2011.

GÓMEZ, L. D.; GILDAY, A.; FEIL, R.; LUNN, J. E.; GRAHAM, I. A. AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. **The Plant Journal**, Malden, v. 64, n.1, p. 1-13, 2010.

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**, Collingwood, v. 32, p. 481–494, 2005.

GRISHAM, M. P.; PAN, Y. B.; RICHARD, E. P. Early Detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane Leaves by Real-Time Polymerase Chain Reaction. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 91, n. 4, p. 430-434, 2007.

GROLL, M.; SCHELLENBERG, B.; BACHMANN, A. S.; ARCHER, C. R.; HUBER, R.; POWELL, T. K.; LINDOW, S.; KAISER, M.; DUDLER, R. A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. **Nature**, London, v. 452, n. 7188, p. 755-758, 2008.

GULLNER, G.; KÖMIVES, T. The role of glutathione and glutathione-related enzymes in plant-pathogen interactions. **Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment**. Springer. Netherlands, v.2, p. 207-239, 2002.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; UPADHYAYA, C. P.; NOOKARAJU, A.; PANDEY, S. K.; PARK, S. W. Plant disease resistance genes: Current status and future directions. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 78, n. 0, p. 51-65, 2012.

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

HARRISON, A., N.; DAVIS, J., M. Colonization of vascular tissues by *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* in stalks of sugarcane cultivars differing in susceptibility to ratoon stunting disease. **Phytopathology**, Saint Paul, p.6, 1988.

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

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

JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L.; BALDANI, J. I.; DÖBEREINER, J. *Herbaspirillum*, an endophytic diazotroph colonizing vascular tissue *Sorghum bicolor* L. Moench. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 48, n. 3, p. 785-798, 1997.

KAUFMANN, K.; SMACZNIAK, C.; DE VRIES, S.; ANGENENT, G. C.; KARLOVA, R. Proteomics insights into plant signaling and development. **Proteomics**, Weinheim, v. 11, n. 4, p. 744-755, 2011.

- KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Jasmonate signaling: toward an integrated view. **Plant Physiology**, Rockville, 146, v.4, p. 1459-1468, 2008.
- KIM, J. S.; JUNG, H. J.; LEE, H. J.; KIM, K. A.; GOH, C.-H.; WOO, Y.; OH, S. H.; HAN, Y. S.; KANG, H. Glycine-rich RNA-binding protein7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Malden, v. 55, n. 3, p. 455-466, 2008.
- KLOPPHOLZ, S.; KUHN, H.; REQUENA, N. A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. **Current biology**, Oxford, v. 21, n. 14, p. 1204-1209, 2011.
- KOŁODZIEJEK, I.; MISAS-VILLAMIL, J. C.; KASCHANI, F.; CLERC, J.; GU, C.; KRAHN, D.; NIESSEN, S.; VERDOES, M.; WILLEMS, L. I.; OVERKLEEF, H. S.; KAISER, M.; VAN DER HOORN, R. A. L. Proteasome activity imaging and profiling characterizes bacterial effector syringolin A. **Plant Physiology**, Rockville, v. 155, n. 1, p. 477-489, 2011.
- KOROLEVA, O. A.; TOMLINSON, M.; PARINYAPONG, P.; SAKVARELIDZE, L.; LEADER, D.; SHAW, P.; DOONAN, J. H. CycD1, a putative G1 cyclin from *Antirrhinum majus*, accelerates the cell cycle in cultured tobacco BY-2 cells by enhancing both G1/S entry and progression through S and G2 phases. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, n. 9, p. 2364-2379, 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural of proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LEE, I.; SEOB, Y.; COLTRANEB, D.; HWANGA, S.; OHA, T.; MARCOTTEC, E.M.; RONALDB, P.C. Genetic dissection of the biotic stress response using a genome-scale gene network for rice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 108, n. 45, p. 18548-18553, 2011.
- LI, J.; ZHAO-HUI, C.; BATOUX, M.; NEKRASOV, V.; ROUX, M.; CHINCHILLA, D.; ZIPFEL, C.; JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. Specific ER quality control components required for biogenesis of the plant innate immune receptor EFR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 37, p. 15973-15978, 2009.
- LIAO, M.; LI, Y.; WANG, Z. Identification of elicitor-responsive proteins in rice leaves by a proteomic approach. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 10, p. 2809-2819, 2009.
- MAGAREY, R. C.; SUMA, S.; IRAWAN; KUNIATA, L. S.; ALLSOPP, P. G. Sik na binatang bilang suka - diseases and pests encountered during a survey of *Saccharum* germplasm 'in the wild' in Papua New Guinea. **Proceedings of the Australian Society of Sugar Cane Technologists**, Brisbane, v. 24, p. 219-227, 2002.
- MAMANE, Y.; PETROULAKIS, E.; MARTINEAU, Y.; SATO, T.-A.; LARSSON, O.; RAJASEKHAR, V. K.; SONENBERG, N. epigenetic activation of a subset of mRNAs by eIF4E explains its effects on cell proliferation. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 2, n. 2, p. e242, 2007.

MARKOVIĆ-HOUSLEY, Z.; DEGANI, M.; LAMBA, D.; VON ROEPENACK-LAHAYE, E.; CLEMENS, E.; SUSANI, M.; FERREIRA, F.; SCHEINER, O.; BREITENEDER, H. Crystal structure of a hypoallergenic isoform of the major birch pollen allergen bet v 1 and its likely biological function as a plant steroid carrier. **Journal of Molecular Biology**, London, v.325, n. 1, p. 123-133, 2003.

MATHEWS, M.B; SONENBERG, N.; HERSHEY, J.W.B. Origins and principles of translational control. **Translational Control in Biology and Medicine**. Cold Spring Harbor, p. 1-10, 2007.

MCFARLANE, S.A. The relationship between extent of colonisation by *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* and yield loss in different sugarcane varieties. **Proceedings of the South African Sugar Technologists Association**, Durban, v.76, p. 281-284, 2002.

MELLO; S., A. F.; YOKOMI; K., R.; MELCHER; ULRICH; CHEN; C., J.; FLETCHER; JACQUELINE. Citrus stubborn severity is associated with *Spiroplasma citri* titer but not with bacterial genotype. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 94, p 75-82, 2009.

MELOTTO, M.; UNDERWOOD, W.; KOCZAN, J.; NOMURA, K.; HE, S. Y. Plant stomata function in innate immunity against bacterial invasion. **Cell**, Cambridge, v. 126, n. 5, p. 969-980, 2006.

MICHÉ, L.; BATTISTONI, F.; GEMMER, S.; BELGHAZI, M.; REINHOLD-HUREK, B. Upregulation of jasmonate-inducible defense proteins and differential colonization of roots of *Oryza sativa* cultivars with the endophyte *Azoarcus* sp. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 5, p. 502-511, 2006.

MØLLER, B. L. Functional diversifications of cyanogenic glucosides. **Current opinion in plant biology**. London, v, 13, n. 3, p. 337-346, 2010.

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

MOTA, S.; MENDES, M.; FREITAS, N.; PENQUE, D.; COELHO, A. V.; CUNHA, C. Proteome analysis of a human liver carcinoma cell line stably expressing hepatitis delta virus ribonucleoproteins. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 4, p. 616-27, 2009.

MUKHERJEE, A. K.; CARP, M.-J.; ZUCHMAN, R.; ZIV, T.; HORWITZ, B. A.; GEPSTEIN, S. Proteomics of the response of *Arabidopsis thaliana* to infection with *Alternaria brassicicola*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 709-720, 2010.

- MUÑOZ, C.; HOFFMANN, T.; ESCOBAR, N. M.; LUDEMANN, F.; BOTELLA, M. A.; VALPUESTA, V.; SCHWAB, W. The strawberry fruit fra a allergen functions in flavonoid biosynthesis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 113-124, 2010.
- NAKAGAMI, H.; KAWAMURA, K.; SUGISAKA, K.; SEKINE, M.; SHINMYO, A. Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/Cyclin-Dependent Kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. **The Plant Cell**, Rockville, v. 14, n. 8, p. 1847-1857, 2002.
- NIELSEN, K.; HRMOVA, M.; NIELSEN, J.; FORSLUND, K.; EBERT, S.; OLSEN, C.; FINCHER, G.; MØLLER, B. Reconstitution of cyanogenesis in barley (*Hordeum vulgare* L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus. **Planta**, Berlin, v. 223, n. 5, p. 1010-1023, 2006.
- NOMURA, K.; MELOTTO, M.; HE, S. Y. Suppression of host defense in compatible plant-*Pseudomonas syringae* interactions. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 8, n. 4, p. 361-8, 2005.
- OH, C. S.; PEDLEY, K. F.; MARTIN, G. B. Tomato 14-3-3 protein 7 positively regulates immunity-associated programmed cell death by enhancing protein abundance and signaling ability of MAPKKK {alpha}. **Plant Cell**, Rockville, v. 22, n. 1, p. 260-72, 2010.
- OKAMOTO, H.; GÖBEL, C.; CAPPER, R. G.; SAUNDERS, N.; FEUSSNER, I.; KNIGHT, M. R. The α -subunit of the heterotrimeric G-protein affects jasmonate responses in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 60, n. 7, p. 1991-2003, 2009.
- PAN, Y. B.; GRISHAM, M. P.; BURNER, D. M. A polymerase chain reaction protocol for the detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease. **Plant Disease**, Saint Paul v. 82, n.3, p. 285-290, 1998.
- PIROFSKI, L.-A.; CASADEVALL, A. Q&A: What is a pathogen? A question that begs the point. **BMC Biology**, London, v. 10, n. 1, p. 6, 2012.
- PIRON, F.; NICOLAÏ, M.; MINOÏA, S.; PIEDNOIR, E.; MORETTI, A.; SALGUES, A.; ZAMIR, D.; CARANTA, C.; BENDAHDANE, A. An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. e11313, 2010.
- PLETT, JONATHAN M.; KEMPPAINEN, M.; KALE, SHIV D.; KOHLER, A.; LEGUÉ, V.; BRUN, A.; TYLER, BRETT M.; PARDO, ALEJANDRO G.; MARTIN, F. A secreted effector protein of *Laccaria bicolor* is required for symbiosis development. **Current biology**, Oxford, v. 21, p. 1197-1203, 2011.
- POLPITIYA, A.D.; QIAN, W.J.; JAITLY, N.; PETYUK, V.A.; ADKINS, J.N.; et al. DANTE: a statistical tool for quantitative analysis of omics data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 24, p. 1556–1558, 2008.

PRASAD, S; DHANYA, M.S. Determination and detoxification of cyanide content in sorghum for ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* strain. **Journal of Metabolomics and Systems Biology**. Victoria Island, v. 2, n. 1, p.10-14, 2011.

RADAUER, C.; LACKNER, P.; BREITENEDER, H. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 8, n. 1, p. 286, 2008.

RAMAMOORTHY, V.; RAGUCHANDER, T.; SAMIYAPPAN, R. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 239, n. 1, p. 55-68, 2002.

REDMAN, R. S.; DUNIGAN, D. D.; RODRIGUEZ, R. J. Fungal symbiosis from mutualism to parasitism: who controls the outcome, host or invader? **New Phytologist**, Malden, v. 151, n. 3, p. 705-716, 2001.

REP, M.; DEKKER, H. L.; VOSSEN, J. H.; DE BOER, A. D.; HOUTERMAN, P. M.; SPEIJER, D.; BACK, J. W.; DE KOSTER, C. G.; CORNELISSEN, B. J. C. mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. **Plant Physiology**, Rockville, v. 130, n. 2, p. 904-917, 2002.

RIZHSKY, L.; HALLAK-HERR, E.; VAN BREUSEGEM, F.; RACHMILEVITCH, S.; BARR, J.E.; RODERMEL, S.; INZÉ, D.; MITTLER, R. Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. **The Plant Journal**, Malden, v. 32, p. 329–342, 2002.

ROBERTS, M. R. 14-3-3 Proteins find new partners in plant cell signalling. **Trends in Plant Science**, London, v. 8, n. 5, p. 218-223, 2003.

ROCHA, F.; PAPINI-TERZI, F.; NISHIYAMA, M.; VENCIO, R.; VICENTINI, R.; DUARTE, R.; DE ROSA, V.; VINAGRE, F.; BARSALOBRES, C.; MEDEIROS, A.; RODRIGUES, F.; ULIAN, E.; ZINGARETTI, S.; GALBIATTI, J.; ALMEIDA, R.; FIGUEIRA, A.; HEMERLY, A.; SILVA-FILHO, M.; MENOSSI, M.; SOUZA, G. Signal transduction-related responses to phytohormones and environmental challenges in sugarcane. **BMC Genomics**, London, v. 8, n. 1, p. 71, 2007.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. bacterial endophytes and their interactions with hosts. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 19, n. 8, p. 827-837, 2006.

SACHETTO-MARTINS, G.; FRANCO, L.O.; DE OLIVEIRA, D.E. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1492, n.1, p.1 -14, 2000.

SANTNER, A.; ESTELLE, M. The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. **The Plant Journal**, Malden, v. 61, n. 6, p. 1029-1040, 2010.

- SCHNITTGER, A.; SCHÖBINGER, U.; BOUYER, D.; WEINL, C.; STIERHOF, Y.-D.; HÜLSKAMP, M. Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Oxford, v. 99, n. 9, p. 6410-6415, 2002.
- SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycological Research**, Cambridge, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.
- SCHULZ, B.; RÖMMERT, A.-K.; DAMMANN, U.; AUST, H.-J.; STRACK, D. The endophyte-host interaction: a balanced antagonism? **Mycological Research**, Oxford, v. 103, n. 10, p. 1275-1283, 1999.
- SHADLE, G. L.; WESLEY, S. V.; KORTH, K. L.; CHEN, F.; LAMB, C.; DIXON, R. A. Phenylpropanoid compounds and disease resistance in transgenic tobacco with altered expression of l-phenylalanine ammonia-lyase. **Phytochemistry**, Oxford, v. 64, n. 1, p. 153-161, 2003.
- SHATERIAN, J.; GEORGES, F.; HUSSAIN, A.; WATERER, D.; DE JONG, H.; TANINO, K. K. Root to shoot communication and abscisic acid in calreticulin (CR) gene expression and salt-stress tolerance in grafted diploid potato clones. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 53, n. 3, p. 323-332, 2005.
- SHI, L.; SUTTER, B. M.; YE, X.; TU, B. P. Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v. 21, n. 12, p. 1982-1990, 2010.
- STES, E.; VANDEPUTTE, O. M.; EL JAZIRI, M.; HOLSTERS, M.; VEREECKE, D. A successful bacterial coup d'etat: how *Rhodococcus fascians* redirects plant development. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 49, p. 69-86, 2011.
- STREITNER, C.; DANISMAN, S.; WEHRLE, F.; SCHÖNING, J. C.; ALFANO, J. R.; STAIGER, D. The small glycine-rich RNA binding protein AtGRP7 promotes floral transition in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal**, Malden, v. 56, n. 2, p. 239-250, 2008.
- SZKLARCZYK, D.; FRANCESCHINI, A.; KUHN, M.; SIMONOVIC, M.; ROTH, A.; MINGUEZ, P.; DOERKS, T.; STARK, M.; MULLER, J.; BORK, P.; JENSEN, L. J.; MERING, C. V. The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 39, n. 1, p. 561-568, 2011.
- TEAKLE, D.S.; RYAN, C.C. The effect of right temperature on the sugarcane ratoon stunting disease bacterium, *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, *in vitro* e *in vivo*. **Sugar Cane**, Saint Paul, n. 6, p.5-7, 1992.
- THIMM, O.; BLÄSING, O.; GIBON, Y.; NAGEL, A.; MEYER, S.; KRÜGER, P.; SELBIG, J.; MÜLLER, L. A.; RHEE, S. Y.; STITT, M. mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. **The Plant Journal**, Malden, v. 37, n. 6, p. 914-939, 2004.

THINES, B.; KATSIR, L.; MELOTTO, M.; NIU, Y.; MANDAOKAR, A.; LIU, G.; NOMURA, K.; HE, S. Y.; HOWE, G. A.; BROWSE, J. JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. **Nature**, London, v. 448, n. 7154, p. 661-665, 2007.

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

ULLAH, H.; CHEN, J.-G.; YOUNG, J. C.; IM, K.-H.; SUSSMAN, M. R.; JONES, A. M. modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. **Science**, Washington, v. 292, n. 5524, p. 2066-2069, 2001.

VANDESTEENE, L.; RAMON, M.; LE ROY, K.; VAN DIJCK, P.; ROLLAND, F. a single active trehalose-6-P synthase (TPS) and a family of putative regulatory TPS-like proteins in Arabidopsis. **Molecular Plant**, Oxford, v. 3, n. 2, p. 406-419, 2010.

VETTORE A.L.; DA SILVA, F. R; KEMPER, E.L.; SOUZA, G.M.; DA SILVA, A.M.; et al. Analysis and functional annotation of an expressed sequence tag collection for tropical crop sugarcane. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, New York, v. 13, p. 2725-2735, 2003.

VIERSTRA, R.D. The ubiquitin-26s proteasome system at the nexus of plant biology. **Nature Reviews**, London, v. 10, p. 385-397, 2009.

WANG, P.; HEITMAN, J. The cyclophilins. **Genome Biology**, London, v. 6, n. 7, p. 1-6, 2005.

WANG, X.-F.; ZHANG, D.-P. Absciscic acid receptors: multiple signal-perception sites. **Annals of Botany**, London, v. 101, n. 3, p. 311-317, 2008.

WANG, Z.; WANG, Z.; CHEN, S.; SHI, L.; XU, F. Proteomics reveals the adaptability mechanism of *Brassica napus* to short-term boron deprivation. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 347, n. 1, p. 195-210, 2011.

WOLOSHEN, V.; HUANG, S; LI, X. RNA-Binding Proteins in Plant Immunity. **Journal of Pathogens**, New York, v. 2011, p. 1-11, 2011.

YANG, S.; TANG, F.; GAO, M.; KRISHNAN, H. B.; ZHU, H. R gene-controlled host specificity in the legume-rhizobia symbiosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.107, n.43, p.18735-18740, 2010.

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

ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C. M. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular Plant Microbe Interactions**, Saint Paul, v. 25, n. 2, p. 139-50, 2012.

ZHANG, W.-K.; SHEN, Y.-G.; HE, X.-J.; DU, B.-X.; XIE, Z.-M.; LUO, G.-Z.; ZHANG, J.-S.; CHEN, S.-Y. Characterization of a novel cell cycle-related gene from Arabidopsis. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 56, n. 413, p. 807-816, 2005.

4 RESPOSTA ANTIOXIDANTE DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RESPOSTA À COLONIZAÇÃO POR *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

Resumo

A cana-de-açúcar, assim como a grande diversidade de culturas de interesse agrônômico, é hospedeira de uma série de patógenos que podem limitar sua produção, entre os quais destaca-se a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx), agente causal do raquitismo-das-soqueiras (RSD). A defesa de plantas contra patógenos é um mecanismo complexo que envolve a ativação de diferentes vias, as quais incluem a explosão oxidativa, caracterizada pela alta produção de espécies reativas de oxigênio (ERO's) e como primeira linha de defesa das plantas ao estresse. As ERO's podem atuar diretamente sobre o patógeno e causar danos às macromoléculas celulares. Por outro lado, podem desempenhar um papel sinalizador servindo como mensageiras secundárias e ativar o sistema de defesa da planta. Em combate à alta produção de ERO's, as plantas desenvolveram mecanismos capazes de manter o estado redox celular, os quais incluem componentes enzimáticos e não-enzimáticos. Este trabalho apresenta o estudo da interação entre cana-de-açúcar e Lxx buscando uma melhor compreensão da evolução do processo de interação do ponto de vista bioquímico, enfatizando o aspecto do sistema antioxidante nesta relação. Para isso, ensaios enzimáticos em espectrofotômetro e em PAGE foram realizados, bem como a quantificação de compostos não enzimáticos. Os resultados alcançados no presente trabalho indicam uma resposta diferencial entre as variedades de cana-de-açúcar RB835486 e SP80-3280, principalmente quando analisadas em conjunto com o crescimento da bactéria Lxx. Foi possível observar que a variedade RB835486 mostrou maior controle do crescimento bacteriano, uma vez que a resposta ao estresse oxidativo iniciou-se precocemente (aos 30 dias após inoculação artificial – 30 DAI), o que pode estar relacionado ao balanço de ERO's utilizada pelo metabolismo como sinalizador celular na interação planta-patógeno. Já a variedade SP80-3280, apresentou indução da atividade de enzimas antioxidantes em sua maioria aos 60 DAI, o que pode indicar a tentativa de combate ao crescimento bacteriano, pois neste período, a bactéria Lxx apresentou os maiores títulos de crescimento.

Palavras-chave: Estresse oxidativo; Bactéria fitopatogênica; Sistema antioxidante

4 ANTIOXIDANT RESPONSE OF SUGARCANE IN RESPONSE TO *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* COLONIZATION

Abstract

Like many other agronomic cultures of interest, sugarcane hosts a number of pathogens that may limit its production, among which bacteria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) stands out, the causal agent of ratoon stunting disease (RSD). The plant defense against pathogens is a complex mechanism that involves activation of different pathways, including the oxidative burst, characterized by high production of reactive oxygen species (ROS) and as a first line of plant defense to stress. ROS can act directly on the pathogen and cause damage to cellular macromolecules. On the other hand, it can also play a signaling role serving as secondary messengers and activate the plant defense system. To combat ROS high production, plants have developed mechanisms to maintain the cellular redox state, which includes enzymatic and non-enzymatic compounds. This paper presents the study of the interaction between sugarcane and Lxx in order to better understand the evolution of the interaction process from the biochemical point of view, emphasizing the antioxidant system in this relationship. For this purpose, spectrophotometric and PAGE assays and the quantification of non-enzymatic compound were carried out. The results obtained indicate a differential response among the varieties RB835486 and SP80-3280 of sugarcane, especially when analyzed in combination with the Lxx growth data. It was observed that RB835486 variety showed greater control of bacterial growth, since the oxidative stress response was initiated early (30 days after artificial inoculation - 30 DAI), which may be related to the balance of ERO's utilized by the cell metabolism as a marker in plant-pathogen interaction. In contrast, SP80-3280 variety showed late induction of antioxidant enzymes (60 DAI), which may indicate an attempt to combat bacterial growth, since in this time, Lxx showed the highest growth titers.

Keywords: Oxidative stress; Phytopathogenic bacteria; Antioxidant system

4.1 Introdução

A caracterização de espécies reativas de oxigênio (ERO's) como moléculas transdutoras de sinais aumentou as evidências de que estas moléculas estão presentes na célula não somente como produtos de reação do metabolismo redox, mas por representarem uma oportunidade para células e organismos aumentarem suas relações com o ambiente, assim como nas interações planta-microrganismo (QUAN et al., 2008; HANCOCK et al., 2001). Em plantas, as ERO's são caracterizadas como moléculas de vida curta produzidas em diferentes compartimentos celulares em resposta à estímulos bióticos e abióticos. Essas moléculas também podem atuar como mensageiras secundárias na sinalização por hormônios, desenvolvimento, morte celular programada (PCD) e em resposta à interação planta-patógenos (CHO et al., 2009).

As ERO's incluem os radicais peróxido de hidrogênio (H_2O_2), superóxido (O_2^-), oxigênio *singlet* ($O_2^{\cdot}$) e radical superóxido ($OH^{\cdot}$) e especificamente, durante a interação com microrganismos, a produção dessas moléculas é percebida por um sistema que as reconhece como moléculas sinais produzidas por potenciais patógenos e desencadeiam uma resposta bioquímica apropriada, caracterizando um fenômeno denominado de explosão oxidativa (MENDOZA, 2011). A especificidade da resposta depende da identidade química das ERO's, da intensidade do sinal gerado (efeito dose), dos sítios de produção, do estágio de desenvolvimento da planta, histórico de estresses anteriores e das interações com outras moléculas sinalizadoras, como os hormônios, o óxido nítrico e alguns mensageiros lipídicos (GECHEV et al., 2006).

Por outro lado, em altas concentrações, as ERO's podem causar danos às macromoléculas celulares, como DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Para combater os danos causados pelas ERO's, as plantas desenvolveram mecanismos capazes de manter a homeostase celular, os quais são divididos em não-enzimáticos e enzimáticos. As defesas não-enzimáticas incluem compostos com intrínseca propriedade antioxidante, como o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), glutatona reduzida (GSH), ácido ascórbico (SCANDALIOS, 2005), NADPH e NADH, as quais são moléculas que ajudam a manter o ambiente redutor (GRATÃO et al., 2005). Já os mecanismos enzimáticos envolvem a Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), peroxidases, Glutathione Redutase (GR), Glutathione S-Transferase (GST), dentre outras (SCANDALIOS, 2005).

De uma maneira geral, na interação planta-bactéria, os autores Mahalingam e Fedoroff (2003) apresentam a resposta da planta à infecção de microrganismos como 'assinatura ERO's', caracterizando-a não apenas como uma simples resposta unitária. As ERO's são

produzidas durante o contato inicial entre o patógeno e a célula vegetal, mas podem também ser produzidas e apresentar um papel sutil nos estádios posteriores da patogênese. Durante a interação planta-patógeno a produção de ERO's acontece em três fases: na fase I ocorre o reconhecimento dos elicitores provenientes do patógeno, que podem ser carboidratos, proteínas ou porções de glicoproteínas. Esse reconhecimento dispara os eventos de transdução de sinais. Durante a fase II são iniciados vários processos relacionados à defesa, mas não identificados por sintomas visíveis. Os processos ou vias metabólicas dessa fase são resultantes do reconhecimento durante a fase I, e nesses processos de defesa incluem-se aumento de antioxidantes, ação de lipoxigenases, a HR, produção de fitoalexinas, lignificação e resistência sistêmica adquirida (SAR). A fase III compreende o processo de evolução da patogênese levando ao desenvolvimento de sintomas visíveis. A diferenciação da patogênese em três fases distintas é apenas um artifício para compreensão de como ocorrem tais processos (TORRES; DANGL, 2005; RESENDE et al, 2003).

A defesa da planta à patógenos é normalmente complexa e o sucesso dessa resposta é devido a ação de vários mecanismos, sendo a explosão oxidativa um ponto crucial na sinalização desse processo. De acordo com o abordado nos capítulos anteriores, Lxx é considerada um endófito obrigatório, que pode estar presente em baixo ou alto título nos tecidos da planta, crescimento endofítico e parasítico, respectivamente. Torres (2010) propõe que existem muitas similaridades na resposta da planta à infecção por patógenos e organismos simbioses e, portanto, o estudo do sistema antioxidante de cana-de-açúcar avaliado durante o crescimento de Lxx *in planta* pode ser avaliado nesse contexto.

Nesse sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o papel do sistema antioxidante na interação entre cana-de-açúcar e Lxx por meio da análise da atividade de enzimas e compostos pertencentes à esse sistema. A obtenção desses dados visa um panorama geral da resposta do sistema antioxidante de cana-de-açúcar em função da colonização de Lxx em seus tecidos, de forma que contribuirão de forma significativa para a melhor compreensão desse patossistema, visto que não existem dados na literatura relacionados à esses tópicos.

4.2 Desenvolvimento

4.2.1 Materiais e Métodos

4.2.1.1. Material vegetal, cultivo de Lxx, desenho experimental e inoculação das plantas

Material vegetal: foram utilizadas as variedades RB835486 e SP80-3280. Tratam-se das mesmas variedades utilizadas para o desenvolvimento do segundo e terceiro capítulos e suas características estão descritas no item 2.2.1.3.

Cultivo de Lxx: utilizou-se a bactéria *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (Lxx) estirpe CTCB07. As condições de cultivo de Lxx já foram descritas no segundo capítulo no item 2.2.1.2.

Desenho experimental e inoculação das plantas: este estudo valeu-se dos mesmos tratamentos do experimento conduzido para o desenvolvimento do segundo capítulo, cujos detalhes experimentais estão descritos no item 2.2.1.3. Entretanto, tanto para a análise de proteínas diferencialmente expressas quanto para o estudo da resposta antioxidante foram escolhidos apenas os tempos de 30 e 60 dias após a inoculação. Desta forma, as análises realizadas nesse trabalho compreenderamos 8 tratamentos já descritos da tabela 1 e figura 1 do terceiro capítulo (item 3.2.1.1): 2 variedades x 2 condições de inoculação (inoculada com o meio de cultura ou com Lxx) x 2 tempos (30 e 60 dias após a inoculação). Portanto, os códigos utilizados nesse capítulo são os mesmos já descritos no capítulo anterior. Os tratamentos foram repetidos três vezes (réplicas biológicas), sendo que cada repetição foi constituída de um vaso com três plantas. Os vasos foram dispostos em um delineamento de blocos ao acaso.

4.2.1.2 Extração e quantificação de proteínas do cartucho foliar de cana-de-açúcar

As proteínas foram extraídas de 0,5g de tecido macerado em um almofariz com nitrogênio líquido. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,5, (proporção de 0,5g amostra: 2 mL tampão), contendo 1 mM EDTA (ácido etileno diamino tetracético), 3 mM DTT (ditiotretol) e 4% (p/v) PVPP (polivinilpolipirrolidona)] de acordo com Gomes-Junior et al. (2007). O homogeneizado foi centrifugado à 10.000 rpm por 30 min à 4°C e o sobrenadante, aliquoteado e estocado em freezer -80°C até o momento das análises. A concentração das proteínas totais foi determinada

segundo o método de Bradford (1976), utilizando-se o BSA (“bovine serum albumin”) como padrão, e o resultado expresso em mg proteína/ml extrato protéico.

4.2.1.3 Quantificação de compostos associados à resposta antioxidante

Foram quantificados os compostos: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), malondialdeído (MDA), glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG).

Quantificação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2): o H_2O_2 é considerado a principal ERO responsável por desencadear a reação da peroxidação lipídica e respostas celulares específicas, e foi quantificado segundo protocolo de Alexieva et al. (2001). As amostras frescas foram maceradas com TCA 0,1% na relação de 1 g/10 mL (w:v). Após a completa homogeneização, foram transferidas para tubos e centrifugados a 10.000 rpm por 15 min, a 4°C. Do sobrenadante, foi retirado 200 μ L ao qual foi adicionado 200 μ L de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 800 μ L de solução 1 M de iodeto de potássio. Os tubos foram colocados em gelo e permaneceram no escuro durante uma hora. Após este período, as amostras permaneceram no escuro por 20 min, porém em temperatura ambiente para estabilização da reação, e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40 a 390 nm. A quantidade de H_2O_2 foi expressa em μ mol g de tecido fresco⁻¹.

Quantificação de MDA, produto resultante da peroxidação lipídica: a peroxidação lipídica é um processo através do qual as espécies reativas de oxigênio, principalmente o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), reagem com os ácidos graxos insaturados da membrana celular, causando danos e liberando produtos tóxicos como aldeídos. Este processo foi determinado através da produção de malondialdeído (MDA), um metabólito reativo a ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), adaptado de Heath e Packer (1968). Amostras biológicas foram maceradas em TCA 0,1% na proporção de 0,2 g/2mL de tampão, juntamente com 20% de PVPP. Após completa homogeneização, a amostra foi centrifugada a 10.000 rpm por 5 min. Do sobrenadante, foi retirado 0,25 mL e transferido para outro tubo juntamente com 1,0 mL de solução contendo TCA 20% e TBA 0,5%. A mistura foi colocada em banho-seco por 30 min a 95°C, e na sequência, resfriada em gelo. As amostras foram novamente centrifugadas por mais 10 min a 10.000 rpm, e, em seguida, foi realizada leitura em espectrofotômetro à 535 e 600 nm. A quantidade de MDA foi expressa em μ mol/g de tecido fresco.

Quantificação de glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSG): a quantificação de GSH e oxidada GSSG foi determinada segundo Israr et al. (2006) com modificações. O tecido vegetal (200 mg) foi macerado em 1,9 mL de ácido sulfosalicílico 0,1%. Após a completa homogeneização, a mistura foi transferida para tubos e centrifugados a 9700 g por 20 min, a 4°C. Do sobrenadante, foram retirados 250 µL aos quais foram adicionados 1,75 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,0), contendo EDTA 0,5 mM (ácido etilenodiamino) e 100 µL de DTNB 3 mM (5,5' dithio-bis- [ácido 2-nitrobenzóico]) e mantido em repouso no escuro por 5 minutos. Para a determinação da GSH, a reação foi lida a 412 nm, em espectrofotômetro (Lambda 40, Perkin Elmer). Após a leitura, na mesma reação foi adicionado 100 µL de NADPH 0,4 mM e 2 µL de glutathiona redutase (GR) e mantido no escuro por mais 20 minutos. Para determinação da glutathiona total, a leitura foi a 412 nm. A quantidade de GSSG foi calculada pela diferença entre os valores da glutathiona total e GSH. O branco consistiu nas mesmas misturas descritas acima, porém, ao invés do sobrenadante da amostra, colocou-se 250 µL de ácido sulfosalicílico 0,1%. A quantidade de GSH/GSSG foi expressa em nmol g⁻¹ de massa fresca.

4.2.1.4 Atividade das enzimas antioxidantes

Foi avaliada a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona redutase (GR) em géis não desnaturantes (PAGE) e a atividade de SOD, CAT, GR, glutathiona-s-transferase (GST), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona peroxidase (GSH-Px), guaicol peroxidase (GPOX) e polifenol oxidase (PPO) em espectrofotômetro.

4.2.1.4.1 Enzimas antioxidantes avaliadas em PAGE

Atividade de SOD: o extrato protéico foi separado em gel de eletroforese (12% de acrilamida). Foi utilizado o sistema Mini Protean II (Bio-Rad). O gel possui espessura de 1,5 mm, altura de 6,5 cm e largura 7,3 cm. Para a confecção de um mini gel foi utilizado 3,0 mL de uma solução 40% de acrilamida (Sigma), 2,5 mL de tampão TRIS 3 M (hidroximetil)-aminometano (pH 8,9) e 4,5 mL de água destilada. Como catalisadores foram utilizados 19 µL de TEMED e 25 µL de persulfato de amônio (1%). Após a polimerização desse gel de resolução (cerca de 30 min.), foi aplicado o gel de empacotamento segundo o protocolo: 500 µL de acrilamida, 1,25 mL tampão TRIS 500 mM, pH 6,7 e 2,75 mL de água. Para a polimerização foram utilizados 10 µL de TEMED e 50 µL de persulfato de amônio (1%). A eletroforese foi realizada a 4°C em corrente constante de 15 mA/placa. O tampão de eletrodo

foi TRIS 25 mM, pH 8,3 acrescido de 192 mM de glicina - 5X concentrado, sendo diluído para 1X e reutilizado até 3 vezes. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de SOD de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 20 µg de proteína total de cartucho foliar de cana-de-açúcar. A atividade foi determinada de acordo com Gomes-Junior et al. (2006). Os géis foram lavados rapidamente em água deionizada e incubados no escuro a temperatura ambiente em uma mistura de reação contendo 50 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,8, 1 mM EDTA, 0,05 mM riboflavina, 0,1 mM nitroblue tetrazolium (NBT) e 0,3% TEMED. Ao final de 30 min, a mistura de reação foi removida, os géis enxaguados com água deionizada e colocados sob iluminação por alguns minutos até o desenvolvimento de bandas brancas sob fundo roxo. Nestas condições ocorre a fotoxidação do gel, propiciando a formação de uma coloração púrpura e as bandas correspondentes à atividade de SOD permanecem sem se fotoxidar, promovendo uma revelação negativa. A fotoxidação foi interrompida mergulhando-se o gel em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

Determinação das isoformas de SOD: realizou-se uma eletroforese (PAGE) com 100 µg de proteína para cada amostra que apresentou perfil diferencial de isoformas para a atividade de SOD. A atividade foi determinada nas mesmas condições descritas anteriormente para SOD. Ao final da eletroforese, o gel foi dividido verticalmente em três partes. A primeira parte foi mantida a 4°C em tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,8. A segunda foi imersa em 100 mL do mesmo tampão contendo 2 mM de KCN e 0,0292 g de EDTA. A terceira, imersa em 100 mL do referido tampão contendo 5 mM de H₂O₂ e 0,0292 g de EDTA. Todos os passos descritos foram realizados no escuro. Após 20 minutos nestas soluções, os géis foram submetidos a revelação com NBT e riboflavina, como citado anteriormente no item 3.9.2.1. Ao final da revelação, foi analisada a presença ou ausência de bandas no controle, e nos tratamentos com KCN e H₂O₂. As isoformas foram então classificadas como Mn-SOD, Fe-SOD ou Cu/Zn-SOD. Mn-SOD é resistente a ambos inibidores (KCN e H₂O₂), Fe-SOD é resistente ao KCN e inibida por H₂O₂ e Cu/Zn-SOD é inibida por ambas as substâncias (AZEVEDO et al., 1998).

Atividade de CAT: a eletroforese em PAGE (12%) foi realizada nas mesmas condições descritas acima para SOD. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de CAT de fígado de boi – Sigma (2 unidades) e 20 µg de proteína total de cartucho foliar de cana-de-

açúcar. A revelação foi realizada após a lavagem do gel por 45 minutos em água deionizada (3 x 15 minutos) e incubação do mesmo por 10 minutos em 0,003 % de H_2O_2 , à temperatura ambiente, com agitação suave e constante. Após este período, o gel foi rapidamente lavado em água deionizada e colocado por 10 minutos em uma solução de FeCl_3 1% (p/v) e $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1% (p/v) sempre com agitação suave. Em seguida, a solução foi retirada e o gel lavado com água. A fixação foi realizada com uma solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

Atividade de GR: a eletroforese em PAGE (12%) foi realizada nas mesmas condições descritas acima para SOD. Para cada gel foram aplicadas amostras de padrão de GR de fígado de boi – Sigma (1 unidade) e 20 μg de proteína total de cartucho foliar de cana-de-açúcar. Após a separação das proteínas por eletroforese, a atividade de GR foi determinada como descrito por Lee e Lee (2000). Após a corrida, os géis foram lavados em água deionizada (2 x 15 minutos) e incubados a temperatura ambiente por 30 minutos em uma solução de 0,25M de TRIS em pH 7,5, 10mg MTT; 10mg DPIP; 3,4mM GSSG (glutathione oxidada) e 0,5mM NADPH para 50 mL de água. O gel foi lavado rapidamente em água deionizada e a reação foi fixada em solução de ácido acético (7%) por 15 minutos. Os géis foram documentados no Image Scanner (Amersham Biosciences).

4.2.1.4.2 Enzimas antioxidantes avaliadas em espectrofotômetro

Atividade de SOD: o protocolo foi padronizado de acordo com Giannopolitis e Ries (1977), no qual a atividade é medida pela habilidade da enzima em inibir a redução fotoquímica do composto cloreto de nitroblue tetrazólio (NBT). A solução de reação (3 mL) foi constituída de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,8), 75 μM NBT, 3 μM riboflavina, 13 mM metionina, 0,1 mM EDTA e 150 μL de extrato enzimático. A solução foi adicionada em tubos de vidro, e irradiada com luz branca (lâmpada fluorescente de 15 W) por 5 min. Após esse período de exposição, a solução foi analisada por espectrofotômetro a 560 nm. Os valores de atividade foram expressos em U SOD mg prot.⁻¹.

Atividade de CAT: foi determinada de acordo com o descrito por Kraus et al. (1995) com algumas modificações conforme Azevedo et al. (1998). Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a atividade foi determinada a 25°C em solução contendo 1 mL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 25 μL de peróxido de hidrogênio (solução de 0,25%)

preparada imediatamente antes do uso. A reação foi iniciada pela adição de 25 μL de extrato protéico e a atividade determinada seguindo-se a decomposição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 1 minuto, através das alterações na absorbância a 240nm. Os resultados foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}$ de proteína⁻¹.

Atividade de GR: foi determinada de acordo com o descrito por Gomes-Junior et al. (2006), com algumas modificações. Em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, a atividade foi determinada a 30°C em uma mistura de reação consistindo de 1 mL tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) contendo 1 mM de DTNB (2-ácido nitrobenzóico), 1 mM de GSSG (glutathiona oxidada) e 0,1 mM NADPH. A reação foi iniciada pela adição de 30 μL de extrato protéico. A atividade foi estimada pela redução de glutathiona oxidada acompanhada por monitoramento na alteração da absorbância a 412 nm por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}$ de proteína⁻¹.

Atividade de GST: foi realizada em espectrofotômetro Perkin Elmer – Lambda 40, através do monitoramento da conjugação da glutathiona ao composto CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno). O ensaio foi baseado inicialmente no método proposto por Anderson e Gronwald (1991), com adaptações de Zablutowicz et al. (1995). O ensaio foi conduzido em uma solução contendo 900 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 25 μL de CDNB 40 mM e 50 μL de GSH 1 M, a qual foi incubada a 30°C. A reação foi iniciada com a adição de 25 μL do extrato de amostra, sendo monitorada por 3 min, a 340 nm. A solução negativa do ensaio, a qual contém todos os reagentes menos a amostra, também teve sua atividade analisada, sendo este valor descontado da atividade da GST encontrada nos tratamentos. Isso se deve ao controle da reação para a taxa de conjugação espontânea da glutathiona ao CDNB. Os valores de atividade da enzima foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}$ de proteína⁻¹.

Atividade de APX: foi realizada de acordo com o método de Nakano e Asada (1981) através do monitoramento da taxa de oxidação do ascorbato a 30°C no comprimento de onda de 290 nm. A reação foi composta de 50 mM de tampão fosfato (pH 7,0), 0,5 mM de ascorbato, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM de H_2O_2 e 40 μL de extrato protéico em 1 mL de reação total. A reação foi iniciada pela adição do ascorbato e o decréscimo na absorbância monitorado por 1 minuto. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}$ de proteína⁻¹.

Atividade de GSH-Px: foi determinada de acordo com o descrito por Flohé e Günzler (1984), com algumas modificações. A mistura da reação consistiu de 550 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM e 3 mM de EDTA (pH 7,0), 100 μL de glutathione redutase (0,24U de GR/ mL), 100 μL de glutathione reduzida (GSH) 10 mM, 25 μL de azida sódica 1 mM e 25 μL do extrato protéico. Essa mistura foi incubada a 37°C por 10 minutos. A reação foi iniciada pela adição de 100 μL de NADPH 1,5 mM e 100 μL de H_2O_2 1,5 mM e monitorada por 5 minutos através da oxidação do NADPH a 340 nm. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

Atividade de GPOX: foi determinada de acordo com o descrito por Matsuno e Uritani (1972). O ensaio foi conduzido em uma mistura de reação contendo 780 μL de tampão fosfato-citrato (solução de fosfato de sódio dibásico 0,2M e ácido cítrico 0,1M, pH 5,0), 50 μL de guaiacol 0,5% e 10 μL de extrato protéico. Essa mistura foi incubada a 30°C por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi colocada em banho de gelo e adicionou-se 50 μL de solução de metabissulfito de sódio a 2% e deixada em repouso por 10 minutos. As leituras foram realizadas a 450 nm. Os valores de atividade foram expressos em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

Atividade de PPO: foi determinada de acordo com o descrito por Kar e Mishra (1976) com modificações. A reação consistiu numa mistura de 517 μL de H_2O , 250 μL de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8), 200 μL de pirogalol 100 mM e 33 μL de extrato protéico, totalizando em um volume final de 1 mL. A formação da purpurogalina (quinona) foi mensurada a um comprimento de onda de 420 nm, entre 2 e 5 minutos após a adição da enzima. Os valores de atividade foram expressos em moles de purpurogalina $\text{min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

4.2.2 Resultados e Discussão

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura sobre o papel do sistema antioxidante em resposta à patógenos reportam estudos de patossistemas com infecções foliares locais que acabam por desencadear o rápido desenvolvimento de HR em interações incompatíveis. Entretanto, pouco se sabe sobre a resposta do sistema antioxidante em interações caracterizadas por infecções sistêmicas, como é o caso de can-de-açúcar e Lxx.

4.2.2.1 As variedades de cana-de-açúcar apresentaram diferentes níveis de estresse oxidativo ao longo dos tempos avaliados

O estresse oxidativo é caracterizado pelo aumento na produção de ERO's, as quais podem levar à um desequilíbrio do sistema redox e consequente danos aos componentes celulares (GRATÃO et al., 2005). Dessa forma, no presente trabalho foram avaliados a produção de H_2O_2 e a peroxidação de lipídeos de membrana, que por sua vez foi avaliada através da quantificação de malondialdeído (MDA). O H_2O_2 é uma molécula sinalizadora e além de estar envolvida na oxidação de membranas, também atua na ativação do sistema de defesa das plantas (QUAN et al., 2008). Em interações planta-patógeno, o H_2O_2 pode atuar de duas diferentes maneiras: o seu acúmulo pode inibir o crescimento de patógenos biotróficos, enquanto pode auxiliar no processo de infecção/colonização de patógenos necrotróficos (DIAS et al., 2011).

De acordo com a figura 4.1, observou-se que os níveis de H_2O_2 aumentaram em função do tempo (30 para 60 DAI) para ambas as variedades e para ambos os tratamentos avaliados (MI e LxxI). Apesar da observação de incremento na produção de H_2O_2 após 60 DAI poder estar relacionado com o estado fisiológico da planta, esse acúmulo também pode estar envolvido na sinalização de defesa da planta, uma vez que foi detectado a presença de Lxx em todos os tratamentos avaliados (Capítulo 2). Outra observação foi que para a variedade SP80-3280 no tratamento MI aos 60 DAI, observou-se a menor tendência de acúmulo de H_2O_2 , o que pode estar relacionado aos níveis endofíticos de crescimento de Lxx detectados no capítulo 2.

Figura 4.1 – Quantificação de peróxido de hidrogênio para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). O desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas

A alta produção de ERO's afeta diretamente os ácidos graxos polinsaturados de membranas desencadeando o processo de peroxidação lipídica. Esses ácidos graxos são degradados em uma grande variedade de produtos como aldeídos, porém, um dos mais intensivamente estudados é a produção de MDA (CABISCOL et al., 2000). Segundo Georgieva (2005), a peroxidação de lipídeos é um dos melhores preditores do nível de EAOs induzidas em situações de estresse.

A análise de peroxidação de lipídeos (Figura 4.2) revelou uma relação direta entre produção de H_2O_2 e seu dano à membrana (MDA) para a variedade RB835486. Em contraste, a variedade SP80-3280 não apresentou alterações nos níveis de MDA para nenhum dos tratamentos avaliados (Figura 4.2). Essa observação sugere respostas diferenciais no combate ao estresse oxidativo bem como no controle das ERO's vinculadas à sinalização celular envolvidas na interação planta patógeno para as duas variedades. Embora a alta produção de MDA seja considerado um processo indicativo de estresse oxidativo (MENDOZA, 2011), alguns trabalhos demonstram o papel dessa e de outras moléculas derivadas da quebra de membrana atuando como moléculas sinalizadoras.

Figura 4.2 – Quantificação de malondialdeído (MDA) para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). O desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas

O aumento de MDA observado para a variedade RB835486 pode estar relacionado à resposta da planta ao crescimento do patógeno, uma vez que essa variedade apresentou menor título de Lxx aos 60 DAI quando comparado com a variedade SP80-3280. Alguns produtos derivados da peroxidação lipídica (incluindo MDA), podem atuar significativamente na modulação da resposta a patógenos, ativando vias de defesa de da plantas (SATTler et al., 2006; WEBER et al., 2004).

4.2.2.2 A resposta ao estresse oxidativo apresentou a ativação de vias enzimáticas diferenciais para as duas variedades estudadas

A regulação da resposta ao estresse oxidativo consiste na primeira linha de defesa e sinalização de plantas em situações de estresse abiótico e biótico. Alterações no estado redox celular podem levar à uma rápida mudança fisiológica, o que por sua vez, desencadeiam na ativação/inibição de várias enzimas envolvidas na manutenção deste estado. Por um longo tempo, as ERO's foram consideradas somente como moléculas danosas, entretanto, sabe-se que estas moléculas desempenham papel fundamental na ativação do sistema de defesa contra patógenos.

A resposta fisiológica ao estresse oxidativo pode ser dividida em duas frentes. A primeira corresponde a enzimas de combate direto às ERO's, as quais incluem principalmente SOD (superóxido dismutase) e peroxidases (CAT - catalase, APX – ascorbato peroxidase, GPOX – guaiacol peroxidase, GSH-Px – glutathione peroxidase). Por outro lado, tão importante quanto estas enzimas, o metabolismo apresenta um sistema de manutenção do estado redox celular, o qual é constituído tanto por enzimas (GR – glutathione reductase, GST – glutathione-S-transferase), como também por compostos não enzimáticos (GSH).

Resposta das enzimas antioxidantes e combate direto à produção das ERO's

Combate ao ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$): SOD

A SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\cdot-}$ em H_2O_2 , sendo considerada uma enzima chave na defesa contra estresse devido a sua função ímpar na atuação contra $O_2^{\cdot-}$. São metaloenzimas (Mn-SOD, Fe-SOD, Cu/Zn-SOD), distribuídas na célula conforme sua especificidade de atuação e localização.

A figura 4.3A ilustra a atividade total de SOD em cana-de-açúcar após a inoculação com os tratamentos MI e LxxI, na qual pode observar-se que, ambas as variedades apresentaram aumento da atividade da enzima em função do tempo somente no tratamento MI. Ao contrário, para plantas inoculadas artificialmente, não observou-se alteração da atividade de SOD entre os tempos analisados. Em outra perspectiva, aos 30 DAI, a atividade da enzima aumentou em resposta a inoculação artificial para ambas as variedades. Por outro lado, quando observada a atividade aos 60 DAI, a resposta das variedades foi similar e apresentou decréscimo da atividade total de SOD. García-Limones et al. (2002) estudou a resposta do sistema antioxidante na interação grão de bico (*Cicer arietinum* L.) e *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* e observou aumento da atividade de SOD somente em interações compatíveis, quando comparada com reações de incompatibilidade.

Uma observação interessante foi o aumento da atividade de SOD aos 30 DAI em plantas inoculadas artificialmente, o que pode estar relacionada à uma resposta inicial do sistema de defesa da planta (explosão oxidativa) na tentativa de controlar o crescimento bacteriano *a posteriori*.

Figura 4.3 – Atividade de SOD em espectrofotômetro (A) e em PAGE não desnaturante (B) para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). Para (A), o desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas. Os tratamentos apresentados em (B) estão alinhados aos tratamentos apresentados em (A). Padrão de SOD bovino (P). As setas indicam as respectivas isoformas identificadas em PAGE

A atividade de SOD em PAGE (Figura 4.3B) não revelou diferenças significativas no perfil de isoformas ativas de SOD para os tratamentos avaliados. Foram observadas 8 isoformas de SOD ativas, das quais 7 foram comuns às duas variedades, e uma exclusiva ao genótipo SP80-3280 (isoforma VII). A caracterização das isoformas de SOD identificou 2 isoformas de Mn-SOD (I e II) localizadas em mitocôndrias e peroxissomos, 1 isoforma Fe-SOD (III), característica de cloroplastos, e 5 isoformas de Cu/Zn-SOD (IV a VIII), as quais podem ser encontradas no citosol, cloroplastos e peroxissomos (Figura 4.4).

Figura 4.4 – Caracterização das isoformas de SOD em PAGE, conforme protocolo de Beuchamp e Fridovich (1971) para as variedades RB835486 (A) e SP80-3280 (B) de cana-de-açúcar. Padrão de SOD bovino (P)

A isoforma VII caracterizada como uma CuZnSOD, apesar de apresentar baixa atividade em relação às demais, é exclusiva da variedade SP80-3280. A atividade dessa isoforma foi inibida apenas aos 60 DAI em plantas inoculadas com Lxx. As CuZnSODs já foram descritas como fatores de virulência, tanto em interações necrotróficas (ROLKE et al., 2004) quanto biotóficas (JACOB et al., 2001), através da inibição da explosão oxidativa (VELUCHAMY et al., 2012), processo importante na ativação de genes de defesa.

Combate ao H_2O_2 : APX, CAT, GPOX e GSH-Px

As peroxidases (PR-9) catalisam a oxiredução entre H_2O_2 e vários agentes redutores. De acordo com suas propriedades estruturais e catalíticas, as peroxidases são classificadas em três subfamílias: peroxidases animais, catalase e peroxidases vegetais. As peroxidases vegetais estão subdivididas em três classes: a classe I é constituída por enzimas intracelulares como a citocromo *c* peroxidase e a APX. A classe II é composta por enzimas extracelulares de fungos, como a lignina peroxidase. A classe III é constituída por peroxidases que são secretadas no apoplasto ou acumuladas no vacúolo e são responsáveis pela maioria das reações de oxiredução estimuladas pelas variações ambientais, fermentos ou reações de interação planta-patógeno (HIRAGA et al., 2001).

Entre as enzimas responsáveis pela quebra do radical H_2O_2 , observou-se resposta diferencial entre as variedades de cana-de-açúcar. A atividade da enzima APX diminuiu significativamente na variedade SP80-3280 aos 60 DAI em plantas inoculadas com Lxx quando comparadas com plantas inoculadas com o meio. Sarowar et al. (2005) estudaram plantas transgênicas de tabaco que superexpressam um gene (CAPOA1) que codifica para uma APX e detectaram aumento de tolerância à infecção por *Phytophthora nicotianae* e

Ralstonia solanacearum. Os autores sugerem que o aumento da atividade de APX levou ao aumento da tolerância ao patógeno. Em nosso estudo, curiosamente, a atividade da APX diminui somente em plantas nas quais observou-se o maior número de células de Lxx em relação aos demais tratamentos (Capítulo 2).

Já a enzima CAT mostrou queda na atividade total ao longo dos tempos avaliados, para as duas variedades, o que pode ser característica do desenvolvimento da planta (Figura 4.4B). Entretanto, a variedade RB835486 não apresentou somente este padrão de resposta, uma vez que quando inoculada com Lxx, apresentou baixa atividade de CAT, desde os 30 DAI. Essa resposta pode também ser avaliada em PAGE, a qual revelou 2 isoformas de CAT para ambas as variedades, sendo que apenas a isoforma II apresentou atividade constitutiva, e não sofreu alteração ao longo do tempo (Figura 4.4C). Além disso, a queda na atividade total de CAT pode ser explicada pela inibição da isoforma I observada aos 60 DAI. Quando comparou-se a atividade de CAT para a variedade RB835486 inoculada com o meio e com Lxx, observou-se menor atividade da enzima dentro de cada tempo avaliado, o que sugere a inibição da mesma em resposta à bactéria.

De acordo com Torres (2010), a supressão da maquinaria antioxidante pode levar a um acúmulo na quantidade de ERO's, que por sua vez, podem ser realocadas em compartimentos celulares específicos e utilizadas para modificações redox de alguns proteínas e para a sinalização e ativação do sistema de defesa da planta. Para variedade RB835486, observou-se número semelhante de células de Lxx aos 60 DAI, tanto para o tratamento inoculado com o meio quanto para o tratamento inoculado com Lxx, que por sua vez foram menores do que os observados para a variedade SP80-3280 inoculada com Lxx (Capítulo 2). Portanto, a modulação negativa do sistema antioxidante da RB83-5486 pode estar contribuindo para o menor crescimento de Lxx nos tecidos da planta dessa variedade. Outra observação é inibição de CAT generalizada aos 60 DAI, e isso pode estar relacionado ao desenvolvimento de Lxx nos tecidos da planta, uma vez que a quebra de H_2O_2 por CATs podem ser um importante mecanismo na atenuação da elicitação do sistema de defesa da planta, hipótese também sugerida por Lambais et al. (2003) em estudo da interação feijão e fungos micorrízicos.

Figura 4.4 – Atividade de APX (A) e CAT (B) em espectrofotômetro e atividade de CAT em PAGE não desnaturante (C) para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). Para (A) e (B), o desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas. Os tratamentos apresentados em (C) estão alinhados aos tratamentos apresentados em (B). Padrão de CAT bovino (P). As setas indicam as respectivas isoformas identificadas em PAGE

A atividade de GPOX não apresentou resposta diferencial entre as variedades de cana-de-açúcar (Figura 4.5A). Entretanto, quando observado o fator tempo, a atividade de GPOX foi menor aos 60 DAI, o que pode estar relacionado à resposta fisiológica da planta,

indiferente do tipo de inóculo utilizado. Por outro lado, a enzima GSH-Px apresentou resposta diferencial somente para a variedade SP80-3280, na qual observou-se aumento de atividade aos 30 DAI em plantas inoculadas com Lxx quando comparadas com plantas inoculadas com o meio (Figura 4.5B).

Apesar de todas as peroxidases atuarem sobre o mesmo substrato, foi possível observar resposta diferencial entre as variedades para a inoculação artificial. Porém, o metabolismo antioxidante também é formado por enzimas que atuam na manutenção do estado redox celular, o qual é imprescindível para a eficiente atuação da maquinaria enzimática no combate às ERO's.

Em estudos realizados com peroxidases, plantas de fumo transgênicas que expressam o gene Shpx2, que codifica uma peroxidase, eram mais resistentes a infecções por *Pseudomonas parasitica* var. *nicotianae* e *Cercospora nicotianae* (WAY et al., 2001). Graham e Graham (1991) estudaram a interação incompatível *P. megasperma* f. sp. *glycinea* (raça 1) soja (cultivar Williams), e verificaram que glucanas extraídas da parede celular do patógeno estimularam a atividade de peroxidase em folhas cotiledonares do hospedeiro quatro horas após a inoculação. Além disso, em cultivares resistentes de *Xanthosoma sagittifolium* a atividade de peroxidase aumentou 41% 2 dias após a inoculação de *Pythium myriotylum*. Porém, em cultivares suscetíveis, a atividade dessa enzima aumentou apenas 13% (BOUDJEKO et al., 2005). Em outro trabalho, Egea et al. (2001) verificaram a existência de correlação positiva entre a resistência de três cultivares de pimentão a *P. capsici* e a excreção de peroxidases a partir de suspensão de células inoculadas com o patógeno. Dessa forma, uma grande diferença que pode existir entre cultivares resistentes e suscetíveis, está relacionada, principalmente à intensidade e tempo da resposta do sistema de defesa da planta.

Figura 4.5 – Atividade de GPOX (A) e GSH-Px (B) em espectrofotômetro para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). O desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas

4.2.2.3 Manutenção do estado redox e sinalização celular ao estresse oxidativo: GR, GST e GSH

A eficiente resposta metabólica na interação planta-patógeno pode interferir no controle do crescimento bacteriano, fator importante para o desenvolvimento do RSD na planta. O estado redox celular condiz com um ambiente reduzido para que as reações enzimáticas possam ocorrer, e também para que a sinalização celular possa atuar, induzindo uma resposta adaptativa quando necessária. Os sensores redox tióis estão envolvidos na

manutenção do estado redox celular, bem como podem estar relacionados a sinalização ao estresse oxidativo.

Alguns trabalhos reportam o acúmulo de GSH em plantas infectadas por patógenos, entretanto, o seu decréscimo evidencia a capacidade diminuída de plantas em resistir aos danos causados pelo estresse oxidativo. A molécula de GSH desempenha diferentes funções no metabolismo celular, as quais incluem: função antioxidante, detoxificação – atuando em conjunto com a GST e sinalização celular, na biossíntese de feilpropanóides (lignificação e fitoalexinas) (GULLNER; KÖMIVES, 2002).

A enzima GR (glutathione reductase) é importante no combate às ERO's (especificamente $O_2^{\bullet -}$ e H_2O_2) via o ciclo Halliwell-Asada. Membro da família de flavoproteínas oxiredutases, sua estrutura é constituída por um grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) transferidor de elétrons que catalisa a redução dependente de NADPH da glutathione oxidada (GSSG) para glutathione reduzida (GSH) (SCRUTON et al., 1987; MASIP et al., 2006). A GST (glutathione-S-transferase) é outra enzima que apresenta atividade com glutathione. Sua função é conjugar a GSH a xenobióticos e eletrofílicos endógenos, por isso tem fundamental participação na desintoxicação, muitas vezes sendo o papel central nestas vias metabólicas (MASIP et al., 2006).

A enzima GR não apresentou diferença na atividade entre os tratamentos, seja entre as variedades, ao longo do tempo ou em resposta à inoculação (Figura 4.6A). A análise em PAGE mostrou grande diversidade de isoformas, sendo identificadas 6 isoformas presentes em ambas as variedades de cana, e uma isoforma exclusiva para a variedade RB835486 (isoforma VII) (Figura 4.6B).

Entretanto, a enzima GST, a qual catalisa a conjugação da glutathione a uma gama de substratos hidrofóbicos eletrofílicos, apresentou diferenças na atividade entre as variedades de cana-de-açúcar. A figura 4.7 mostra que, enquanto a variedade RB835486 não apresentou diferença na atividade de GST para os tratamentos analisados, a variedade SP80-3280 teve a atividade de GST induzida após 60 DAI, o que pode estar relacionado à sinalização celular. Estes dados sugerem que o aumento desta atividade enzimática pode estar relacionado a resposta fisiológica do crescimento da planta, uma vez que foi observada independente do inóculo utilizado.

Figura 4.6 – Atividade de GR em espectrofotômetro (A) em PAGE não desnaturante (B) para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). Para (A), o desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas. Os tratamentos apresentados em (B) estão alinhados aos tratamentos apresentados em (A). Padrão de GR bovino (P). As setas indicam as respectivas isoformas identificadas em PAGE

Por outro lado, a relação GSH:GSSG, catalisada pela enzima GR, é bastante importante em estudos de estresse oxidativo, pois reflete o estado redox celular e, consequentemente a capacidade do metabolismo em manter funções celulares, como atividade de enzimas e sinalização celular. A figura 4.8 ilustra esta relação, e dessa forma fica claro observar que esta razão é menor aos 30 DAI. Porém, se observado especificamente a variedade SP80-3280, a razão GSH:GSSG é mantida entre os tratamentos analisados, com ressalva das plantas inoculadas com Lxx, que aos 60 DAI apresentou ligeira queda na relação GSH:GSSG.

No entanto, a resposta mais expressiva observada na figura 4.8 foi o aumento considerável da razão GSH:GSSG na variedade RB835486 inoculada com Lxx aos 60 DAI. Esta alta razão reflete o equilíbrio do estado redox, pois em um ambiente reduzido, a

concentração de GSH será sempre maior à GSSG, refletindo um ambiente eficiente para a realização das funções celulares (GULLNER; KÖMIVES, 2002).

Figura 4.7 – Atividade de GST em espectrofotômetro para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). O desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas

Figura 4.8 – Quantificação de GSSG, GSH e razão GSH/GSSG para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI)

Ainda, em estudo realizado com mutantes de *Arabidopsis* para o gene regulador de *APX2*, que expressa constitutivamente *APX2* mas apresenta cerca de 50% menor a quantidade de GSH, demonstrou a correlação positiva entre as quantidades de glutatona na célula e a expressão de genes relacionados à defesa, incluindo SOD, APX e MDAR (monodehidroascorbato redutase) (BALL et al., 2004). Esse tipo de informação demonstra a integração da resposta entre os componentes do sistema antioxidante com demais genes relacionados à defesa de plantas contra patógenos.

A figura 4.9 ilustra a atividade da enzima PPO (polifenoloxidase). Observou-se diminuição da atividade da enzima para os tratamentos inoculados com Lxx apenas aos 60 DAI, para ambas as variedades, entretanto, quando analisou-se a atividade total, notou-se que, para a variedade SP80-3280, a atividade total foi menor comparada à RB835486.

Figura 4.9 – Atividade de PPO em espectrofotômetro para as variedades RB835486 e SP80-3280 de cana-de-açúcar nos tempos 30 e 60 dias após a inoculação (DAI) para os tratamentos inoculado com o meio (MI) e com *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* (LxxI). O desvio padrão é referente à média de 3 amostras biológicas e 2 técnicas

As PPOs catalizam a oxidação de compostos fenólicos para quinonas, que por sua vez, são moléculas diretamente tóxicas aos microrganismos. As PPOs são enzimas notavelmente induzidas em resposta a estresses bióticos e abióticos e, como resultado da sua reação podem produzir compostos secundários responsáveis pela coloração marrom decorrentes do processo de oxidação (THIPYAPONG et al., 2007).

Em um estudo realizado com plantas transgênicas de tomate que apresenta supressão da atividade de PPO, observou-se, tanto em interações compatíveis quanto incompatíveis, essa diminuição de PPO levou a maior susceptibilidade à infecção por *Pseudomonas syringae* (THIPYAPONG et al., 2004). Dessa forma, a diminuição da atividade de PPO observada aos 60 DAI corrobora com dados observados de maior crescimento de Lxx *in planta* (Capítulo 2).

De uma maneira geral, a figura 4.10 ilustra vários processos e mecanismos apresentados e discutidos nesse trabalho de uma maneira integrada, que auxilia a melhor compreensão dos componentes do sistema antioxidante envolvidos nesse mecanismo de defesa da planta à patógenos, adaptado de Pastori e Foyer (2002). A figura demonstra a complexidade da resposta de defesa que pode ser mediada por sinais ERO's e que o balanço entre todos os componentes podem desencadear em diferentes respostas à planta.

Figura 4.10 – Mecanismos de produção de ERO's por plantas em resposta à interação compatógenos e seu papel como moléculas sinalizadoras. Enzimas e compostos marcados com quadrados vermelhos foram avaliados nesse trabalho. APX (ascorbato peroxidase); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); GPX (guaiacol peroxidase); GSH-Px (glutathione peroxidase); GST (glutathione-S-transferase); GR (glutathione reductase); GSSG (glutathione oxidada); GSH (glutathione reduzida); H₂O₂ (peróxido de hidrogênio)

Embora plantas de cana-de-açúcar possam apresentar alto título de Lxx (alta colonização), a ativação do sistema de defesa da planta mediado por ERO's pode ser limitado, transiente, e possivelmente restrita à células específicas. A falta da observação de uma reação de hipersensibilidade em resposta à colonização por Lxx, sugere que mecanismos específicos podem atenuar ou até mesmo suprimir o sistema de defesa da planta, e isso possui um importante papel no controle do crescimento de Lxx *in planta*. Por isso, quando o objetivo do trabalho foi estudar a resposta do sistema de antioxidante nesse patossistema, não se pode, por todo momento, referenciar trabalhos de clássicos de interação planta-patógeno e suas relações com as ERO's.

4.3 Conclusões

As duas variedades de cana-de-açúcar apresentaram comportamentos diferenciais do sistema antioxidante em resposta aos mesmos tratamentos, o que pode estar relacionado ao crescimento diferencial do patógeno ao longo dos tempos avaliados.

A variedade RB835486 apresentou diversidade encontrada na resposta ao estresse pode ser relacionada a estudos de investigação das funções e associações do sistema antioxidativo, e apresentar muito provavelmente um potencial para a futura aplicação biotecnológica destes organismos na desintoxicação ambiental.

Muitas bactérias patogênicas usam efetores que bloqueiam o reconhecimento do patógeno ou a via de transdução de sinal que leva a primeira linha de defesa de plantas, e muitas delas também bloqueiam a explosão oxidativa, como demonstrada no presente estudo.

Referências

- AZEVEDO, R.A.; ALAS, R.M.; SMITH, R.J.; LEA, P.J. Response of antioxidant to transfer from elevated carbon dioxide air and ozone fumigation, in the leaves and roots of wild-type and a catalase-deficient mutant of barley. **Physiologia Plantarum**, Copenhagen, v. 104, p. 280-292, 1998.
- BALL, L.; ACCOTTO, G-P.; BECHTOLD, U.; CREISSEN, G.; DIETMAR, F.; JIMENEZ, A.; KULAR, B.; LEYLAND, N.; MEJIA-CARRANZA, J.; REYNOLDS, H.; STANISLAW, K.; MULLINEAUX, P.M. Evidence for a Direct Link between Glutathione Biosynthesis and Stress Defense Gene Expression in Arabidopsis. **The Plant Cell**, Rockville, v. 16, p. 2448-2462, 2004.
- BEUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase – Improved assays and assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 44, p.276, 1971.

BOUDJEKO, T.; OMOKOLO, N.A.; DRIOUICH, A.; BALANGÉ, A.P. Peroxidase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v.153, n.7/8, p. 409-416, 2005.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, Lleida, v. 3, p. 3-8, 2000.

CHO, D.; SHIN, D.; JEON, B.W.; KWAK, J.M. ROS-Mediated ABA Signaling. **Journal of Plant Biology**, New York, v.52, p.102-113, 2009.

DIAS, C.V.; MENDES, J.S.; SANTOS, A.C.; PIROVANI, C.P.; GESTEIRA, A.S.; MICHELI, F.; GRAMACHO, K.P.; HAMMERTONE, J.; MAZZAFERA, P.; CASCARDO, J.C.M. Hydrogen peroxide formation in cacao tissues infected by the hemibiotrophic fungus *Moliniophthora perniciosa*. **Plant Physiology and Biochemistry**, New Delhi, v. 49, p. 917-922, 2011.

EGEA, C.; AHMED, S.A.; CANDELA, M.E. Elicitation of peroxidase activity and lignin biosynthesis in pepper suspension cell by *Phytophthora capsici*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v.158, p. 151-158, 2001.

GARCÍA-LIMONES, C.; HERVÁS, A.; NAVAS-CORTÉS, J.A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M.; TENA, M. Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 61, p. 325-337, 2002.

GECHEV, T.S.; VAN BREUSEGEM, F.; STONE, J.M.; DENEV, I.; LALOI, C. Reactive oxygen species as signals that modulate plant stress responses and programmed cell death. **Bioessays**, Cambridge, v. 28, p. 1091-1101, 2006.

GEORGIEVA, N.V. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, Stara Zagora, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2005.

GOMES Jr, R.A.; GRATÃO, P.L.; GAZIOLA, S.A.; MAZZAFERA, P.; LEA, P.J.; AZEVEDO, R.A. Selenium-induced oxidative stress in coffee cell suspension cultures. **Functional Plant Biology**, Victoria, v. 39, p. 449-456, 2007.

GRAHAM, M.Y.; GRAHAM, T.L. Rapid accumulation of anionic peroxidase and phenolic polymers in soybean cotyledon tissues following treatment with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* wall glucan. **Plant Physiology**, Rockville, v.97, p.1145-1155, 1991.

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**, Collingwood, v. 32, p. 481-494, 2005.

GULLNER, G.; KÖMIVES, T. The Role of Glutathione and Glutathione-related Enzymes in Plant-pathogen Interactions. In: GRILL, D.; TAUSZ, M.; KOK, L. J. (Ed.). **Significance of Glutathione to Plant Adaptation to the Environment**, Springer: Netherlands, 2002. p. 207-239.

HANCOCK J.T.; DESIKAN, R.; CLARKE, A.; HURST, R.D.; NEILL, S.J. Cell signaling following plant /pathogen interactions involves the generation of reactive oxygen and reactive nitrogen species. **Plant Physiology Biochemistry**, New Delhi, v. 40, p. 611-617, 2002.

HIRAGA, S.; SASAKI, K.; ITO, H.; OHASHI, Y.; MATSUI, H. A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, Oxford, v. 42, n. 2, p. 462-468, 2001.

HOEBERICHTS, F.A.; WOLTERING, E.J. Multiple mediators of plant programmed cell death: Interplay of conserved cell death mechanisms and plant-specific regulators. **Bioessays**, Cambridge, v. 25, p. 47-57, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAMB, C.; DIXON, R. A. The oxidative burst in plant disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 48, p. 251-275, 1997.

LAMBAIS, M.R.; RÍOS-RUIZ, W.F.; ANDRADE, R.M. Antioxidant responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) roots colonized by arbuscular mycorrhizal fungi. **New Phytologist**, Cambridge, v. 160, p. 421-428, 2003.

MAHALINGAM, R.; FEDOROFF, N. Stress response, cell death and signalling: the many faces of reactive oxygen species. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 119, p. 56-68, 2003.

OVERMEYER, K.; BROSCHE, M.; KANGASJÄRVI, J. Reactive oxygen species and hormonal control of cell death. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 8, n. 7, p. 335-342, 2003.

PASTORI, G.M. FOYER, C.H. Common Components, Networks, and Pathways of Cross-Tolerance to Stress. The Central Role of "Redox" and Absciscic Acid-Mediated Controls. **Plant Physiology**, Rockville, v.129, p.460-468, 2002.

QUAN, L.J; ZHANG, B.; SHI, W.W.; LI, H.Y. Hydrogen Peroxide in Plants: A Versatile Molecule of Reactive Oxygen Species Network. **Journal of Integrative Plant Biology**, v.50, n.1, p. 2-18, 2008.

REZENDE, M.L.V.; SALGADO, S.M.L.; CHAVES, Z.M. Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas à Patógenos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.28, n.3, p.123-130, 2003.

SHETTY, N.P.; JORGENSEN, H.J.L.; JENSEN, J.D.; COLLINGE, D.B.; SHETTY, H.S. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.121, p.267-280, 2008.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M.D.; STEFFENS, J.C. Antisense Downregulation of Polyphenol Oxidase Results in Enhanced Disease Susceptibility. **Planta**, Berlin, v. 220, p. 105-117, 2004.

THIPYAPONG, P.; STOUT, M.J.; ATTAJARUSIT, J. Functional Analysis of Polyphenol Oxidases by Antisense/Sense Technology. **Molecules**, Basel, v. 12, p. 1569-1595, 2007.

TORRES, M.A.; DANGL, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v.8, p.397-403, 2005.

WAY, H.M.; KAZAN, K.; GOULTER, K.C.; BIRCH, R.G.; MANNERS, J.M. Expression of the shpx2 peroxidase gene of *Stylosanthes humilis* in transgenic tobacco leads to enhanced resistance to *Phytophthora parasitica* pv. *Nicotianae* and *Cercospora nicotianae*. **Molecular Plant Pathology**, Malden, v.1, n.4, p.223-232, 2001.

WEBER, H.; CHETELAT, Q.; REYMOND, P.; FARMER, E.E. Selective and powerful stress gene expression in *Arabidopsis* in response to malondialdehyde. **The Plant Journal**, Malden, v. 37, p. 877-888, 2004.